Expressions- und Evolutionsstudien an Vertretern der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und
den Naturwissenschaften, Fachbereich Biologie
der Unversität Hamburg

vorgelegt von
Samantha Malaika Scherbaum, geb. Didier
aus Hamburg

Hamburg, 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. T. BURMESTER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. C. LOHR
Tag der Disputation: 28. Mai 2014

Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Inhalt

Zusammenfassung 1
1. **Einleitung** 3
1.1. Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden 3
1.1.1. Hämocyanin 4
1.1.2. Phenoloxidase 7
1.1.3. „Kupferlose“ Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie 9
1.2. Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden 10
1.2.1. Onychophora 10
1.2.2. Chelicerata 11
1.2.3. Myriapoda 13
1.2.4. Crustacea 14
1.2.5. Hexapoda 17
1.3. Zielsetzung 21
2. Material und Methoden 22
2.1. Materialien 22
2.1.1. *Drosophila melanogaster* 22
2.1.2. *Palinurus elephas* 22
2.1.3. *Scolopendra dehaani* 23
2.1.4. Geräte 23
2.1.5. Chemikalien und Kits 24
2.1.6. Vektoren 25
2.1.7. Primer 25
2.2. Methoden 26
2.2.1. Anzucht von Mikroorganismen 26
2.2.2. Zellkultur 27
2.2.3. Molekularbiologische Methoden 28
2.2.4. Analyse der relativen Genexpression mittels Realtime qRT-PCR 34
2.2.5. Sequenz- und phylogenetische Analyse 35
2.2.6. Rekombinante Expression von Proteinen im prokaryotischen System 36
2.2.7. Expression der Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* im prokaryotischen System unter Anwesenheit von $CuCl_2$ 37
2.2.8. Expression der Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* in Insektenzellen 37
2.2.9. Herstellung der Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* im *in vitro* Expressionssystem 38
2.2.10. Aufreinigung von Proteinen 39
2.2.11. Rekonstitution des LSP2 40

2.2.12. Kupfereinbauversuche in das rekombinant hergestellte PelHc4 40
2.2.13. Biochemische Methoden.....41
2.2.14. Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven 46
2.2.15. Strukturanalysen 46
3. Ergebnisse 49
3.1. Etablierung von Expressions-, Aufreinigungs- und Rekonstitutionssystemen für Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie 49
3.1.1. Larvales Serumprotein 2 von *D. melanogaster* 49
3.1.2. Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* 54
3.1.3. Prophenoloxidase 3 von *D. melanogaster*.....63
3.2. Nachweis von Hämocyanin und Phenoloxidase in *S. dehaani*.....65
3.2.1. Sequenzanalyse 65
3.2.2. Phylogenetische Analyse 66
3.2.3. Proteinbiochemischer Nachweis des Hämocyanins in der Hämolymphe...70
3.2.4. Sauerstoffbindungskinetik des Hämocyanins.....70
3.2.5. Nachweis von Phenoloxidaseaktivität in der Hämolymphe von *S. dehaani*71
3.2.6. Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene in Ei und Mitteldarmdrüse ...72
3.2.7. Proteinbiochemischer Nachweis von Hämocyanin in Ei und Mitteldarmdrüse.....73
4. Diskussion 75
4.1. Rekombinante Expression von Hexamerin, Hämocyanin und einer Phenoloxidase 75
4.1.1. Ausgewählte Proteine aus der Hämocyanin-Superfamilie 76
4.1.2. Die Wahl des Expressionssystems 76
4.1.3. Die Wahl eines geeigneten Systems zum Kupfereinbau.....77
4.2. Eignung von Expressionssytemen zur Herstellung von Proteinen aus der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden.....77
4.2.1. Larvales Serumprotein 2 von *D. melanogaster* 78
4.2.2. Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* Phenoloxidase 3 von *D. melanogaster*.....80
4.3. Das aktive Zentrum des Hämocyanins 87
4.4. Eignung von Absorptionsspektren zur Überprüfung eines erfolgreichen Kupfereinbaus.....88
4.5. Kupferlose versus kupferhaltige Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie 89
4.6. Nachweis von Hämocyanin und Phenoloxidasen in *S. dehaani*.....90
4.6.1. Funktionelles Hämocyanin in *S. dehaani* 90
4.6.2. Funktionelle Phenoloxidasen in *S. dehaani*.....93
4.6.3. Analyse der Hämocyaninexpression in den Eiern und der Mitteldarmdrüse von *S. dehaani*.....95
Ausblick.....97

5. Literaturverzeichnis 98
6. Anhang 118
6.1. Abkürzungsverzeichnis 118
6.2. Primer 120
6.3. Bakterielle und *in vitro* Expressionskonstrukte und Bakterienstämme 122
6.4. Stabil transfizierte Zelllinien 122
6.5. Modifizierte PelHc4-, DmeLSP2- und DmePPO3-Sequenzen 122
6.5.1. DmeLSP2 122
6.5.2. PelHc4 123
6.5.3. DmePPO3 126
6.6. Expressions-, Aufreinigungs- und Rekonstitutions-systeme für Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie 127
6.7. Nachweis von Hämocyanin und Phenoloxidase in *S. dehaani* 128
6.7.1. Sequenzen 128
6.7.2. Phylogenie 136
6.7.3. Realtime qRT-PCR 152

Zusammenfassung

Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden besteht aus kupferhaltigen Hämocyaninen und Phenoloxidasen sowie den kupferlosen Hexamerinen, Cryptocyaninen (Pseudo-Hämocyaninen) und den Hexamerinrezeptoren. Die einzelnen Vertreter übernehmen unterschiedliche Funktionen (BEINTEMA et al., 1994; BURMESTER und SCHELLER, 1996; BURMESTER, 2001; BURMESTER, 2002), zu denen u. a. der Sauerstofftransport (Hämocyanine), die Immunabwehr (Phenoloxidasen) und die Speicherung von Aminosäuren (Hexamerine, Cryptocyanine) zählen. Während Hämocyanine in allen Unterstämmen zu finden sind, ist das Vorkommen der anderen Vertreter auf einzelne oder mehrere Unterstämme beschränkt.

Struktur- und vor allem Funktionsuntersuchungen an Vertretern der Hämocyanin-Superfamilie existieren kaum, da bisher nur ausgewählte Vertreter rekombinant hergestellt werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expressions-, Aufreinigungs- und Rekonstitutionsbedingungen für ein Hexamerin so optimiert, dass anhand von Strukturanalysen gezeigt werden konnte, dass es sich um das richtig gefaltete Protein handelt. Für ein Hämocyanin wurden verschiedene Expressions- sowie Kupferrekonstitutionssysteme gewählt. Unter keiner der gewählten Bedingungen konnte sicher Oxyhämocyanin nachgewiesen werden. Lediglich die Kupferrekonstitution nach BROUWER und BROUWER-HOEXUM (1992) lieferte Hinweise auf eine mögliche Oxyform des Hämocyanins. Eine Phenoloxidase wurde in einem *in vitro* Expressionssystem mit Kupfer hergestellt. Die Aktivität der Phenoloxidase konnte allerdings nicht sicher nachgewiesen werden. Während das Hexamerin also richtig gefaltet hergestellt werden konnte, gelang dies nicht sicher für die kupferhaltigen Vertreter der Hämocyanine und Phenoloxidasen, da Schwierigkeiten beim Kupfereinbau bestanden.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Myriapoden aufgrund ihres ausgeprägtem Tracheensystem über kein respiratorisches Protein verfügen. Inzwischen konnte in allen Unterklassen außer den Pauropoden Hämocyanin nachgewiesen werden. Über die Anwesenheit von Phenoloxidasen in den Myriapoden gab es lediglich Hinweise. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei vollständige Hämocyanin-Untereinheiten sowie drei Phenoloxidasen in dem Chilopoden *Scolopendra dehaani* identifiziert werden. Das Hämocyanin zeigte sowohl eine geringe Sauerstoffaffinität als auch eine geringe Kooperativität. Außerdem konnte die Mitteldarmdrüse als putativer Syntheseort des

Hämocyanins festgelegt werden. *S. dehaani* verfügt des Weiteren über eine starke Hämocyanin-Genexpression in den Eiern. Auch die Proteinexpression war im Ei stark.

1. Einleitung

1.1. Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden

Die Arthropoden sind einer der artenreichsten Tierstämme, der die Onychophora, Chelicerata, Myriapoda, Crustacea und Hexapoda beinhaltet. Arthropoden bewohnen die unterschiedlichsten ökologischen Nischen. Die Sauerstoffversorgung sowie ein aktives Immunsystem werden innerhalb der Arthropoden unter anderem durch die Hämocyanin-Superfamilie gewährleistet (JAENICKE, 2002). Alternativ erfolgt bei einigen Crustaceen- und Hexapodenspezies die Sauerstoffversorgung durch das respiratorische Protein Hämoglobin (z. B. FOX, 1957; BERGTROM et al., 1976; DANGOTT und TERWILLIGER, 1981). Die Hämocyanin-Superfamilie stellt eine Gruppe von Proteinen dar, zu denen sowohl kupferhaltige als auch kupferlose Vertreter zählen. Erstere sind die Hämocyanine und Phenoloxidasen, während zu den letzteren die Hexamerine, ihre Rezeptoren sowie die Cryptocyanine (Pseudo-Hämocyanine) zählen. Die Proteine der Hämocyanin-Superfamile übernehmen verschiedene Funktionen (BEINTEMA et al., 1994; BURMESTER und SCHELLER, 1996; BURMESTER, 2001; BURMESTER, 2002). Diese reichen von einer zentralen Rolle bei der Sauerstoffversorgung (Hämocyanin), über die Immunabwehr (Phenoloxidasen) bis hin zum Transport von z. B. Hormonen und der Speicherung von Aminosäuren (Hexamerin und Cryptocyanin/Pseudo-Hämocyanin; BURMESTER, 2002).

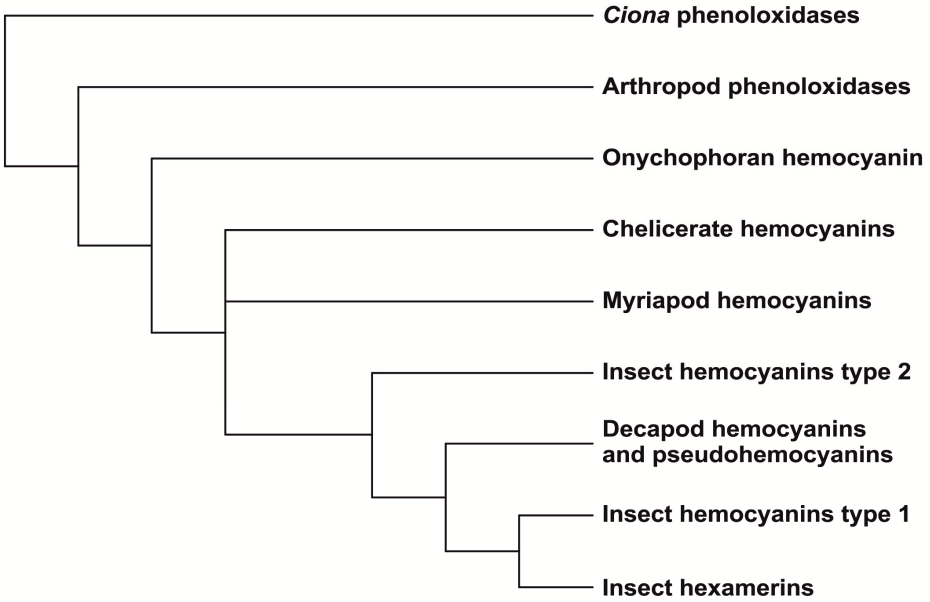


Abb. 1.1: Evolution der Proteine der Hämocyanin-Superfamilie (BURMESTER, 2004).

IMMESBERGER und BURMESTER (2004) konnten zeigen, dass auch außerhalb der Arthropoden Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie zu finden sind und konnten in dem Tunicaten *Ciona intestinalis* zwei putative Phenoloxidasegene nachweisen (Abb. 1.1). Des Weiteren konnten Ähnlichkeiten mit einer Hämocyanin-Domäne in Kupfer-bindenden Proteinen der Amoebozoa, des Pilzes *Aspergillus niger*, des Schwammes *Amphimedon queenslandica*, des Ctenophoren *Mnemiopsis leidyi* und des Hemichordaten *Saccoglossus kowalevskii* identifiziert werden (MARTIN-DURAN et al., 2013).

Hämocyanin kommt aber nicht nur bei den Arthropoden, sondern auch bei den Mollusken vor. Die Hämocyanine beider Tierstämme sind kupferhaltige Sauerstofftransportproteine, die sich in der Hämolymphe befinden (MARKL und DECKER, 1992; VANHOLDE und MILLER, 1995). Das Fehlen signifikanter Sequenzähnlichkeiten in den Hämocyaninen dieser beiden Tierstämme deutet auf eine konvergente Entwicklung des Hämocyanins hin (BURMESTER, 2001; VANHOLDE et al., 2001; BURMESTER, 2002).

1.1.1. Hämocyanin

Hämocyanin ist ein Protein, das innerhalb der Arthropoden sowohl bei den Insekten, Cheliceraten, Crustaceen als auch den Myriapoden zu finden ist (MARKL und DECKER, 1992; VANHOLDE und MILLER, 1995; BURMESTER, 2001). Es kommt gelöst in der Hämolymphe, typischerweise in hohen Konzentrationen vor. Dort ist es vor allem am Sauerstofftransport beteiligt. Arthropodenhämocyanine weisen bei der Sauerstoffbindung eine sehr hohe Kooperatvität mit Hill-Koeffizienten von bis zu 9 auf (LOEWE, 1978; DECKER und STERNER, 1990a; VANHOLDE und MILLER, 1995). Ihr Sauerstoffbindungsverhalten wird dabei durch physiologische Effektoren wie Protonen, Ionen und L-Lactat beeinflusst (DECKER und STERNER, 1990a).
Hämocyanin fungiert aber nicht ausschließlich als Sauerstofftransportprotein. Es ist auch am Transport von Metallionen und deren Metabolismus beteiligt (CHAN und WEEKS, 1992). Des Weiteren kann Hämocyanin in der Energiespeicherung (UGLOW, 1969) und in der Osmoregulation mitwirken (MANGUM, 1983). Zudem ist es in der Lage unter bestimmten Bedingungen eine Phenoloxidasefunktion einzunehmen (NAGAI et al., 2001). Diese konnte sowohl für ausgewählte Cheliceraten- als auch Crustaceenspezies gezeigt werden (DECKER und RIMKE, 1998; DECKER und TUCZEK, 2000). Die Anwesenheit von distinkten Hämocyanin- und Phenoloxidase-Proteinen in allen

Unterstämmen der Arthropoden spricht dafür, dass die Hämocyanine und Phenoloxidasen vor der Aufspaltung der Arthropoden-Unterstämme divergierten (BURMESTER, 2002). Die Entstehung der Hämocyanine aus den Phenoloxidasen könnte mit dem Anstieg der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration im frühen Kambrium und der damit verbundenen Größenzunahme der Tiere sowie der Entwicklung der Kutikula zusammenhängen (BURMESTER, 2002; KUSCHE et al., 2002). Die Diffusion des Sauerstoffs war nicht mehr effizient genug, um den Stoffwechsel anzutreiben. Damit verschaffte die Entwicklung von Sauerstofftransport-Proteinen einen Selektionsvorteil (BURMESTER, 2001).

Das Hämocyanin der Arthropoden, mit Ausnahme der Cheliceraten, verfügt über ein N-terminales Signalpeptid, das für den intrazellulären Transport des Hämocyanins in das raue endoplasmatische Retikulum sorgt (MANGUM et al., 1985; MARKL und DECKER, 1992; VANHOLDE und MILLER, 1995; VOIT et al., 2000). Dort wird das Protein gefaltet. Anschließend wird das Hämocyanin in die Hämolymphe sezerniert. Syntheseort des Hämocyanins ist bei den Crustaceen die Mitteldarmdrüse (MARKL und DECKER, 1992), bei den Hexapoden*) wahrscheinlich der Fettkörper. Bei den Cheliceraten, denen das N-terminale Signalpeptid fehlt, wird das Hämocyanin durch Lyse der Hämocyanin-bildenden Zellen in die Hämolymphe freigesetzt (KEMPTER, 1983; VOIT et al., 2000).

1.1.1.1. Struktur des Hämocyanins

Arthropodenhämocyanine bilden typischerweise Hexamere, die sich in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten stark unterscheiden können. Diese Hexamere können sich zu Oligohexameren von bis zu 8x6-meren zusammenlagern (Abb. 1.2C; MANGUM, 1985; MARKL, 1986; MARKL et al., 1992; VANHOLDE und MILLER, 1995). Eine Untereinheit bindet zwei Kupferionen, die durch je drei Histidine koordiniert werden. Die beiden Kupferionen binden ein Sauerstoffmolekül reversibel (Abb. 1.2A) und werden als CuA und CuB bezeichnet. Aufgrund der Symmetrie der Kupferbindungsstellen zählt das Hämocyanin zu den Proteinen mit einem Typ3-Kupferbindungzentrum.

*) Die Begriffe Insecta und Hexapoda werden hier synonym verwendet. Sie beinhalten sowohl die Entognatha (Collembola, Protura, Diplura) als auch die Ectognatha (Archaeognatha, Zygentoma, Pterygota).

Eine Hämocyanin-Untereinheit weist typischerweise eine Länge zwischen 630 und 660 Aminosäuren mit einer Molekülmasse zwischen 70 und 80 kDa auf. Die Aminosäuresequenz ist in drei Bereiche unterteilt, welche sich in ihren Faltungsmotiven unterscheiden (Abb 1.2A; VOLBEDA und HOL, 1989; HAZES et al., 1993; MAGNUS et al., 1994). Die N-terminal liegende Domäne 1 besteht aus fünf oder sechs α-Helices und schützt das aktive Zentrum. Dieses befindet sich in Domäne 2. Die Lage der sechs Kupfer-koordinierenden Histidinreste wird durch ein aus vier α-Helices bestehendes Barrel stabilisiert. Die Domäne 2 ist der am stärksten konservierte Bereich in einer Hämocyanin-Untereinheit. C-terminal befindet sich die Domäne 3, bestehend aus einem sieben-strängigen antiparallelen β-Barrel. Domäne 1 und 2 enthalten insgesamt drei konservierte Phenylalanine, die stabilisierend auf die Sauerstoffbindung wirken. Die einzelnen Untereinheiten werden durch nicht-kovalente Bindungen aneinander gebunden. Einige 2x6 Hämocyanine werden durch Disulfidbrücken gebildet (MARKL und DECKER, 1992; VANHOLDE und MILLER, 1995). Röntgenstrukturanalysen liegen sowohl für das deoxigenierte 1x6 Hämocyanin der Kalifornischen Languste *Palinurus interruptus* (GAYKEMA et al., 1984) als auch für das des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphenus* in seiner oxy- und deoxygenierten Form vor (HAZES et al., 1993; MAGNUS et al., 1994). Auch das 6x4 Hämocyanin des Kaiserskorpions *Pandinus imperator* konnte kürzlich kristallisiert werden (JAENICKE et al., 2012). Des Weiteren gibt es 3D-Rekonstruktionen verschiedener Arthropodenhämocyanine (z. B. TAVEAU et al., 1997; MEISSNER et al., 2003; MARTIN et al., 2007; MARKL et al., 2009).

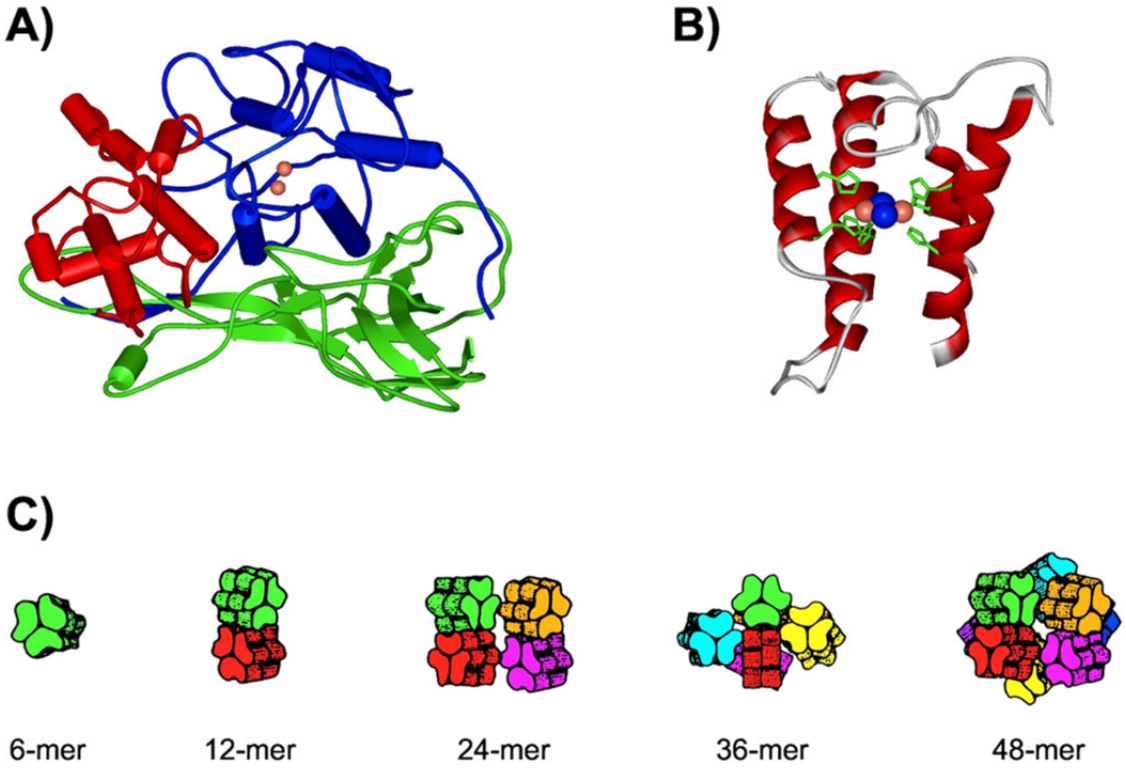


Abb. 1.2: Struktur der Arthropodenhämocyanine (JAENICKE, 2002)
A) Hämocyanin-Untereinheit von *P. interruptus*: Domäne 1 ist rot, die zweite blau und die dritte grün gefärbt. Die beiden Kupferatome im aktiven Zentrum sind orange.
B) Aktives Zentrum einer Hämocyanin-Untereinheit von *Limulus polyphemus*: Die beiden Kupferionen (orange), die das Sauerstoffmolekül (blau) binden, werden durch sechs Histidinreste (grün) koordiniert.
C) Quartärstrukturen von Arthropodenhämocyaninen

1.1.2. Phenoloxidase

Phenoloxidasen sind multifunktionale Enzyme. Sie katalysieren die o-Hydroxylierung von Monophenolen zu o-Diphenolen und die Oxidation von o-Diphenolen zu o-Chinonen (Tyrosinaseaktivität) oder nur die Oxidation von o-Diphenolen zu o-Chinonen (Catecholoxidaseaktivität; Abb. 1.3). Bei der Sklerotisierung der Kutikula werden in diesem Prozess Proteine der Kutikula und Chitin quervernetzt (HOPKINS und KRAMER, 1992; SUGUMARAN, 1996).

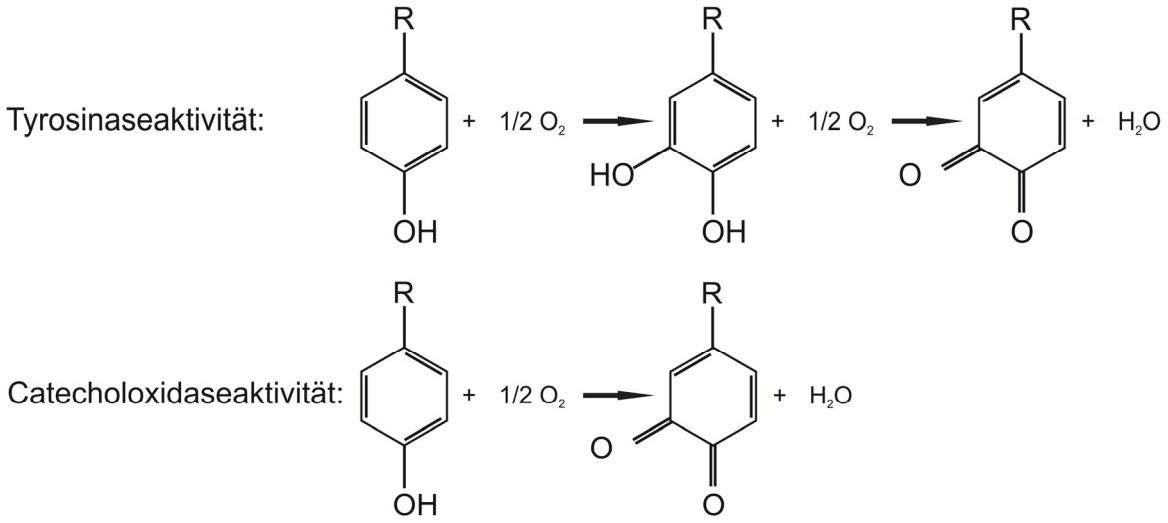


Abb. 1.3: Reaktionen, die durch die Phenoloxidase katalysiert werden:
Oben: Tyrosinaseaktivität; unten: Catecholoxidaseaktivität.

Nach der Bildung des o-Chinons kommt es zu einer nichtenzymatischen Vernetzung zu Melanin (MONDER et al., 1957a; MONDER et al., 1957b; MARMARAS et al., 1996; SUGUMARAN, 1996). Melanin wird häufig an Verwundungen, um aggregierte Hämocyten und eingekapselte Parasiten gefunden (SUGUMARAN und KANOST, 1993).

Phenoloxidasen werden als Zymogene synthetisiert (Prophenoloxidasen, PPO) und durch die Abspaltung eines N-terminalen Peptids aktiviert (ASPAN et al., 1995; KAWABATA et al., 1995; CHOSA et al., 1997; SODERHALL und CERENIUS, 1998). Diese Aktivierung kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Zum einen durch limitierte Proteolyse mit speziellen Proteasen. Es wird dabei ein Peptid abgespalten, das ca. der ersten Domäne der Arthropodenhämocyanine entspricht (ASPAN et al., 1995; KAWABATA et al., 1995; CHOSA et al., 1997; SODERHALL und CERENIUS, 1998). Zum anderen können z. B. Fettsäuren, Phospholipide, Detergenzien und Alkohol für eine Aktivierung der Prophenoloxidase sorgen. Entscheidend ist dabei der lipophile Charakter der verwendeten Reagenzien (MOORE und FLURKEY, 1990; SUGUMARAN und NELLAIAPPAN, 1991; ASADA et al., 1993; NELLAIAPPAN und SUGUMARAN, 1996; ASADA, 1998; ESPIN und WICHERS, 1999). Wie die Hämocyanine der Arthropoden weisen die Phenoloxidasen zwei Kupferbindungsstellen auf, wobei die Kupferionen durch jeweils drei Histidinreste koordiniert werden (FUJIMOTO et al., 1995; BURMESTER und SCHELLER, 1996; TERWILLIGER et al., 1999). Innerhalb der Arthropoden konnten sie bisher bei den Hexapoden und Crustaceen nachgewiesen werden. Bei den Myriapoden gibt es Hinweise auf die Existenz von

Phenoloxidasen sowohl auf biochemischer (XYLANDER und BOGUSCH, 1992; XYLANDER, 1996) als auch auf mRNA-Ebene (PICK et al., 2014). Bei den Cheliceraten fehlen sie vollständig (NAGAI und KAWABATA, 2000; DECKER et al., 2001). Hier ist jedoch das Hämocyanin, zumindest in einigen Arten, in der Lage eine Phenoloxidaseaktivität zu übernehmen (DECKER und RIMKE, 1998).

1.1.3. „Kupferlose“ Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie

Zu den „kupferlosen“ Vertretern der Hämocyanin-Superfamilie zählen die Hexamerine, ihre Rezeptoren sowie die Cryptocyanine/Pseudo-Hämocyanine. Hexamerine kommen in der Hämolymphe vieler Hexapoden vor. Sie haben sich aus der Hämocyanin-Untereinheit 1 der Hexapoden entwickelt (BURMESTER, 2001; HAGNER-HOLLER et al., 2004; PICK et al., 2009). Bei den meisten Hexamerinen handelt es sich um 1x6-mere, die aus sechs identischen oder sehr ähnlichen Untereinheiten aufgebaut sind (TELFER und KUNKEL, 1991). Die Hexamerine haben die für die Sauerstoffbindung essentiellen Histidine verloren und agieren somit als Speicherproteine. Sie kommen in hohen Konzentrationen in der Hämolymphe von Larven- und Nymphenstadien vor und können dort Energie und Aminosäuren zum Aufbau adulter Strukturen zur Verfügung stellen (KINNEAR und THOMSON, 1975; LEVENBOOK und BAUER, 1984). Hexamerine können noch weitere Funktionen übernehmen. Hierzu zählt die Bindung von Steroidhormonen (ENDERLE et al., 1983), von Riboflavin (MAGEE et al., 1994) und von Juvenilhormonen (BRAUN und WYATT, 1996) sowie die Beteiligung an der Sklerotisierung der Kutikula (PETER und SCHELLER, 1991). Wie das Hämocyanin der Hexapoden werden sie wahrscheinlich im Fettkörper synthetisiert. Ein Signalpeptid ist für die Sezernierung in die Hämolymphe verantwortlich, wo das Hexamerin akkumuliert (BEINTEMA et al., 1994; BURMESTER, 2001; BURMESTER, 2002). Während der Verpuppung wird das Hexamerin selektiv vom Fettkörper wieder aufgenommen und in Proteingranula in den Fettkörperzellen eingelagert (TOJO et al., 1978; UENO und NATORI, 1982).

Der Hexamerinrezeptor wurde bisher nur bei den Dipteren (UENO und NATORI, 1984; BURMESTER und SCHELLER, 1992; BURMESTER und SCHELLER, 1995) identifiziert. Dort ist er für die Aufnahme des Hexamerins in den Fettkörper verantwortlich. Er wird daher genauer unter Punkt 1.2.5.4. Hexamerinrezeptor der Hexapoda beschrieben.

Die hexameren Proteine in der Hämolymphe vieler Decapoden werden als Cryptocyanin (TERWILLIGER et al., 1999) oder als Pseudo-Hämocyanin (BURMESTER, 1999) bezeichnet. Sie haben mindestens eins der kupferbindenden Histidine verloren und fungieren als Speicherproteine. Eine ausführlichere Beschreibung ist unter 1.2.4.2. Cryptocyanin/Pseudo-Hämocyanin der Crustacea zu finden.

1.2. Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden

1.2.1. Onychophora

Die Onychophoren (Stummelfüßer) sind eng verwandt mit den Arthropoda und verfügen wie viele Vertreter der Arthropoda über ein Tracheensystem (BRUSCA et al., 1990). Man unterscheidet zwei Familien. Dies sind die Peripatopsidae und die Peripatidae. Als Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie konnte bei den Onychophoren nur Hämocyanin nachgewiesen werden. Über die Existenz einer Phenoloxidase ist nichts bekannt.

1.2.1.1. Hämocyanin der Onychophora

Onychophoren verfügen über das respiratorische Protein Hämocyanin. Dies konnte in jeweils einer Art der beiden vorkommenden Familien gefunden werden. Dabei handelt es sich um *Epiperipatus* sp. (Peripatidae, KUSCHE et al., 2002) und *Peripatopsis sedgwicki* (Peripatopsidae, nicht publiziert). Es konnte gezeigt werden, dass das Hämocyanin der Onychophoren aus einer einzelnen Hämocyanin-Untereinheit besteht. Über das Sauerstoffbindungsverhalten dieser Hämocyanin-Untereinheit ist noch nichts bekannt. Sie bildet eine Schwestergruppe zu den Hämocyaninen, Cryptocyaninen und Hexamerinen der Euarthropoden (Chelicerata, Myriapoda, Crustacea und Hexapoda; Abb. 1.1). Dies deutet darauf hin, dass das Hämocyanin bereits in einem gemeinsamen Vorfahren aller Panarthropoda (Arthropoda, Onychophora, Tarigrada) vorhanden war. Dabei sind die Hämocyanine offensichtlich aus den Phenoloxidasen der Arthropoden hervorgegangen (Abb. 1.1).

1.2.2. Chelicerata

Der Unterstamm Chelicerata setzt sich aus den Ordnungen Xiphosura (Pfeilschwanzkrebse), Scorpiones (Skorpione), Uropygi (Geißelskorpione), Amblypygi (Geißelspinnen), Aranea (Webspinnen), Opiliones (Weberknechte), Pseudoscorpiones (Pseudoskorpione), Solifugae (Walzenspinnen), Pycnogonida (Asselspinnen), Palpigradi (Palpenläufer), Ricinulei (Kaputzenspinnen) und Acari (Milben) zusammen. Der Aufnahme von Sauerstoff dienen Kiemen bei marinen Cheliceraten, Buchlungen und Tracheen bei terrestrischen Formen. Als Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie konnte bei den Cheliceraten nur Hämocyanin identifiziert werden. Sie verfügen offenbar weder über Phenoloxidasen noch über Speicherproteine.

1.2.2.1. Hämocyanin der Chelicerata

Innerhalb der Cheliceraten konnte Hämocyanin bei den Xiphosura, Scorpiones, Uropygi, Amblypygi, Aranea und Pycnogonida nachgewiesen werden. Bei den Opiliones, Pseudoscorpiones, Solifugae und Acari ging es offenbar verloren (REHM et al., 2012). Opiliones, Pseudoscorpiones und Solifugae sind Apulmonata, die über Tracheen verfügen. Diese scheinen für den aeroben Metabolismus auszureichen (REHM et al., 2012). Die Acari sind sehr klein und haben ebenfalls Tracheen (OBENCHAIN und OLIVER, 1975). Scorpiones, Uropygi, Amblypygi und Aranea haben hingegen Buchlungen. Diese sind mit Hämolymphe gefüllt, wodurch der Sauerstoffverbrauch der einzelnen Gewebe limitiert ist (REHM et al., 2012). Cheliceratenhämocyanine setzen sich aus bis zu acht distinkten Untereinheiten zusammen und bilden 1x6-, 2x6-, 4x6- und 8x6-mere (MARKL, 1986; MARKL et al., 1986). Die 2x6-mere vieler Labidognatha bestehen aus zwei Hexameren, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (MARKL, 1980; MARKL, 1986). Bei dem Hämocyanin der Xiphosuren handelt es sich um 8x6-mere, während das Hämocyanin der Arachniden in der Regel 4x6-mere bildet. 1993 konnte die Kristallstruktur der deoxygenierten Hämocyanin-Untereinheit 2 von *Limulus polyphemus* in einer Auflösung von 2,18 Å ermittelt werden (HAZES et al., 1993). MARTIN et al. (2007) konnten die Quartärstruktur des 8x6-mers im Cryo-TEM (Cryo-Tranmissionselektronenmikroskopie) und mittels 3D-Rekonstruktion in 10 Å auflösen. Es wurden 46 Interhexamer-Kontaktstellen identifiziert. 24 davon befinden sich innerhalb der vier 2x6-mere, zehn werden zur Herstellung der 4x6-mere benötigt und zwölf um die beiden 4x6-mere in ein 8x6-mer umzuwandeln. Dieses 8x6-mer setzt sich wiederum aus acht distinkten Untereinheiten zusammen. Diese Untereinheitstypen haben sich vor 540-

420 Millionen Jahren auseinanderentwickelt (VOIT et al., 2000; AVERDAM et al., 2003). Sie wurden in vier monopyletischen Gruppen zusammengefasst (REHM et al., 2012). Der ersten monophyletischen Gruppe gehören die Arachniden Hämocyanin-Untereinheitstypen b und c sowie die V/VI-Untereinheitstyp der Xiphosuren an. Die zweite Gruppe wird durch den a-Typ Arachniden- und den II-Typ Xiphosurenhämocyanin gebildet. Die dritte Gruppe beinhaltet den Arachnidenhämocyanintyp d und f sowie den Xiphosurenhämocyanintyp IIIb und IV. Die Hämocyanin-Untereinheiten e und g der Arachniden genauso wie I und IIIa der Xiphosuren bilden die vierte monophyletische Gruppe (REHM et al., 2012). Alle funktionellen Untereinheiten sind beim Cheliceraten Hämocyanin an der Sauerstoffbindung beteiligt. Die Kooperativität nimmt vom 4x6-, über das 2x6- zum 1x6-mer schrittweise ab (BROUWER und SERIGSTAD, 1989; HARTMANN und DECKER, 2002). Für das Hämocyanin von *Eurypelma californicum*[*)] konnte eine geringe Sauerstoffaffinität bei pH 7,0 (P_{50}~30,9 Torr) und eine moderate Sauerstoffaffinität bei pH 7,6 (P_{50}~18,2 Torr) gezeigt werden. Der Hill-Koeffizient betrug bei pH 7,0 2,2 und bei pH 7,8 2,6 (DECKER und STERNER, 1990b).

Den Hämocyanin-Untereinheiten der Cheliceraten fehlt ein Signalpeptid, trotzdem liegt es gelöst in der Hämolymphe vor. Es wird, dies wurde zumindest für *E. californicum* gezeigt, an freien Ribosomen synthetisiert und durch Lyse der Zellen freigesetzt. Die Synthese erfolgt in Hämocyten-ähnlichen Zellen, die an die innere Herzoberfläche geheftet sind (KEMPTER, 1983; VOIT et al., 2000).

Das Hämocyanin der Cheliceraten ist in der Lage eine Phenoloxidaseaktivität auszuüben. Diese ist sowohl bei *E. californicum* (DECKER und RIMKE, 1998) als auch bei *L. polyphemus* (DECKER et al., 2001) vorhanden. Das Hämocyanin ist damit an der humoralen Immunantwort und der Sklerotisierung der Kutikula beteiligt. Bei beiden Hämocyaninen konnte die Phenoloxidaseaktivität durch geringe SDS-Konzentrationen ausgelöst werden. Diese Eigenschaft ist allerdings auf bestimmte Untereinheiten beschränkt (DECKER et al., 2001).

[*)] *Eurypelma californicum* wurde falsch bestimmt, tatsächlich handelt es sich um *Aphonopelma hentzi* (NENTWIG, 2012). Dennoch wurde die Bezeichnung beibehalten.

1.2.3. Myriapoda

Myriapoden umfassen die Chilopoda (Hundertfüßer), Diplopoda (Doppelfüßer), Pauropoda (Wenigfüßer) und die Symphyla (Zwergfüßer). Sie verfügen wie Hexapoden über ein ausgeprägtes Tracheensystem. Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Existenz eines respiratorischen Proteins aufgrund der Anwesenheit dieses Tracheensystems nicht notwendig sei. Als Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie konnte bei den Myriapoda Hämocyanin identifiziert werden. Außerdem gibt es Hinweise auf die Existenz von Phenoloxidasen, Speicherproteine scheinen zu fehlen.

1.2.3.1. Hämocyanin der Myriapoda

Innerhalb der Myriapoda wurde bei den Chilopoda, Diplopoda und Symphyla Hämocyanin nachgewiesen (SUNDARA RAJULU, 1969; MANGUM et al., 1985; GEBAUER und MARKL, 1999; JAENICKE et al., 1999; KUSCHE und BURMESTER, 2001; KUSCHE et al., 2003a; MARKL et al., 2009; DAMSGAARD et al., 2013; PICK et al., 2014). Das Hämocyanin der Pauropoden wurde bislang noch nicht untersucht. Während bei den Symphylen bisher nur Sequenzdaten vorhanden sind, existieren bei den Vertretern der Chilopoden und Diplopoden auch funktionelle und strukturelle Untersuchungen des Hämocyanins. Die erste Entdeckung fand bei dem Hundertfüßer *Scutigera longicornis* statt (SUNDARA RAJULU, 1969). Später konnte für *Scutigera coleptrata* gezeigt werden, dass es sich bei dem Hämocyanin um ein 6x6-mer handelt (MANGUM et al., 1985). Es wurden auf RNA-Ebene fünf Hämocyanin-Untereinheiten (ScoHcA-D und ScoHcX) identifiziert (KUSCHE et al., 2003a). Dabei konnte die Untereinheit X nicht im nativen Protein nachgewiesen werden. Die Untereinheiten A-D kommen im nativen Protein in einem Verhältnis von ungefähr 2:2:1:1 vor (GEBAUER und MARKL, 1999; KUSCHE et al., 2003a). Bei den Diplopoden konnten JAENICKE et al. (1999) bei drei Arten aus der Familie der Spirostreptidae (Diplopoda) zeigen, dass das Hämocyanin ebenfalls 6x6-mere bildet. Es wurde zunächst angenommen, dass es sich aus zwei Hämocyanin-Untereinheiten zusammensetzt. Auf molekularer Ebene konnte nur die Sequenz einer Untereinheit identifiziert werden (KUSCHE und BURMESTER, 2001). Bei dem Tausendfüßer *Archispirostreptus gigas* wurde nachgewiesen, dass es sich nicht, wie zuvor angenommen, um zwei verschiedene Hämocyanin-Untereinheiten, sondern um unterschiedliche Glykosilierungsformen einer einzelnen Untereinheit handelt (DAMSGAARD et al., 2013).

Das Sauerstoffbindungsverhalten des Hämocyanins der Diplopoden *Spirostreptus* sp. und *A. gigas* weist ein gegensätzliches Verhältnis zum Hämocyanin des Chilopoden *S. coleoptrata* auf. Während das Hämocyanin von *Spirostreptus* und *A. gigas* eine hohe Sauerstoffaffinität (P_{50}=4,7 Torr bei pH 7,5 und P_{50}=3,5 Torr bei pH 8,1) und eine geringe Kooperativität (h=1,3 ± 0,2 und h=3, bei pH 7,4) zeigt, ist die Situation beim Hämocyanin von *S. coleptrata* revers. Hier liegt eine geringe Sauerstoffaffinität (P_{50}=55 Torr bei pH 7,5) und eine hohe Kooperativität vor (h=8,9 bei pH 7,5; MANGUM et al., 1985; JAENICKE et al., 1999). Die deutet darauf hin, dass das Hämocyanin von *Spirostreptus* und *A. gigas* der Sauerstoffspeicherung dient, während das Hämocyanin von *S. coleptrata* schnell Sauerstoff bereitstellen kann.

1.2.3.2. Phenoloxidase der Myriapoda

Über die Phenoloxidasen der Myriapoden sind bisher kaum Daten verfügbar. Sie konnten bisher nur biochemisch nachgewiesen werden (XYLANDER und BOGUSCH, 1992; XYLANDER, 1996). PICK et al. 2014 konnten Hinweise für eine PPO mRNA in dem Diplopoden *Polyxenus lagurus* entdecken. In Datenbankanalysen konnten sie zudem in dem vollständig sequenzierten Genom des Chilopoden *Strigamia maritima* das Gen für eine putative PPO identifizieren. Beiden Proteinen fehlt ein Signalpeptid, was auf ein intrazelluläres Protein hindeutet. Des Weiteren konnte in keiner der beiden Arten Hämocyanin nachgewiesen werden (PICK et al., 2014).

1.2.4. Crustacea

Crustaceen sind ein sehr formenreicher Unterstamm der Arthropoden. Zu ihnen zählen die Oligostraca, Branchiopoda (Kiemenfußkrebse), Copepoda (Ruderfußkrebse), Malacostraca (höhere Krebse), Thecostraca (Kapselschaler), Remipedia und Xenocarida. Crustacea verfügen in der Regel über Kiemen, bei den höheren Landasseln (Onscidea) haben sich Tracheen entwickelt. Als Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie konnten bei den Crustacea Hämocyanin, Phenoloxidasen sowie das Speicherprotein Cryptocanin nachgewiesen werden.

1.2.4.1. Hämocyanin der Crustacea

Innerhalb der Crustacea schien Hämocyanin nur bei den Malacostraca und Remipedia vorhanden zu sein (MANGUM, 1985; MARKL und DECKER, 1992; ERTAS et al., 2009). 2013 konnte gezeigt werden, dass auch die Ostracoden über Hämocyanin verfügen (persönliche Mitteilung: MARXEN, 2013). Die anderen Klassen haben entweder kein respiratorisches Protein oder sie verwenden Hämoglobin (MANGUM, 1985).

Das Hämocyanin der Crustacea verfügt im Vergleich zu dem stark konservierten Hämocyanin der Cheliceraten (BURMESTER, 2002; REHM et al., 2012) über eine höhere Variabilität in der Untereinheitenzusammensetzung. Diese kann sich innerhalb nahe verwandter Arten und sogar innerhalb von Populationen unterscheiden (MARKL, 1986; MARKL et al., 1986; STÖCKER et al., 1988; MANGUM und JOY, 1997). Einige Untereinheiten werden nur unter spezifischen physiologischen Bedingungen exprimiert (MARKL und DECKER, 1992; DURSTEWITZ und TERWILLIGER, 1997; TERWILLIGER, 1998). Bei den Malacostrca kommen 1x6-, 2x6-mere und 4x6-mere vor. 1x6-mere wurden z. B. bei den Isopoden identifiziert (MARKL, 1986). Bei den 2x6-meren existieren zwei verschiedene Quartärstrukturen. 4x6-mere konnten in dem Maulwurfskrebs *Upogebia pusilla* und in *Callianassa californiensis* identifiziert werden (MILLER et al., 1977; MARKL et al., 1986; MARKL und DECKER, 1992; PAOLI et al., 2007).

Das Sauerstoffbindungsverhalten des Hämocyanins der Crustacea ist gut untersucht und variiert stark. So konnte in diversen Arbeiten gezeigt werden, dass bei verschiedenen Spezies eine Veränderung der Ionenkonzentration der Hämolymphe zu einer Veränderung der Sauerstoffaffinität und der Kooperativität führt (LARIMER und RIGGS, 1964; TRUCHOT, 1975; MASON et al., 1983). Es gibt aber noch diverse andere Faktoren die das Sauerstoffbindungsverhalten beeinflussen (BROWN und TERWILLIGER, 1998). Zu diesen zählen unter anderem Temperatur, L-Lactat und andere natürlich vorkommende organische Effektoren wie z. B. Harnstoffverbindungen, Dopamin und verwandte Neuroamine sowie Stickstoffmetaboliten (TRUCHOT, 1980; BOOTH et al., 1982; GRAHAM et al., 1983; MORRIS et al., 1985; MORRIS et al., 1986; LALLIER et al., 1987; LALLIER und TRUCHOT, 1989; MORRIS und MCMAHON, 1989; MORRIS, 1990; SANDERS et al., 1992).

Zu den Malacostraca zählen die Eucarida (Decapoda und Euphausiacea), Hoplocarida (Stomatopoda), Peracrida (u.a. Amphipoda und Isopoda), Syncarida (Anaspidacea,

Bathynellacea) und Phyllocarida (Leptostraca). Das Hämocyanin der Decapoda wurde ursprünglich immunologisch in drei Untereinheitstypen klassifiziert, die als α, β und γ bezeichnet wurden (MARKL, 1986; STÖCKER et al., 1988). Diese Klassifizierung konnte auch durch jüngere molekulare phylogenetische Analysen weitestgehend unterstützt werden (BURMESTER, 2002; HAGNER-HOLLER et al., 2005; SCHERBAUM et al., 2010; MARXEN et al., 2013). Innerhalb dieser drei Untereinheitstypen ist der α-Untereinheitstyp näher mit dem γ-Untereinheitstyp verwandt als der β-Untereinheitstyp (MARKL, 1986; MARKL et al., 1986; KUSCHE et al., 2003b; HAGNER-HOLLER et al., 2005; SCHERBAUM et al., 2010). Der α- und γ-Typ trennten sich vor ~400 Millionen Jahren. Die Aufspaltung des β-Untereinheitstyps von der α/γ-Linie hingegen fand bereits im frühen Kambrium vor ~520 Millionen Jahren statt (SCHERBAUM et al., 2010; MARXEN et al., 2013). Neben dem α-, β- und γ-Untereinheitstyp gibt es innerhalb der Malacostraca auch noch das Hämocyanin der Amphipoda und Isopoda, welches nicht mit den anderen drei Untereinheitstypen gruppiert (MARXEN et al., 2013). Die Hämocyanine der Crustaceen sind z. T. in der Lage eine Funktion als Phenoloxidase zu übernehmen (DECKER und JAENICKE, 2004).

1.2.4.2. Cryptocyanin/Pseudo-Hämocyanin der Crustacea

Das Cryptocyanin/Pseudo-Hämocyanin ähnelt stark dem Hämocyanin, kann jedoch keinen Sauerstoff binden (MARKL et al., 1979), da die kupferbindenden Histidine durch andere Aminosäuren ersetzt wurden (BURMESTER, 1999; TERWILLIGER et al., 1999). Mit dem Verlust des Sauerstoffbindungszentrums ließ der Selektionsdruck nach (BURMESTER, 2002), was zu einer signifikant höheren Substitutionsrate als beim Hämocyanin führte. Die Cryptocyanine entwickelten sich aus dem γ-Typ Hämocyanin der Decapoden vor ca. 180 Millionen Jahren (KUSCHE et al., 2003b).
Es wird vermutet, dass es sich um ein Speicherprotein handelt (BURMESTER, 2002), da sich die Cryptocyaninkonzentration innerhalb von Häutungszyklen unterscheidet (TERWILLIGER et al., 1999). Syntheseort des Cryptocyanins ist das Bindegewebe der Mitteldarmdrüse, respektive das Herzgewebe und die Ovarien (BURMESTER, 1999; TERWILLIGER et al., 1999). TERWILLIGER et al. (2005) konnten zeigen, dass, synchron mit dem Häutungszyklus, Cryptocyanin in die Hämolymphe sezerniert wird und durch die Epidermis in die extrazelluläre Matrix des neuen Exoskeletts wandert .

1.2.4.3. Phenoloxidase der Crustacea

Phenoloxidasen zirkulieren in der Hämolymphe von Crustaceen in ihrer inaktiven Form, der Prophenoloxidase (PPO), in den Hämocyten (TERWILLIGER und RYAN, 2006). Sie werden bei den Crustacea von granulären bis semi-granulären Hämocyten gebildet (CERENIUS et al., 2003). Dabei fehlen unreifen Hämocyten des Signalkrebses *Pacifastacus leniusculus* die PPO, während reife Hämocyten in der Hämolymphe über diese verfügen (SODERHALL et al., 2003). In den Crustacea wurde bisher pro Spezies nur ein für die PPO kodierendes Gen gefunden (CERENIUS und SODERHALL, 2004), während es bei den Insecta bis zu zehn verschiedene Gene pro Spezies gibt (WATERHOUSE et al., 2007). Phenoloxidasen sind an der Immunantwort beteiligt. Bei *P. leniusculus* konnte gezeigt werden, dass die Produktion der Phenoloxidase mit einer erhöhten Resistenz gegen das hoch pathogene Bakterium *Aeromonas hydrophila* einhergeht (LIU et al., 2007). Die Phenoloxidasen der Crustacea bilden Hexamere (JAENICKE und DECKER, 2003). Innerhalb der Crustacea gibt es zwei distinkte PPO-Gruppen. Dies sind zum einen die PPO der Decapoda und zum anderen die PPO der Branchiopoda. Den Iso- und Amphipoden hingegen scheinen die PPO zu fehlen (TERWILLIGER und RYAN, 2006).

1.2.5. Hexapoda

Zu den Hexapoden zählen die Ecto- und Entognatha. Die meisten Hexapoden verfügen über ein Tracheensystem, in dem sauerstoffhaltiges Gas durch Stigmata in der Kutikula aufgenommen und im Körper durch Diffusion verteilt wird. Als Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie konnten bei den Hexapoden Hämocyanin, Phenoloxidasen sowie das Speicherprotein Hexamerin und dessen Rezeptor nachgewiesen werden.

1.2.5.1. Hämocyanin der Hexapoda

Die meisten Hexapoden verfügen über ein ausgeprägtes Tracheensystem, über das der Gasaustausch stattfindet. Daher wurde lange angenommen, dass sie neben dem Hämoglobin bei einigen Spezies keine weiteren respiratorischen Proteine besitzen (MANGUM, 1985; LAW und WELLS, 1989; WILLMER et al., 2005). PICK et al. (2009) konnten Hämocyanin innerhalb der Hexapoda in den Collembola, Archegonatha, Zygentomata, Plecoptera, Dermaptera, Orthoptera, Phasmatodea, Mantodea, Isoptera und Blattaria nachweisen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die eumetabolen Insekten die

Hämocyanine verloren haben (HAGNER-HOLLER et al., 2004; BURMESTER und HANKELN, 2007). Auch bei einigen Vertretern der ametabolen und hemimetabolen Insekten könnten sie verloren gegangen sein. Eine weitere Erklärung für die Abwesenheit des Hämocyanins in diesen Insekten könnte eine Expression nur in bestimmten Entwicklungsstadien sein. Für das Hämocyanin der argentinischen Waldschabe *Blaptica dubia* konnte dies gezeigt werden (PICK et al., 2010).

Hexapoden verfügen über zwei Hämocyanin-Untereinheitstypen (Hc1 und Hc2). Diese separierten sich bereits vor der Aufspaltung der Remipedia*) und Hexapoda (ERTAS et al., 2009). Da Hc1 in allen soweit untersuchten Hexapoden vorhanden ist, wird davon ausgegangen, dass sie der zentrale Baustein des Hexapodenhämocyanins ist. Hc2 ist innerhalb der Hexapoden mehrmals unabhängig voneinander verloren gegangen (PICK et al., 2009).

Das Sauerstoffbindungsverhalten des Hämocyanins wurde innerhalb der Hexapoden nur bei der Steinfliege *Perla marginata* untersucht. Es weist eine hohe Sauerstoffaffinität (P_{50}~8 Torr) und eine gewisse Kooperativität (h=2) auf. Dabei bildet es ein 1x6-mer als Quartärstruktur (HAGNER-HOLLER et al., 2004).

1.2.5.2. Phenoloxidase der Hexapoda

Alle bisher untersuchten Insekten verfügen über mindestens zwei Phenoloxidasegene mit Ausnahme der Honigbiene, welche nur über ein Gen verfügt (EVANS et al., 2006). In einigen Moskito-Spezies konnte gezeigt werden, dass bestimmte PPO-Gene z. T. nur in einigen Stadien oder in der Anwesenheit spezieller Pathogene exprimiert werden (MULLER et al., 1999; HUANG et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass die einzelnen PPO unterschiedliche Aufgaben haben, zumindest in den Diptera (CERENIUS und SODERHALL, 2004). Die Synthese der Prophenoloxidasen findet größtenteils in Hämocyten statt (CERENIUS und SODERHALL, 2004). Der Hämocytentyp ist speziesspezifisch. Die Prophenoloxidase der Lepidoptera wird beispielsweise in sogenannte Oenocyten synthetisiert (JIANG et al., 1997), während der Syntheseort bei den Moskitos die granulären Hämocyten und Oenocyten sind (CASTILLO et al., 2006). Bei *Drosophila melanogaster* werden die Prophenoloxidasen 1 und 2 primär in Kristallzellen exprimiert, wohingegen die Expression der Prophenoloxidase 3 nach einer

*) Remipedia sind Crustacea. Sie wurden als Vorfahren der Hexapoda vorgeschlagen (ERTAS et al., 2009).

parasitären Infektion in Lamellocyten stattfindet (RIZKI und RIZKI, 1984; IRVING et al., 2001; TANG, 2009). Prophenoloxidasen befinden sich in der Hämolymphe, trotz Abwesenheit eines Signalpeptids. Dies deutet darauf hin, dass sie durch die Ruptur der Hämocyten dorthin gelangen (KANOST und GORMAN, 2008). Dabei unterscheiden sich Hämocytentypen in ihrer Stabilität, sodass einige Prophenoloxidasen ohne Auslöser in die Hämolymphe entlassen werden. In den Lepidoptera findet man die Prophenoloxidasen hauptsächlich in der Hämolymphe, während z. B. die Prophenoloxidasen der Heuschrecken und Schaben dominant in den Hämocyten vorkommen, aus denen sie erst durch eine Aktivierung entlassen werden (BREHÉLIN et al., 1989; DURRANT et al., 1993). Im Gegensatz zum Hämocyanin und Hexamerin scheinen die Prophenoloxidasen der Insekten nicht ausschließlich Hexamere zu bilden. So bildet die Prophenoloxidase des Tabakschwärmers *Manduca sexta* Mono-, Di-, Tri- und höhere Oligomere. Dabei begünstigt eine geringe Salzkonzentration die Bildung höherer Oligomere (JIANG et al., 1997). Dies konnte ebenfalls bei der Phenoloxidase von *Bombyx mori* gezeigt werden (ASHIDA, 1971). Es wird angenommen, dass min. zwei der drei *Drosophila* PPO als Homodimere *in vivo* vorliegen (SEZAKI et al., 2001).

1.2.5.3. Hexamerin der Hexapoda

Hexamerin wurde bei allen bisher untersuchten Insekten in der Hämolymphe gefunden (SCHELLER et al., 1990; TELFER und KUNKEL, 1991) und dient während Häutungs- und in Hungerphasen als Speicherprotein (TELFER und KUNKEL, 1991; BURMESTER, 1999; BURMESTER, 2001). Es kann keinen Sauerstoff binden, da die dafür verantwortlichen Histidine durch andere Aminosäuren ersetzt wurden (BEINTEMA et al., 1994; BURMESTER, 2001; BURMESTER, 2002). Trotzdem weisen Hexamerine und Hämocyanine Ähnlichkeiten bezüglich ihrer Struktur auf (TELFER und KUNKEL, 1991; BEINTEMA et al., 1994).

Die Hexamerine der Hexapoden zeigen kein homogenes Bild in Bezug auf ihre Aminosäurenzusammensetzung. Sie wurden aufgrund des häufigen Vorkommens bestimmter Aminosäuren benannt. Einige Hexamerine weisen besonders viele aromatische Aminosäuren auf (Arylphorine), andere sind besonders methioninreich (Met-rich storage protein), bzw. die Aminosäuren Glutamin und Glutaminsäure sowie Asparagin und Asparaginsäure sind besonders häufig vertreten (TELFER und KUNKEL, 1991). Arylphorine und methioninreiche Hexamerine findet man in fast allen Insektenordnungen, während die Glutamin-/Glutaminsäure- und Asparagin-

/Asparaginsäure-reichen Hexamerine nur bei den Hymenoptera vorhanden sind (WHEELER und BUCK, 1995; MARTINEZ et al., 2000). Innerhalb der Dipteren konnten zwei Hexamerine identifiziert werden, welche als larvale Serumproteine (LSP) bezeichnet werden. Die Hexamerine der Dipteren werden entweder den LSP1- oder den LSP2-ähnlichen Hexamerinen zugeordnet (ROBERTS et al., 1977; MASSEY et al., 1997; MOUSSERON-GRALL et al., 1997; BURMESTER et al., 1998). *D. melanogaster* besitzt beide LSP. Die Expression der zwei LSP ist auf den Fettkörper ab dem letzten Larvenstadium beschränkt (ROBERTS et al., 1977; POWELL et al., 1984). Nur LSP2 wird in adulten Tieren exprimiert (SHIRRAS und BOWNES, 1989; BENES et al., 1990).

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte LSP2 ist wie das LSP1 ein Hexamer. Im Gegensatz zum LSP1, das sich aus α-, β- und γ-Untereinheiten zusammensetzt, besteht das LSP2 aus sechs identischen Untereinheiten. Dabei hat jede Untereinheit eine theoretische Molekülmasse von 83,5 kDa. Diese weicht stark von der experimentell beobachteten Molekülmasse ab, welche zwischen 74,5 und 79 kDa liegt (MOUSSERON-GRALL et al., 1997). Für das LSP2 konnte gezeigt werden, dass die Transkription durch das Häutungshormon 20-Hydroxyecdyson induziert wird (JOWETT und POSTLETHWAIT, 1981; NAKANISHI und GAREN, 1983). Betrachtet man die Quartärstruktur des Hexamerins, so konnte MARTIN (2007) zeigen, dass die Untereinheiten bohnenförmig sind und die Ecken eines trigonalen Antiprismas in einer „D3 point-group“ Symmetrie besetzen.

1.2.5.4. Hexamerinrezeptor der Diptera

Der Hexamerinrezeptor ist innerhalb der Hexapoda auf die Diptera beschränkt (UENO und NATORI, 1984; BURMESTER und SCHELLER, 1992; BURMESTER und SCHELLER, 1995). In Datenbankanalysen konnte festgestellt werden, dass er innerhalb der Diptera nur bei den Brachycera vorkommt (persönliche Mitteilung: BURMESTER, 2013). Er weist hohe Sequenzähnlichkeiten zu seinem Liganden, dem Hexamerin, von dem er abstammt, auf (BURMESTER und SCHELLER, 1996; BURMESTER, 1999; BURMESTER, 2002). Lokalisiert ist er an der Oberfläche der Fettkörperzellen, wo er durch das Häutungshormon 20-Hydroxyecdyson aktiviert wird (UENO et al., 1983; UENO und NATORI, 1984; BURMESTER und SCHELLER, 1995). Er ist verantwortlich für die Endozytose des Hexamerins in den Fettkörper (MARX, 1983; BURMESTER und SCHELLER, 1992; BURMESTER und SCHELLER, 1997; HANSEN et al., 2002). Die Sequenzähnlichkeiten des Hexamerinrezeptors zu den anderen Vertretern der

Hämocyanin-Superfamilie beschränken sich auf den N- und C-terminalen Bereich, der in etwa der ersten und dritten Domäne des Arthropoden-Hämocyanins entspricht. Er ist jedoch länger als die anderen Proteine der Hämocyanin-Superfamilie (BURMESTER und SCHELLER, 1996).

1.3. Zielsetzung

Um Struktur- und Funktionsanalysen an Proteinen durchführen zu können, ist es notwendig sie rekombinant herzustellen. Das Interesse gilt bei den Proteinen der Hämocyanin-Superfamilie insbesondere dem Sauerstoffbindungszentrum. Untersuchungen an diesen Proteinen *in vitro* sind nur für ein Hexamerin vorhanden. Ziel dieser Arbeit war es ein System zu entwickeln um Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie in ihrer aktiven Form, richtig gefaltet zu exprimieren. An diesen rekombinant hergestellten Proteinen könnten u. a. Mutagenesexperimente am aktiven Zentrum durchgeführt werden, um so den Mechanismus der Sauerstoffbindung besser zu verstehen.

Innerhalb der Cheliceraten, Crustaceen und Hexapoden sind die Hämocyanine vieler Spezies genauer in Bezug auf ihre Evolution, Funktion, Struktur sowie Syntheseort untersucht. Phenoloxidasen konnten bisher nur bei den Crustaceen und Hexapoden nachgewiesen werden. Über die Hämocyanine der Myriapoden existieren kaum Daten. Auch über die Phenoloxidasen aus diesem Unterstamm ist wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Daten über das Hämocyanin und die Phenoloxidase der Myriapoden gesammelt werden, um diese evolutiv einordnen zu können, ihre Funktion zu ermitteln sowie ihren Syntheseort zu bestimmen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (MEIGEN, 1830), die „schwarzbäuchige“ Taufliege, entwickelt sich nach dem Schlüpfen über drei Larvenstadien bis zur Verpuppung. Ein Lebenszyklus von der Befruchtung bis zum Schlüpfen der Fliegen dauert ca. 13-15 Tage (WOLPERT et al., 1998).

Stamm	Arthropoda
Unterstamm	Hexapoda
Klasse	Insecta
Überordnung	Neoptera
Ordnung	Diptera
Unterordnung	Brachycera
Familie	Drosophilidae
Gattung	Drosophila
Art	*Drosophila melanogaster*

2.1.2. *Palinurus elephas*

Palinurus elephas (FABRICIUS, 1803), die europäische Languste, kann eine Körperlänge von bis zu 50 cm erreichen und kommt im Ostatlantik vom südwestlichen Norwegen bis nach Marokko sowie im Mittelmeer vor.

Stamm	Arthropoda
Unterstamm	Crustacea
Klasse	Malacostraca
Überordnung	Eucarida
Ordnung	Decapoda
Art	*Palinurus elephas*

2.1.3. *Scolopendra dehaani*

Scolopendra dehaani (VAHTERA et al., 2013), der vietnamesische Hundertfüßer, kommt vor allem in Südostasien vor und zählt dort zu den größten Hundertfüßern mit einer Körperlänge von bis zu 30 cm.

Stamm	Arthropoda
Unterstamm	Myriapoda
Klasse	Chilopoda
Ordnung	Scolopendromorpha
Familie	Scolopendidae
Gattung	Scolopendra
Art	*Scolopendra dehaani*

Die hier verwendeten Hundertfüßer wurden von der Firma b.t.b.e. (Schnürpflingen) oder Spinnen Vinmann (Krefeld) käuflich erworben.

2.1.4. Geräte

Agarosegelkammer	Horizontal-Elektrophoresekammer (A. Hartenstein, Würzburg)
Autoklav	Systec VE-55 (Systec, Wettenberg)
	Tuttnauer 3850 ELV (Biomedis, Gießen)
Binokular	SZ61 (Olympus, Hamburg)
Blotkammer	Elektroblotter Typ SD 18 (A. Hartenstein, Würzburg)
Brutschränke	Innova 4200 und 4230 Incubator Shakers (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Drehrotator	Tube Rotator (VWR, Hannover)
Elektronenmikroskop	Filter Elektronenmikroskop LEO 912 (Carl Zeiss AG, Hamburg)
	EM 902A (Zeiss, West Germany)
FPLC-Anlage	ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare, Freiburg)
Geldokumentationssystem	Fusion Fx7 (Peqlab, Erlangen)
Heizblock	Bio TDB-100 (A. Hartenstein, Würzburg)
Horizontaler Schüttler	See-saw rocker SSL4 (Stuart, Staffordshire UK)
Mikroskope	Olympus IX50 (Olympus, Hamburg)
pH-Meter	InoLab pH 720 (WTW, Weilheim)
	Schott CG 842 (Schott, Mainz)
Photometer	NanoDrop 1000 (Peqlab, Erlangen)

	BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg)
Platereader	DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Krefeld)
SDS-Gelkammer	Mini-PROTEAN Electrophoresis System (Bio-Rad, München)
Spannungsgeräte	Consort EV243 (Jencons, Bedfordshire UK)
PowerPac™	Power Supply (Bio-Rad, München)
Speed Vac	Speed Vac SC110 (Thermo/Savant, Dreieich)
Spektralphotometer	Lambda 2S (Perkin Elmer, Fremont, USA)
Sterilwerkbank	LaminAir LB-48-C (Heraeus, Hanau)
Thermocycler	LabCycler Gradient (SensoQuest GmbH, Göttingen)
	T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
Ultraschallgerät	Ultraschallgerät (KLN Ultraschall AG, Heppenheim)
	Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlin)
Waagen	Kern 474 (Kern & Sohn GmbH, Albstadt)
	Sartorius 1203MP (Sartorius AG, Göttingen)
	Sartorius BP210S (Sartorius AG, Göttingen)
	SPO 51 (Scaltec, Göttingen)
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5804 (Eppendorf AG, Hamburg)
	Eppendorf Zentrifuge 541R (Eppendorf AG, Hamburg)
	Heraeus Labofuge 400R (Heraeus, Hanau)
	Sigma 1-14 Mikrozentrifuge (Sigma, Osterode am Harz)
	Zentrifuge GS 15R (Beckman Coulter, Fullerton)

2.1.5. Chemikalien und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Biowest (Renningen), Carl Roth (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), PAA Laboratories GmbH (Cölbe), Peqlab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

Kits wurden von den Firmen Applied Biosystems (Darmstadt), IBA (Göttingen), Invitrogen (Karlsruhe), PAA Laboratories GmbH (Cölbe), Peqlab (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Thermo Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Weitere Komponenten und Verbrauchsmaterialien wie Antibiotika, Marker, Enzyme, Einmalsterilspritzen, Sterilfilter, Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen, sterile Einmalpipetten, Zellkulturflaschen, Petrischalen, Kryoröhrchen und Pipettenspitzen lieferten die Firmen Invivogen (Toulouse, Frankreich), Fermentas (St. Leon-Roth), New

England Biolabs (Frankfurt), A. Hartenstein (Würzburg), Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf), Gibco (Karlsruhe) und Starlab (Ahrensburg).

2.1.6. Vektoren

Tabelle 2.1 fasst alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren zusammen.

Tabelle 2.1: Vektoren und ihre Resistenzen

Vektor	Resistenz	Firma
pGEM-T Easy	Ampicillin	Promega (Mannheim)
pGEM-T	Ampicillin	Promega (Mannheim)
TOPO TA	Ampicillin, Kanamycin	Invitrogen (Karlsruhe)
pET16b	Ampicillin	Novagen (Darmstadt)
pET24a	Kanamycin	Novagen (Darmstadt)
pMT/V5-His B	Ampicillin	Invitrogen (Karlsruhe)
pCoHygro	Hygromycin	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.7. Primer

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Operon synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Sie wurden in HPLC-Wasser gelöst, wobei eine 100 µM Stammlösung und eine 10 µM Arbeitslösung hergestellt wurden. Beide wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.
Die Primer, mit einer Länge zwischen 18 und 63 Nukleotiden, wurden anhand bekannter Sequenzen erstellt. Die Schmelztemperatur T_M lag über 58°C und der G/C-Gehalt zwischen 40 und 60%. Zur Vermeidung von Selbst- oder Heterodimeren wurden die Primer mit der Online Software OligoAnalyser 3.1 (http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/) analysiert. In anderen Fällen wurden die Primer durch das Programm Primerlyse (BORNER, nicht veröffentlicht) erstellt. Alle verwendeten Primer sind im Anhang (Tabelle 6.1 bis 6.6) dargestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Anzucht von Mikroorganismen

2.2.1.1. Verwendete Bakterienstämme

Es wurde ausschließlich mit Bakterien des K12-Stammes der Art *Escherichia coli* gearbeitet. Diese gehören alle der Risikogruppe 1 an und wurden bereits in kompetenter Form kommerziell erworben. Während Bakterien des JM109-Stammes ausnahmslos für Klonierungen eingesetzt wurden, wurde der Bakterienstamm Rosetta2(DE3)pLysS für die rekombinante Expression von Proteinen verwendet. Kompetente Bakterienzellen wurden bei -80°C gelagert. Eine genauere Beschreibung der verwendeten Bakterienstämme ist in Tabelle 2.2 zu finden.

Tabelle 2.2: Bakterienstämme und ihre Resistenzen

Bakterienstamm	Resistenz	Firma
JM109	keine	Promega (Mannheim)
Rosetta2(DE3)pLysS	Chloramphenicol	Novagen (Darmstadt)

2.2.1.2. Nährmedien und Antibiotika

Alle verwendeten Medien (Tabelle 2.3) wurden nach der Herstellung für 20 min bei 121°C (2,1 bar) autoklaviert. Der LB-Agar wurde bis auf 60°C im Wasserbad abgekühlt, für ein gewünschtes Blau-Weiß-Screening mit 0,25 mM X-Gal (in Dimethylformamid gelöst) und 0,2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) versetzt und anschließend unter sterilen Bedingungen ca. 0,5 cm hoch in Petrischalen (∅ 85 mm) gefüllt.

Tabelle 2.3: Medien und ihre Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
L-Medium	5 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt; pH 7,4
LB-Medium	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt; pH 7,4
LB-Agarplatten	1 l LB-Medium, 20 g Agar Agar

Die verwendeten Antibiotika wurden in dem entsprechenden Lösungsmittel gelöst (Tabelle 2.4) und als Stammlösungen angesetzt. In destilliertem Wasser gelöste Antibiotika wurden durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert. Die Stammlösungen wurden bei 4°C gelagert.

Tabelle 2.4: Konzentration und Lösungsmittel verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin	100 µg/ml	destilliertes Wasser, steril filtriert
Kanamycin	10 µg/ml	destilliertes Wasser, steril filtriert
Chloramphenicol	34 µg/ml	100%iger Alkohol
Tetracyklin	10 µg/ml	100%iger Alkohol
Hygromycin-B	300 µg/ml	kommerziell erworben (Carl Roth)

2.2.1.3. Übernachtkulturen

Zur Anzucht von Bakterien wurden Übernachtkulturen in Volumen zwischen 5 und 50 ml L-, bzw. LB-Medium angesetzt und mit den entsprechenden Antibiotika sowie dem jeweiligen Klon unter sterilen Bedingungen versetzt. Sie wurden über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert.

2.2.1.4. Dauerkulturen

Für die längerfristige Lagerung von Klonen wurden Dauerkulturen angelegt. Diese beinhalteten 700 µl Übernachtkultur und 300 µl Glycerin und wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Schneider 2 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in der Zellkultur ausschließlich Schneider 2 Zellen (S2) verwendet. Diese Zelllinien sind von späten embryonalen Stadien von *D. melanogaster* abgeleitet (20 bis 24 h alt; SCHNEIDER, 1972). Es handelt sich dabei um Insektenzellen, die sowohl schwach adhärent als auch in Suspension bei Raumtemperatur kultiviert werden können. Die Zellen wurden stabil transfiziert und bei der Kultivierung der Zellen wurde im Wesentlichen nach dem „Drosophila Expression System“ (DES) der Firma Invitrogen vorgegangen.

2.2.2.2. Nährmedien und Antibiotika

Das hier verwendete Schneider´s *Drosophila* Medium sowie das fetale Kälberserum wurde von der Firma BioWest bezogen. Dabei setzte sich das Vollmedium aus Schneider´s *Drosophila* Medium, 10% fetalem Kälberserum (fetal bovine serum, FBS)

und 300 µg/ml Hygromycin-B zusammen. Das FBS wurde vor Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert. Das Einfriermedium setzte sich aus 45% conditioned Medium (Medium, in dem bereits Zellen gewachsen sind) und 45% Vollmedium sowie 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zusammen. Das Vollmedium konnte einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.2.2.3. Passagieren von Zellen

Die S2 Zellen wurden in 25, 75 und 125 cm^3 Flaschen mit Belüftungsfunktion in Volumen von 5, 10 und 25 ml in Vollmedium kultiviert. Vor dem Passagieren wurde die Vitalität der Zellen überprüft. Abhängig von der Anzahl der Zellen wurden diese in dem Medium von den Wänden der Flasche abgewaschen und anschließend in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in Vollmedium in einer neuen Flasche gelöst.

2.2.2.4. Anlegen und Auftauen von Dauerkulturen

Beim Anlegen und Einfrieren von Dauerkulturen wurde nach dem „Drosophila Expression System“ vorgegangen.

2.2.2.5. Zellzählung

Vor der Bestimmung der Zellzahl erfolgte eine Überprüfung der Vitalität der Zellen mit einer Trypanblau-Färbung. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen werden kann. Diese erscheinen dunkelblau. Dem Zellvitalitätstest folgte die Zellzählung in einer Neubauer-Kammer.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA-Extraktion nach „Holmes Bonner“

Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNA durch die klassische Methode mit Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol nach Holmes und Bonner extrahiert (HOLMES und BONNER, 1973). Das Gewebe wurde in 1 ml HBS pro 100-200 mg Gewebe homogenisiert und mindestens dreimal mit Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol versetzt, um Proteine zu isolieren. Anschließend wurden die Nukleinsäuren in 2,5 Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Es wurde für eine halbe Stunde bei 20 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in TES gelöst, mit 4,5 M Natriumacetat, pH 5,2 versetzt und für 3 h auf Eis inkubiert, um die RNA zu fällen. Es folgte ein weiterer

Zentrifugationsschritt bei 4°C und 20 000 x g für 30 min, das Pellet wurde in 3 M Natriumacetat, pH 5,2 sowie in 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst.

Tabelle 2.5: Puffer für die RNA-Extraktion

Puffer	Zusammensetzung
HBS	7 M Harnstoff, 0,35 M NaCl, 1 mM EDTA, 2% SDS, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4
PCI	Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol 25:24:1
TES	10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,2% SDS

2.2.3.2. Isolierung von Gesamt-RNA mit TriFast und dem CHRISTAL RNA Mini Kit

Bei der Isolierung der Gesamt-RNA aus Geweben wurden mehrere Methoden kombiniert. Zunächst erfolgte die mechanische Zerkleinerung des Gewebes unter Einsatz von Flüssig Stickstoff und Mörsern, dann wurden die Zellen mittels des in dem TriFast enthaltenen Guanidinthiocyanat aufgebrochen. Es folgte eine Phenol-Chlorophorm Extraktion. Anschließend wurde die Gesamt-RNA über die Säulen des CHRISTAL RNA Mini Kits (biolab products) aufgereinigt.

2.2.3.3. DNase Verdau der isolierten Nukleinsäuren

Der DNase Verdau der isolierten Nukleinsäuren diente der Entfernung noch vorhandener DNA in den RNA Proben. Er erfolgte mittels des RNase free DNase Kits (Quiagen, Hilden). Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen, wobei der Verdau entweder nach einer abgeschlossenen RNA-Isolation oder bei Verwendung des CHRISTAL RNA Mini Kits während des letzten Waschschritts auf der Filtersäule R für 15 min bei RT erfolgte.

2.2.3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (SAMBROOK et al., 1989), da in diesem Bereich die aromatischen Ringe der Basen absorbieren. Bei einer RNA-Lösung entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 40 ng/µl, bei einer DNA-Lösung von 50 ng/µl. Der Quotient der OD_{260} zur OD_{280} gibt Information über die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Liegt er unter 1,8 liefert dies einen Hinweis auf eine Verunreinigung der Probe durch Proteine oder organische Verbindungen.

2.2.3.5. DNA Gelelektrophorese

Die DNA Gelelektrophorese diente sowohl der Analyse von DNA als auch ihrer Präparation. Sie erfolgte in 1%igen Agarosegelen, die durch das Aufkochen von Agarose in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM Na_2EDTA; pH 8,0) hergestellt wurden. Die Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 100 Volt statt. Anschließend wurden die Gele zur Visualisierung der DNA in Ethidiumbromid gefärbt. Bei präparativen Gelen wurde die DNA ausgeschnitten und mit dem CRYSTAL Gel-Extraktionskit (biolab products) aufgereinigt.

2.2.3.6. RNA Gelelektrophorese

Die RNA Gelelektrophorese diente der Qualitätskontrolle der RNA und fand ebenfalls in Agarosegelen statt. Es wurden denaturierende Bedingungen durch die Zugabe von Formaldehyd gewählt und die RNA wurde vor der Elektrophorese für 10 min auf 65°C erhitzt, um eine Sekundärstrukturbildung zu vermeiden. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet. Die Proben wurden mit dem äquivalenten Volumen einer Ethidiumbromid-haltigen 2 x Loading Dye Solution (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und konnten so visualisiert werden.

Tabelle 2.6: Puffer für die RNA Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
10 x MOPS	0,20 M MOPS, 0,05 M Natriumacetat; 0,1 M EDTA, pH 7,0
RNA Gel	0,35 g Agarose/22 ml H_20, 3,0 ml 10 x MOPS, 4,5 ml 37%iges Formaldehyd

2.2.3.7. Reverse Transkription

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/µl) der Firma Invitrogen oder dem Revert Aid H Minus Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo SCIENTIFIC. Es wurden Oligo(dT)-Primer verwendet und stets strikt nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.2.3.8. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR; SAIKI et al., 1988) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Teilbereichen. Es wurden standardmäßig die rekombinante *Taq* Polymerase MolTaq (Molzym) oder AccuPrime (Invitrogen) verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Abhängig von der Größe der zu amplifizierenden Teilbereiche, der *Taq* Polymerase sowie den

verwendeten Primern (Tabelle 6.1 bis 6.6, Anhang) wurde die Temperatur innerhalb der verschiedenen Schritte der Reaktion variiert. Zur Erhöhung der Ausbeute der PCR wurde in einigen Fällen eine nested PCR durchgeführt. Dies bedeutet, dass zwei PCRs aufeinander folgen. Dabei wird in der 2. PCR ein Primerpaar verwendet, das innerhalb des in einer ersten PCR hergestellten DNA-Teilbereichs bindet.

2.2.3.9. Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Zur Vervollständigung von 3'- und 5'-Enden der cDNA wurde die RACE Methode gewählt. Diese Methode beruht auf der selektiven Bindung eines 5'-RACE Adapters an die Monophosphatgruppe der mRNA, der zuvor die 5' Cap-Struktur entfernt wurde mit anschließender RT-PCR (MARUYAMA und SUGANO, 1994; VOLLOCH et al., 1994; SCHAEFER, 1995). Die RACE wurde mit dem Generacer Kit der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die 5' RACE wurden 5 µg isolierte RNA eingesetzt und in der RT-PCR wurden Random Hexamere als Primer verwedet. Für die 3' RACE wurden ebenfalls 5 µg RNA eingesetzt und mit Oligo(dT)-Primern revers transkribiert. Die Amplifikation von spezifischen Sequenzabschnitten erfolgte mit gen- und adapterspezifischen Primern in einer PCR und nested PCR (Tabelle 6.3 und 6.4, Anhang).

2.2.3.10. Klonierungen

Klonierungen dienen dem gezielten Einbringen bestimmter DNA-Abschnitte in Vektoren, diese werden in Bakterienzellen transformiert, vervielfältigt und aufgereinigt. Dann können sie sequenziert werden. Bei den als Vektoren verwendeten Plasmiden handelt es sich um zirkuläre doppelsträngige extrachromosomale DNA-Moleküle, die sich in Bakterienzellen vervielfältigen lassen.

2.2.3.10.1. TA-Klonierungen

TA-Klonierungen machen sich die Eigenschaft der *Taq* DNA Polymerasen sequenzunabhängig am 3'-Ende der synthetisierten DNA ein überhängendes Adenosin anzuhängen zunutze. Dieses kann dann in einen linearisierten Vektor mit einem 5' Desoxythymidinüberhang ligiert werden.

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde hier das pGEM-T (Easy) Vector System der Firma Promega verwendet. Bei diesem erfolgt die Ligation des PCR-Fragments in den Vektor durch eine T4-DNA Ligase, die die Bildung einer Phosphodiesterbrücke aus einer

Hydroxid- und einer Phosphatgruppe katalysiert. Das Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.3.10.2. Gerichtete Klonierungen

Gerichtete Klonierungen wurden angewendet, um DNA-Fragmente in die entsprechenden Vektoren für eine Expression in S2 Zellen zu klonieren. Dabei wurden die DNA-Fragmente am 3'- und am 5'-Ende mittels PCR mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen versehen (EcoRV und NotI). Der verwendete Vektor (pMT/V5-His B) wies Schnittstellen für dieselben Restriktionsenzyme auf. Die gewählten Restriktionsenzyme wiesen unterschiedliche Erkennungssequenzen auf. Vektor und Konstrukt wurden mit den beiden Restriktionsenzymen sequenziell verdaut und anschließend mittels einer T4-DNA Ligase ligiert.

2.2.3.10.3. Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA-Fragmenten und Vektoren mit Restriktionsenzymen erfolgte zum einen zur Herstellung von Expressionskonstrukten und zum anderen, um zu überprüfen, ob das Integrat innerhalb eines Vektors die richtige Größe besaß. Für den Verdau wurden TypII-Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die doppelsträngige DNA an bestimmten Erkennungssequenzen schneiden. Die Restriktionsendonukleasen wurden von NEB (New England Biolabs) oder Fermentas (St. Leon Roth) bezogen. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.2.3.10.4. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren erfolgte mit einer T4-DNA Ligase. Dabei wurden ausschließlich Konstrukte mit komplementären überhängenden Enden (sticky ends) ligiert. Ligationsansätze hatten immer ein Volumen von 10 µl, wobei der Vektor in einer Konzentration von 50-100 ng und das zu ligierende Fragment in 3-5 fachen molarem Überschuss vorlag. Das Enzym sowie ein ATP-haltiger Puffer waren weitere Bestandteile. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C.

2.2.3.10.5. Transformation

Die Transformation bereits kompetenter Zellen (JM109, Promega oder Rosetta2(DE3)pLysS, Novagen) erfolgte mittels Hitzeschock. Dabei wurden die Zellen zunächst 20 min auf Eis aufgetaut, mit 1-6 µl Ligationsansatz versetzt und für 30-50 sec

auf 42°C erhitzt. Anschließend wurden sie 2 min auf Eis abgekühlt und auf ein Endvolumen von 275 µl mit L-Medium aufgefüllt. Zur Regeneration der Zellen und Ausbildung ihrer Antibiotika-Resistenz wurden sie für 60-90 min bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurden sie auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika bzw. Indikatorplatten (vgl. 2.2.1.2.) ausplattiert und über Nacht bei 37°C gelagert.

2.2.3.10.6. Präparation von Plasmid DNA

Die Präparation von Plasmid DNA erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I der Firma PeqLab. Dieses beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Plasmiden (BIMBOIM und DOLY, 1979). Die DNA-Präparation erfolgte aus Übernachtkulturen (vgl. 2.2.1.3.). Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.2.3.11. Phenol-Chlorophorm Extraktion

Um präparierte Plasmid DNA für weitere Versuche von störenden RNasen zu befreien, wurde eine Phenol-Chlorophorm Extraktion durchgeführt. Dieser schloss sich immer eine Fällung der DNA mit Alkohol an. Die Extraktion erfolgte über ein 2-Phasen System, bei dem die Proteine in der organischen Phase gelöst werden, während sich die DNA in der wässrigen Phase befindet. Die DNA wurde mit dem gleichen Volumen PCI (Phenol Chlorophorm Isoamylalkohol 25:24:1) versetzt und 5 min durch Vortexeren und Invertieren vermischt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei RT. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen CI (Chlorophorm Isoamylalkohol 49:1) versetzt, wieder vermischt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die darin vorhandenen Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt.

2.2.3.12. Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die Ethanolfällung diente der Reinigung der Nukleinsäuren von anderen Komponenten. Es wird sich dabei die schlechte Löslichkeit von Nukleinsäuren in Ethanol zunutze gemacht. Des Weiteren benötigen die Nukleinsäuren zweiwertige Kationen zum Ausfallen. Die Nukleinsäuren wurden mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2-5,4) versetzt und vermischt. Außerdem wurden 2,5 Volumen 100%iger Ethanol hinzugegeben. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -80°C. In einem Zentrifugationsschritt bei 4°C und 20 000 x g wurden die gefällten Nukleinsäuren pelletiert und mit 5 Volumen 70%igem Ethanol gewaschen. In einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 12 000 x g wurden die restlichen Salze gelöst, das Pellet getrocknet und in H_2O resuspendiert.

2.2.3.13. Sequenzierung

Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte dort nach der Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977). Die für die Sequenzierungen verwendeten Primer sind in Tabelle 6.6, Anhang zu finden.

2.2.4. Analyse der relativen Genexpression mittels Realtime qRT-PCR

In einer Realtime qRT-PCR (WANG et al., 1989; HIGUCHI et al., 1993) wurde die quantitative Genexpression analysiert. Bei dieser Methode werden PCR-Produkte während ihrer Entstehung (in „realtime“) hochspezifisch detektiert. Es wurde die SYBR Green Methode in Kombination mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet, wobei während der exponentiellen Phase der PCR die Fluoreszenz des in die doppelsträngige DNA interkalierenden SYBR Greens detektiert und verarbeitet wird. Es wurden die relativen Genexpressionen der Gene Hämocyanin 1 und 2 (SdeHc1 und 2), der Prophenoloxidase 1, 2 und 3 (SdePPO1-3) sowie der Referenzgene β-Actin und RPLP0 im Ei und in der Mitteldarmdrüse des Hundertfüßers *S. dehaani* untersucht. Hierfür wurden 775 ng RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Von allen zu untersuchenden Proben wurden Tripletts angelegt, die zur Reduktion des Pipettierfehlers aus einem Mastermix stammten. Für eine PCR wurden 10 µl SYBR Green, 1 µl cDNA, 0,5 µl Primer forward (10 µM), 0,5 µl Primer reverse (10 µM) sowie 8 µl Wasser eingesetzt. Ebenfalls wurde pro Gen ein Triplett einer „No Template Control“ (NTC, Negativkontrolle), die keine cDNA enthielt, angelegt.
Des Weiteren wurden Standardproben mitgeführt (Plasmide, die das entsprechende Genfragment enthielten), von denen die genaue Kopienzahl/µl bekannt war. Von ihnen wurde eine serielle 10-fach Verdünnung von 10^8 bis 10^3 angesetzt und eine Standardkurve erstellt. Mit Hilfe dieser Standardkurve konnte die absolute Kopienanzahl in den Proben sowie die PCR-Effizienz errechnet werden.
Die qRT-PCR erfolgte in 96-Well-Platten (biolab products) nach dem in Tabelle 2.7 beschriebenen Standardprogramm.

Tabelle 2.7: Standardprogramm bei einer qRT-PCR Reaktion

Reaktionsschritt		Dauer	Temperatur
Primäre Denaturierung		10 min	95°C
Denaturierung	40 Zyklen	15 sec	95°C
Annealing		15 sec	58°C
Elongation (Detektion)		30 sec	72°C
Finale Elongation		10 min	72°C

Der PCR schloss sich eine Schmelzpunktanalyse aller Proben an, um mögliche Primerdimere sowie unspezifische Amplifikate zu identifizieren.

2.2.4.1. Auswertung der qRT-PCR Daten

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der ΔΔCt-Methode (LIVAK und SCHMITTGEN, 2001), bei der die relative Genexpression evaluiert wird. Dafür wurden die aus den technischen Replikaten gemittelten Ct-Werte verwendet. Die so errechneten relativen Expressionsverhältnisse wurden mit den absoluten Kopienzahlen multipliziert und auf Kopienzahlen pro µg eingesetzter RNA gebracht. Bezogen wurde die relative Genexpression auf die Mitteldarmdrüse. Die Auswertung erfolgte sowohl mit dem Referenzgen β-Actin als auch mit RPLP0.

2.2.5. Sequenz- und phylogenetische Analyse

Ermittelte Sequenzen wurden zunächst mit einer Online-Software (http://web.expasy.org/translate/) in Aminosäuresequenzen translatiert und dann auf Proteinebene analysiert. Dazu zählte die Überprüfung von Länge und theoretischer Molekülmasse sowie die Suche nach putativen Signalpeptiden (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) und N-Glykosylierungsstellen (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). Zum Vergleich einzelner Sequenzen miteinander wurden Sequenzalignments mit der Online-Software MAFFT version 7 (KATOH und STANDLEY, 2013) erstellt und in der Software GeneDocV. 2.7.000 (NICHOLAS et al., 1997) bearbeitet.

Das als Grundlage für den in dieser Arbeit erstellten Stammbaum fungierende multiple Sequenzalignment wurde mit Sequenzdaten von Cheliceraten-, Pancrustaceen- und Myriapodenhämocyaninen sowie mit Phenoloxidasesequenzen von Pancrustaceen und Myriapoden ergänzt. Aus diesem Alignment wurde mit der Software MrBayes Version

3.1.2 (HUELSENBECK und RONQUIST, 2001) unter Annahme des WAG-Modells (WHELAN und GOLDMAN, 2001) und einer Gamma-Verteilung der Substitutionsraten ein Stammbaum erstellt. Diese auf der Bayes´schen Analyse basierende Software berechnet Wahrscheinlichkeiten der Aufspaltungen eines Stammbaumes, welche als posterior probabilities bezeichnet werden. Die Wahrscheinlichkeiten des Stammbaums werden mit der Wahrscheinlichkeit der Daten bei einem gegebenen Stammbaum multipliziert und das Produkt durch die Summe aller Wahrscheinlichkeiten geteilt. Da sich das Produkt nicht errechnen lässt, wird mit Hilfe des Metropolis-Hastings-Green-Algorithmus, eine Variation der Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo Simulation, dieser Wert angenähert. Es werden eine cold chain und drei heated chains verwendet, um den größtmöglichen likelihood-Wert für einen Stammbaum zu finden. Es wurden 5 Millionen Generationen analysiert, von der jede 100ste Generation in die Berechnung mit einbezogen wurde, da aufeinander folgende Generationen korrelieren. Von den 50 000 erstellten Stammbäumen wurden die ersten 10 000 als burnin verworfen und aus den verbleibenden 40 000 ein Konsensusbaum berechnet.

2.2.6. Rekombinante Expression von Proteinen im prokaryotischen System

Die rekombinante Expression des larvalen Serumproteins 2 (LSP2) von *D. melanogaster* bzw. der Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* erfolgte in dem *E. coli* T7/pET-System in dem Expressionsstamm Rosetta2(DE3)pLysS in 1 l bzw. 100 ml Kulturen (abgewandelt nach HEFENBOCK, 2008). Diese wurden mit Übernachtkulturen versetzt und wuchsen, bis sie eine optische Dichte von OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 erreicht hatten. Die Expression wurde durch die Zugabe von 0,4 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und für 12 h bei 27°C bzw. 3 h bei 37°C durchgeführt. Vor der Zugabe des IPTGs bzw. nach Abschluss der Expression wurde eine Induktions-, bzw. Expressionskontrolle abgenommen und direkt mit Probenpuffer (4 x Lämmli) versetzt.

2.2.6.1. Larvales Serumprotein 2 von *D. melanogaster*

Nach der Expression wurden die Bakterienzellen bei 4°C und 4500 x g eine Stunde pelletiert, in 20 mM Tris/HCl, pH 8,5 resuspendiert und für min. eine Nacht bei -20°C gelagert. Dem 2-stündigen DNase-/RNase-Verdau bei 37°C ging der Aufschluss der

Zellen durch Sonifizieren voraus. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4000 x g und 4°C für 60 min, bei dem der lösliche Proteinüberstand abgetrennt wurde.

2.2.6.2. Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas*

Im Anschluss an die Expression wurden die Bakterienzellen für 1 h bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert und das Pellet in Stabilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$) resuspendiert. Es folgte der Aufschluss der Zellen durch Sonifizieren und ein DNase-/RNase-Verdau für 15 min bei RT. Der lösliche Proteinüberstand wurde von den Zelltrümmern durch 60-minütiges Zentrifugieren bei 4000 x g und 4°C abgetrennt.

2.2.7. Expression der Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* im prokaryotischen System unter Anwesenheit von $CuCl_2$

Die rekombinante Expression des PelHc4 fand wie unter 2.2.6. beschrieben statt. Allerdings wurde zusätzlich zur Induktion der Expression durch das IPTG auch 20 µM $CuCl_2$ zu den Bakterienzellen gegeben (nach DIRKS-HOFMEISTER et al., 2012). Anschließend wurde wie für das Hämocyanin beschrieben vorgegangen.

2.2.8. Expression der Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* in Insektenzellen

2.2.8.1. Transfektion der S2 Zellen

Die Transfektion der Wildtyp (WT) S2 Zellen mit verschiedenen Palinurushämocyanin-Konstrukten (Tabelle 2.8; im Vektor pMT/V5-His B) erfolgte mit dem Nanofection Kit der Firma PAA (Pasching) nach Angaben des Herstellers. Gleichzeitig wurden die WT S2 Zellen mit dem pCoHygro Vektor transfiziert, welcher das *E. coli* Hygromycin-Resistenzgen trägt (GRITZ und DAVIES, 1983). Dieser verleiht den transfizierten Zellen die Möglichkeit mit dem Antibiotikum Hygromycin B selektiert zu werden (PALMER et al., 1987). Außerdem wurde zu Kontrollzwecken ein Leervektor transfiziert. Das hier zur Transfektion verwendete Nanofectin Kit besteht aus einem positiv geladenen Polymer, das DNA binden kann und sich in einem Nanopartikel befindet. Dieser Nanopartikel schützt die eingebettete DNA vor Degradation durch Nukleasen und begünstigt aufgrund seiner geringen Größe die Aufnahme in die Zellen.

Tabelle 2.8: Modifikationen der verschiedenen Expressionskonstrukte

Konstrukt PelHc4	Modifikationen
Strep II Kozak	C-terminaler *Strep*-tag II angefügt, modifizierte Kozaksequenz
Strep II	C-terminaler *Strep*-tag II angefügt
His Kozak	C-terminaler His-tag angefügt, modifizierte Kozaksequenz
His	C-terminaler His-tag angefügt

2.2.8.2. Selektion der transfizierten S2 Zellen

Die Selektion der transfizierten S2 Zellen erfolgte mit dem Antibiotikum Hygromycin-B. Dieses wurde in einer Endkonzentration von 300 µg/ml im Vollmedium eingesetzt. Dabei wurde alle fünf Tage das Medium mit Antibiotikum gewechselt. Neben den transfizierten S2 Zellen wurden bei der Selektion ebenfalls WT Zellen kultiviert. Sobald diese im Vitalitätstest mit Trypanblau als „tot“ identifiziert wurden, konnte die Selektion beendet werden. Eine Selektion dauerte in der Regel drei bis vier Wochen. Anschließend konnten die Zellen passagiert und Dauerkulturen angelegt werden.

2.2.8.3. Expression in S2 Zellen

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten pMT/V5-His B Vektor handelt es sich um einen Vektor, der den Vorteil einer induzierbaren Expression des rekombinanten Proteins durch den Metallothioninpromotor bietet (MARONI et al., 1986; BUNCH et al., 1988). Die Induktion der Expression erfolgt mit 500 µM $CuSO_4$ (Endkonzentration). Vor der Expression wurden die Zellen gewaschen, gezählt und auf eine Zelldichte von ca. 2 x 10^6 Zellen/ml gebracht. Sie wurden in 25 ml Ansätzen in 175 cm^2-Kulturflaschen überführt. Es erfolgte zunächst eine Inkubation für 6 h bei 27°C, dann wurden die Zellen mit dem steril filtrierten $CuSO_4$ versetzt. Die Expression dauerte zwischen 24 und 96 h. Anschließend wurden die Zellen bei 100 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 aufgenommen. Das Pellet sowie die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.9. Herstellung der Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* im *in vitro* Expressionssystem

Ein weiterer Ansatz zur Herstellung von richtig gefaltetem *P. elephas* Hämocyanin war die Nutzung des *in vitro* Expressionssytems der Firma NEB (New England Biolabs).

Dieses zellfreie Transkriptions-/Translationssytem stammt aus *E. coli* und bietet die Möglichkeit in relativ kurzer Zeit nicht modifizierte Proteine herzustellen. Die Translation wird dabei durch die Zugabe der DNA initiiert. Das Vorgehen erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

2.2.10. Aufreinigung von Proteinen

2.2.10.1. Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltrationschromatographie handelt es sich um eine Methode zur Größenfraktionierung von Molekülen. Dabei können große Moleküle die Matrix einer Säule schneller passieren als kleinere. Die Matrix wird aus porösen Kügelchen eines Kohlenhydratpolymers gebildet, in die kleine Moleküle eindringen können, größere aber nicht. Dadurch entsteht eine Korrelation zwischen Zeitpunkt der Elution von der Säule und Größe der Proteine. Die Gelfiltration wurde mit der ÄKTApurifier (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala) unter Verwendung einer „HiLoad™ 26/60 Superdex 200 prep grade“ Säule (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit 1 l Dialysepuffer (steril filtriert). Es wurde max. 1 ml Proteinprobe auf die Säule gegeben. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min und es wurde in einem Volumen von 3 ml fraktioniert.

2.2.10.2. Affinitätschromatographie mittels *Strep*-tag II

Die Aufreinigung von Konstrukten mit einem *Strep*-tag II erfolgte über eine *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. Bei dieser Chromatographie handelt es sich um ein modifiziertes Streptavidin-Biotin-System. In diesem weist die als *Strep*-tag II bezeichnete Peptidsequenz (NH2-Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-COOH; SCHMIDT et al., 1996) eine hohe Affinität zu dem Streptavidinderivat *Strep*-Tactin auf. Da das Säulenmaterial der hier verwendeten Säulen daraus besteht, binden Proteine, die mit einem *Strep*-tag II versehen sind, reversibel an dieses Material. Die Elution erfolgte mit Desthiobiotin. Bei der Verwendung der manuellen gravity flow columns der Firma IBA und der *Strep*Trap HP der Firma GE Healthcare wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Dabei wurden alle Puffer selber ohne EDTA angesetzt und vor Gebrauch steril filtriert.

2.2.11. Rekonstitution des LSP2

Nach abgeschlossener Aufreinigung und Einengen auf ca. 1 ml mittels Amicon Ultra 50 (Millipore, Schwalbach), wurde das LSP2 zur Rekonstitution gegen einen Natrium- und Kaliumphosphat-haltigen Puffer in Anwesenheit von N-Phenylthioharnstoff und Dithiotreitol dialysiert (Tabelle 2.9). Die Dialyse erfolgte in einem Dialyseschlauch mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 10 kDa für 96 h bei 4°C. Anschließend wurde die umgepufferte Probe aus dem Dialyseschlauch entnommen und einer Größenfraktionierung unterzogen, um einzelne Untereinheiten von zusammengelagerten Hexameren zu trennen. Das rekonstituierte LSP2 konnte dann für Strukturanalysen eingesetzt werden.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Puffer für die Dialyse

Puffer	Zusammensetzung
Kaliumphosphatpuffer, pH 4,8	140 mM NaCl, 15 mM KH_2PO_4
Natriumphosphatpuffer, pH 9,0	140 mM NaCl, 18,81 mM Na_2PO_4
Dialysepuffer, pH 6,3	10 mM $MgCl_2$, 1 l Kaliumphosphatpuffer, pH 4,8, 300 ml Natriumphosphatpuffer, pH 9,0; Stabilisatoren: 15% N-Phenylthioharnstoff; 15% Dithiotreitol

2.2.12. Kupfereinbauversuche in das rekombinant hergestellte PelHc4

2.2.12.1. Kupfereinbau nach JENSEN et al. (1999)

Bei Kupfereinbauversuchen nach JENSEN et al. (1999) wurde generell ein Puffer verwendet, welcher sich aus 1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 200 µM $CuCl_2$ sowie 10 mM Ascorbinsäure ($TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer) zusammensetzte . Es gab 2 Versuchsansätze (A und B), die jeweils noch variiert wurden (Tabelle 2.10).

In Versuchsansatz A wurde 1 mg rekombinant hergestelltes Hämocyanin verwendet. Dieses wurde 1:10 mit dem $TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer versetzt und bei 10°C jede Stunde die Absorption bei 340 nm gemessen bzw. alle 24 h ein Absorptionsspektrum mit einem UV/VIS Spektrometer gemessen.

Versuchsansatz B wurde wie Versuchsansatz A durchgeführt, zusätzlich wurde dem Puffer noch 1 M PPS (3-(1-Pyridinio)-1-propansulfonat) zur Erhöhung der Löslichkeit des Proteins zugesetzt.

Tabelle 2.10: Variationen der Versuchsansätze A und B

Versuchsansatz	Variation 1
A	Protein auf pH 6 umgepuffert, um Kupfereinbau zu unterstützen
B	Protein auf pH 6 umgepuffert, um Kupfereinbau zu unterstützen

Neben den Variationen A/A1 und B/B1 gab es noch weitere Modifikationen dieses Versuchs. So wurde das Hämocyanin (1 mg in 1 ml) gegen den $TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer bei 4°C für unterschiedliche Zeiträume dialysiert. Außerdem erfolgte der Versuch in einem $TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer mit einem pH Wert von 7,0. Auch wurde die Konzentration der Ascorbinsäure von 10 mM auf 100 µM reduziert.

2.2.12.2. Kupfereinbau nach WIGFIELD und GOLTZ (1993)

Bei diesem Ansatz gab es drei Versuche, die sich in ihrem pH Wert von 6,0, 6,5 und 7,0 unterschieden. Es wurden $1{,}25*10^{-5}$ M rekombinantes PelHc4 in 50 mM Tris/HCl (verschiedener pH Werte) eingesetzt. Davon wurden 0,2 ml mit 20 µl einer $1{,}25*10^{-4}$ M $CuSO_4$-Lösung versetzt und bei 10°C alle 1 h die Absorption bei 340 nm gemessen. In einem weiteren Versuch wurden dieselben Bedingungen gewählt. Hier wurde die Absorption jedoch nicht nur bei einer Wellenlänge gemessen, sondern es wurden alle 24 h Absorptionsspektren zwischen 250 und 700 nm gemessen.

2.2.12.3. Kupfereinbau nach BROUWER und BROUWER-HOEXUM (1992)

Das in Bakterienzellen rekombinant exprimierte und über eine Affinitätschromatographie aufgereinigte PelHc4 wurde wie von BROUWER und BROUWER-HOEXUM (1992) beschrieben 10 µM eingesetzt und mit 40 µM Cu(I) und 200 µM Glutathion versetzt (BROUWER und BROUWER-HOEXUM, 1992). Nach 4, 6 und 24 h wurden Absorptionsspektren gemessen.

2.2.13. Biochemische Methoden

2.2.13.1. Entnahme von Körperflüssigkeit bei *S. dehaani*

Das Tier wurde bei -20°C für 5 min sediert. Da die Entnahme der Hämolymphe mit einer Spritze nicht möglich war, wurde das Tier seziert und in kleine Gewebestücke zerteilt. Diese wurden in einer Zentrifugationssäule für 10 min bei 10 000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Durchfluss war die Körperflüssigkeit enthalten. Diese wurde 1:2 mit

Myriapoden-Stabilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 20 mM $CaCl_2$, 20 mM $MgCl_2$) sowie 1 mM Pefabloc versetzt. Anschließend wurde sie für 15 min bei 14 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.2.13.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte photometrisch. In einer Proteinlösung ist die Absorption bei 280 nm abhängig von der Anzahl der aromatischen Aminosäuren. Es wird davon ausgegangen, dass bei einer Küvettenschichtdicke von 1 cm eine OD_{280} von 1 einer Hämocyaninkonzentration von ca. 1,1 mg/ml entspricht (LOEWE, 1978).

2.2.13.3. UV/VIS Spektroskopie

Bei einem Zweistrahl UV/VIS Spektrometer strahlt die Lichtquelle ultraviolettes, sichtbares und nahinfrarotes Licht, welches zunächst durch einen Monochromator geschickt wird. Dieser lässt nur Lichtstrahlen der zu messenden Wellenlängen durch. Anschließend fällt der Lichtstrahl auf einen Sektorspiegel. Dieser lässt den Lichtstrahl abwechselnd durch die Probe und einen Vergleichswert fallen. Die nicht von der Probe bzw. vom Vergleichswert absorbierten Strahlen verschiedener Wellenlänge und Intensität werden vom Detektor empfangen, abgeglichen und in einem Spektrum verarbeitet, wobei der Vergleichswert die Nullkurve darstellt. Die zu messende Probe sowie der Vergleichswert befinden sich in einer Quarzküvette. Bei dem verwendeten Gerät wird die Strahlung im VIS Bereich durch eine Halogenlampe und im UV-Bereich durch eine Deuteriumlampe erzeugt. Für die Absorptionsspektren wurden Proteinlösungen unterschiedlicher Konzentration in der Regel in einem Bereich von 250 bis 700 nm gemessen. Bei den Kupfereinbauversuchen wurden 700 µl des Versuchsansatzes gegen 700 µl der Negativkontrolle gemessen.

2.2.13.4. SDS PAGE

Die SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen in Anwesenheit von 0,1% (w/v) SDS unter denaturierenden Bedingungen (LAEMMLI, 1970) nach ihrer molekularen Masse. Es wurden 7,5%- und 10%ige Trenngele sowie 3,9%ige Sammelgele verwendet (Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Pipettierschema für zwei SDS-Gele

Reagenzien	7,5%iges Trenngel	10%iges Trenngel	3,9%iges Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid	2,0 ml	2,66 ml	0,45 ml
1,5 M Tris, pH 8,5	1,75 ml	1,75 ml	-----
0,5 M Tris, pH 6,8	-----	-----	0,8 ml
10% SDS	80 µl	80 µl	30 µl
dest. H_2O	3,92 ml	3,42 ml	2 ml
TEMED	8 µl	8 µl	3 µl
10% APS	80 µl	80 µl	30 µl
Gesamtvolumen	ca. 8 ml	ca. 8 ml	ca. 3,3 ml

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit β-Mercaptoethanol-haltigen 4 x Lämmli-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Gelelektrophorese erfolgte in vertikalen Laufkammern in einem Tris/Glycin-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 V für 90-140 min.
Anschließend wurden die Gele 1 h in Coomassie Färbelösung gefärbt, für eine Stunde entfärbt und in Aufbewahrungslösung bis zur Dokumentation gelagert.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung
1 x SDS-Laufpuffer	23 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,2% SDS
4 x Lämmli-Probenpuffer	1,25 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 1,00 ml Glycerin, 0,25 ml dest. H_2O, 1 Spatelspitze Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol
Coomassie-Färbelösung	2 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 400 ml Methanol, 100 ml Essigsäure (100%), 500 ml dest. H_2O, vor Gebrauch filtrieren
Entfärbelösung	10% Essigsäure, 25% Isopropanol
Aufbewahrungslösung	7,5% Essigsäure

2.2.13.5. Native PAGE

Bei der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese bleibt bei der Auftrennung der Proteine ihre native Konformation erhalten. Es findet also im Gegensatz zu einer PAGE unter denaturierenden Bedingungen keine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe statt. Die native PAGE erfolgte mit den gleichen Puffern wie die SDS PAGE, allerdings wurde bei allen Puffern auf den Zusatz des Detergens SDS verzichtet. Die Proben, in einem Probenpuffer (5 x) aus 50% Glycerin (v/v) und 0,1% Brompenolblau (w/v), wurden nicht aufgekocht, sondern auf Eis gelagert. Die PAGE fand bei 4°C für 127 min statt.

2.2.13.6. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, um Proteine nach einer SDS PAGE elektrophoretisch auf eine Membran zu übertragen und anschließend immunologisch sichtbar zu machen.

Hier wurde eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Der Western Blot erfolgte nach dem Semi-Dry Verfahren (KYHSEANDERSEN, 1984).

2.2.13.6.1. Elektrophoretischer Transfer

Nach der SDS PAGE wurden Gel, Membran und Filterpapier für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Für den Transfer wurde der Blot so aufgebaut, dass eine senkrecht angelegte Spannung dazu führte, dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wanderten. Zur Überprüfung des Transfers konnten die Proteine auf der Nitrocellulosemembran reversibel mit Ponceau S angefärbt werden (Tabelle 2.13).

2.2.13.6.2. Immunologische Detektion

Die immunologische Detektion von Proteinen auf der Membran fand mit einem Antikörper gegen das Hämocyanin von *S. coleptrata*, gegen das von *P. elephas* oder mit dem kommerziell erworbenen Antikörper *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat der Firma IBA statt. Bei letzterem wurde die Immundetektion nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei der Verwendung der Hämocyanin-Antikörper wurde die Membran zunächst mit 2-5% Milchpulver mit oder ohne 0,5% TWEEN in 1 x TBS für 1 h bei RT, zur Vermeidung unspezifischer Bindungen, abgesättigt. Es folgten 90 min Inkubation im Erstantikörper, verdünnt 1:10 000 bis 1:5000 in 1 x TBS. Dieser bindet spezifisch an das entsprechende Hämocyanin, weist aber auch konservierte Bereiche auf, gegen die der Zweitantikörper (aus einer anderen Spezies) gerichtet ist. Dieser wiederum ist an ein Enzymsystem (Alkalische Phosphatase) gebunden, das in einer Farbreaktion reagiert. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde 4 x 5 min in 1 x TBS gewaschen und dann der Zweitantikörper Anti-Rabbit-AP (1:10 000) hinzugegeben. Es folgte ein weiterer 4-facher Waschschritt in 1 x TBS, dann wurde die Membran in AP-Reaktionspuffer äquilibriert und anschließend erfolgte die Visualisierung in der Detektionslösung. Die Reaktion wurde durch die Umlagerung der Membran in H_2O gestoppt.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung der Puffer für den Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer	2,9 g Glycin, 5,8 g Tris, 0,37 g SDS, 200 ml Methanol, 800 ml dest. H_2O
Ponceau S	5% Essigsäure, 0,02% Ponceau S
5 x TBS	100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 750 mM NaCl
NBT	75 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid
BCIP	50 mg/ml BCIP in reinem Dimethylformamid
AP-Reaktionspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl
Detektionslösung	10 ml AP-Puffer, 33 µl BCIP, 66 µl NBT

2.2.13.7. Veränderung der Konzentration von Proteinlösungen

Für viele Versuche mussten Proteine in hoher Konzentration bzw. in geringen Volumina eingesetzt werden. Dies erfolgte bei Volumina unter 500 µl durch Vakuumzentrifugation und bei größeren Volumina mit Amicon Ultra 50 Zentrifugationsröhrchen (Millipore, Schwalbach). Diese haben einen Filter mit einer Ausschlussmasse von 50 kDa, d.h. nur Moleküle, die eine molekulare Masse unter 50 kDa haben, können diesen passieren.

2.2.13.8. Aktivitätsnachweis von Phenoloxidasen

Generell gibt es zwei Möglichkeiten, um die Aktivität von Phenoloxidasen nachzuweisen: den Dopachrom-Assay (MASON, 1948) und den MBTH-Assay (PIFFERI und BALDASSARI, 1973). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich der MBTH-Assay verwendet, welcher ca. achtmal sensitiver als der Dopachrom-Assay ist. Dies beruht auf dem höheren molaren Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs. Er entsteht in einer Reaktion zwischen Besthorns-Hydrazon mit Dopachinon. Dabei reagiert das D,L-Dopa, das von der Phenoloxidase zu Dopachinon umgesetzt wurde, mit dem Besthorn-Hydrazon (MBTH) zu einem rosa Farbstoff. Dieser ist stabil und reagiert nicht weiter. Wie von JAENICKE (2002) beschrieben, wurde hier auf den Zusatz von 2% (v/v) Dimethylformamid verzichtet und 0,45 mM MBTH eingesetzt. Der Aktivitätsnachweis erfolgte in nativen Polyacrylamidgelen oder auf einer Nitrocellulose-Membran. Als Positivkontrolle wurde in beiden Fällen kommerziell erworbene Champignon Tyrosinase eingesetzt (30 ng). Beim Nachweis in einem nativen Polyacrylamidgel wurde dieses nach abgeschlossener Elektrophorese zunächst für 15 min in 0,1 M Phosphatpuffer inkubiert und anschließend in die Färbelösung gegeben bis die Signale erschienen. Auf die Nitrocellulosemembran wurden zu 5 µl Probe dasselbe Volumen Färbelösung gegeben. Als Negativkontrolle fungierten 5 µl Färbelösung.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung der Puffer für den MBTH-Assay

Puffer	Zusammensetzung
0,1 M Phosphatpuffer, pH 7	61,5 mM Na_2HPO_4, 38,5 mM $NaHPO_4$
Dopaminpuffer	500 mM Dopamin in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7 (eiskalt)
Färbelösung	1 ml Dopaminpuffer, 0,45 mM MBTH, 10 mM SDS, 3% Ethanol

2.2.14. Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven

Sauerstoffbindungskurven wurden nach der fluorimetrisch polarographischen Methode gemessen (LOEWE, 1978). Diese Methode beruht darauf, dass deoxygeniertes Hämocyanin bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge um die 290 nm fluoresziert. Die Intensität dieser Fluoreszenz nimmt mit steigender Sauerstoffsättigung des Hämocyanins linear ab. Die Fluoreszenz wurde mit einem Standard Fluorimeter bei 338 nm gemessen, während die Sauerstoffsättigung der Hämocyaninlösung simultan mit einer Sauerstoffelektrode determiniert wurde. Aus der sich ergebenden Sauerstoffbindungskurve wurde der Halbsättigungswert P_{50} abgelesen und nach Umwandlung in einen Hill-Plot die Kooperativität bestimmt. Sauerstoffbindungskurven wurden von Prof. Dr. N. Hellmann, Universität Mainz, angefertigt.

2.2.15. Strukturanalysen

2.2.15.1. Circhulärdichroismus-Spektroskopie

Circhulärer Dichroismus (CD) kann beobachtet werden, wenn optisch aktive Substanzen links und rechts circhulär polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren (ATKINS und DE PAULA, 2005). Aus CD-Spektren erhält man Informationen über die Sekundärstruktur von Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren. Diese Methode erfordert die Anwesenheit von Asymmetriezentren in einer Probe, da diese für die optische Aktivität verantwortlich sind. Bei Proteinen stellt jedes C_α ein Asymmetriezentrum dar. Entscheidend für das CD-Spektrum sind allerdings im Wesentlichen die Asymmetriezentren der Seitenketten. Ein CD-Spektrum wird in einem Wellenlängenbereich zwischen 190 und 250 nm gemessen. Mittels Dekonvolution wird aus den gemessenen Daten ein *fit* erstellt, der eine Aussage über den prozentualen Anteil an α-Helices, β-Faltblättern und Coils liefert.

CD-Spektren wurden von der AG Prof. Dr. Betzel, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, der Universität Hamburg, durchgeführt. Dafür wurde eine Proteinlösung mit einer Konzentration von ca. 100 µg/ml und einem Volumen von ca. 100 µl benötigt.

2.2.15.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Bei der hier durchgeführten Elektronenmikroskopie (EM) von Proteinlösungen muss die Probe zuvor mit einem Schwermetall, 1-2%igem Uranylacetat, negativ angefärbt werden, um ausreichend Kontrast zu schaffen. Der hochenergetische Elektronenstrahl trifft im EM auf die Probe, wobei die Elektronen umso mehr abgelenkt werden, je höher die Atommasse der Teilchen ist, auf die sie treffen. Das entstehende Zwischenbild wird durch das vorhandene Linsensystem noch stark vergrößert und kann digital sichtbar gemacht werden. Dunkle Bereiche zeigen eine hohe, hellere eine weniger hohe Elektronendichte an. Mit Elektronenmikroskopen kann eine Auflösung von bis zu 0,1 nm erreicht werden.
Elektronenmikroskopische Bilder wurden im botanischen Institut der Universität Hamburg in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Dr. Quader oder im Zoologischen Museum der Universität in Zusammenarbeit mit der AG Friedrich erstellt. Es wurden immer kommerziell erworbene bereits mit Kohlenstoff befilmte Grids (Science Services) verwendet. Diese wurden im Heinrich-Pette-Institut, Abteilung Elektronenmikroskopie, beglimmt. Proteinlösungen wurden in Konzentrationen zwischen 0,01 und 1 mg/ml auf die Grids aufgetragen. Dabei wurden 10 µl Proteinlösung auf das Grid getropft, 10 sec inkubiert und anschließend mit einem Kimtech Tuch abgesaugt. Dem folgten drei Waschschritte jeweils für 30 sec mit 20 µl H_2O. Die Negativkontrastierung wurde mit 10 µl 1-2%igem Uranylacetat für 10 sec durchgeführt. Anschließend wurden die Grids getrocknet und konnten bis zur Dokumentation bei RT gelagert werden.

2.2.15.3. 3D-Rekonstruktion aus „negative staining“

Bei dieser Methode wird zunächst eine Vielzahl negativ gefärbter elektronenmikroskopischer Bilder mit einer sehr hohen Auflösung erzeugt. Mit den entsprechenden Computerprogrammen kann das Protein dann dreidimensional rekonstruiert werden, wobei ein molekulares Modell des Gesamtproteins entsteht. Aus diesem Modell lassen sich Positionen einzelner Aminosäuren sowie intramolekulare Verbindungen ablesen.

„Negative staining“ und 3D-Rekonstruktionen wurden von der AG Prof. Dr. Markl, Fachbereich Molekulare Biophysik, an der Universität Mainz durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung von Expressions-, Aufreinigungs- und Rekonstitutionssystemen für Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie

Um Struktur- und Funktionsanalysen an Proteinen durchzuführen, ist es wichtig diese rekombinant herstellen zu können. Insbesondere beim Hämocyanin wäre es interessant den Mechanismus der Kupferbindung durch den Austausch einzelner Aminosäuren genauer zu untersuchen. Da sich die rekombinante Expression der Proteine aus der Hämocyanin-Superfamilie als schwierig erwies, existiert bisher nur die Strukturanalyse eines rekombinanten Hexamerins (RYU et al., 2009). Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Proteinen war bereits gezeigt worden, dass eine rekombinante Expression möglich ist. Für das Hexamerin larvales Serumprotein 2 von *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass eine Expression und Rekonstitution im T7/pET-System möglich ist (HEFENBOCK, 2008). Auch die Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* konnte in ihrer Apoform in diesem System hergestellt werden (DIDIER, 2009). Die Phenoloxidase 3 von *D. melanogaster* wurde in *Drosophila*-Zellen als funktionelles Enzym rekombinant exprimiert (ERTAS, 2009). Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Optimierung der rekombinanten Expression dieser Proteine der Hämocyanin-Superfamilie sowie der Etablierung eines Systems zum erfolgreichen Einbau von Kupfer.

3.1.1. Larvales Serumprotein 2 von *D. melanogaster*

Das larvale Serumprotein 2 von *D. melanogaster* (DmeLSP2) ist ein Hexamerin und stellt somit ein kupferloses Protein der Hämocyanin-Superfamilie dar (ROBERTS et al., 1977; AKAM et al., 1978; MOUSSERON-GRALL et al., 1997). Es bildet eine aus sechs identischen Untereinheiten bestehende Quartärstruktur, wobei jede Untereinheit aus 697 Aminosäuren besteht und eine theoretische molekulare Masse von 83,4 kDa mit Signalpeptid aufweist. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Expressionsskonstrukt wurde von HEFENBROCK (2008) hergestellt. Es bestand aus der für das LSP2 kodierenden Sequenz, ligiert in den Vektor pET24a. Ihm fehlte das Signalpeptid, da dieses die rekombinante Expression im T7/pET-System behindert (HEFENBOCK, 2008).

Die theoretische molekulare Masse ohne Signalpeptid, jedoch mit *Strep*-tag II, betrug 82,4 kDa.

3.1.1.1. DmeLSP2 - Rekombinante Expression im prokaryotischen System, Aufreinigung und Rekonstitution

HEFENBROCK (2008) konnte zeigen, dass eine Expression von DmeLSP2 im prokaryotischen Expressionssystem möglich ist. Während sie auf den Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS zurückgriff, wurde im Rahmen dieser Arbeit der effizientere Expressionsstamm Rosetta2(DE3)pLysS verwendet. Auch hier konnte nach der rekombinanten Expression für 12 h bei 27°C in 1,5 l Kulturen lösliches Protein im Zellüberstand nachgewiesen werden (Abb. 3.1A). Die Aufreinigung des Proteins erfolgte in einem Einschritt-Protokoll über eine Affinitätschromatographie mittels *Strep*-tag II und nicht wie von HEFENBROCK (2008) beschrieben über eine Ammoniumsulfatpräzipitation mit anschließender Anionenaustauschchromatographie. Durch diese vereinfachte Aufreinigung konnte der Verlust an Protein verringert werden. Nach abgeschlossener Aufreinigung lagen in der Regel über 6 mg LSP2 aus einer 1,5 l Expressionskultur vor. Gleichzeitig konnte reines DmeLSP2 erhalten werden (Abb. 3.1B).

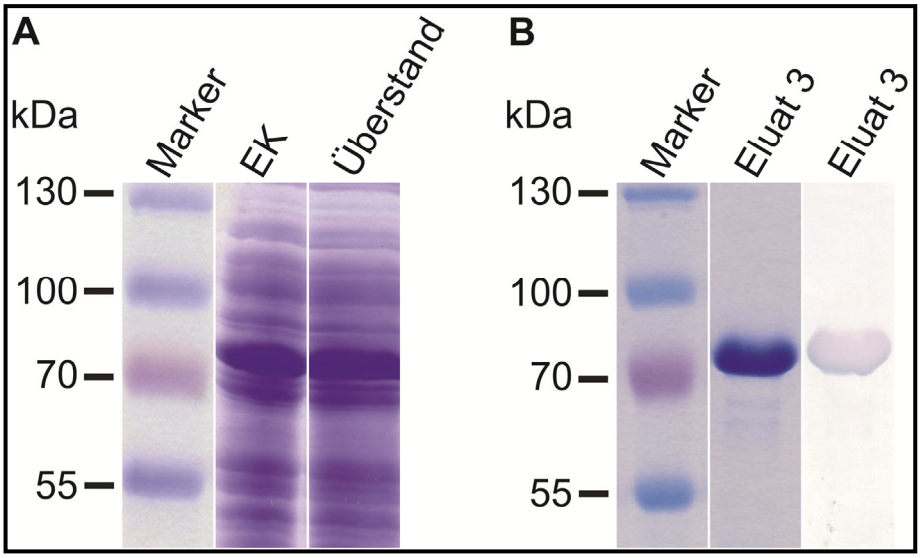
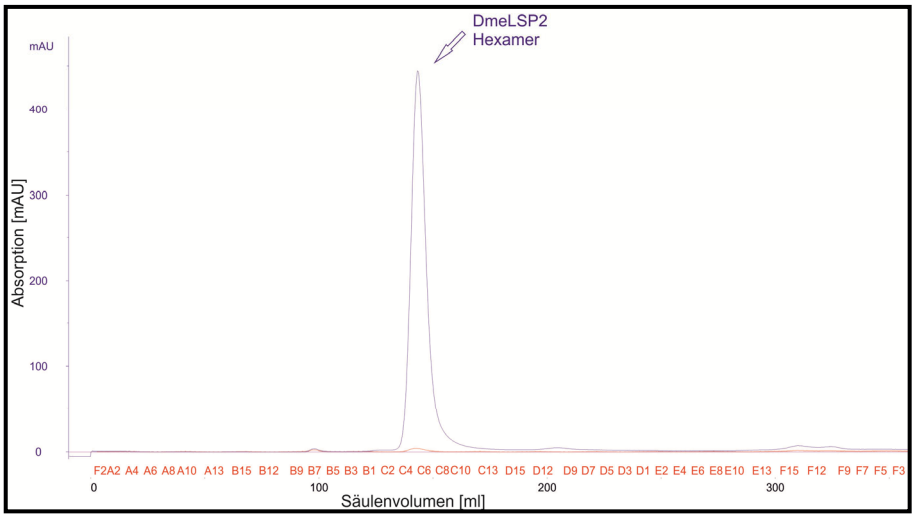


Abb. 3.1: Diskontinuierliche SDS PAGE und immunologischer Nachweis der rekombinanten Expression von DmeLSP2 und anschließender *Strep*-tag Aufreinigung
A) SDS PAGE der Expressionskontrolle (EK) und des Zellüberstandes
B) SDS PAGE (Mitte) und Western Blot (rechts) einer Eluatfraktion (Eluat 3) nach der *Strep*-tag Affinitätsaufreinigung. Verwendeter Antikörper: *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat.

Die Rekonstitution der einzelnen mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten LSP2-Untereinheiten zu einem Hexamer erfolgte durch eine Dialyse für 96 h bei 4°C in Anwesenheit von N-Phenylthioharnstoff (N-PTH) und Dithiotreitol (DTT). Das N-PTH verhindert die Oxidation von Aminosäuren, während das DTT unterstützend auf die

Bildung von Disulfidbrücken wirkt. Der Dialyse schloss sich eine Gelfiltrationschromatographie an, um einzelne Untereinheiten von den rekonstituierten Hexameren zu trennen. Unter Verwendung des gleichen Puffersystems wurde zunächst mit Proteinen bekannter Größe ermittelt bei welchem Säulenvolumen diese eluierten. Daraus ergab sich, dass die Elution eines Großteils des DmeLSP2 bei ca. 450 kDa stattfand (Abb. 3.2 oben). Diese molare Masse entspricht in etwa der des DmeLSP2 Hexamers. Die Elutionsfraktionen wurden proteinbiochemisch mittels SDS PAGE und Western Blot analysiert, um sicher zu stellen, dass es sich tatsächlich um das LSP2 handelt (Abb. 3.2 unten).



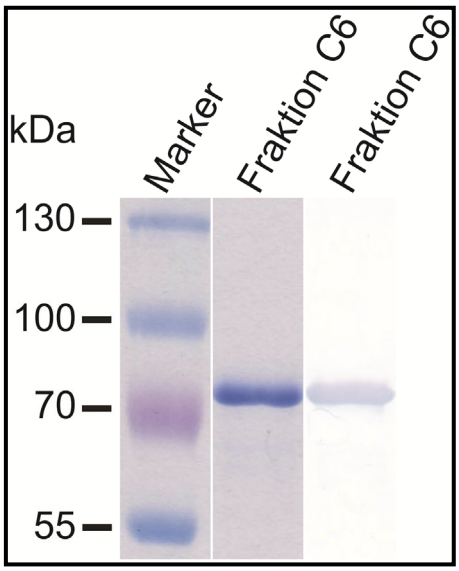


Abb. 3.2: oben: Chromatogramm der Gelfiltration des DmeLSP2
Unten: Diskontinuierliche SDS PAGE (Mitte) und immunologischer Nachweis (rechts) des DmeLSP2 in einer Fraktion der Gelfiltrationschromatographie. Verwendeter Antikörper: *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat.

3.1.1.2. DmeLSP2 - Strukturanalysen

Die Struktur des rekombinant exprimierten und rekonstituierten DmeLSP2 wurde auf drei verschiedenen Wegen analysiert. Es wurde mittels Elektronenmikroskopie überprüft, ob sich tatsächlich Hexamere gebildet haben. Durch ein CD-Spektrum wurden in

Kooperation mit der AG Betzel, Biochemie, Universität Hamburg, Daten über die Sekundärstruktur generiert. Zur Überprüfung der Quartärstruktur wurde in Kooperation mit der AG Markl, molekulare Tierphysiologie, Uni Mainz, aus negativ gefärbten TEM-Aufnahmen eine 3D-Rekonstruktion erstellt. Diese sollte Aufklärung darüber liefern, wie die Untereinheiten im Hexamer angeordnet sind und über welche Strukturen sie miteinander in Kontakt stehen.

In elektronenmikroskopischen Bildern erkennt man das Hexamer des DmeLSP2 als quaderförmige Struktur mit Kantenlängen um die 10 nm (MOUSSERON-GRALL et al., 1997). Wie bereits erwartet, konnten auch bei dem rekombinant exprimierten, rekonstituierten DmeLSP2 auf den elektronenmikroskopischen Bildern (Abb. 3.3) ähnliche Strukturen identifiziert werden. Sie wiesen ebenfalls Kantenlängen um die 10 nm auf. HEFENBROCK (2008) konnte nach der Rekonstitution des rekombinanten DmeLSP2 in elektronenmikroskopischen Bildern neben diesen quaderförmigen Strukturen auch noch deutlich kleinere Strukturen erkennen, die sie als einzelne Untereinheiten definierte. Solche deutlich kleineren Strukturen sind nach dem hier verwendeten Expressions-, Aufreinigungs- und Rekonstitutionsprotokoll eindeutig nicht vorhanden.

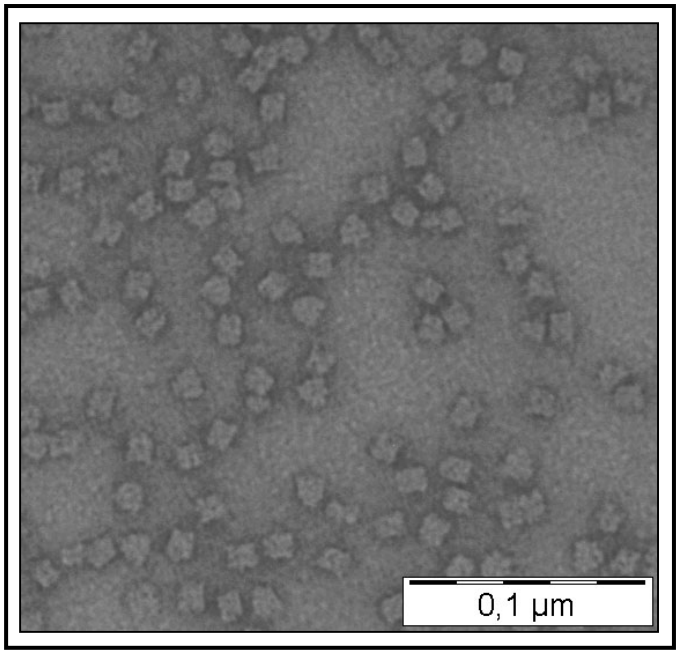


Abb.: 3.3: Elektronenmikroskopische Bilder des rekombinant hergestellten und rekonstituierten DmeLSP2.

Die elektronenmikroskopischen Bilder brachten erste Informationen über die Quartärstruktur des DmeLSP2, lieferten aber keine Information über die Faltung der einzelnen Untereinheiten. Um diese zu überprüfen, wurde ein CD-Spektrum erstellt, wobei das rekombinante, rekonstituierte DmeLSP2 in einer Konzentration von 100 mg/ml

in einem Volumen von 100 µl eingesetzt wurde. Aus dem CD-Spektrum (Abb. 3.4) ergab sich, dass 44% des Proteins als α-Helix vorlagen und 10% als β-Faltblatt gefaltet waren. 48% lagen als Turns und Random Coils vor. Diese Werte wurden mit der Sekundärstruktur eines aus der SWISS-MODEL Datenbank stammenden Modells für natives DmeLSP2 verglichen. Das Modell beruht auf der Kristallstruktur des Hexamerins Arylphorin des chinesischen Eichenseidenspinners *Antheraea pernyi*. Aus diesem geht hervor, dass 21% des Proteins als β-Faltblatt, 27% α-Helix und 52% als Random Coils vorliegen.

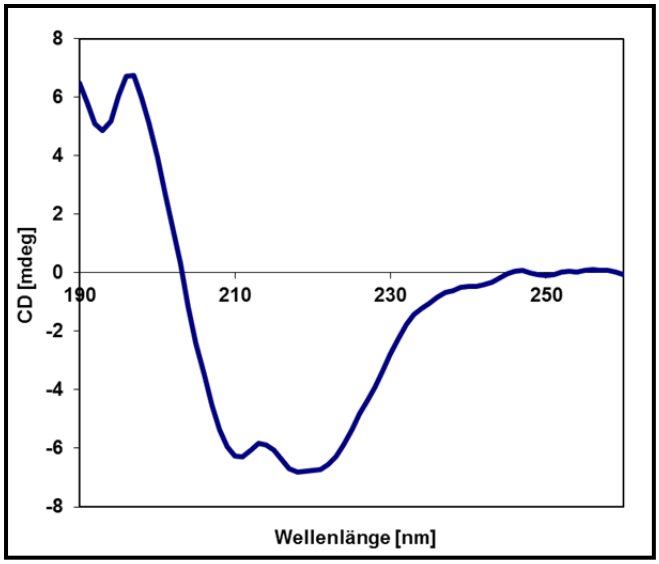


Abb. 3.4: CD Spektrum des rekombinanten rekonstituierten DmeLSP2.

Aus negativ gefärbten TEM-Aufnahmen wurde die 3D-Struktur des DmeLSP2 rekonstruiert (Abb. 3.5A-D). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich um ein Hexamer handelt. In die 3D-Struktur wurde die Sekundärstruktur der Untereinheiten „gefittet“. Dabei ist aufgrund der Auflösung von 20 Å nicht eindeutig zu erkennen, über welche Strukturen die Untereinheiten bei der Bildung des Hexamers in Kontakt stehen. In der Aufsicht (topview) erscheint das DmeLSP2 grob viereckig, in der Seitenansicht (sideview) hexagonal.

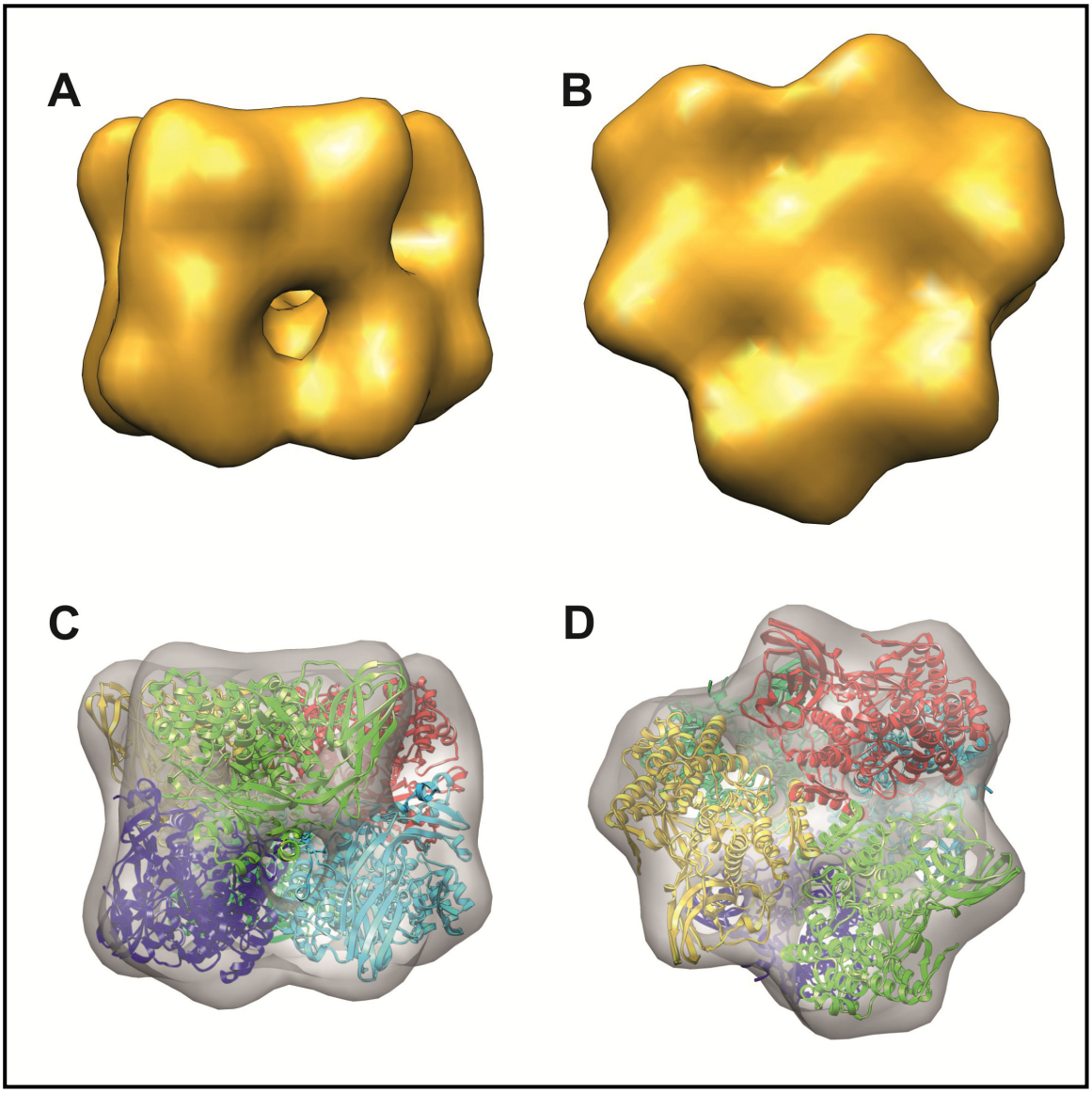


Abb. 3.5: 3D-Rekonstitution des LSP2 von *D. melanogaster* mit einer Auflösung von 20 Å
A) und B) verschiedene Ansichten des Hexamers. A) Topview, B) Sideview
C) und D) in die verschiedenen Ansichten des Hexamers wurde die Sekundärstruktur der einzelnen Untereinheiten eingebettet.

3.1.2. Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas*

Das Hämocyanin der europäischen Languste *P. elephas* ist ein Hexamer, welches aus vier ähnlichen Untereinheiten besteht (MARKL et al., 1979; BELLELLI et al., 1988; NEUTEBOOM et al., 1989; KUSCHE et al., 2003b). Diese unterscheiden sich in weniger als 5% ihrer Aminosäuresequenzen voneinander. Die hier verwendete Untereinheit 4 besitzt ein 15 Aminosäuren langes Signalpeptid, welches für die Expression im T7 System und im *in vitro* Expressionssystem entfernt wurde. Sie hat eine theoretische

Molekülmasse von 79,83 kDa mit und 78,37 kDa ohne Signalpeptid (KUSCHE et al., 2003b). Das für die Expression im prokaryotischen und *in vitro* System verwendete PelHc4 verfügte über einen *Strep*-tag II und kein Signalpeptid. Es wies eine theoretische molekulare Masse von 78,37 kDa auf und lag bereits in dem Vektor pET16b vor (HEFENBOCK, 2008).

3.1.2.1. PelHc4 - Expression im prokaryotischen System

Für die Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* (PelHc4) konnte gezeigt werden, dass nach einer rekombinanten Expression für drei Stunden bei 37°C in 100 ml Kulturen in dem Bakterienstamm Rosetta2(DE3)pLysS lösliches PelHc4 vorlag (Abb. 3.6A). Dieses konnte durch eine Strep-*tag* II Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Abb. 3.6B). Dabei betrug die Ausbeute ca. 1 mg PelHc4 bei einem Expressions-ausgangsvolumen von 10 x 100 ml.

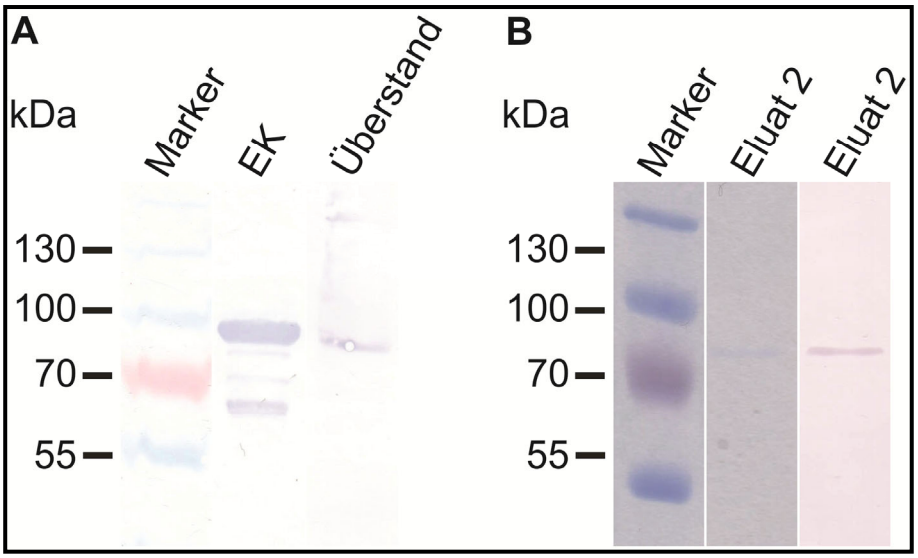


Abb. 3.6: Diskontinuierliche SDS PAGE und immunologischer Nachweis der rekombinanten Expression von PelHc4 und anschließender *Strep*-tag Aufreinigung
A) SDS PAGE der Expressionskontrolle (EK) und des Zellüberstandes
B) SDS PAGE (Mitte) und Western Blot (rechts) einer Eluatfraktion (Eluat 2) nach der *Strep*-tag Affinitätsaufreinigung. Verwendeter Antikörper: *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat.

3.1.2.2. PelHc4 - Expression im prokaryotischen System in Anwesenheit von $CuCl_2$

Bei der rekombinanten Expression von PelHc4 in Anwesenheit von $CuCl_2$ (nach DIRKS-HOFMEISTER et al., 2012) wurden die Zellen, nachdem sie eine OD_{600} von über 0,4 erreicht hatten, zusätzlich zur Induktion der Expression mit 20 µM $CuCl_2$ versetzt und für 3 h bei 37°C inkubiert. Auch hier konnte anschließend lösliches PelHc4 nachgewiesen werden (Abb. 3.7A). Nach einer erfolgreichen Aufreinigung mittels *Strep*-tag II lag das Protein im Vergleich zur Expression ohne $CuCl_2$ trotz gleichem Ausgangsvolumen bei der rekombinanten Expression in einer höheren Konzentration vor (Abb. 3.7B). Bei einem Ausgangsvolumen von 10 x 100 ml lagen nach Aufreinigung ca. 1,3 mg PelHc4 vor.

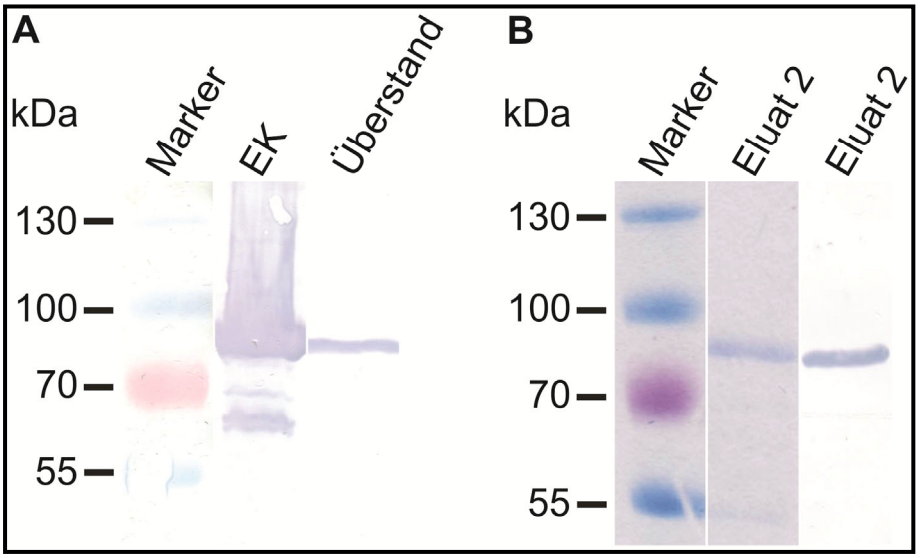


Abb. 3.7: Diskontinuierliche SDS PAGE und immunologischer Nachweis der rekombinanten Expression von PelHc4 in Anwesenheit von $CuCl_2$ und anschließender *Strep*-tag Aufreinigung
A) SDS-PAGE der Expressionskontrolle (EK) und des Zellüberstandes
B) SDS-PAGE (Mitte) und Western Blot (rechts) einer Eluatfraktion (Eluat 2) nach der *Strep*-tag Affinitätsaufreinigung. Verwendeter Antikörper: *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat.

3.1.2.3. PelHc4 - Expression in Schneider 2 Zellen

Für die Expression in Schneider 2 Zellen (S2 Zellen) wurden das PelHc4 gerichtet in den Vektor pMT/V5-His B kloniert. Dabei lag das PelHc4 mit einer modifizierten Kozaksequenz zur Initiation der Translation vor (KOZAK, 1987; KOZAK, 1990; KOZAK, 1991). Da durch diese Modifikation die zweite Aminosäure ausgetauscht wurde (Lysin gegen Glutaminsäure), gab es ein weiteres Expressionskonstrukt ohne diese Veränderung. Von jedem dieser beiden Varianten existierte eine mit einem C-terminalen His-tag und eine mit einem C-terminalen *Strep*-tag II. Sie wurden als Kozak Strep, Strep; Kozak His und His bezeichnet. Da es sich bei dem pMT/V5-His B-Vektor um einen

Vektor handelt, der eine induzierbare Expression des rekombinanten Proteins durch einen Metallothioninpromotor ermöglicht, wurde die Expression des Zielproteins durch die Zugabe von $CuSO_4$ initiiert. Die PelHc4-Untereinheit verfügte über ein N-terminales Signalpeptid, welches *in vivo* dafür verantwortlich ist, dass das Protein in die Hämolymphe sezerniert wird. Die S2 Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionskonstrukten sowie dem pCoHygro Vektor, der den Zellen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin verleiht, stabil transfiziert und selektiert. Anschließend erfolgte die Expression durch die Zugabe von 500 µM $CuSO_4$. Dabei zeigte sich, dass bei allen Konstrukten, außer Kozak His, nach 24, 48 und 96 h PelHc4 löslich in den Zellen vorlag (Abb. 3.8), im Medium konnte kein PelHc4 detektiert werden. In den Zellen liegt die detektierte Bande bei ca. 100 kDa und nicht wie im prokaryotischen System um die 80 kDa (Abb. 3.6).

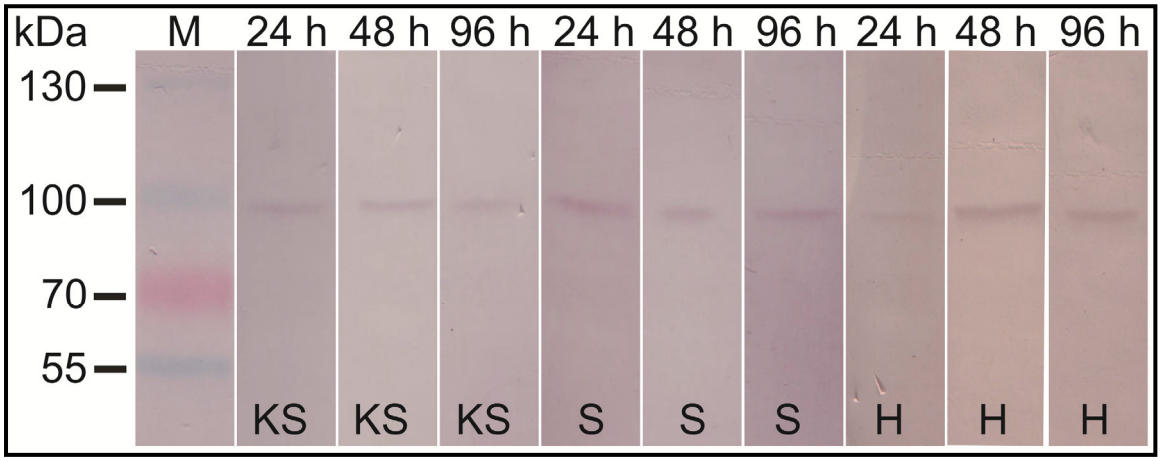


Abb. 3.8: Immunologischer Nachweis der Expression von PelHc4 in S2 Zellen: Expressionsdauer 24 h, 48 h und 96 h; Expressionskonstrukte: KS Kozak Strep, S Strep, H His: Verwendeter Antikörper: α-PelHc Hämocyanin von *P. elephas*.

Das PelHc4 konnte im Medium trotz des vorhandenen Signalpeptids für die Sezernierung nicht nachgewiesen werden. Dies wurde im Folgenden näher analysiert. Dabei wurde nur mit den Expressionskonstrukten, die über einen *Strep*-tag II verfügten weitergearbeitet. Da die Menge an rekombinantem Protein bei allen drei Zeitpunkten ähnlich war, fand die Expression für 48 h statt. Im Western Blot ließ sich im Medium kein PelHc4 detektieren. Bei einer SDS PAGE der Mediumproteine stellte sich heraus, dass eine hohe Dichte an Proteinen mit einer molekularen Masse zwischen 50 und 150 kDa vorhanden war (Abb. 3.9, erstellt im Rahmen einer Elternzeitvertretung von K. Schwarze).

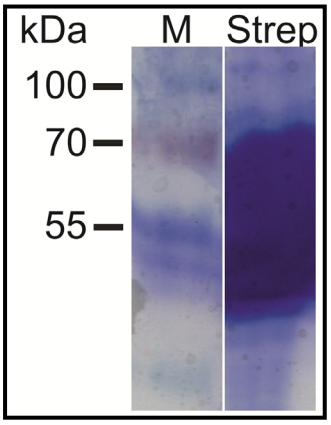


Abb. 3.9: SDS PAGE der Mediumproteine nach Expression von PelHc4 Kozak Strep in Schneider 2 Zellen

Um auszuschließen, dass diese Mediumproteine das PelHc4 „überdecken“, wurde die Expression in einem serumfreien Medium durchgeführt. Hier konnte das PelHc4 nach 48 h sowohl in den Zellen als auch im Medium immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 3.10, erstellt im Rahmen einer Elternzeitvertretung von K. Schwarze).

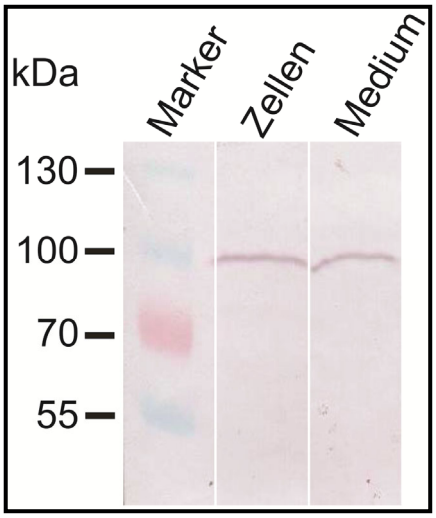


Abb. 3.10: Immnuologischer Nachweis von PelHc4 in Zellen und Medium nach rekombinanter Expression von PelHc4 Kozak Strep in S2 Zellen in serumfreiem Medium. Verwendeter Antikörper: *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat.

Nach rekombinanter Expression des PelHc4 in S2 Zellen liegt lösliches Protein in den Zellen und im Medium vor. Allerdings ist das PelHc4 im Medium nur dann nachweisbar, wenn serumfreies Medium verwendet wird. Die Proteinkonzentration im Medium ist so gering, dass keine Aufreinigung stattfinden kann. Damit entfällt auch die Möglichkeit zu überprüfen, ob das rekombinante PelHc4 in den S2 Zellen bereits Kupfer gebunden hat.

3.1.2.4. PelHc4 - Expression im *in vitro* Expressionssystem

Neben der Expression in den beiden zellbasierenden Systemen *E. coli* und *Drosophila*-Zellen fand die Expression des PelHc4 auch zellfrei *in vitro* statt. Hierfür wurde ebenfalls das Expressionskonstrukt PelHc4 ohne Signalpeptid jedoch mit *Strep*-tag II in dem

Vektor pET16b verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression erfolgreich war (Abb. 3.11). Probenvolumen und Probenkonzentration waren jedoch nach abgeschlossener Reaktion gering.

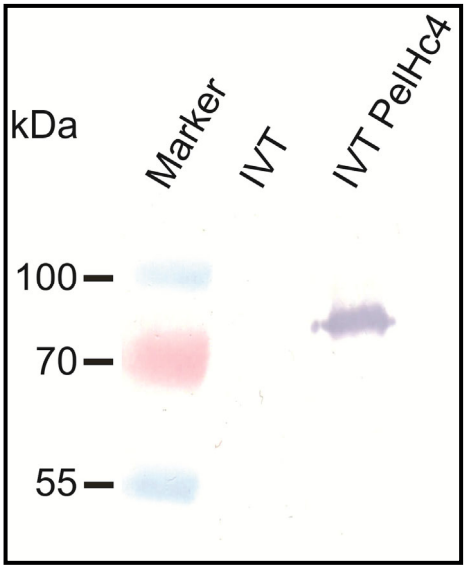


Abb. 3.11: Immunologischer Nachweis der *in vitro* Translation von PelHc4
IVT: *in vitro* Translation ohne DNA (Negativkontrolle), IVT PelHc4: *in vitro* Translation von PelHc4. Verwendeter Antikörper: *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat.

3.1.2.5. PelHc4 - *in vitro* Kupfereinbauversuche in das rekombinante Apohämocyanin

Da es sich beim Hämocyanin, im Gegensatz zum Hexamerin, um einen kupferhaltigen Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie handelt, stand hier nicht die Rekonstitution, sondern der Kupfereinbau im Vordergrund. Dabei wurden unterschiedliche Bedingungen gewählt. Ein Fokus lag darauf, sowohl Cu(I) als auch Cu(II) zur Verfügung zu stellen. Neben der Wahl der Kupferquelle wurden aber auch Parameter wie pH Wert, Kupferkonzentration in den Puffern, Art der Pufferbereitstellung etc. getestet.

Kuperhaltiges Hämocyanin lässt sich photometrisch an einem zusätzlichen Absorptionsmaximum um die 340 nm nachweisen. Um sicher zu stellen, dass es sich um eine hämocyanin- und nicht proteinspezifische Reaktion handelt, wurden in der Regel parallel Absorptionsspektren unter identischen Bedingungen mit rekombinant hergestelltem DmeLSP2 oder mit BSA (bovine serum albumin) gemessen, die jeweils kein Kupfer binden.

3.1.2.5.1. Kupfereinbau nach JENSEN et al. (1999)

JENSEN et al. (1999) konnten den erfolgreichen Kupfereinbau in das Menkes-Protein, eine kupferbindende P-Typ ATPase zeigen. Sie verwendeten dafür einen $TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer. In diesem wird Kupfer als Cu(I) bereitgestellt. Analog zu den beschriebenen

Versuchsbedingungen wurden 1 mg rekombinantes PelHc4 verwendet und 1:10 mit $TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer versetzt (VA). Alternativ wurde in VB 1 M PPS (3-(1Pyridinio)-1-propansulfonat) zur Erhöhung der Löslichkeit des Proteins zugesetzt. In VA1 und VB1 wurde das Protein zunächst auf pH 6 umgepuffert, da ein niedriger pH Wert den Kupfereinbau unterstützt (WIGFIELD und GOLTZ, 1993). Bei allen Versuchsansätzen wurde die Absorption bei 340 nm über einen Zeitraum von 120 h gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Änderungen der Absorption beim PelHc4 den Änderungen beim DmeLSP2 sehr ähnlich waren (Abb. 3.12; VA, VA1, und VB nicht gezeigt). Es kam zu keinem Anstieg der Absorption bei 340 nm. In vorrangegangenen Versuchen war es gelungen, unter Versuchsbedingung A1 ein hämocyanintypisches Absorptionsspektrum zu zeigen (DIDIER, 2009), diese Ergebnisse waren nicht reproduzierbar. Neben den Versuchsbedingungen VA, VA1, VB und VB1 wurde der Versuch noch anderweitig modifiziert. So wurde das rekombinante PelHc4 nicht mit dem $TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer versetzt, sondern schonender durch Dialyse umgepuffert. Des Weiteren wurde der pH Wert des $TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer auf 7 herabgesetzt. Auch die Konzentration der Ascorbinsäure wurde von 10 mM auf 100 µM reduziert. Keine dieser Modifikationen führte zu einem Absorptionsmaximum bei 340 nm (Daten nicht gezeigt).

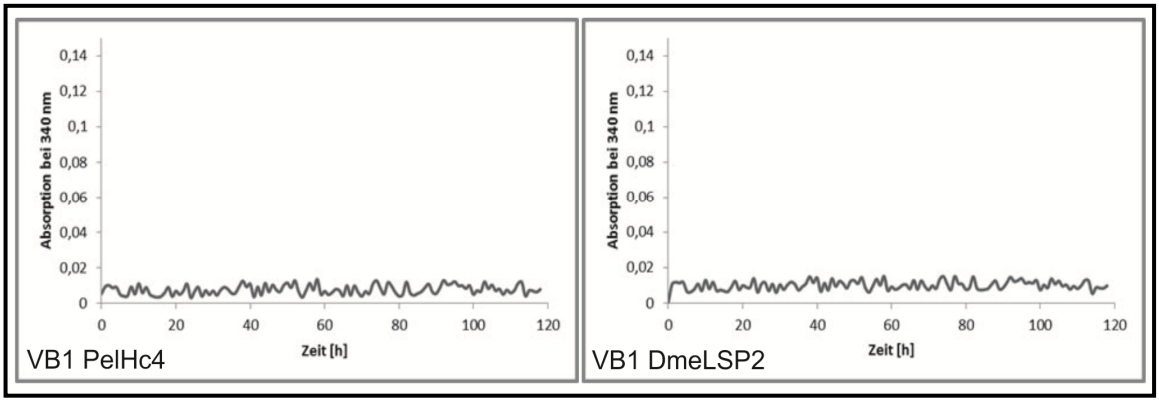


Abb. 3.12: Absorption bei 340 nm gegen die Zeit während eines Kupfereinbauversuchs nach JENSEN et al. (1999)
VB1 PelHc4: Kupfereinbauversuch in PelHc4, VB1 DmeLSP2: Kupfereinbau in DmeLSP2 als Negativkontrolle.

3.1.2.5.2. Kupfereinbau nach WIGFIELD und GOLTZ (1993)

WIGFIELD und GOLTZ (1993) konnten eine Methode für einen erfolgreichen Kupfereinbau in eine Apotyrosinase etablieren . Der Kupfereinbau erfolgte schneller bei niedrigeren pH Werten, wobei Kupfer als Cu(II) bereitgestellt wurde. Es wurde in Anlehnung an die Versuchsbedingungen das rekombinante Hämocyanin bzw. Hexamerin (als Negativkontrolle) $1{,}25*10^{-5}$ M in 50 mM Tris/HCl gelöst. Es gab drei Ansätze, die sich in ihren pH Werten unterschieden, welche pH 7,0, pH 6,5 und pH 6,0

waren. Das in dem Tris-Puffer verschiedener pH Werte gelöste, rekombinante Protein wurde mit $1{,}25*10^{-4}$ M $CuSO_4$ (10-facher Überschuss) versetzt. Die Messung der Absorption bei 340 nm erfolgte über 77 h (Abb. 3.13). Während es beim Hämocyanin bei allen drei pH Werten zu einem Anstieg der Absorption nach ca. 30 h kam, konnte dies beim Hexamerin nicht beobachtet werden. Bei allen drei pH Werten lag das rekombinant hergestellte PelHc4 im Gegensatz zum DmeLSP2 am Ende des Versuchs nicht mehr in Lösung vor. Um zu überprüfen, wann es innerhalb dieser gemessenen 77 h zur Präzipitation des PelHc4 kommt, wurden Absorptionsspektren zwischen 250 und 750 nm gemessen. Die Absorption wurde alle 24 h überprüft (Abb. 6.8a und b, Anhang). Diese Absorptionsspektren zeigten keine Absorptionsmaxima bei 340 nm, was darauf hinweist, dass der Anstieg der Absorption im ersten Versuch mit einer frühen Präzipitation des PelHc4 zusammenhängt.

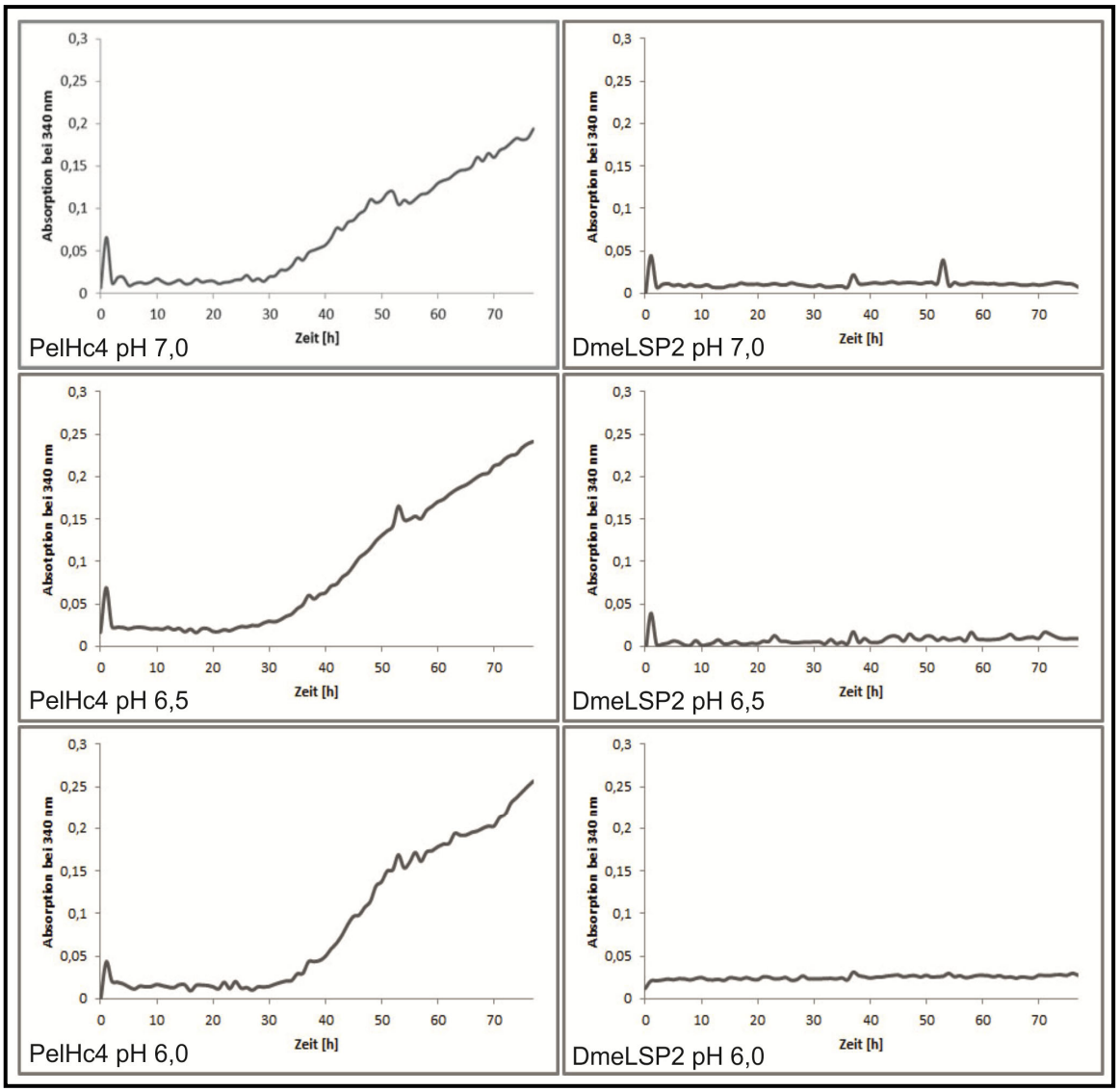


Abb. 3.13: Messung der Absorption bei 340 nm während eines Kupfereinbauversuchs nach WIGFIELD und GOLTZ (1993)

3.1.2.5.3. Kupfereinbau nach BROUWER und BROUWER-HOEXUM (1992)

BROUWER und BROUWER-HOEXUM (1992) konnten zeigen, dass der Einbau von Kupfer als Cu(I) in natives Apohämocyanin möglich ist (BROUWER und BROUWER-HOEXUM, 1992). Analog zu den von ihnen gewählten Versuchsbedingungen wurde rekombinantes aufgereinigtes Apohämocyanin verwendet und mit einem Cu(I)-haltigen Puffer (pH 6) versetzt. In den gemessenen Absorptionsspektren (Abb. 3.14) wird das proteintypische Absorptionsmaximum bei 280 nm durch ein Absorptionsmaximum bei 260 nm überlagert, welches mit Nukleinsäuren korrespondiert. Nach 4 und 6 h verändert sich die Absorption zwischen 300 und 350 nm. Es ist aber kein deutliches Absorptionsmaximum bei 340 nm zu erkennen.

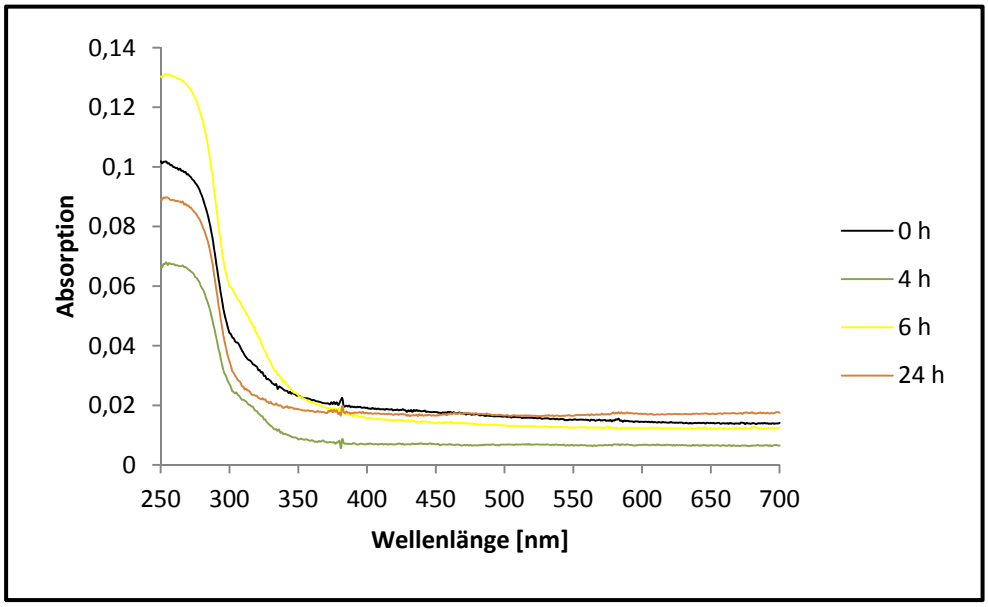


Abb. 3.14: Absorptionssspektren während eines Kupfereinbaus nach BROUWER und BROUWER-HOEXUM (1992)

3.1.2.6. PelHc4 - Kupfereinbau während der Expression im prokaryotischen/*in vitro* System

Eine andere Strategie der Herstellung von korrekt gefaltetem, kupferhaltigem Hämocyanin war es, bereits während der rekombinanten Expression Kupfer bereitzustellen und anschließend das Protein durch eine Affinitätschromatographie von den bakterieneigenen Proteinen abzutrennen.

3.1.2.6.1. Kupfereinbau während der Expression im prokaryotischen System

Bei der Expression der Hämocyanin-Untereinheit 4 im prokaryotischen Expressionssystem in Anwesenheit von $CuCl_2$ (DIRKS-HOFMEISTER et al., 2012) wurden anschließend an die Aufreinigung Absorptionsspektren gemessen. Zu keinem

der untersuchten Zeitpunkte konnte ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm detektiert werden (Abb. 3.15). Das proteintypische Absorptionsmaximum bei 280 nm wurde durch ein Absorptionsmaximum bei 260 nm überlagert. Die Expression des PelHc4 in Anwesenheit von $CuCl_2$ ist möglich, es kommt zu keiner Bindung des Kupfers an das PelHc4.

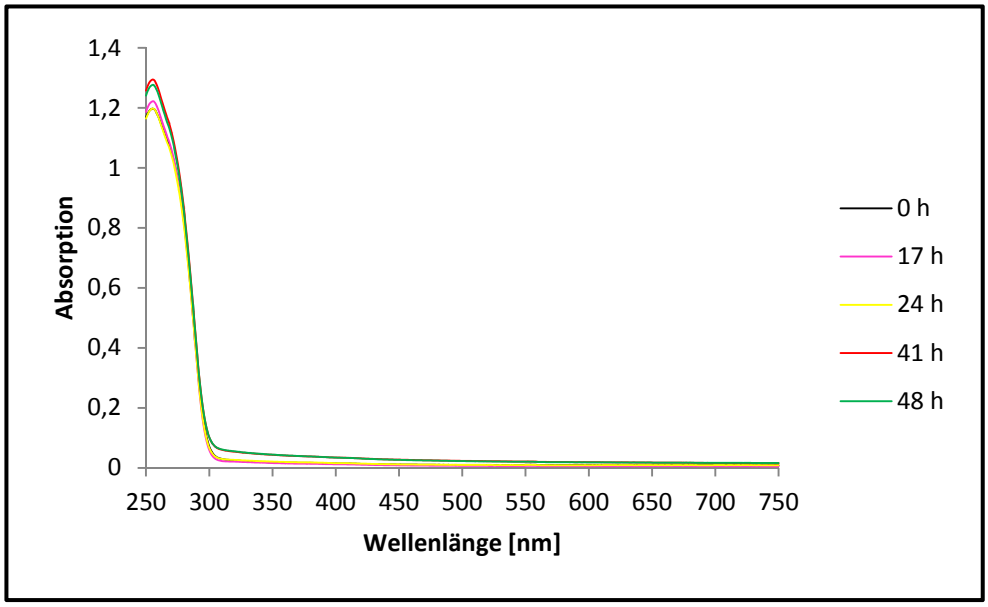


Abb.: 3.15: Absorptionsspektren nach Expression in Anwesenheit von $CuCl_2$

3.1.2.6.2. Kupfereinbau während der Expression im *in vitro* Expressionssystem

Der *in vitro* Expressionsansatz wurde bereits zu Beginn der Reaktion mit 10, 50, 100, 500 µM $CuSO_4$ versetzt. Auch in Anwesenheit des Kupfers war die Expression des PelHc4 erfolgreich (nicht gezeigt). Nach abgeschlossener Reaktion lag jedoch nicht ausreichend Protein vor, um es aufzureinigen und Absorptionspektren zu messen.

3.1.3. Prophenoloxidase 3 von *D. melanogaster*

Bei der Prophenoloxidase 3 von *D. melanogaster* (DmePPO3) handelt es sich um ein Enzym mit Tyrosinase- und Catecholoxidaseaktivität. Sie hat eine theoretische Molekülmasse von ca. 79 kDa, verfügt nativ über kein Signalpepitd und ist ein Zymogen. Dieses wird durch die Abspaltung eines Peptids am N-Terminus aktiviert.

3.1.3.1. DmePPO3 - *in vitro* Expressionssystem in Anwesenheit von $CuSO_4$

Die Expression der DmePPO3 im *in vitro* Expressionssystem war erfolgreich. Dies konnte sowohl durch eine zusätzliche Bande zwischen 70 und 80 kDa (im Vergleich zur

Negativkontrolle) in einem 10%-igem SDS-Gel (nicht gezeigt) als auch in einem Western Blot belegt werden (Abb. 3.16).

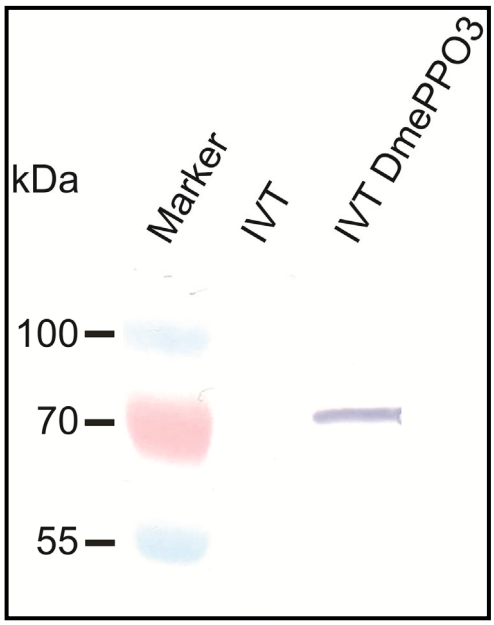


Abb. 3.16: Immunologischer Nachweis der *in vitro* Translation von DmePPO3
IVT: *in vitro* Translation ohne Plasmid (Negativkontrolle), IVT DmePPO3: *In vitro* Translation von DmePPO3. Verwendeter Antikörper: *Strep*-Tactin Alkalische Phosphatase Konjugat.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression der DmePPO3 im *in vitro* System generell möglich ist, fand die Expression in Anwesenheit von $CuSO_4$ statt. Es wurden zwei pH Werte (pH 5,5 und 7,0) und unterschiedliche $CuSO_4$-Konzentrationen (10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM) gewählt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Expression erfolgreich war (nicht gezeigt). Anschließend erfolgte ein MBTH-Assay um zu überprüfen, ob die DmePPO3 das Kupfer gebunden hatte, und somit aktiv war. Als Positivkontrolle wurden 30 ng Champignon-Tyrosinase verwendet. Bei den $CuSO_4$-Konzentrationen 10 und 50 µM war bei beiden pH Werten eine schwache Färbung erkennbar. Auch die Negativkontrolle wies eine leichte Färbung auf, da das $CuSO_4$ mit der MBTH-Färbelösung kreuzreagierte. Diese Reaktion nahm mit steigender $CuSO_4$-Konzentration zu. Es konnte nicht sicher eine Aktivität der PPO3 nachgewiesen werden (Abb. 3.17), der Kupfereinbau ist damit fraglich.

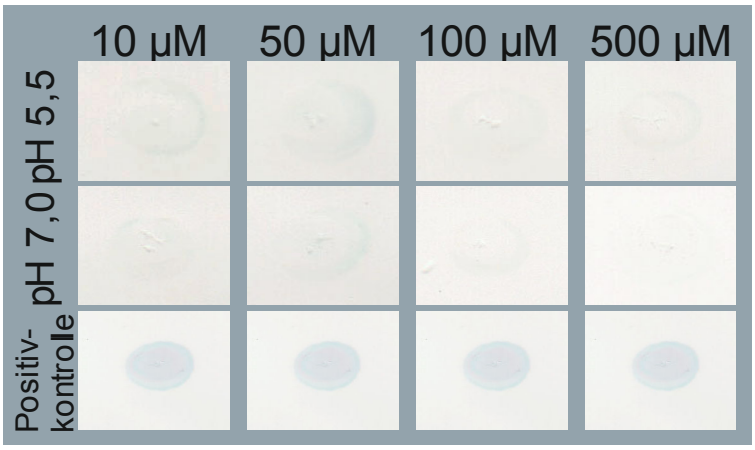


Abb. 3.17: MBTH-Assay der *in vitro* Translation von DmePPO3 in Anwesenheit von $CuSO_4$ in verschiedenen Konzentrationen bei zwei pH Werten. Positivkontrolle: 30 ng Champignon-Tyrosinase.

3.2. Nachweis von Hämocyanin und Phenoloxidase in *S. dehaani*

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war der Nachweis von Hämocyanin und Phenoloxidasen in dem Hundertfüßer *S. dehaani.* Hierfür mussten zunächst die entsprechenden Sequenzen identifiziert werden. Eine phylogenetische Analyse der Sequenzen sollte deren Stellung innerhalb der Arthropoden zeigen. Außerdem sollten biochemische Untersuchungen belegen, dass es sich tatsächlich um Hämocyanine bzw. Phenoloxidasen handelt. Die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene lieferte Information über den Syntheseort des Hämocyanins.

3.2.1. Sequenzanalyse

Aus EST-Daten (REHM et al., eingereicht) waren bereits Teilsequenzen bekannt, die mit großer Wahrscheinlichkeit Hämocyanine- oder Phenoloxidasen von *S. dehaani* darstellten. Anhand dieser Sequenzen wurden Primer erstellt (Tabelle 6.2, Anhang). Mittels PCR konnten Sequenzen ermittelt werden, bei denen sich in einer BLAST Analyse herausstellte, dass es sich um fünf verschiedene Hämocyanin-ähnliche Sequenzen handelte. Die 3'- und 5'-Enden dieser Teilsequenzen wurden mittels RACE vervollständigt (Sequenzen befinden sich im Anhang, Abb. 6.9 bis 6.13). Die fünf Sequenzen wiesen die für Hämocyanine und Phenoloxidasen typischen konservierten Histidine auf (Abb. 3.18). Sie wurden mit den Hämocyaninsequenzen der Untereinheiten A-D des Chilopoden *S. coleptrata* verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass zwei der Sequenzen höhere Identitäten zu ScoHcA-D aufwiesen als die verbleibenden drei (Tabelle 3.1). Dies und die Tatsache, dass diese beiden Sequenzen ein für Hämocyanin typisches Signalpeptid aufwiesen, deutete darauf hin, dass es sich um Hämocyanin-Untereinheiten handeln könnte. Sie wurden daher vorläufig als SdeHc1 und 2 bezeichnet. Die beiden putativen Hämocyanin-Untereinheiten bestehen aus 660 respektive 662 Aminosäuren und weisen Signalpeptide zwischen 15 und 19 Aminosäuren auf. Ihre theoretische Molekülmasse beträgt ca. 75 kDa und beide Untereinheiten haben zwei bzw. drei putative N-Glykosilierungsstellen. Nur eine dieser putativen N-Glykosilierungsstellen befindet sich in beiden Untereinheiten an derselben Position. Die verbleibenden drei Sequenzen wiesen keine Signalpeptide und deutlich geringere durchschnittliche Identitäten zu ScoHcA-D auf, was den Verdacht nahe legt, dasss es sich um Prophenoloxidasen handeln könnte. Sie wurden daher vorläufig als

SdePPO1-3 benannt. Sie weisen zwischen 642 und 665 Aminosäuren auf, was einer theoretischen Molekülmasse zwischen ca. 75 und 77 kDa entspricht (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Überblick über die Charakteristika der putativen Hämocyanine und Phenoloxidasen von *S. dehaani*
ORF: open reading frame; theoretische Molekülmasse ohne Signalpeptid; [x]: Phenoloxidasen sind *in vivo* nicht glykosyliert.

	ORF	Protein (Amino-säuren)	Theore-tische Molekül-Masse [kDa]	Signal-peptid (Amino-säuren)	Putative N-Glykosy-lierungs-stellen	Durchschnitt-tliche Identitäten zu ScoHcA-D [%]
SdeHc1	1989	662	74,57	19	2	44
SdeHc2	1983	660	74,75	15	3	45
SdePPO1	1998	665	76,79	-	[7]	34
SdePPO2	1935	644	75,02	-	[3]	34
SdePPO3	1929	642	75,38	-	[5]	33

3.2.2. Phylogenetische Analyse

Die ermittelten Aminosäuresequenzen der putativen Hämocyanine und Prophenoloxidasen von *S. dehaani* wurden phylogenetisch analysiert. Diese Analyse sollte Informationen darüber erbringen, wo die putativen Hämocyanine und Phenoloxidasen gruppieren. Es wurde ein multiples Sequenzalignment erstellt, das mit bereits bekannten Hämocyanin- und Phenoloxidasesequenzen anderer Arthropoda ergänzt wurde. Daraus wurde ein Stammbaum errechnet.

3.2.2.1. Multiples Sequenzalignment

Aus den beiden vermeintlichen Hämocyanin- sowie den drei Phenoloxidasesequenzen wurde ein multiples Sequenzalignment erstellt (Abb. 3.18). Die Berechnung der Identitäten und Ähnlichkeiten zwischen den Hämocyanin- und PPO-Sequenzen erfolgte mit der Dayhoff PAM 250 Matrix (Tabelle 3.2). SdeHc1 weist Ähnlichkeiten von 66% und Identitäten von 45% zu SdeHc2 auf. Die Ähnlichkeiten zu den drei PPO liegen bei SdeHc1 und 2 zwischen 54% und 56%, die Identitäten zwischen 33% und 36%. Die drei PPO weisen zueinander Ähnlichkeiten zwischen 61% und 76% auf. Die Identitäten liegen zwischen 46% und 56%.

```
                    *        20         *        40         *        60         *        80
SdeHc1   : MAALQWFLLGLVALSLVAGEKCPK-TNDIQEKQRRLVEALSYVNRPYNPKPK----------------DHELTPAEKKFLE :  64
SdeHc2   : M---RCFVLVLLIAATFASQ-CPKPPSDAEAKQQQIFQIVEYINKAQTPEPV----------------VEGVEEKELKYL- :  60
SdePPO1  : M------------------------AEVKSMQRLVLDLFDNVSEPLDQRQP--FHTAFASGPVITSRDAAATGTRLRPQM :  54
SdePPO2  : M-------------------------EDQLNLQKLVLDLFRNVSEPLSESDFPVFATSYAGNKDIFYEFEE---------- :  46
SdePPO3  : M-------------------------EKTRQMQGFILDMFNKVSESHPRHKH--EHILASHGIQFSSYFE--TETFLKSE- :  51
                                        ααα1.1ααα  ααα                                α1.3

                   *       100         *       120         *       140         *       160
SdeHc1   : SHVGYLPRREVYSVHDARYLPEANASLYFL--LDPPNFDGFIRAIDILSKHINEDMLYYVVSVAATHRDDTRGVILPRIHD : 143
SdeHc2   : ---GHLPKNEIFSLHDERNWPEAKAAVKYL--LEPKTFDDFIKAAKILITRINDEIFLYALSVAILHRPDTRGVQIPRIQD : 136
SdePPO1  : TGIGILPRGRIFSTHNRDHMDEAMRVVRLL--MRLDD-RDLQLALAYLRDNINEELFVYSISVLSTSQPTLRRTKLPPVEE : 132
SdePPO2  : -KIGILPKGRIFSTHKREHMKEAIDIIELL--TKTET-NNLDPIMLKLRKKVNEELFVYATSVFFIQNPDLK-IKLPLIEE : 122
SdePPO3  : -GLGVLKKGKIFSPHNNEHMDEAFKAIKYLNDTKLDT-KSLIIKIVGLHMLLNEELFVYVTSYVIINHPDFKTVHLPPYQE : 130
                         αααα1.4αααα    αα      αα1.5αα      αααα1.6αα            ααα

                  *       180         *       200         *       220         *       240
SdeHc1   : IYPDKFLRSEIIGQIKQKALGNEKD---IVVDDTKQHVDYRDPYSRLGYFLNDIAMNSHHYHWHVQNSLIWKNRTYPSVAN : 221
SdeHc2   : VFPDKFIPNFLLQQIREEAIRGDQN---PIV-NLNISSNYLNVENSLNYFTNDLGMNSHHYHYHVVHPATG----VPI-QT : 208
SdePPO1  : VLPAKFIPSSAISQARTIQRRASQETQETIIIDVDFTGNDLDPEHRLAYWREDIGLNAHHWHWHIVYPYTW----IPE-LG : 208
SdePPO2  : VLPQKFCTGDVIRKA--VKENEKAMSMIPIIIDVEYTSTPLEPEHALAYWREDIGLNAHHWHWHIVYPYEW-----PD-GN : 195
SdePPO3  : IFPDKFIHKETISKIKRQVIHNGKDSKKEIVIPADFSGDNLDPEHRLAYWREDIQLNSHHWNWHLVYPTDW----TPDSGE : 207
           α       αααα1.7ααα             β1Bββ         αααα   αααα2.1αα

                 *       260         *       280         *       300         *       320
SdeHc1   : LLKERIGAAHAYMHHEMVNRFDAELLSNKLPRVTPFENWNDPILEGYAAHLIVDRYQYNYMYRPPNLKLKDLPETTRNQMR : 302
SdeHc2   : VTRDRHGSRHAHMHSQLVRRYESERLSSGLPLTESFVNWDEPIQTGFSSHLTIFKKSYYYNFRPEGITLSDLPELTKNKML : 289
SdePPO1  : TIRDRKGELHYYMHQQIIARYDCERISLNFPRVRPLLNWTEPMAEGYAPHLSKEISGTVYAFRPANMTMRDLPFITVDRLR : 289
SdePPO2  : KPKDRRGELHYYMHQQMIARYDCERLAVDLPRVVPLHDWDNFIPEGYAPHLNKEIANTIYCYRPSNMILN---QVNIDELR : 273
SdePPO3  : GLRDRKGELHYYMHQQLVARYNCERLSVHYPRVTAFFEWDEPIVEGYNSHLLKENSGINYGPRPGNMILQDLPNLTKSILR : 288
                αααααα2.2αααα                                  β2B     β2C              αααα
                 *       340         *       360         *       380         *       400
SdeHc1   : QWRDRILDSIHKGYAI-SKDGRNVTLSEEDGIDIIGNMVESTVNSINLPLYGNLHCYAHTIAARVADPDNTYGEDNGAMYD : 382
SdeHc2   : LWKHRILLGIHSQFLI-SANNKNVSLEREDGEDLLGNAVESSLLSINRQFYGNLHNYAHVIAGRASDPDGRYGAHNGVMHD : 369
SdePPO1  : TWYQRIIQDIHKGSFT-RDDGTKVQLDNDQGIDIVGDVVEAAYTTPNATFYGDFHNLGHQIIARVHDPDERYKEEVGVMAD : 369
SdePPO2  : QMYETIIQDLRSGFFI-RNDDAKIPLDTERGIDIVGNTVEASNASANMDRYGSLHNNGHNAIARIHDPDGRFKLEDGVMAD : 353
SdePPO3  : AWYQRIMQSIHLGYLTSREYNTHIPLNNEGGIDKIGAIVEASRLSVNYDFYGNLHNMSHNSLSRIHDPDERYKGDPGVMGD : 369
           2.3αααααααββ2Dβ       ββ2Eβ    αα2.4αα          ααα   ααα2.5ααα

                *       420         *       440         *       460         *       480
SdeHc1   : VATSARDPLHYRWHKYIDKIIQAYRNSLRSYTVEQLTWPVVVVEGLTVEGAK----VNKIKTFWEDDVLTVGTGFTFTGPS : 459
SdeHc2   : VATSARDPLHYRWHKFIESLFQQLREHLKPYSHYELTYPAVVVEKVEVVPDKHPETVNKVRTGYTTNKLKLNPGFDFTRQS : 450
SdePPO1  : STTAMRDPIHYRWHKFIDNVFVEHKMKLKPYTEEELTFKDIVVNGIQVQGKM-SQRPHIIGTFWQERTISLQRGITFNSAI : 449
SdePPO2  : TATAMRDPIHYRWHKFIDNIFLQHKSRLTPYTREELMFEKVIIDSIYIQGKT-SKATDKIETFWQESKLNLENGINFKNKV : 433
SdePPO3  : VATTVRDPIHFRWHKFIDDIFQEHKLQLPSYNEEGLMFKDIIVKSVDTEGKQ----NNQLQTFWEESTLDMKYGLAFECGS : 446
                αααααα2.6αααα            α3.1   βββ3Aββ ββ  βββββ3Bβββββ

               *       500         *       520         *       540         *       560
SdeHc1   : ATAKVNVRHLEHEEFSYNIQVVNNAGENKKAVFRIFLAPKYDEKGHEFDFNEQRQSMIELDKFVTELTPGKNVVI-RKSSE : 539
SdeHc2   : -TATVNVQHLDHEPFHYKFRIYNNAQQVQNAAVRIFLAPKYDEQGHRLKVNDQRQLMIELDKFVVHLQPGVNQFL-RSSSE : 529
SdePPO1  : -PVSVRYRHLQHESFTWNIEVENKSNADKPGTVRIFMAPTFNDTRQRFSPNDQRVLMLEMDKFEFNFKPGKNIIQ-QRSEQ : 528
SdePPO2  : -SVSVRYRHLQHEKFEWNIEVENKWNENEQGTVRIFMAPIYGEDGKELSPNEQRLLMIEMDKFEYTLRPGTNYIS-RRSDQ : 512
SdePPO3  : -PIVVRYRHLQHEQFNWSIIVENISNEKKQGMVRIFMAPKYDVTGNQFTPNELRKLMIEMDKFEFTFEAKKTVIVTRKSRD : 526
            βββββββ3Cβββββββ βββ3Dβββββββ    βββββ3Eβββ βββ   β3F  α3.2    βββββββ3Gββββ  βββββ 3Hβββ

              *       580         *       600         *       620         *       640
SdeHc1   : SSVTQKHEKIYANPKERQQ-------NDHCNCGWPDNLLVPRGSYEGTEFQVFVVVTNYEEDYVPS--DESCHCGDGRSYC : 611
SdeHc2   : SSVTMPTKYFFGDVQDIAR-------NHSCNCGWPEYLLLPRGSYEGLDFQLFVAVTNWDEDKVKDKVEPECQCSESLSYC : 603
SdePPO1  : SNITIPTLRSFGELIAESESDDLLDAQSYCSCGLPEHLLVPRGKQEGMPFQTFVMITDAVKDRVNG---DSKQCHDATSYC : 606
SdePPO2  : SNVTIQTLKRFSELDKETKVTN----EASCSCGLPDHLLVPRGKKDGMAFQTFVMITSAIEDRVKG---KGQHCLDAASYC : 586
SdePPO3  : SSVIIPDAKTTQNIREELQKDD--PWQHYCGCGLPSHLLVPRGKREGMNFMTFVMITDXTKDKVYE--EDDDVCKTAPSYC : 603
           β β3I                                α3.4        βββββ3Jβββββββα3.5

             *       660         *       680         *       700         *       720
SdeHc1   : GILFGNHPDRRPYGYPFEKRTDAHTFQDFKTPNMYAVDVSIQFTGVIKKSS---------------------------- : 662
SdeHc2   : GTISGKYPDRRPFGYPFERPIVESNWEDFVTQNIHISDVNIRFVGNVEEEKQ-----------IEKHH----------- : 660
SdePPO1  : GVINEKYPDKKPMGYPFDRVILAADWSTFKTSNMNFGDVTVTFKEEVINANAGSLVFPKTFFDFEKKKKKKTLSCRYVA : 685
SdePPO2  : GVINDKYPDKKPMGFPFDRVINAADWSSFKTPNMGFGVIKICFEDIVKDSDLHD----------ENDH----------- : 644
SdePPO3  : GILNKKYPDKRAMGFPFDRQISDNSWQKFQKPNNEV---------------------------------------WRT : 642
                                        α3.6   βββββββ3Kβββββββ
```

Abb. 3.18: Multiples Sequenzalignment von SdeHc1 und 2 sowie SdePPO1, 2 und 3
Konservierte Histidine sind blau, stabilisierende Phenylalanine pink hinterlegt. Das Signalpeptid ist in roter Schrift markiert. Unter dem Alignment ist die Sekundärstruktur eingezeichnet. Diese folgt den Standardkonventionen der Hämocyaninstruktur (GAYKEMA et al., 1984; HAZES et al., 1993). α: α-Helix, β: β-Faltblatt.

Tabelle 3.2: Identitäten und Ähnlichkeiten zwischen SdeHc1, Hc2 und PPO1, 2 und 3

	SdeHc1	SdeHc2	SdePPO1	SdePPO2	SdePPO3	
SdeHc1		66,51%	55,28%	54,19%	55,91%	Ähnlichkeit
SdeHc2	45,30%		55,30%	55,12%	54,67%	
SdePPO1	33,53%	33,36%		73,29%	67,45%	
SdePPO2	34,31%	33,39%	55,59%		61,68%	
SdePPO3	36,29%	35,36%	48,44%	46,12%		
	Identität					

3.2.2.2. Erstellung eines Stammbaums

Die Erstellung des Stammbaums (Abb. 3.19) erfolgte anhand von Aminosäure-sequenzen. Dabei wurden die Hämocyanin- und Phenoloxidasesequenzen von *S. dehaani* in ein multiples Sequenzalignment eingefügt, das Hämocyaninsequenzen verschiedener Arthropoden, aber auch Phenoloxidasesequenzen von Pancrustaceen und Myriapoden enthielt. Anhand dieses Alignments wurde dann mit der Bayes`schen Analyse ein Stammbaum errechnet. Dabei fungierten die Hämocyanin-Untereinheiten von zwei Onychophoren als Außengruppe. Die Hämocyanin-Untereinheiten der Myriapoda bilden innerhalb des Baums ein maximal unterstütztes Monophylum. Bei den Myriapodenhämocyanin-Untereinheiten fand eine basale Aufspaltung in zwei Untereinheitstypen mit einem Unterstützungswert von 1,0 statt. Diese beiden Untereinheitstypen werden hier als Typ I und Typ II bezeichnet. Typ I beinhaltet Hämocyanin-Untereinheiten der Diplopoden und Chilopoden, zu Typ II zählen Hämocyanin-Untereinheiten der Chilopoden, Diplopoden und Symphylen. Die beiden Untereinheitstypen sind also vor der Evolution der Chilopoden, Diplopoden und Symphylen entstanden. Die beiden putativen Hämocyanin-Untereinheiten von *S. dehaani* (SdeHc1 und 2) gehören der Typ II Myriapodenhämocyanin-Untereinheit an. Dabei bildet SdeHc1 eine Schwestergruppe zur Hämocyanin-Untereinheit B des Chilopoden *S. coleptrata* (ScoHcB, Unterstützungswert 1,0) und SdeHc2 zu *S. coleptrata* HcA (ScoHcA, Unterstützungswert 0,94). Die drei putativen Phenoloxidasen von *S. dehaani* (SdePPO1-3) gruppieren mit der putativen Phenoloxidase des Chilopoden *Strigamia maritima* (Unterstützungswert 1,0; PICK et al., 2014). Sie bilden eine Schwestergruppe zum Hämocyanin der Chelicerata, Pancrustacea und Myriapoda. Damit liefert die phylogenetische Analyse einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich tatsächlich um Hämocyanin-Untereinheiten handelt, da sie mit weiteren Myriapodenhämocyanin-Untereinheiten gruppieren. Auch die drei putativen Phenoloxidasesequenzen gruppieren mit einer vermeintlichen Myriapodenphenoloxidase.

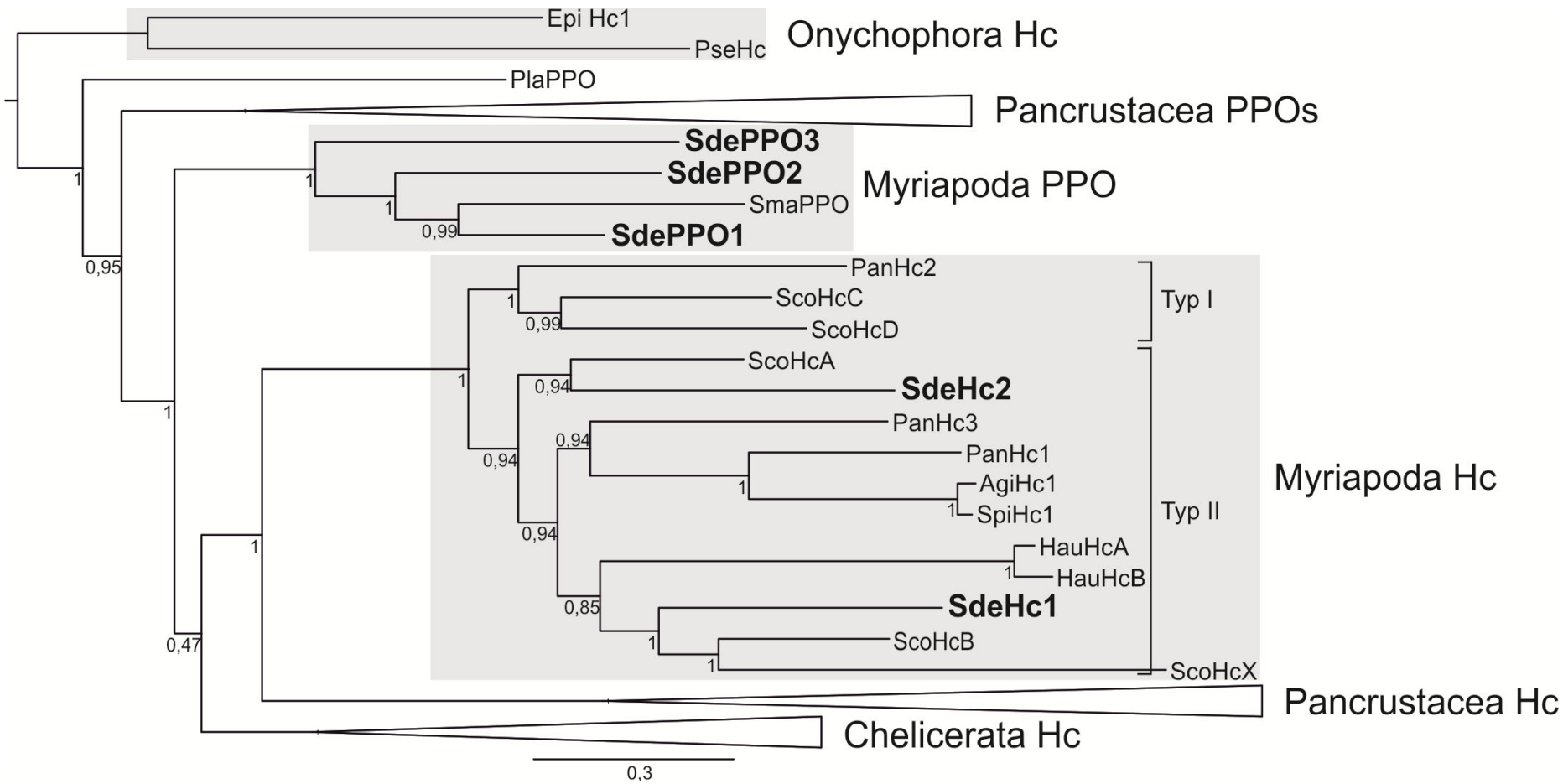


Abb. 3.19: Nach der Bay`schen Analyse erstellter Konsensusbaum der Hämocyanine und Prophenoloxidasen einiger Arthropoden. Myriapodenhämocyanine und Phenoloxidasen sind grau hinterlegt. Der Baum wurde mit den Hämocyanin-Untereinheiten von zwei Onychophoren gewurzelt.

3.2.3. Proteinbiochemischer Nachweis des Hämocyanins in der Hämolymphe

Es konnte gezeigt werden, dass auf mRNA-Ebene zwei Sequenzen vorhanden sind, bei denen es sich wahrscheinlich um Hämocyanin-Untereinheiten handelt. Um zu überprüfen, ob in der Hämolymphe Hämocyanin vorhanden ist, wurde ein Western Blot durchgeführt. Es wurde ein Antikörper gegen das Hämocyanin eines weiteren Chilopoden, *S. coleptrata* verwendet. In der SDS PAGE und im Western Blot sind drei Banden im Bereich zwischen 75 und 85 kDa zu erkennen (Abb. 3.20), bei anderen Individuen konnten nur zwei Banden identifiziert werden (nicht gezeigt). In der Hämolymphe von *S. dahaani* ist also Hämocyanin respektive ein Hämocyanin-ähnliches Protein vorhanden.

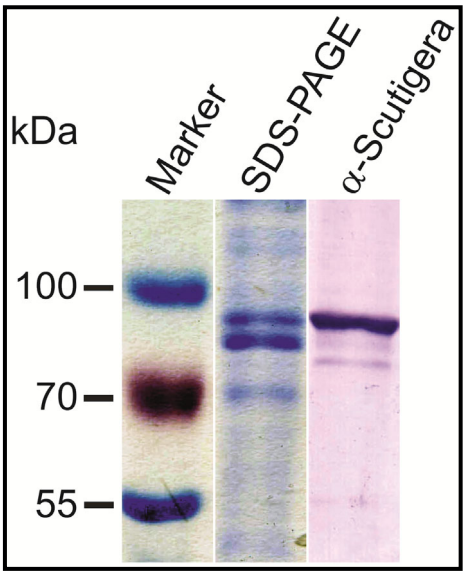


Abb. 3.20: SDS PAGE und immunologischer Nachweis von Hämocyanin in der Hämolymphe von *S. dehaani* (5 µg aufgetragen). Verwendeter Antikörper: α-*Scutigera* Hämocyanin.

3.2.4. Sauerstoffbindungskinetik des Hämocyanins

Nachdem auf mRNA-Ebene putative Hämocyanin-Untereinheiten identifiziert wurden und in einem Western Blot putatives Hämocyanin in der Hämolymphe von *S. dehaani* nachgewiesen werden konnte, wurde zum Nachweis des Hämocyanins die Sauerstoffbindungskinetik der Hämolymphe von *S. dahaani* gemessen. Diese fand in Kooperation mit Prof. Dr. N. Hellmann (Biophysik, Uni Mainz) statt.

Aus den geglätteten Sauerstoffbindungskurven (Abb. 3.21) ergab sich eine höhere Sauerstoffaffinität bei pH 7,7 als bei pH 6,8 (pH 7,7: P_{50}~19,2 Torr; pH 6,8: P_{50}~27,2 Torr), was auf einen Bohreffekt hinweist. Der leicht sigmoidale Verlauf der Sauerstoffbindungskurven deutet auf eine Kooperativität hin. Nach Transformation der Sauerstoffbindungskurve in den Hill-Plot konnte der Hill-Koeffizient bestimmt werden. Dieser liegt bei pH 7,7 bei ~1,86 und bei pH 6,8 bei ~1,6. Bei beiden pH Werten liegt eine geringe Kooperativität vor.

In der Hämolymphe von *S. dehaani* liegt also funktionelles Hämocyanin, das Sauerstoff binden kann, vor.

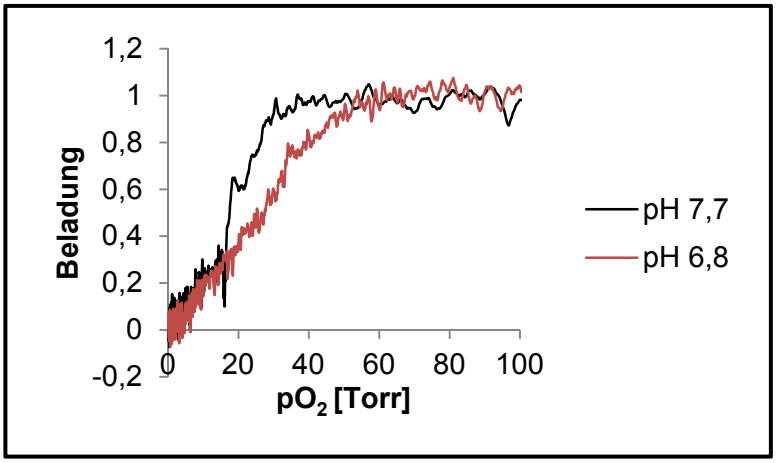


Abb. 3.21: Geglättete Sauerstoffbindungskurven der Hämolymphe von *S. dehaani* bei pH 7,7 (schwarz) und pH 6,8 (rot)

3.2.5. Nachweis von Phenoloxidaseaktivität in der Hämolymphe von *S. dehaani*

Der Nachweis von Phenoloxidaseaktivität erfolgte in frisch entnommener Hämolymphe. Diese wurde in verschiedenen Verdünnungen einer nativen PAGE unterzogen und anschließend in einem MBTH-Assay analysiert. In dem Gel sind bei allen Verdünnungsstufen deutlich rote Banden sichtbar (Abb. 3.22). Die Stellung der drei putativen Phenoloxidasen in der phylogenetischen Analyse sowie der Nachweis einer Phenoloxidaseaktivität in der Hämolymphe von *S. dehaani* unterstützen die Annahme, dass es sich bei den drei Sequenzen um Phenoloxidasen handelt.

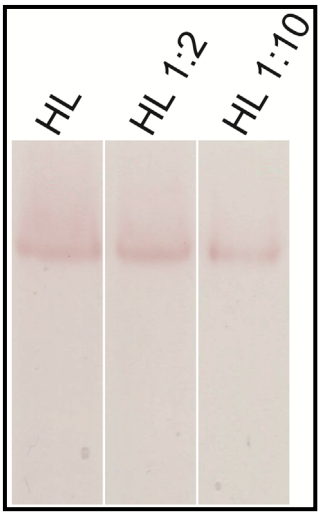


Abb. 3.22: PO-Aktivitätsnachweis in der Hämolymphe von *S. dehaani* mit MBTH. HL Hämolymphe

3.2.6. Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene in Ei und Mitteldarmdrüse

Aus Ei und Mitteldarmdrüse von *S. dehaani* wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde zur Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene in einer qRT-PCR eingesetzt. Bezogen wurde die relative Genexpression auf die Mitteldarmdrüse. Zur Normalisierung dienten die Referenzgene β-Actin (Abb. 3.23) und RPLP0 (Abb. 6.15 und 6.16, Anhang). Beide Referenzgene zeigten ähnliche Tendenzen. Wider der Erwartung, dass in der Mitteldarmdrüse am meisten mRNA Kopien von SdeHc1 und SdeHc2 vorliegen, stellte sich heraus, dass von SdeHc1 im Ei ca. 1500-mal mehr Kopien mRNA vorhanden sind als in der Mitteldarmdrüse. Bei SdeHc2 liegt der Faktor bei ca. 3400. Bei den Phenoloxidasen ist der Unterschied nicht so stark. Von SdePPO1 liegen 7-mal mehr Kopien mRNA im Ei als in der Mitteldarmdrüse vor, bei SdePPO3 liegt der Faktor bei 0,4. Von SdePPO2 liegen um den Faktor 181 mehr Kopien mRNA im Ei als in der Mitteldarmdrüse vor. Sowohl im Ei als auch in der Mitteldarmdrüse ist das Verhältnis der beiden Hämocyanin-Untereinheiten zueinander ähnlich. Von SdeHc1 liegen im Ei 4-mal mehr Kopien mRNA vor als von SdeHc2. In der Mitteldarmdrüse sind es ca. 9-mal mehr Kopien mRNA. Bei den Phenoloxidasen lässt sich in den beiden Geweben keine deutliche Tendenz erkennen. Während in der Mitteldarmdrüse von allen drei PPO ähnlich viele Kopien mRNA vorliegen, sind im Ei 9-mal mehr Kopien von SdePPO2 als von SdePPO1 vorhanden. Von SdePPO3 liegen im Ei 237-mal weniger Kopien mRNA vor als von SdePPO2.

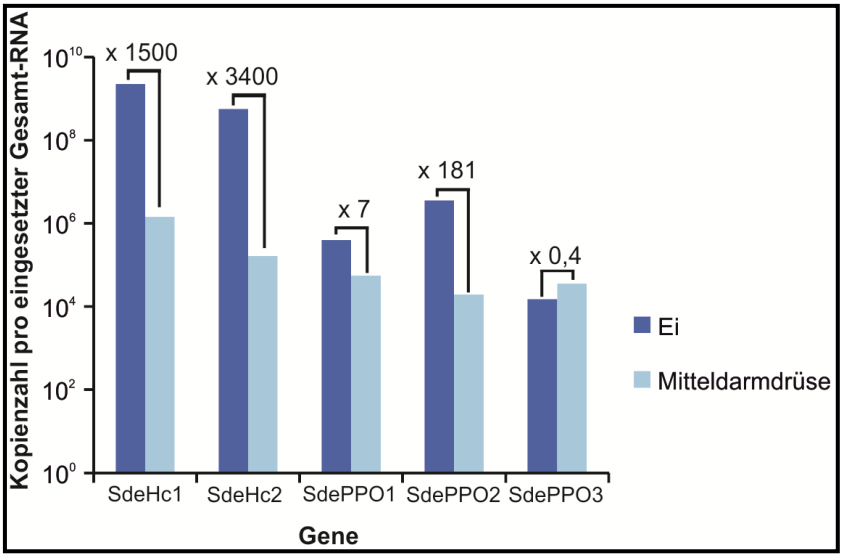


Abb. 3.23: Genexpression auf RNA-Ebene normalisiert auf das Referenzgen β-Actin, bezogen auf das Gewebe Mitteldarmdrüse.

3.2.7. Proteinbiochemischer Nachweis von Hämocyanin in Ei und Mitteldarmdrüse

Aus den Geweben Ei und Mitteldarmdrüse wurden neben der RNA auch die Proteine isoliert und in einem Western Blot analysiert. Des Weiteren erfolgte eine Quantifizierung der relativen Bandenintensität mit der Software ImageJ. In beiden Geweben liegt Hämocyanin vor (Abb. 3.24). Dies zeigt eine deutliche Bande bei ca. 75 kDa. Im Gegensatz zu dem Hämocyanin-Nachweis in der Hämolymphe (Abb. 3.20) wurde hier nur eine Bande detektiert. Die Intensität der Hämocyanin-Bande im Ei war 6-mal stärker als die in der Mitteldarmdrüse (Abb. 3.25).

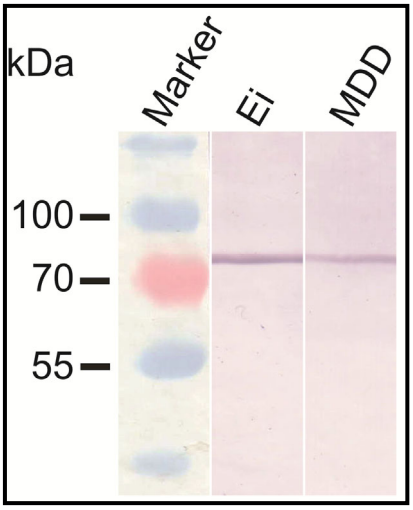


Abb. 3.24: Immunologischer Nachweis von Hämocyanin im Ei und in der Mitteldarmdrüse von *S. dehaani.* MDD: Mitteldarmdrüse. Verwendeter Antikörper: α-*Scutigera* Hämocyanin.

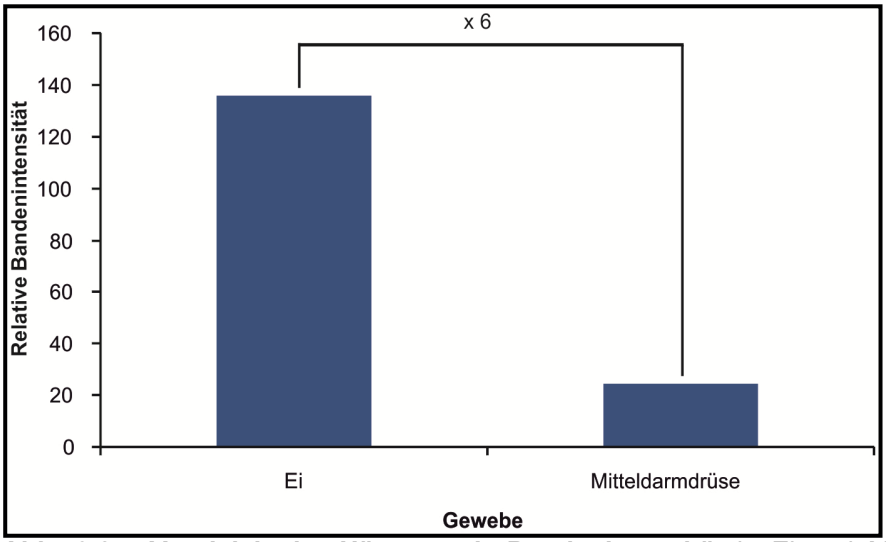


Abb. 3.25: Vergleich der Hämocyanin-Bandenintensität in Ei und Mitteldarmdrüse mit der Software ImageJ

4. Diskussion

Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden ist eine Proteingruppe, die neben dem als respiratorischem Protein fungierenden Hämocyanin auch Phenoloxidasen, die als Tyrosinasen und Catecholoxidasen agieren, beinhaltet. Des Weiteren zählen zu dieser Superfamilie die beiden Speicherproteine Hexamerin und Pseudo-Hämocyanin sowie der Rezeptor der Hexamerine. Während Hämocyanine in allen Unterstämmen der Arthropoden vorhanden sind (MARKL und DECKER, 1992; BURMESTER, 2001; VANHOLDE et al., 2001), sind die anderen Mitglieder auf einzelne oder mehrere Unterstämme beschränkt. So findet man Phenoloxidasen nur bei Crustaceen und Hexapoden, innerhalb der Cheliceraten fehlen sie (NAGAI und KAWABATA, 2000; DECKER et al., 2001). Bei den Myriapoden gibt es Sequenzdaten von zwei Spezies (PICK et al., 2014) sowie biochemische Nachweise einer Phenoloxidaseaktivität in anderen Spezies (XYLANDER und BOGUSCH, 1992; XYLANDER, 1996). Die Hexamerine und ihre Rezeptoren sind ausschließlich bei den Hexapoden zu finden und Pseudo-Hämocyanine kommen nur bei den decapoden Krebsen vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits bestehende Expressions- und Rekonstitutionssysteme für Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie optimiert, sowie neue Protokolle etabliert.
Ein weiterer Fokus lag auf der Charakterisierung des Hämocyanins und der Phenoloxidasen des Myriapoden *S. dehaani*.

4.1. Rekombinante Expression von Hexamerin, Hämocyanin und einer Phenoloxidase

Die Untersuchung der Struktur und Funktion von Proteinen setzt vorraus, dass diese rekombinant exprimiert werden können. So können zum Beispiel durch den Austausch einzelner Aminosäuren deren Relevanz in Bezug auf die Faltung und Interaktion mit anderen Molekülen analysiert werden. Insbesondere bei den kupferhaltigen Vertretern der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden ist es interessant den Mechanismus der Sauerstoffbindung näher zu untersuchen. Hierbei stehen die kupferbindenden Histidine sowie die die Sauerstoffbindung stabilisierenden Phenylalanine im Vordergrund. Bei den Globinen ist die rekombinante Expression von funktionsfähigem Protein möglich

(GAMBACURTA et al., 1993; DEWILDE et al., 2001; BOBOFCHAK et al., 2003). Anhand dieser rekombinant hergestellten Globine konnten bereits diverse strukturelle und funktionelle Studien durchgeführt werden (z. B. DEWILDE et al., 2001; FUCHS et al., 2004; YU et al., 2009). Voraussetzungen für Struktur- und Funktionsanalysen sind, dass das Protein richtig gefaltet ist und in seiner aktiven Form vorliegt.

4.1.1. Ausgewählte Proteine aus der Hämocyanin-Superfamilie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die rekombinante Expression ein kupferloses Hexamerin sowie ein kupferhaltiges Hämocyanin und eine Phenoloxidase ausgewählt. Bei dem Hexamerin handelt es sich um das larvale Serumprotein 2 von *D. melanogaster* (DmeLSP2), bei dem Hämocyanin um die Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* (PelHc4) und bei der Phenoloxidase um eine von *D. melanogaster* (DmePPO3). Die rekombinante Expression dieser drei Proteine war bereits in früheren Arbeiten untersucht worden. So konnte gezeigt werden, dass eine Expression von DmeLSP2 im T7/pET-System mit anschließender Rekonstitution generell möglich ist (HEFENBOCK, 2008). Das PelHc4 ließ sich ebenfalls in diesem Expressionssystem in seiner Apoform herstellen (DIDIER, 2009). Die DmePPO3 konnte als funktionelles Enzym in *Drosophila*-Zellen exprimiert werden (ERTAS, 2009).

4.1.2. Die Wahl des Expressionssystems

Für die rekombinante Expression dieser drei Proteine wurden prokaryotische *E. coli* Zellen, eukaryotische *Drosophila*-Zellen der Linie Schneider 2 (SCHNEIDER, 1972) sowie ein *in vitro* Expressionssystem verwendet. Letzteres bietet den Vorteil, dass es zellfrei ist. So können sich bei der Expression in diesem System keine Inclusion Bodies (Einschlusskörper) bilden, wie es z. B. bei der Expression in Mikroorganismen der Fall sein kann (NAKANO und YAMANE, 1998). Diese unlöslichen Proteinaggregate bilden sich im Cyto- oder Periplasma. Sie stellen zum einen eine Chance und zum anderen ein Problem dar (STRANDBERG und ENFORS, 1991). Die Chance besteht darin, dass das überexprimierte Protein meist in hoher Konzentration in den Proteinaggregaten vorliegt. Das Problem ist dabei die Solubilisierung. Diese ist bei der DmePPO3 nicht möglich (ERTAS, 2009). Die prokaryotischen *E. coli* Zellen haben den Vorteil einer einfachen Handhabung und großer Proteinausbeuten, verbunden mit einem geringen

Kostenaufwand (BANEYX, 1999). Ein Nachteil der prokaryotischen Zellen ist eine andere posttranslationale Modifikation der Proteine als im eukaryotischen System. So gibt es diverse Unterschiede in der N-Glykosylierung von pro- und eukaryotischen Proteinen (VALDERRAMA-RINCON et al., 2012). Diese Tatsache wiederum ist ein Vorteil bei der Expression von eukaryotischen Proteinen z. B. in Schneider 2 Zellen.

4.1.3. Die Wahl eines geeigneten Systems zum Kupfereinbau

Neben der Wahl des „richtigen“ Expressionssystems stand im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die Ermittlung eines geeigneten Systems zum Einbau von Kupfer in das rekombinant exprimierte Hämocyanin bzw. die Phenoloxidase im Vordergrund. Hämocyanine und Phenoloxidasen (Tyrosinasen und Catecholoxidasen) zählen zu den Typ3-Kupferproteinen. Diese verfügen über ein binukleäres Kupferbindungszentrum. Die Bindung von einem Molekül Sauerstoff erfolgt in einer „side-on“ Koordination durch zwei Kupferatome (DECKER et al., 2007). Die Kupferionen A und B werden von jeweils drei Histidinen koordiniert. Oxygenierte Hämocyanine und Phenoloxidasen weisen ein charakteristisches Absorptionsmaximum um die 340 nm auf. Dieses reflektiert die Bildung eines Kupfer-Sauerstoff-Komplexes.

4.2. Eignung von Expressionssytemen zur Herstellung von Proteinen aus der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden

Die im Rahmen dieser Arbeit für die rekombinante Expression verwendeten Proteine verfügten alle über einen C-terminalen *Strep*-tag II zur Aufreinigung. Für das DmeLSP2 konnte gezeigt werden, dass nach Expression im T7-Expressionssystem, *Strep*-tag Aufreinigung und Dialyse das Protein als Hexamer vorlag (Abb. 4.1). An diesem wurden Strukturuntersuchungen durchgeführt. Das PelHc4 konnte in drei verschiedenen Expressionssytemen erfolgreich exprimiert werden. Nur nach der Expression im T7-Expressionssystem lag ausreichend Protein für eine *Strep*-tag Affinitätschromatographie vor. Dieser folgten unterschiedliche Kupfereinbauversuche, deren Erfolg anhand von UV/VIS Spektroskopie untersucht wurde. Zudem erfolgte die Expression des PelHc4 im T7-Expressionssystem unter Anwesenheit von $CuCl_2$. Nach Affintätschromatographie konnte in UV/VIS Spektren jedoch kein Hinweis auf funktionelles Hämocyanin erhalten

werden. Die DmePPO3 wurde im *in vitro* Expressionssytem in Anwesenheit von Kupfer exprimiert. Der Nachweis der Phenoloxidaseaktivität erfolgte direkt im Expressionsansatz, dabei konnte nicht sicher eine Aktivität nachgewiesen werden.

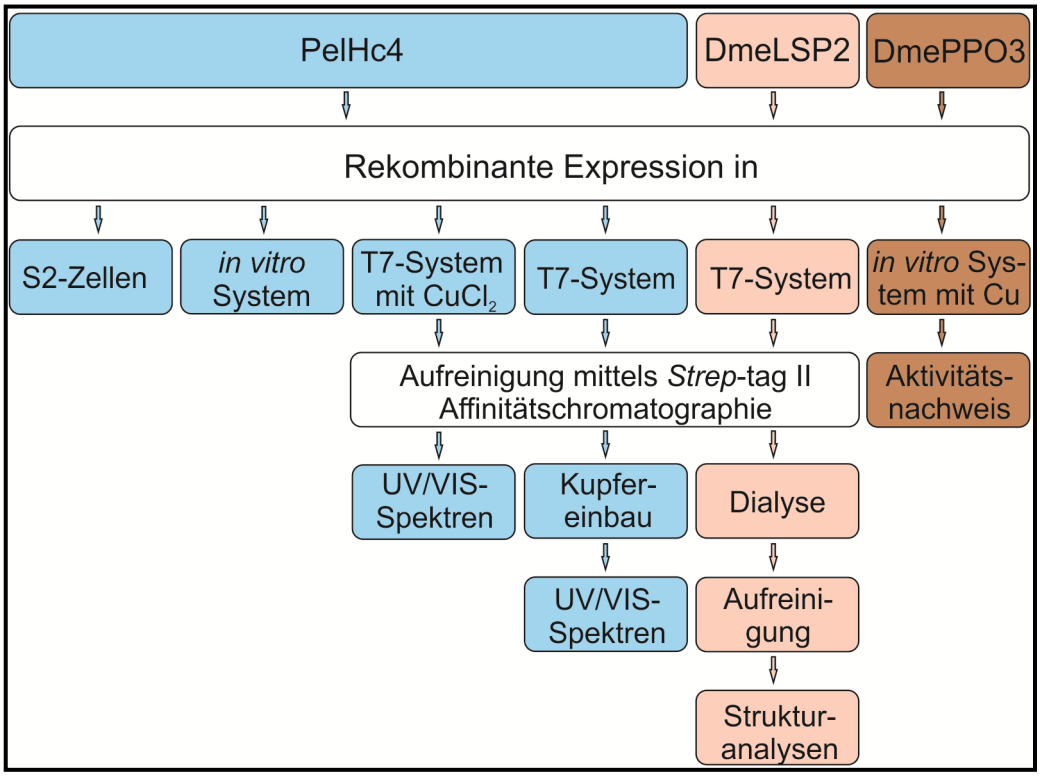


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionssysteme, Aufreinigungsmethoden und Rekonstitutionbedingungen für die drei Proteine PelHc4, DmeLSP2 und DmePPO3

4.2.1. Larvales Serumprotein 2 von *D. melanogaster*

Das DmeLSP2 ist ein Hexamer, welches sich aus sechs identischen Untereinheiten zusammensetzt. Es verfügt natürlicherweise über ein N-terminales Signalpeptid, über das es in die Hämolymphe sezerniert wird (MOUSSERON-GRALL et al., 1997). Für eine erfolgreiche rekombinante Expression in *E. coli* muss dieses entfernt werden (HEFENBOCK, 2008; ERTAS, 2009). Das Hexamer lässt sich im TEM an seiner quaderförmigen Struktur mit Kantenlängen um die 10 nm identifizieren (MOUSSERON-GRALL et al., 1997). 2008 war es HEFENBROCK gelungen, einzelne Untereinheiten im T7/pET-Expressionssystem in dem Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS rekombinant zu exprimieren. Diese wurden nach erfolgreicher Aufreinigung in einer Dialyse rekonstituiert und die Quartärstruktur mittels TEM überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Hexamere als auch einzelne Untereinheiten vorlagen.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und rekonstituierten DmeLSP2 lagen nach abgeschlossener Rekonstruktion ausschließlich Hexamere und keine einzelnen Untereinheiten vor. Das Expressions-, Aufreinigungs- und Rekonstitutionsprotokoll wurde so optimiert, dass ausreichend rekombinantes, richtig gefaltetes Protein für Strukturanalysen vorlag. Die Optimierungen bestanden in der Verwendung des Rosetta2(DE3)pLysS Expressionsstammes, welcher über das pRARE Plasmid verfügt. Dieses trägt laut Herstellerangaben die tRNA Gene für sieben von *E. coli* selten verwendete Codons. Die Aufreinigung des DmeLSP2 wurde von einer Dreischritt-Aufreinigung auf ein Einschritt-Protokoll mittels *Strep*-tag II (SCHMIDT et al., 1996) Affinitätschromatographie reduziert. Dieser *Strep*-tag II bietet neben der effizienten Aufreinigung des Proteins auch die Möglichkeit der Detektion durch einen gegen den *Strep*-tag II gerichteten Antikörper. Ein weiterer Vorteil des *Strep*-tag II ist, dass er in der Regel weder Proteinfaltung noch Sekretion behindert (SCHMIDT und SKERRA, 2007). Des Weiteren kann die Elution unter physiologischen Bedingungen stattfinden. Während bei HEFENBROCK (2008) nach abgeschlossener Aufreinigung 5 mg LSP2 aus einer 1,5 l Expressionskultur vorlagen, lagen bei dem hier verwendeten Einschritt-Protokoll in der Regel über 6 mg vor. Die erfolgreiche Optimierung wurde mittels Strukturanalysen bestätigt. Die offensichtlich korrekte Faltung und Bildung des Hexamers konnte sowohl in elektronenmikroskopischen Bildern als auch in einer 3D-Rekonstruktion gezeigt werden (Abb. 3.3 und 3.5). MARTIN (2006) konnte zeigen, dass die Untereinheiten des DmeLSP2 bohnenförmig sind und die Ecken eines trigonalen Antiprismas in einer „D3 point-group“ Symmetrie besetzen. In der hier angefertigten 3D-Rekonstruktion wiesen die Untereinheiten keine deutliche bohnenförmige Struktur auf. Ursache dafür ist wahrscheinlich, dass die 3D-Rekonstruktion von MARTIN (2006) „überfittet“ war (persönliche Mitteilung: MARKL, 2013). Die Struktur eines trigonalen Antiprismas ist jedoch zu erkennen. Das rekombinante rekonstituierte DmeLSP2 scheint in der 3D-Rekonstruktion in der Seitenansicht (sideview) grob hexagonal, in der Aufsicht (topview) rechteckig.

Das rekombinante DmeLSP2 ist wahrscheinlich nicht wie *in vivo* glykosyliert, da es in der SDS PAGE die zu erwartende molekulare Masse aufweist und nicht wie für Glykosylierungen typisch eine höhere molekulare Masse hat. Dabei scheint die N-Glykosylierung des Proteins keinen entscheidenden Einfluss auf die Bildung des Hexamers zu haben, denn *in vivo* ist das LSP2 glykosyliert (ROBERTS und EVANS-ROBERTS, 1979).

In der Analyse der Sekundärstruktur des DmeLSP2 mittels CD-Spektroskopie stellte sich heraus, dass 44% des Proteins als α-Helix vorliegen und 10% als β-Faltblatt. Die Werte weichen stark von dem SWISS MODELL Repository (SCHWEDE et al., 2003; ARNOLD et al., 2006; KOPP und SCHWEDE, 2006; KIEFER et al., 2009) für DmeLSP2 ab, in dem 21% des Proteins als β-Faltblatt, 27% α-Helix und 52% als Random Coils vorliegen. Dieses 3D-Strukturmodell basiert auf der Kristallstruktur des chinesischen Eichenseidenspinners (*A. perny)* Arylphorins, bei dem es sich ebenfalls um ein Hexamerin handelt. Die Ursache für diese Abweichungen in der Sekundärstruktur beruht wahrscheinlich darauf, dass es sich bei der Methode um eine grobe Abschätzung handelt. Die Tatsache, dass ein relativ hoher Prozentsatz an gefalteten Strukturen vorliegt, deutet darauf hin, dass das Protein richtig gefaltet ist.

Nachdem für das DmeLSP2 gezeigt werden konnte, dass es sich erfolgreich im prokaryotischen System rekombinant exprimieren und rekonstituieren lässt, lag bei den kupferhaltigen Vertretern der Hämocyanin-Superfamilie, PelHc4 und DmePPO3, der Schwerpunkt auf dem Kupfereinbau.

4.2.2. Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas* Phenoloxidase 3 von *D. melanogaster*

4.2.2.1. Auswirkungen der Zugabe von Kupfer während der Expression in *E. coli*

Das Hämocyanin der europäischen Languste *P. elephas* ist ein Hexamer, welches sich aus vier ähnlichen Untereinheiten zusammensetzt (MARKL et al., 1979; BELLELLI et al., 1988; NEUTEBOOM et al., 1989; KUSCHE et al., 2003b). Die Aminosäuresequenz dieser vier Untereinheiten unterscheidet sich in weniger als 5%. Natürlicherweise verfügt die hier verwendete Untereinheit vier über ein Signalpeptid, welches für die Expression im T7/pET-System sowie im *in vitro* Expressionssytem abgespalten wurde. Bei der Expression im bakteriellen T7/pET-System gibt es generell zwei Möglichkeiten um funktionelles, kupferhaltiges Hämocyanin herzustellen. Entweder wird das Kupfer während der Expression ins Medium gegeben oder es findet zunächst die Expression der Apoform mit anschließendem *in vitro* Kupfereinbau statt. Bei der Expression in Anwesenheit von Kupfer wurde die Bakteriensuspension während der Expression mit 20 µM $CuCl_2$ versetzt.

Kupfer ist schon in geringen Konzentrationen für Zellen toxisch. Kupfer^{1+} und Kupfer^{2+} können hochaffin an adventive Strukturen partiell gefalteter Proteine binden und dort die Autooxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren katalysieren (PUFAHL et al., 1997). Daher haben Zellen einen streng kontrollierten Mechanismus für die Aufnahme, intrazelluläre Verteilung, Verwendung sowie Exkretion von Kupfer (MIYAYAMA et al., 2011). Bei verschiedenen Polyphenoloxidasen (Phenoloxidasen der Pflanzen) konnte jedoch gezeigt werden, dass sie nach Expression in *E. coli* in Anwesenheit von 20 µM $CuCl_2$ Aktivität aufwiesen (SULLIVAN et al., 2004; DIRKS-HOFMEISTER et al., 2012). Wahrscheinlich bleibt die Kupferhomöostase hier erhalten. Über diese ist bei Prokaryoten bisher kaum etwas bekannt. Es wird angenommen, dass sie bei Eukaryoten durch folgenden Mechanismus der Verteilung des Kupfers an die Kupferenzyme aufrechtgehalten wird (KIM et al., 2008). Kupfer liegt in der Zelle als Kupferion vor, gebunden an das Ctr1, einem Kupfertransporter, der an der Plasmamembran exprimiert wird (ZHOU und GITSCHIER, 1997; LEE et al., 2000). Kupfertransportproteine, sogenannte Kupferchaperone, transportieren das Kupfer zu den Kupferenzymen. Ein Beispiel ist das Kupferchaperon CCS (copper chaperone for superoxide dismutase) der Superoxiddismutase 1 (SOD1), das Kupfer an SOD1 durch Bildung eines Heterodimers abgibt. Das Kupferchaperon Atox1 (aus Hefezellen) transportiert Kupfer zu Atp7a und Atp7b, ATP- abhängigen Kupfertransportproteinen, in dem sekretorischen Stoffwechselweg des Kupfers über den Golgi-Apparat (KLOMP et al., 1997; HAMZA et al., 1999). Im Golgi-Apparat wird das Kupfer entweder direkt in Kupferenzyme eingebaut oder es wird über sekretorische Vesikel ausgeschieden. Auch in Prokaryoten existiert ein Atx1-ähnliches Kupferchaperon CopZ (COBINE et al., 1999), für das verschiedene Funktionen vorgeschlagen wurden (COBINE et al., 1999; ROSENZWEIG und O'HALLORAN, 2000). Cox17 ist ebenfalls ein Kupferchaperon, das für den Transport des Kupfers in die Mitochondrien, zum Einbau in die Cytochrom C Oxidase, in humanen und Hefezellen verantwortlich ist (GLERUM et al., 1996; AMARAVADI et al., 1997; BEERS et al., 1997; SRINIVASAN et al., 1998).

Für einige Typ3-Kupferproteine, zu denen auch die Hämocyanine und Phenoloxidasen zählen, sind die entsprechenden Kupferchaperone bekannt. So konnte bei diversen *Streptomyces* Spezies gezeigt werden, dass das Melanin-synthetisierende Operon aus zwei Genen, die für MelC1 und MelC2 kodieren, besteht (z. B. LEE et al., 1988; BETANCOURT et al., 1992; CHEN et al., 1992). MelC1 kodiert upstream für ein kleines Metallochaperon (Caddie-Protein), das für den Kupfereinbau in die durch MelC2 kodierte Apotyrosinase verantwortlich ist (LEE et al., 1988; CHEN et al., 1992). Das marine

Bakterium *Marinomonas mediteranea* verfügt über ein Operon, auf dem für die Prophenoloxidase B (PPOB) zwei Gene liegen, PPOB1 und B2. Während B1 für die Apotyrosinase kodiert, ist das B2 Protein wahrscheinlich an dem Kupfereinbau in die Apotyrosinase B1 beteiligt (LOPEZ-SERRANO et al., 2004). Dieses vermeintliche Kupferchaperon scheint sehr spezifisch zu agieren, denn *M. mediteranea* verfügt noch über eine weitere PPO (PPOA), welche jedoch nicht von PPOB2 mit Kupfer versorgt werden kann (LOPEZ-SERRANO et al., 2007). Der Kupfereinbau in Proteine ist bisher ein unvollständig erforschtes Phänomen, insbesondere über die Kupferbeladung von Typ3-Kupferproteinen ist wenig bekannt (JAENICKE et al., 2010). Hämocyanine weisen jedoch in der Domäne 3 ein Cupredoxin-ähnliches Motif auf (Typ1-Kupferbindungszentrum). JAENICKE et al. (2010) schlugen vor, dass die Hämocyanine von einem Protein abstammen, dass sowohl über ein Typ1- als auch über ein Typ3-Kupferbindungszentrum verfügte. Da die Kupferbeladung während der Hämocyaninbiosynthese durch bestimmte Kupferchaperone erfolgte, nahm der selektive Druck auf den Erhalt des Kupferbindungszentrums in der Cupredoxin-ähnlichen Domäne ab. Über die Kupferchaperone der Hämocyanine fehlen bisher weitere Daten. Daher war eine Expression in Anwesenheit des entsprechenden Chaperons für PelHc4 nicht möglich.

Neben den Kupferchaperonen scheinen auch die Metallothionine eine wichtige Rolle in der Kupferhomöostase der Zelle zu spielen. Sie sind Cystein-reiche intrazelluläre Metall-bindende Proteine, die eine geringe molare Masse aufweisen (z. B. KLAASSEN et al., 1999; COYLE et al., 2002; GRENNAN, 2011). Auch für Hämocyanin konnte gezeigt werden, dass Kupfer-Metallothionine das Potential besitzen, Kupfer in das aktive Zentrum von Apohämocyanin zu transportieren (BROUWER et al., 1986; BROUWER et al., 2002). Für diesen Versuch wurden beide Proteine aus dem Organismus isoliert.

Im Rahmen dieser Arbeit führte die Expression in Anwesenheit von $CuCl_2$ sogar zu höheren Proteinausbeuten als ohne diesen Zusatz. Das deutet nicht darauf hin, dass das Kupfer nicht toxisch für die *E. coli* Zellen war. Die Zugabe von Kupfer während der Expression hatte bei einigen Polyphenoloxidasen zu funktionellem Enzym geführt. Unter diesen Bedingungen konnte hier jedoch kein funktionelles PelHc4 nachgewiesen werden. Wahrscheinlich erfolgt der Kupfereinbau in die Polyphenoloxidasen in dem prokaryotischen Expressionssysem entweder ohne ein entsprechendes Chaperon oder ein Metallochaperon von *E. coli* ist in der Lage Kupfer in diese Proteine einzubauen. Dem erfolglosen Kupfereinbau in das Hämocyanin der Crustaceen könnten auch

Strukturunterschiede zu den Polyphenoloxidasen zugrunde liegen. Generell zeigen Sequenzvergleiche, dass die Tyrosinasen und Catecholoxidasen der Pflanzen, Pilze, Bakterien und Vertebraten mehr dem Molluskenhämocyanin als dem der Arthropoden in ihrer Sekundärstruktur ähneln (VANGELDER et al., 1997; VANHOLDE et al., 2001). Vergleicht man jedoch die Proteinstrukturen um das aktive Zentrum von Mollusken- und Arthropodenhämocyanin sowie der Catecholoxidase der Süßkartoffel, so sind diese sich in allen drei Proteinen sehr ähnlich (DECKER und TUCZEK, 2000).

Die Expression von PelHc4 im prokaryotischen T7/pET-System unter Zugabe von Kupfer führte nicht, wie für einige Polyphenoloxidasen beschrieben, zu funktionellem Protein. Das T7/pET-System in Korrelation mit der Zugabe von Kupfer während der Expression eignet sich also nicht zur Herstellung von funktionellem PelHc4.

4.2.2.2. Auswirkungen der Zugabe von Kupfer nach der rekombinanten Expresssion in das Apoprotein

Die alternative Möglichkeit der Herstellung von funktionellem kupferhaltigen Hämocyanin ist die Expression des PelHc4 in seiner Apoform mit anschließendem *in vitro* Kupfereinbau. Diese Methode hatte sich schon bei anderen Kupferproteinen als erfolgreich herausgestellt und die Versuchsbedingungen wurden zum Teil an diese Bedingungen angepasst. Dabei ist es generell möglich, Kupfer als Cu^{1+} oder Cu^{2+} einzusetzen.

JENSEN et al. (1999) konnten für das Menkes-Protein zeigen, dass eine Expression in dem Bakterienstamm BL21(DE3)pLyS mit anschließendem Kupfereinbau durch Dialyse gegen einen $TrisCuCl_4^{3-}$-Puffer, in dem Kupfer als Cu^{1+} vorliegt, möglich ist (JENSEN et al., 1999). Bei dem Menkes-Protein handelt es sich um eine P-Typ ATPase, die sechs sich wiederholende stark metallassoziierte (HMA: heavy metal-associated) Sequenzen am N-Terminus aufweist (DIDONATO et al., 1997). Dieses HMA-Motiv ist stark konserviert und wurde in mehreren bakteriellen HMA-Proteinen (BULL und COX, 1994) sowie in dem Kupferchaperon Atox1 respektive Atx1 gefunden (KLOMP et al., 1997). Das HMA-Motiv bindet Kupfer entweder über zwei Cysteinreste oder über diese beiden Cysteinreste plus einen Methioninrest (PUFAHL et al., 1997; GITSCHIER et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Versuchsbedingungen in Bezug auf pH Wert, Art des Lösens des Proteins und Molarität der Ascorbinsäure modifiziert, nachdem DIDIER (2009) mit diesem Ansatz vermutlich die Oxy- und die Metform des PelHc4 nachweisen konnte. Ein erfolgreicher Kupfereinbau konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet

werden. Vermutlich lagen Probleme mit der Faltung des PelHc4 vor. DIDIER (2009) beschrieb bereits dieses Problem und konnte die erzielten Ergebnisse nicht reproduzieren.

Unter Einsatz eines Cu^{1+}-haltigen Puffers war es (1992) BROUWER und BROUWER-HOEXUM gelungen, das Apohämocyanin des amerikanischen Hummers *Homarus americanus* mit Kupfer zu funktionsfähigem Protein zu rekonstituieren. Sie entnahmen dem Hummer dafür Hämocyanin und deoxygenierten dieses. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bedingungen für die Kupferrekonstitution des Apo-PelHc4, wie von BROUWER und BROUWER-HOEXUM als optimal beschrieben, gewählt. Der erfolgreiche Kupfereinbau wurde anhand von Absorptionsspektren überprüft. Nach vier bis sechs Stunden kam es zu einer Veränderung der Absorption zwischen 300 und 350 nm. Ein deutliches Oxyhämocyanin Absorptionsmaximum konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis darauf, dass es sich um eine geeignete Methode zur Kupferrekonstituion von Apo-PelHc4 handeln könnte, die Versuchsbedingungen aber noch weiter optimiert werden müssen.

Für eine Champignon-Tyrosinase konnten WIGFIELD und GOLTZ (1993) zeigen, dass eine Rekonstitution mit Kupfersulfat möglich war. Sie verwendeten kommerziell erworbene Tyrosinase, die sie durch Inkubation mit Cyanid in ihre inaktive Apoform umwandelten (WIGFIELD und GOLTZ, 1990). Der Versuch wurde bei verschiedenen pH Werten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Kupferrekonstitution der Apotyrosinase ein pH Wert-abhängiger Prozess ist, der bei der Verwendung von Cu^{2+} bei pH 7,5 ca. zwölfmal langsamer erfolgt als bei pH 5,8. Beim Vergleich von Cu^{1+} versus Cu^{2+} bei pH 5,8 stellte sich heraus, dass der Kupfereinbau ins native Protein mit Cu^{1+} 16 mal effektiver ist (WIGFIELD und GOLTZ, 1990). Dieser Versuch erwies sich für das PelHc4 als vielversprechend, da es im Laufe der Zeit zu einem Anstieg der Absorption bei 340 nm kam. Allerdings präzipitierte das Protein nach abgeschlossenem Versuch, was auf eine falsche Faltung hindeutet.

Im Gegensatz zu der Kupferzugabe während der Expression von PelHc4 weist die Zugabe von Kupfer nach der Expression auf mögliche Versuchsbedingungen zur Herstellung von funktionellem Hämocyanin hin. Allerdings müssen hier noch mehrere Faktoren, wie die Proteinfaltung und die Bedingungen bei Kupfereinbau optimiert werden.

4.2.2.3. Eignung von Insektenzellen (Schneider 2 Zellen)

Nachdem die Expression von PelHc4 im prokaryotischen T7/pET-System zwar erfolgreich war, aber Probleme mit der Stabilität des Proteins vorlagen, wurde alternativ das „Drosophila Expression System“ verwendet. Diese aus *D. melanogaster* stammende Zelllinie wurde stabil transfiziert (SCHNEIDER, 1972). Neben der einfachen Handhabung der Zellen bietet dieses System die Möglichkeit Vektoren zu verwenden, welche über einen starken Metallothioninpromotor verfügen (MARONI et al., 1986; BUNCH et al., 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der pMT/V5-His B Vektor ausgewählt. Durch seinen starken Metallothioninpromotor ist es möglich, die Expression des Zielproteins durch die Zugabe von $CuSO_4$ zu induzieren. Das PelHc4 verfügt natürlich über ein Signalpeptid, was *in vivo* für die Sezernierung in die Hämolymphe verantwortlich ist. Bei der Verwendung von serumfreien Medium konnte PelHc4 in diesem nachgewiesen werden, allerdings lag es in geringer Konzentration vor. Auch in den Zellen lag lösliches PelHc4 in einer geringen Konzentration vor. Für die Prophenoloxidase 3 aus *D. melanogaster* war die Expression in diesem für sie homologen System erfolgreich (ERTAS, 2009). Sie lag anschließend als funktionelles Enzym vor. Dies konnte in einem Aktivitätsassay nachgewiesen werden. Da ihr ein Signalpeptid fehlt, befand sich die lösliche DmePPO3 in den Zellen. Der Aktivitätsnachweis konnte im Zelllysat erfolgen. Das Protein wurde demzufolge nicht aufgereinigt.

Die erfolgreiche Expression von funktioneller Phenoloxidase in Schneider 2 Zellen hatte gezeigt, dass es generell möglich ist, kupferhaltige Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden in diesem System herzustellen. Damit schien es ein geeignetes Expressionssystem für PelHc4 zu sein. Das Problem der geringen Expressionsrate von PelHc4 in S2 Zellen führte dazu, dass nach der chromatographischen Auftrennung der *Drosophila*-Proteine zu wenig Zielprotein für die Messung von Absorptionsspektren vorhanden war. Ob der Einbau von Kupfer in das in S2 Zellen hergestellte PelHc4 überhaupt möglich ist, bleibt letztendlich ungeklärt. Sollte wie bereits beim prokaryotischen System ausgeführt, ein Kupferchaperon für den Kupfereinbau in das PelHc4 benötigt werden, kann wahrscheinlich auch in *Drosophila*-Zellen kein Oxyhämocyanin hergstellt werden. Da Kupferchaperone generell spezifisch zu sein scheinen (LOPEZ-SERRANO et al., 2007), könnten die *Drosophila*-eigenen Chaperone unter Umständen nicht für den Kupfereinbau in das Apohämocyanin sorgen. Die erfolgreiche Expression der DmePPO3 in S2 Zellen könnte damit zusammenhängen,

dass es sich um ein homologes System handelt und das entsprechende Kupferchaperon bereits vorhanden ist.

4.2.2.4. Eignung eines zellfreien *in vitro* Expressionssystems in Anwesenheit von Kupfer

Zellfreie *in vitro* Expressionssysteme werden in der Regel aus *E. coli*, Weizenkeimen oder Kaninchen Retikulozyten gewonnen (z. B. JERMUTUS et al., 1998; ENDO und SAWASAKI, 2003; JACKSON et al., 2004). Sie bieten unter anderem die Möglichkeit der Modifizierung von Reaktionsbedingungen, z. B. für eine bessere Proteinfaltung (KATZEN et al., 2005). Im Fall des PelHc4 bot es die Möglichkeit die Expression in Gegenwart von Kupfer stattfinden zu lassen. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete, auf *E. coli*-Komponenten basierende System, bietet den Vorteil von hohen Syntheseraten. Die Produkte können von wenigen Mikro- bis zu einigen Milligramm pro Milliliter Reaktion reichen, sind jedoch protein- und reaktionsabhängig (KIGAWA et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst 25 µl Ansätze verwendet, um zu überprüfen, ob eine Expression möglich ist. Diese geringen Ausgangsvolumen führten dazu, dass nach einer Affinitätsaufreinigung praktisch kein Protein mehr vorlag. Somit war es für das PelHc4 nicht möglich Absorptionsspektren zu messen. Zur Überprüfung, ob sich das zellfreie *in vitro* Expressionssystem zur Herstellung von funktionellen Typ3-Kupferproteinen aus der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden generell eignet, wurde mit der DmePPO3 weitergearbeitet. Für dieses Protein konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass es als funktionelles Enzym in *Drosophila* Schneider 2 Zellen exprimiert werden kann. Zum Nachweis der Aktivität und damit auch der Funktionalität und Kupferbindung kann bereits bei sehr geringen Mengen an PPO ein Aktivitätstest (hier: MBTH-Assay) im Zelllysat durchgeführt werden (ERTAS, 2009). Zunächst erschien dieser Ansatz als erfolgsversprechend. Das freie Kupfer interagierte jedoch mit dem Färbereagenz MBTH, sodass alle Negativkontrollen stark mit angefärbt wurden. Alternativ kann eine Phenoloxidaseaktivität auch mit dem Dopachrom-Assay nachgewiesen werden (MASON, 1948), welches jedoch weniger sensitiv ist und daher für diese Zwecke nicht in Frage kam.

Das *in vitro* Expressionssytem eignet sich wahrscheinlich nicht für die Herstellung von Typ3-Kupferproteinen. Bei einem Ausgangsvolumen von 25 µl ist die Proteinausbeute für den Nachweis von funktionellem PelHc4 zu gering. Da bei der DmePPO3 nicht sicher ein Aktivitätsnachweis erfolgen konnte, wurde die Expression von PelHc4 in diesem System nicht weiter verfolgt.

4.3. Das aktive Zentrum des Hämocyanins

Während die rekombinante Expression von Hämocyanin in allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expressionssystemen etabliert werden konnte, blieb ein stabiler Erfolg beim Kupfereinbau in das Apohämocyanin aus. Die Oxygenierung von Hämocyanin induziert eine Veränderung des Oxidationsstatus von $Cu(I)_2$ zu $Cu(II)_2$ sowie eine Veränderung der Absorption im UV/VIS Bereich (EICKMAN et al., 1979). Diese Veränderungen sind charakteristische Absorptionsbanden bei 340 und 570 nm (Abb. 4.2), welche aus der Bildung des Sauerstoff-Kupfer-Komplexes resultieren (SOLOMON et al., 1992). Beide Absorptionsmaxima stellen ein lineares Signal zu der Menge an gebundenem Sauerstoff dar und verschwinden, wenn kein Sauerstoff gebunden ist (RICHEY et al., 1983). Der Abstand zwischen den beiden Kupferionen im aktiven Zentrum beträgt 3,5 Å in der Oxy- und 4,6 Å in der Deoxyform. In dem binukleären Zentrum des Hämocyanins sind drei Oxidationsstufen möglich: Cu^{I}_2 (Deoxyhämocyanin), Cu^{II}_2 (Oxy- oder Methämocyanin) und $Cu^{I}Cu^{II}$ (Semimethämocyanin; ANDREW et al., 1993). Methämocyanin weist ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 680 nm auf. Semimethämocyanin kommt unter physiologischen Bedingungen nicht vor. Für eine humane Tyrosinase wurde dieser Zustand ($Cu^{I}Cu^{II}$) jedoch als Teil des Mechanismus der Oxidation von L-Dopa und L-Tyrosin vorgeschlagen (WOOD und SCHALLREUTER, 1991). Während in dieser Arbeit nur eine steigende Absorption bei 340 nm beim PelHc4 beobachtet werden konnte, konnte DIDIER (2009) die Bildung der putativen Oxy- und Metform beobachten. Diese Ergebnisse ließen sich schon von DIDIER nicht reproduzieren und hängen wahrscheinlich mit Faltungsproblemen des PelHc4 bei der Expression im T7/pET-System zusammen.

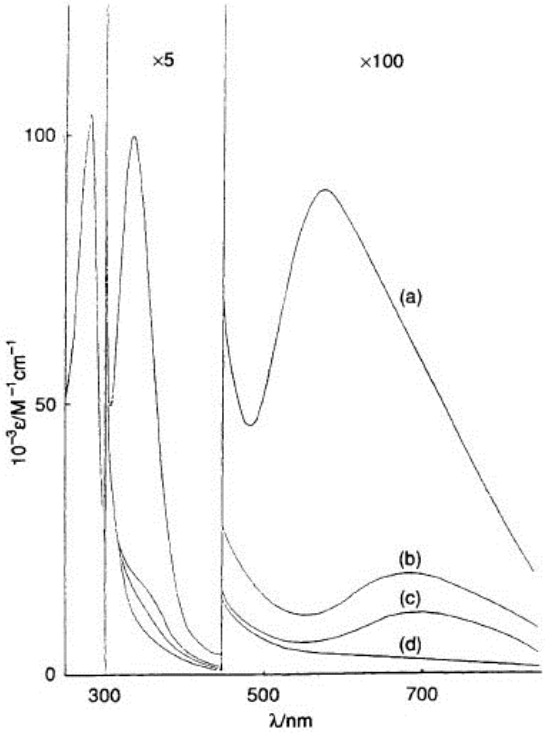


Abb. 4.2: Absorptionsspektren von Hämocyanin: (a) Oxyhämocyanin, (b) Methämocyanin, (c) Semimethämocyanin, (d) Desoxyhämocyanin (ANDREW et al., 1993)

BROUWER und BROUWER-HOEXUM war es 1992 gelungen, natives Hämocyanin aus *Homarus americanus* aufzureinigen, in seine Apoform zu überführen und *in vitro* mit Kupfer zu rekonstituieren. Sie fassten den Rekonstitutionsprozess folgendermaßen zusammen: 1. Cu^{1+} bindet an der Hämocyaninoberfläche (Eingang zum Kupfertunnel). 2. Das Cu^{1+} wandert langsam durch den Kanal in das aktive Zentrum und bildet zunächst ein mononukleäres Zentrum. 3. Das zweite Kupferion wandert schnell in das Hämocyanin hinein, wodurch sich das binukleäre Zentrum bildet (BROUWER und BROUWER-HOEXUM, 1992). Die Rolle des Kupfers im aktiven Zentrum des Hämocyanins ist auch mehrfach Gegenstand weiterer Untersuchungen (BROUWER et al., 2002; GATTO et al., 2004; SPINOZZI et al., 2005). Dabei spielt die Wirkung der Kupferionen auf die Struktur eine entscheidende Rolle. In Strukturanalysen (CD-Spektroskopie) konnte gezeigt werden, dass beim Hämocyanin der Mittelmeer-Strandkrabbe *Carcinus aestuarii* die Entfernung des Kupfers aus dem aktiven Zentrum zu marginalen Konformationsänderungen des Hexamers führte. Beim Monomer hingegen führte die Entfernung zu Veränderungen der Tertiärstruktur (SPINOZZI et al., 2005). Ungeklärt bleibt, ob der Einbau des Kupfers in die Apoform *in vivo* nach der Proteinbiosynthese und Proteinfaltung oder bereits während der Translation stattfindet (BROUWER und BROUWER-HOEXUM, 1992). Sollte der Kupfereinbau tatsächlich *in vivo* während der Translation stattfinden, ist es unter Umständen schwierig mit einem System, wie dem hier verwendeten T7/pET-System in Kombination mit einem *in vitro* Kupfereinbau, funktionelles Hämocyanin herzustellen. Viel wahrscheinlicher scheint die Expression von funktionellem Protein in einem System, in dem Kupfer bereits während der Translation oder nach der Proteinsynthese und Proteinfaltung eingebaut werden kann. Das ist jedoch beim T7/pET-System nicht der Fall, in S2 Zellen und im *in vitro* Expressionssystem konnte es aufgrund zu geringer Proteinmengen nicht nachgewiesen werden.

4.4. Eignung von Absorptionsspektren zur Überprüfung eines erfolgreichen Kupfereinbaus

Wie bereits erwähnt war ein zentrales Problem bei der Herstellung von funktionellem PelHc4, neben Problemen bei der Proteinfaltung und dem Kupfereinbau, die Etablierung einer Methode zur Überprüfung des erfolgreichen Kupfereinbaus. Die hier verwendete Methode der UV/VIS-Spektroskopie wird sowohl zum Nachweis von oxygeniertem Hämocyanin in der Hämolymphe (z. B. JAENICKE et al., 1999), als auch zur

Überprüfung der Rekonstitution von kupferfreiem Hämocyanin mit Kupfer (BROUWER et al., 1986; BROUWER und BROUWER-HOEXUM, 1992) verwendet.
Zur Messung von UV/VIS-Spektren sind recht hohe Proteinkonzentrationen und Volumina erforderlich, was bei einer Vielzahl der Versuche dazu führte, dass ein erfolgreicher Kupfereinbau nicht überprüft werden konnte. Ein weiterer Aspekt ist die Sensitivität der Absorptionsspektren, denn die Absorption bei 340 nm ist deutlich geringer als die bei 280 nm. Das Verhältnis zwischen den beiden Messpunkten kann stark variieren und korrespondiert zum einen mit der Stärke der Absorption bei 280 nm, also der Anzahl an aromatischen Aminosäuren, und zum anderen mit der Menge an gebundenem Sauerstoff (RICHEY et al., 1983). Eine sehr sensitive Methode zur Messung der Sauerstoffbindung an das aktive Zentrum des Hämocyanins ist Fluoreszenz (LOEWE, 1978). Deoxygeniertes Hämocyanin fluoresziert bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 290 nm. Je mehr Sauerstoff gebunden wird, desto schwächer wird die Fluoreszenz. Dabei besteht ein lineares Verhältnis zwischen Sauerstoffsättigung und Fluoreszenz. Da die Sauerstoffaffinität nicht durch die Hämocyaninkonzentration beeinflusst wird (LOEWE und LINZEN, 1975; LOEWE, 1978), reichen geringe Proteinkonzentrationen aus. Die Möglichkeit Sauerstoffbindung an das Hämocyanin mittels Fluoreszenz zu messen, bestand im Rahmen dieser Arbeit nicht und das Hämocyanin war für einen Transport zu instabil.

4.5. Kupferlose versus kupferhaltige Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie

Ziel dieser Arbeit war es, ein Expressionssystem für Proteine aus der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden zu etablieren und zu optimieren. Dabei lag der Fokus insbesondere auf dem kupferhaltigen Vertreter Hämocyanin. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die rekombinante Expression von richtig gefaltetem DmeLSP2 im Cytopasma von *E. coli* möglich ist, wurde angenommen, dass unter denselben Bedingungen richtig gefaltetes Hämocyanin hergestellt werden kann. Immerhin verfügen das hier verwendete DmeLSP2 und PelHc4 über 27,58% identische und 48,91% ähnliche Aminosäuren. DIDIER (2009) konnte zeigen, dass die rekombinante Expression des PelHc4 in *E. coli* möglich ist. Bei der *in vitro* Rekonstitution des PelHc4 mit Kupfer wurden jedoch immer wieder Präzipitate festgestellt, was auf eine nicht korrekte Proteinfaltung hindeutet. DmeLSP2 verfügt wie PelHc4 über eine putative N-Glykosylierungsstelle. Während dieses Glykan beim DmeLSP2 offensichtlich nicht für die

Proteinfaltung und Stabilität entscheidend ist, könnte es beim PelHc4 eine Rolle spielen. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die N-Glykosylierung von Proteinen nicht nur für ihre Faltung, sondern auch für ihre Stabilität verantwortlich ist (MITRA et al., 2003; BUCK et al., 2004; MITRA et al., 2006). Dagegen spricht wiederum, dass in Strukturanalysen gezeigt werden konnte, dass sich die Glykane mit Ausnahme von zwei N-Acetylglucosaminen vor allem auf der Oberfläche der Proteine befinden (WORMALD et al., 2002). Bei der Hämocyaninuntereinheit B von der kalifornischen Languste *P. interruptus* ist ein Asparagin glykosyliert. Dieses Glykan steht mit Ausnahme des ersten Zuckers nicht in Kontakt mit den anderen Aminosäureresten (GAYKEMA et al., 1984). Bei der Expression von PelHc4 in S2 Zellen konnte gezeigt werden, dass es eine deutlich höhere molare Masse aufwies als bei der Expression in *E. coli,* was ein Hinweis auf eine Glykosylierung ist.

Die Expression des kupferhaltigen PelHc4 unter ähnlichen Bedingungen wie die beim DmeLSP2 führen trotz großer Ähnlichkeiten auf Aminosäureebene wahrscheinlich zu nicht korrekt gefalteten PelHc4 ohne posttranlationale Modifikationen. Der entscheidende Unterschied zwischen diesen beiden Proteinen ist das im LSP2 verlorengegangene Kupferbindungszentrum. Dieses scheint auch Einfluss auf die Proteinfaltung zu haben. Es erscheint logisch, dass die Expressionsbedingungen für das PelHc4 denen für DmePPO3 ähneln müssen, da es sich bei diesem Enzym ebenfalls um ein Typ3-Kupferprotein handelt. Allerdings sind S2 Zellen nicht das geeignete Expressionssytem für PelHc4.

4.6. Nachweis von Hämocyanin und Phenoloxidasen in *S. dehaani*

4.6.1. Funktionelles Hämocyanin in *S. dehaani*

Myriapoden verfügen wie Hexapoden über ein ausgeprägtes Tracheensystem. Lange wurde deswegen angenommen, dass sie keine respiratorischen Proteine aufweisen und dass die wenigen Vorkommen von Hämocyanin in den Scutigeromorphen Ausnahmen darstellten. Diese Ausnahmen wurden in Korrelation mit der hohen Aktivität der Tiere und ihrem auffälligen blind endenden Tracheensystem gestellt (MANGUM und GODETTE, 1986). Noch immer ist das Hämocyanin der Myriapoden nicht so gut erforscht wie das der Crustaceen und Cheliceraten. Immerhin konnte es inzwischen in den Chilopoden

(Hundertfüßern), Diplopoden (Doppelfüßern) und Symphylen (Zwergfüßern) nachgewiesen werden (SUNDARA RAJULU, 1969; MANGUM et al., 1985; GEBAUER und MARKL, 1999; JAENICKE et al., 1999; KUSCHE und BURMESTER, 2001; KUSCHE et al., 2003a; MARKL et al., 2009; DAMSGAARD et al., 2013; PICK et al., 2014). Dabei ist Hämocyanin in einigen Chilopoden- und Diplopodenspezies vorhanden, während es in anderen Spezies offenbar fehlt (PICK et al., 2014). Pauropoden (Wenigfüßer) standen noch nicht für Hämocyanin-Untersuchungen zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmalig der Nachweis von putativer Hämocyanin-mRNA in dem Hundertfüßer *S. dehaani*. Dabei konnten die vollständigen Sequenzen von zwei Untereinheiten identifiziert werden. In einer phylogenetischen Analyse gruppierten sie mit anderen Myriapodenhämocyanin-Untereinheiten. Bei den Myriapoden gibt es zwei Hämocyaninuntereinheitstypen, welche in den Chilopoda, Diplopoda und Symphyla vorhanden und damit bereits vor der Entstehung dieser drei Unterklassen entstanden sind. Sie wurden in dieser Arbeit als Typ I und Typ II Myriapodenhämocyanin definiert (Abb. 3.17). Die beiden in dieser Arbeit identifizierten vermeintlichen Hämocyanin-Sequenzen enthielten die für die Sauerstoffbindung essentiellen Kupferbindungsstellen sowie die, die Sauerstoffbindung stabilisierenden, Phenylalanine und ein Signalpeptid. Dies wies auf eine Funktion als respiratorisches Protein hin, welche durch die Charakterisierung der Sauerstoffbindungskinetik der Hämolymphe von *S. dehaani* bestätigt werden konnte. Dabei stellte sich heraus, dass das Hämocyanin eine moderate Sauerstoffaffinität aufweist (pH 7,7: P_{50}~19,2 Torr; pH 6,8: P_{50}~27,2 Torr). Ein Bohr-Effekt ist vorhanden, da die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins bei dem niedrigeren pH Wert geringer ist als bei dem höheren. Bei beiden untersuchten pH Werten liegt eine geringe Kooperativität vor (pH 7,7 bei h~1,86 und bei pH 6,8 bei h~1,6). In anderen Arbeiten wurde das Sauerstoffbindungsverhalten dreier weiterer Myriapoden-hämocyanine bestimmt. Dies ist zum einen das des Chilopodens *S. coleoptrata*. Bei diesem liegt eine geringe Sauerstoffaffinität (P_{50}=55 Torr) und eine hohe Kooperativität vor (h=8,9 bei pH 7,5; MANGUM et al., 1985). Zum anderen handelt es sich um das Hämocyanin des *Spirostreptus* sp., welches eine hohe Sauerstoffaffinität (P_{50}=4,7 Torr) und eine geringe Kooperativität aufweist (h~1,3 bei pH 7,5; JAENICKE et al., 1999). Bei dem Hämocyanin eines weiteren Diplopodens *A. gigas* sind die Verhältnisse ähnlich (P50=3,5 Torr bei pH 8,1 und h~1,5 zwischen pH 7,0 und 8,0; DAMSGAARD et al., 2013). KUSCHE et al. (2003) schlugen vor, dass dieses unterschiedliche Sauerstoffbindungsverhalten des Hämocyanins zwischen *S. coleoptrata* und *Spirostreptus* sp. mit den verschiedenen Lebensweisen einhergeht. So handelt es sich

bei *S. coleoptrata* um ein sehr schnelles Tier, das Sauerstoff benötigt um sich entsprechend bewegen zu können. *Spirostreptus* sp. bewegt sich langsam und lebt teilweise in der Erde. Das Hämocyanin muss daher in der Lage sein, Sauerstoff zu speichern. Dies ist auch bei *A. gigas* der Fall. *S. dehaani* ist wie *S. coleoptrata* ein agiles Tier, bei dem das Hämocyanin eine höhere Sauerstoffbindungsaffinität als die des Hämocyanins von *S. coleptrata*, aber eine geringere als die der beiden Diplopodenhämocyanine aufweist.

Bei den decapoden Krebsen konnte gezeigt werden, dass zusätzliche Untereinheiten zum Sinken der Sauerstoffaffinität und zum Steigen der Kooperativität führen (MARKL und DECKER, 1992). Dies könnte auch bei den Myriapoden der Fall sein (MANGUM et al., 1985). Die Hämocyanin-Untereinheiten von *A. gigas*, *Spirostreptus* sp. und *S. dehaani* gruppieren alle mit dem Typ II Myriapodenhämocyanin und weisen eine geringe Kooperativität und eine höhere Sauerstoffaffinität als das Hämocyanin von *S. coleoptrata* auf. Dessen Hämocyanin-Untereinheiten gruppieren zum Teil mit dem Typ I (ScoHcA, ScoHcC und ScoHcD), aber auch mit dem Typ II Myriapodenhämocyanin (ScoHcB).

In der phylogenetischen Analyse konnte gezeigt werden, dass alle bisher untersuchten Myriapodenhämocyanine zumindest eine Untereinheit aufweisen, die zum Typ II Myriapodenhämocyanin zählt. Es wäre möglich, dass dieser Untereinheitstyp der Grundbaustein des Myriapodenhämocyanins darstellt, während Typ I nur optional anwesend ist. Ein erweiterter Myriapodenhämocyanin-Datensatz wird Informationen darüber und auch über die Verwandtschaftsverhältnisse der Hämocyanine der einzelnen Klassen innerhalb der Myriapoden liefern.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit in der Hämolymphe von *S. dehaani* Hämocyanin mittels Antikörper gegen das Hämocyanin von *S. coleptrata* immunologisch nachgewiesen werden. Dabei konnte eine distinkte Bande mit einer molekularen Masse zwischen 90 und 100 kDa identifiziert werden. Bei zwei weiteren Banden, die eine etwas geringere molekulare Masse aufweisen (zwischen 80 und 90 kDa), handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte, denn sie sind im Verhältnis zu der distinkten Bande schwach. Sollte es sich bei den beiden schwächeren Banden um Untereinheiten handeln, müsste ihre Bandenintensität in einem x:6 Verhältnis zu der distinkten Bande stehen, denn Hämocyanine sind Hexamere. Dies ist augenscheinlich nicht der Fall. Die theoretische molekulare Masse der beiden in dieser Arbeit identifizierten Hämocyanin-Untereinheiten ist deutlich geringer als die im immunologischen Nachweis ermittelte und

liegt um die 75 kDa. Dies deutet auf eine posttranslationale Modifikation hin. Beide Untereinheiten weisen drei putative N-Glykosylierungsstellen auf, von denen zumindest eine in beiden Untereinheiten konserviert ist. Ein Hinweis dafür, dass es sich nicht nur um eine putative, sondern um eine funktionelle N-Glykosylierungsstelle handelt. Diese N-Glykosylierungsstelle befindet sich wie bei den vier *S. coleoptrata* Hämocyanin-Untereinheiten (MARKL et al., 2009) in der β2D→β2E Schleife.

Die beiden Hämocyanin-Untereinheiten von *S. dehaani* verfügen über ein N-terminales Signalpeptid zum Proteintransport. Es konnte gezeigt werden, dass dieses bei den Crustaceen und Hexapoden für den intrazellulären Transport in das raue endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist (MANGUM et al., 1985; MARKL und DECKER, 1992; VANHOLDE und MILLER, 1995; VOIT et al., 2000). Anschließend wird es über Vesikel aus der Zelle transportiert. Der Syntheseort ist die Mitteldarmdrüse (MARKL und DECKER, 1992). Anschließend wird das Hämocyanin über das Signalpeptid in die Hämolymphe sezerniert. Dem Hämocyanin der Cheliceraten fehlt das Signalpeptid. Es wird an freien Ribosomen synthetisiert und durch Lyse der Zellen in die Hämolymphe freigesetzt. Sessile Hämocyten-ähnliche Zellen sind der Syntheseort (KEMPTER, 1983; VOIT et al., 2000). Die Existenz des N-terminalen Signalpeptids in beiden Hämocyanin-Untereinheiten von *S. dehaani* spricht dafür, dass der Syntheseort des Hämocyanins wie bei den Crustaceen die Mitteldarmdrüse ist (MARKL und DECKER, 1992).

In der Hämolymphe von *S. dehaani* konnte reversibel sauerstoffbindendes Hämocyanin nachgewiesen werden. Die vollständigen Sequenzen zweier Hämocyanin-Untereinheiten gruppieren in einer phylogenetischen Analyse mit anderen Myriapodenhämocyanin-Untereinheiten. In einem Western Blot konnte gezeigt werden, dass das Hämocyanin wahrscheinlich N-glykosyliert ist.

4.6.2. Funktionelle Phenoloxidasen in *S. dehaani*

Über die Phenoloxidasen der Myriapoda ist bisher kaum etwas bekannt. Es existieren Nachweise von Phenoloxidaseaktivität (XYLANDER und BOGUSCH, 1992; XYLANDER, 1996) sowie putative Phenoloxidasesequenzen bei dem Diplopoden *Polyxenus langurus* und dem Chilopoden *S. maritim*a (PICK et al., 2014). Bei *P. langurus* wurde in einer RT-PCR cDNA identifiziert, die signifikante Ähnlichkeiten mit den Phenoloxidasen von

Crustaceen und Hexapoden aufwies. Das korrespondierende Protein besteht aus 678 Aminosäuren und weist kein Signalpeptid auf. Das Gen für die vermeintliche PPO von *S. maritima* wurde in dessen Genom identifiziert. Der ORF (open reading frame) translatiert in ein aus 670 Aminosäuren bestehendes Protein, ebenfalls ohne Signalpeptid. Beiden Spezies fehlt Hämocyanin.

In dieser Arbeit konnte neben den beiden Hämocyanin-Untereinheiten die mRNA von drei weiteren Hämocyanin-ähnlichen Sequenzen in *S. dehaani* identifiziert werden. Aufgrund des Fehlens eines Signalpeptids und den sehr viel geringeren durchschnittlichen Identitäten zu den Hämocyanin-Untereinheiten A-D von *S. coleptrata* wurde angenommen, dass es sich bei diesen drei Sequenzen um PPO handeln könnte. Sie wurden daher SdePPO1, 2 und 3 benannt. Die Existenz der drei konservierten Histidine pro Kupferbindungsstelle sowie die drei, die Sauerstoffbindung stabilisierenden Phenylalanine in allen drei Sequenzen, zeigten bereits, dass es sich wahrscheinlich um Phenoloxidasen handelt. In einer phylogenetischen Analyse gruppierten sie nicht mit den Hämocyanin-Untereinheiten der Myriapoden, sondern mit der putativen Phenoloxidase von *S. maritima*. Untermauert wurde die Annahme, dass es sich tatsächlich um Phenoloxidasen handelt dadurch, dass in der Hämolymphe von *S. dehaani* Phenoloxidaseaktivität nachgewiesen werden konnte.

In der phylogenetischen Analyse gruppierten SdePPO1, 2 und 3 nicht mit den Phenoloxidasen der Pancrustacea und der vermeintlichen PPO des Diplopoden *P. langurus*. Die Phenoloxidasen der Pancrustacea stehen basal zu ihnen. Die PPO von *P. langurus* wiederum steht basal zu den Phenoloxidasen der Pancrustacea, den restlichen Myriapoden sowie den Hämocyaninen der Euarthropoden. Warum die Phenoloxidasen der Myriapoden in dieser phylogenetischen Analyse paraphyletisch sind und nicht mit den PPO der Pancrustacea gruppieren, bleibt ungeklärt. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre eine sehr frühe Divergenz der Phenoloxidasen in den Arthropoden (PICK et al., 2014). Die Sequenzen könnten auch aufgrund dieser hohen Divergenz falsch eingeordnet worden sein. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass es sich bei der hier als Außengruppe definierten Hämocyaninsequenz des Onychophoren *Epiperipatus* sp. (KUSCHE et al., 2002) um eine Phenoloxidase handelt. Es müssen mehrere PPO-Gene in den einzelnen Unterstämmen der Arthropoden vorhanden gewesen sein, die zum Teil wieder verloren gegangen sind. Bei den Myriapoda gab es wahrscheinlich zwei PPO-Gene, wobei bei *P. langurus* und *S. maritima* sowie *S. dehaani* das jeweils andere

verloren gegangen ist. Die Hämocyanine der Myriapoda, Pancrustacea und Chelicerata haben sich aus der Phenoloxidase von *S. dehaani* und *S. maritima* entwickelt.

In dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, eine Phenoloxidase in einem Myriapoden sicher nachzuweisen. *S. dehaani* ist der erste Myriapode, in dem sowohl Hämocyanin-Untereinheiten als auch Phenoloxidasen nachgewiesen werden konnten.

4.6.3. Analyse der Hämocyaninexpression in den Eiern und der Mitteldarmdrüse von *S. dehaani*

In einer qRT-PCR wurde die Hämocyaninexpression der beiden Untereinheiten sowie der drei Phenoloxidasen im Ei und in der Mitteldarmdrüse überprüft. Bei der Mitteldarmdrüse wurde angenommen, dass es sich um den Syntheseort des Hämocyanins handelt. Die Eier wurden ausgewählt, da bereits bei der Waldschabe *Blaptica dubia* eine hohe Hämocyaninexpression in der Oothek gezeigt wurde. Dabei stellt sich heraus, dass im Ei ~1500 (SdeHc1), bzw. ~3400 (SdeHc2) x mehr Kopien mRNA vorlagen als in der Mitteldarmdrüse. Auf Proteinebene war das Hämocyanin im Ei sechsfach stärker vorhanden als in der Mitteldarmdrüse. Dieses geringere Verhältnis auf Protein-Ebene ist darauf zurückzuführen, dass Unterschiede zwischen der Anzahl an mRNA-Kopien und Proteinexpression vorliegen können (GREENBAUM et al., 2003). Außerdem ist die Mitteldarmdrüse nicht der Ort, an dem viel Hämocyanin erwartet wurde, da dieses aufgrund seines Signalpeptids in die Hämolymphe sezerniert wird. Das Hämocyanin in den Eiern dient wahrscheinlich der Sauerstoffversorgung des Embryos im Ei. Dadurch, dass in den Eiern viel Hämocyanin vorhanden ist, könnte dieses die Sauerstoffabgabe vom maternalen auf das embryonale Gewebe erleichtern. Außerdem vefügen die Embryos im Gegensatz zu den adulten Tieren nicht über ein ausgeprägtes Tracheensystem und sind somit stärker auf ein Sauerstofftransportprotein angewiesen. Auch in der argentinischen Waldschabe *Blaptica dubia* liegt eine relativ höhere Hämocyaninexpression in der Oothek als in den Muttertieren vor (PICK et al., 2010). Die hohe Hämocyaninexpression im embryonalen Gewebe in den Hexapoden und Myriapoden ist konvergent entstanden. Die deutlich geringere Hämocyaninexpression in der Mitteldarmdrüse als in den Eiern könnte erklären, warum in den meisten Myriapoden bisher kein Hämocyanin identifiziert werden konnte. Wahrscheinlich wurden nur adulte Tiere untersucht. Dagegen spricht jedoch, dass in dem vollständig sequenzierten Genom

des Geophilomorphen *S. maritima* offenbar kein Hämocyanin identifiziert werden konnte (PICK et al., 2014).

Aufgrund des vorhandenen Signalpeptids wurde die Mitteldarmdrüse bereits als möglicher Syntheseort für das Hämocyanin von *S. dehaani* vorgeschlagen. Auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass in der Mitteldarmdrüse mehr mRNA-Kopien von SdeHc1 und 2 als von den Phenoloxidasen vorlagen, was einen weiterer Hinweis auf den Syntheseort liefert. Die Anzahl der SdePPO1, 2 und 3 mRNA-Kopien in der Mitteldarmdrüse ist deutlich höher als erwartet, denn es wurde angenommen, dass die Phenoloxidasen der Myriopoden wie die der Crustaceen und Hexapoden in den Hämocyten synthetisiert werden (CERENIUS et al., 2003; CERENIUS und SODERHALL, 2004) und nicht in der Mitteldarmdrüse. Da den Phenoloxidasen ein Signalpeptid fehlt, gelangen sie durch Ruptur der Hämocyten in die Hämolymphe (KANOST und GORMAN, 2008). Dies ist bei der Mitteldarmdrüse nicht möglich. Wahrscheinlich stammen die mRNA-Kopien der SdePPO nicht aus der Mitteldarmdrüse, sondern aus einem anderen Gewebe, das zusammen mit der Mitteldarmdrüse isoliert wurde.

Ausblick

Bereits im Rahmen anderer Arbeiten (HEFENBOCK, 2008; DIDIER, 2009; ERTAS, 2009) wurde gezeigt, dass die Expression eines Hexamerins mit anschließender Rekonstitution erfolgreich war. Für das Hämocyanin PelHc4 wurden diverse Expressions- und Rekonstitutionssysteme getestet, wobei es nie zu einer reproduzierbaren Bildung der Oxyform kam. Ein anderer als die bisher getesteten Ansätze wäre die Expression in Anwesenheit eines Kupferchaperons. Da dies für das Hämocyanin nicht bekannt ist, könnte z. B. ein Chaperon einer Tyrosinase verwendet werden. Allerdings scheinen die Kupferchaperone sehr spezifisch nur an ein bestimmtes Zielprotein zu „liefern“ (LOPEZ-SERRANO et al., 2007). Die Expression des PelHc4 unter Anwesenheit eines Kupferchaperons im T7/pET-System könnte zeigen, ob dies ein vielversprechender Ansatz zur Herstellung von kupferhaltigem Hämocyanin ist. Sollte dies der Fall sein, könnten funktionelle und strukturelle Untersuchungen an dem PelHc4 vorgenommen werden. Hierzu zählt z. B. eine Überprüfung des Sauerstoffbindungsverhaltens. Des Weiteren könnten durch Mutageneseexperimente Aminosäuren im aktiven Zentrum ausgetauscht werden und so deren Rolle bei der Sauerstoffbindung ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Hämocyanin-Untereinheiten und drei Phenoloxidasen in dem Chilopoden *S. dehaani* identifiziert werden. In einer phylogenetischen Analyse ist die Stellung der drei Phenoloxidasen überraschend, da sie nicht mit den Phenoloxidasen der Pancrustacea gruppieren. Durch einen erweiterten Datensatz könnte diese Stellung bestätigt werden, aber auch eine Aussage über die Verwandtschaftsverhältnisse der Hämocyanine der einzelnen Klassen innerhalb der Myriapoden getroffen werden. Des Weiteren werden TEM-Aufnahmen der Hämolymphe zeigen um welche Quartärstruktur es sich beim Hämocyanin von *S. dehaani* handelt. Die Anaylse der Hämocyanin-Genexpression hatte gezeigt, dass diese in den Eiern stärker als in der Mitteldarmdrüse ist. Das könnte eine mögliche Ursache darstellen, warum in vielen Myriapodenspezies kein Hämocyanin nachgewiesen werden konnte. Die Untersuchung der Eier von verschiedenen Myriapodenspezies wird zeigen, ob es sich bei dieser starken Hämocyanin-Genexpression um ein verbreitetes Phänomen innerhalb der Myriapoda handelt.

5. Literaturverzeichnis

Akam, M. E., Roberts, D. B., Richards, G. P. und Ashburner, M. (1978). "*Drosophila*: the genetics of two major larval proteins." Cell **13:** 215-225.

Amaravadi, R., Glerum, D. M. und Tzagoloff, A. (1997). "Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment." Hum Genet **99:** 329-333.

Andrew, C. R., Armstrong, G. D., McKillop, K. P., Salmon, G. A. und Sykes, A. G. (1993). "Studies Relating to the Formation of Semi-Met Cu(I)Cu(II) *Panulirus Interruptus* Hemocyanin." J Chem Soc Dalton 2297-2303.

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. und Schwede, T. (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." Bioinformatics **22:** 195-201.

Asada, N., Fukumitsu, T., Fujimoto, K. und Masuda, K. (1993). "Activation of Prophenoloxidase with 2-Propanol and Other Organic-Compounds in *Drosophila Melanogaster*." Insect Biochem Molec **23:** 515-520.

Asada, N. (1998). "Reversible activation of prophenoloxidase with 2-propanol in *Drosophila melanogaster*." J Exp Zool **282:** 28-31.

Ashida, M. (1971). "Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*." Arch Biochem Biophys **144:** 749-762.

Aspan, A., Huang, T. S., Cerenius, L. und Soderhall, K. (1995). "cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation." Proc Natl Acad Sci USA **92:** 939-943.

Atkins, P. W. und De Paula, J. (2005). Elements of physical chemistry. Oxford [u.a.], Oxford Univ. Press.

Averdam, A., Markl, J. und Burmester, T. (2003). "Subunit sequences of the 4 x 6-mer hemocyanin from the golden orb-web spider, *Nephila inaurata* - Intramolecular evolution of the chelicerate hemocyanin subunits." Eur J Biochem **270:** 3432-3439.

Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." Curr Opin Biotech **10:** 411-421.

Beers, J., Glerum, D. M. und Tzagoloff, A. (1997). "Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle." J Biol Chem **272:** 33191-33196.

Beintema, J. J., Stam, W. T., Hazes, B. und Smidt, M. P. (1994). "Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins)." Mol Biol Evol **11:** 493-503.

Bellelli, A., Giardina, B., Corda, M., Pellegrini, M. G., Cau, A., Condo, S. G. und Brunori, M. (1988). "Sexual and Seasonal Variability of Lobster Hemocyanin." Comp Biochem Phys A **91:** 445-449.

Benes, H., Edmondson, R. G., Fink, P., Kejzlarovalepesant, J., Lepesant, J. A., Miles, J. P. und Spivey, D. W. (1990). "Adult Expression of the *Drosophila* Lsp-2 Gene." Dev Biol **142:** 138-146.

Bergtrom, G., Laufer, H. und Rogers, R. (1976). "Fat body: a site of hemoglobin synthesis in *Chironomus thummi* (diptera)." J Cell Biol **69:** 264-274.

Betancourt, A. M., Bernan, V., Herber, W. und Katz, E. (1992). "Analysis of Tyrosinase Synthesis in *Streptomyces Antibioticus*." J Gen Microbiol **138:** 787-794.

Bimboim, H. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7:** 1513-1523.

Bobofchak, K. M., Mito, T., Texel, S. J., Bellelli, A., Nemoto, M., Traystman, R. J., . . . Fronticelli, C. (2003). "A recombinant polymeric hemoglobin with conformational, functional, and physiological characteristics of an *in vivo* O_2 transporter." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285:** H549-561.

Booth, C. E., McMahon, B. R. und Pinder, A. W. (1982). "Oxygen-Uptake and the Potentiating Effects of Increased Hemolymph Lactate on Oxygen-Transport during Exercise in the Blue-Crab, *Callinectes Sapidus*." J Comp Physiol **148:** 111-121.

Braun, R. P. und Wyatt, G. R. (1996). "Sequence of the Hexameric Juvenile Hormone-binding Protein from the Hemolymph of *Locusta migratoria*." **271:** 31756-31762.

Brehélin, M., Drif, L., Baud, L. und Boemare, N. (1989). "Insect haemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*." Insect Biochem Mol Biol **19:** 301-307.

Brouwer, M., Whaling, P. und Engel, D. W. (1986). "Copper-Metallothioneins in the American Lobster, *Homarus Americanus* - Potential Role as Cu(I) Donors to Apohemocyanin." Environ Health Persp **65:** 93-100.

Brouwer, M. und Serigstad, B. (1989). "Allosteric control in *Limulus polyphemus* hemocyanin: functional relevance of interactions between hexamers." Biochemistry-Us **28:** 8819-8827.

Brouwer, M. und Brouwer-Hoexum, T. (1992). "Glutathione-Mediated Transfer of Copper(I) into American Lobster Apohemocyanin." Biochemistry-Us **31:** 4096-4102.

Brouwer, M., Syring, R. und Brouwer-Hoexum, T. (2002). "Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin." J Inorg Biochem **88:** 228-239.

Brown, A. C. und Terwilliger, N. B. (1998). "Ontogeny of hemocyanin function in the dungeness crab *Cancer magister*: Hemolymph modulation of hemocyanin oxygen-binding." J Exp Biol **201:** 819-826.

Brusca, R. C., Brusca, G. J. und Haver, N. J. (1990). Invertebrates, Sinauer Associates Sunderland, MA.
Buck, T. M., Eledge, J. und Skach, W. R. (2004). "Evidence for stabilization of aquaporin-2 folding mutants by N-linked glycosylation in endoplasmic reticulum." Am J Physiol-Cell Ph **287:** C1292-C1299.

Bull, P. C. und Cox, D. W. (1994). "Wilson Disease and Menkes Disease - New Handles on Heavy-Metal Transport." Trends Genet **10:** 246-252.

Bunch, T. A., Grinblat, Y. und Goldstein, L. S. B. (1988). "Characterization and Use of the *Drosophila* Metallothionein Promoter in Cultured *Drosophila Melanogaster* Cells." Nucleic acids research **16:** 1043-1061.

Burmester, T. und Scheller, K. (1992). "Identification of Binding-Proteins Involved in the Stage-Specific Uptake of Arylphorin by the Fat-Body Cells of *Calliphora Vicina*." Insect Biochem Molec **22:** 211-220.

Burmester, T. und Scheller, K. (1995). "Ecdysteroid-Mediated Uptake of Arylphorin by Larval Fat-Bodies of *Calliphora Vicina* - Involvement and Developmental Regulation of Arylphorin Binding-Proteins." Insect Biochem Molec **25:** 799-806.

Burmester, T. und Scheller, K. (1996). "Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor." J Mol Evol **42:** 713-728.

Burmester, T. und Scheller, K. (1997). "Developmentally controlled cleavage of the *Calliphora* arylphorin receptor and posttranslational action of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone." Eur J Biochem **247:** 695-702.

Burmester, T., Massey, H. C., Zakharkin, S. O. und Benes, H. (1998). "The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects." J Mol Evol **47:** 93-108.

Burmester, T. (1999). "Evolution and function of the insect hexamerins." Eur J Entomol **96:** 213-225.

Burmester, T. (2001). "Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily." Mol Biol Evol **18:** 184-195.

Burmester, T. (2002). "Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins." J Comp Physiol [B] **172:** 95-107.

Burmester, T. (2004). "Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins." Micron **35:** 121-122.

Burmester, T. und Hankeln, T. (2007). "The respiratory proteins of insects." J Insect Physiol **53:** 285-294.

Castillo, J. C., Robertson, A. E. und Strand, M. R. (2006). "Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*." Insect Biochem Molec **36:** 891-903.

Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Soderhall, I. und Soderhall, K. (2003). "Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*." Cell Microbiol **5:** 353-357.

Cerenius, L. und Soderhall, K. (2004). "The prophenoloxidase-activating system in invertebrates." Immunol Rev **198:** 116-126.

Chan, H. M. und Weeks, J. M. (1992). "The Subunit Structural Composition of Amphipod Hemocyanin (Crustacea, Amphipoda, Talitridae)." Comp Biochem Phys B **101:** 567-572.

Chen, L. Y., Leu, W. M., Wang, K. T. und Lee, Y. H. W. (1992). "Copper Transfer and Activation of the *Streptomyces* Apotyrosinase Are Mediated through a Complex-Formation between Apotyrosinase and Its Transactivator Melc1." J Biol Chem **267:** 20100-20107.

Chosa, N., Fukumitsu, T., Fujimoto, K. und Ohnishi, E. (1997). "Activation of prophenoloxidase A1 by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*." Insect Biochem Mol Biol **27:** 61-68.

Cobine, P., Wickramasinghe, W. A., Harrison, M. D., Weber, T., Solioz, M. und Dameron, C. T. (1999). "The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor." Febs Lett **445:** 27-30.

Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C. und Rofe, A. M. (2002). "Metallothionein: The multipurpose protein." Cell Mol Life Sci **59:** 627-647.

Damsgaard, C., Fago, A., Hagner-Holler, S., Malte, H., Burmester, T. und Weber, R. E. (2013). "Molecular and functional characterization of hemocyanin of the giant African millipede, *Archispirostreptus gigas*." J Exp Biol **216:** 1616-1623.

Dangott, L. J. und Terwilliger, R. C. (1981). "Arthropod extracellular hemoglobins: structural and functional properties." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **70:** 549-557.

Decker, H. und Sterner, R. (1990a). "Oxygen binding of arthropod hemocyanin. The role of allosteric equilibria in terms of the nested Monod-Wyman-Changeux model." Biol Metals **3:** 85-86.

Decker, H. und Sterner, R. (1990b). "Nested Allostery of Arthropodan Hemocyanin (*Eurypelma Californicum* and *Homarus Americanus*) - the Role of Protons." J Mol Biol **211:** 281-293.

Decker, H. und Rimke, T. (1998). "Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity." J Biol Chem **273:** 25889-25892.

Decker, H. und Tuczek, F. (2000). "Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism." Trends Biochem Sci **25:** 392-397.

Decker, H., Ryan, M., Jaenicke, E. und Terwilliger, N. (2001). "SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*." J Biol Chem **276:** 17796-17799.

Decker, H. und Jaenicke, E. (2004). "Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins." Dev Comp Immunol **28:** 673-687.

Decker, H., Terwilliger, N. und Portner, H. O. (2007). "The integrative and evolutionary biology of gas-binding copper proteins: an introduction." Integr Comp Biol **47:** 628-630.
Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuza, V., Aerts, T., . . . Moens, L. (2001). "Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family." J Biol Chem **276:** 38949-38955.

Didier, S. M. (2009). Untersuchungen zur Expression und Evolution des Hämocyanins der Krustentiere, Hamburg.

DiDonato, M., Narindrasorasak, S., Forbes, J. R., Cox, D. W. und Sarkar, B. (1997). "Expression, purification, and metal binding properties of the N-terminal domain from the Wilson disease putative copper-transporting ATPase (ATP7B)." J Biol Chem **272:** 33279-33282.

Dirks-Hofmeister, M. E., Inlow, J. K. und Moerschbacher, B. M. (2012). "Site-directed mutagenesis of a tetrameric dandelion polyphenol oxidase (PPO-6) reveals the site of subunit interaction." Plant Mol Biol **80:** 203-217.

Durrant, H. J., Ratcliffe, N. A., Hipkin, C. R., Aspan, A. und Soderhall, K. (1993). "Purification of the pro-phenol oxidase enzyme from haemocytes of the cockroach *Blaberus discoidalis*." Biochem J **289 (Pt 1):** 87-91.

Durstewitz, G. und Terwilliger, N. B. (1997). "Developmental changes in hemocyanin expression in the Dungeness crab, *Cancer magister*." J Biol Chem **272:** 4347-4350.

Eickman, N. C., Himmelwright, R. S. und Solomon, E. I. (1979). "Geometric and electronic structure of oxyhemocyanin: spectral and chemical correlations to met apo, half met, met, and dimer active sites." Proc Natl Acad Sci USA **76:** 2094-2098.

Enderle, U., Käuser, G., Renn, L., Scheller, K. und Koolmann, J. (1983). Ecdysteroids in the hemolymph of blowfly are bound to calliphorin. The larval serum proteins of insects: function, biosynthesis, genetic; 9 tables. K. Scheller and L. Levenbook. Stuttgart [u.a.], Thieme [u.a.]**:** 40-49.

Endo, Y. und Sawasaki, T. (2003). "High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system." Biotechnol Adv **21:** 695-713.

Ertas, B. (2009). Die Expression respiratorischer Proteine ausgewählter Arthropodenspezies.

Ertas, B., von Reumont, B. M., Wagele, J. W., Misof, B. und Burmester, T. (2009). "Hemocyanin Suggests a Close Relationship of Remipedia and Hexapoda." Mol Biol Evol **26:** 2711-2718.

Espin, J. C. und Wichers, H. J. (1999). "Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). kinetic properties of the SDS-activated isoform." J Agr Food Chem **47:** 3518-3525.

Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., . . . Hultmark, D. (2006). "Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*." Insect Mol Biol **15:** 645-656.

Fox, H. M. (1957). "Haemoglobin in the Crustacea." Nature **179:** 148-148.

Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., Schmidt, M., . . . Burmester, T. (2004). "Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding." J Biol Chem **279:** 24116-24122.

Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S., Iwanaga, S. und Ohnishi, E. (1995). "Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci USA **92:** 7769-7773.

Gambacurta, A., Piro, M. C. und Ascoli, F. (1993). "Cooperative homodimeric hemoglobin from *Scapharca inaequivalvis*. cDNA cloning and expression of the fully functional protein in *E. coli*." Febs Lett **330:** 90-94.

Gatto, S., De Filippis, V., Spinozzi, F., Di Muro, P., Bubacco, L. und Beltramini, M. (2004). "Structural role of the copper ions in the dinuclear active site of *Carcinus aestuarii* hemocyanin." Micron **35:** 43-44.

Gaykema, W. P. J., Hol, W. G. J., Vereijken, J. M., Soeter, N. M., Bak, H. J. und Beintema, J. J. (1984). "3.2 a Structure of the Copper-Containing, Oxygen-Carrying Protein *Panulirus Interruptus* Hemocyanin." Nature **309:** 23-29.

Gebauer, W. und Markl, J. (1999). "Identification of four distinct subunit types in the unique 6 x 6 hemocyanin of the centipede *Scutigera coleoptrata*." Die Naturwissenschaften **86:** 445-447.

Gitschier, J., Moffat, B., Reilly, D., Wood, W. I. und Fairbrother, W. J. (1998). "Solution structure of the fourth metal-binding domain from the Menkes copper-transporting ATpase." Nat Struct Biol **5:** 47-54.

Glerum, D. M., Shtanko, A. und Tzagoloff, A. (1996). "Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase." J Biol Chem **271:** 14504-14509.

Graham, R. A., Mangum, C. P., Terwilliger, R. C. und Terwilliger, N. B. (1983). "The Effect of Organic-Acids on Oxygen Binding of Hemocyanin from the Crab *Cancer Magister*." Comp Biochem Phys A **74:** 45-50.

Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. und Gerstein, M. (2003). "Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale." Genome Biol **4:** 117.

Grennan, A. K. (2011). "Metallothioneins, a Diverse Protein Family." Plant Physiol **155:** 1750-1751.

Gritz, L. und Davies, J. (1983). "Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*." Gene **25:** 179-188.

Hagner-Holler, S., Schoen, A., Erker, W., Marden, J. H., Rupprecht, R., Decker, H. und Burmester, T. (2004). "A respiratory hemocyanin from an insect." P Natl Acad Sci USA **101:** 871-874.

Hagner-Holler, S., Kusche, K., Hembach, A. und Burmester, T. (2005). "Biochemical and molecular characterisation of hemocyanin from the amphipod *Gammarus roeseli*: complex pattern of hemocyanin subunit evolution in Crustacea." J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol **175:** 445-452.

Hamza, I., Schaefer, M., Klomp, L. W. J. und Gitlin, J. D. (1999). "Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis." P Natl Acad Sci USA **96:** 13363-13368.

Hansen, I. A., Meyer, S. R., Schafer, I. und Scheller, K. (2002). "Interaction of the anterior fat body protein with the hexamerin receptor in the blowfly *Calliphora vicina*." Eur J Biochem **269:** 954-960.

Hartmann, H. und Decker, H. (2002). "All hierarchical levels are involved in conformational transitions of the 4×6-meric tarantula hemocyanin upon oxygenation." Biochim Biophys Acta: Proteins Proteomics **1601:** 132-137.

Hazes, B., Magnus, K. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K. H. und Hol, W. G. J. (1993). "Crystal-Structure of Deoxygenated *Limulus Polyphemus* Subunit-II Hemocyanin at 2.18-Angstrom Resolution - Clues for a Mechanism for Allosteric Regulation." Protein Sci **2:** 597-619.

Hefenbock, C. (2008). Rekombinante Expression von Arthropoden-Hämocyaninen, Hamburg.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. und Watson, R. (1993). "Kinetic Pcr Analysis - Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions." Bio-Technol **11:** 1026-1030.

Holmes, D. S. und Bonner, J. (1973). "Preparation, molecular weight, base composition, and secondary structure of giant nuclear ribonucleic acid." Biochemistry-Us **12:** 2330-2338.

Hopkins, T. L. und Kramer, K. J. (1992). "Insect Cuticle Sclerotization." Annu Rev Entomol **37:** 273-302.

Huang, L. H., Christensen, B. M. und Chen, C. C. (2001). "Molecular cloning of a second prophenoloxidase cDNA from the mosquito *Armigeres subalbatus*: prophenoloxidase expression in blood-fed and microfilariae-inoculated mosquitoes." Insect Mol Biol **10:** 87-96.

Huelsenbeck, J. P. und Ronquist, F. (2001). "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees." Bioinformatics **17:** 754-755.

Immesberger, A. und Burmester, T. (2004). "Putative phenoloxidases in the tunicate *Ciona intestinalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily." J Comp Physiol [B] **174:** 169-180.

Irving, P., Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., . . . Hetru, C. (2001). "A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci USA **98:** 15119-15124.

Jackson, A. M., Boutell, J., Cooley, N. und He, M. (2004). "Cell-free protein synthesis for proteomics." Brief Funct Genomic Proteomic **2:** 308-319.

Jaenicke, E., Decker, H., Gebauer, W. A., Markl, J. und Burmester, T. (1999). "Identification, structure, and properties of hemocyanins from diplopod myriapoda." J Biol Chem **274:** 29071-29074.

Jaenicke, E. (2002). Zum funktionellen und strukturellen Vergleich von Phenoloxidasen und Hämocyaninen.

Jaenicke, E. und Decker, H. (2003). "Tyrosinases from crustaceans form hexamers." Biochem J **371:** 515-523.

Jaenicke, E., Buchler, K., Markl, J., Decker, H. und Barends, T. R. M. (2010). "Cupredoxin-like domains in haemocyanins." Biochem J **426:** 373-378.

Jaenicke, E., Pairet, B., Hartmann, H. und Decker, H. (2012). "Crystallization and Preliminary Analysis of Crystals of the 24-Meric Hemocyanin of the Emperor Scorpion (*Pandinus imperator*)." Plos One **7**.

Jensen, P. Y., Bonander, N., Moller, L. B. und Farver, O. (1999). "Cooperative binding of copper(I) to the metal binding domains in Menkes disease protein." Biochim Biophys Acta **1434:** 103-113.

Jermutus, L., Ryabova, L. A. und Pluckthun, A. (1998). "Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation." Curr Opin Biotech **9:** 534-548.

Jiang, H. B., Wang, Y., Ma, C. C. und Kanost, M. R. (1997). "Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: Molecular cloning of subunit ProPO-P1." Insect Biochem Molec **27:** 835-850.

Jowett, T. und Postlethwait, J. H. (1981). "Hormonal-Regulation of Synthesis of Yolk Proteins and a Larval Serum-Protein (Lsp2) in *Drosophila*." Nature **292:** 633-635.

Kanost, M. R. und Gorman, M. R. (2008). Regulation of insect hemolymph phenoloxidases. Insect immunology. N. E. Beckage. Amsterdam [u.a.], Elsevier/Academic Press**:** 317-342.

Katoh, K. und Standley, D. M. (2013). "MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability." Mol Biol Evol **30:** 772-780.

Katzen, F., Chang, G. und Kudlicki, W. (2005). "The past, present and future of cell-free protein synthesis." Trends Biotechnol **23:** 150-156.

Kawabata, T., Yasuhara, Y., Ochiai, M., Matsuura, S. und Ashida, M. (1995). "Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin." Proc Natl Acad Sci USA **92:** 7774-7778.

Kempter, B. (1983). "Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Eurypelma californicum*." Die Naturwissenschaften **70:** 255-256.

Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L. und Schwede, T. (2009). "The SWISS-MODEL Repository and associated resources." Nucleic acids research **37:** D387-D392.

Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T. und Yokoyama, S. (1999). "Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins." Febs Lett **442:** 15-19.

Kim, B. E., Nevitt, T. und Thiele, D. J. (2008). "Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation." Nat Chem Biol **4:** 176-185.

Kinnear, J. F. und Thomson, J. A. (1975). "Nature, Origin and Fate of Major Hemolymph Proteins in *Calliphora*." Insect Biochem **5:** 531-552.

Klaassen, C. D., Liu, J. und Choudhuri, S. (1999). "Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity." Annu Rev Pharmacol **39:** 267-294.

Klomp, L. W. J., Lin, S. J., Yuan, D. S., Klausner, R. D., Culotta, V. C. und Gitlin, J. D. (1997). "Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis." J Biol Chem **272:** 9221-9226.

Kopp, J. und Schwede, T. (2006). "The SWISS-MODEL repository: new features and functionalities." Nucleic Acids Res **34:** D315-D318.

Kozak, M. (1987). "An Analysis of 5'-Noncoding Sequences from 699 Vertebrate Messenger-Rnas." Nucleic Acids Res **15:** 8125-8148.

Kozak, M. (1990). "Downstream Secondary Structure Facilitates Recognition of Initiator Codons by Eukaryotic Ribosomes." P Natl Acad Sci USA **87:** 8301-8305.

Kozak, M. (1991). "An Analysis of Vertebrate Messenger-Rna Sequences - Intimations of Translational Control." J Cell Biol **115:** 887-903.

Kusche, K. und Burmester, T. (2001). "Diplopod hemocyanin sequence and the phylogenetic position of the Myriapoda." Mol Biol Evol **18:** 1566-1573.

Kusche, K., Ruhberg, H. und Burmester, T. (2002). "A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins." P Natl Acad Sci USA **99:** 10545-10548.

Kusche, K., Hembach, A., Hagner-Holler, S., Gebauer, W. und Burmester, T. (2003a). "Complete subunit sequences, structure and evolution of the 6 x 6-mer hemocyanin from the common house centipede, *Scutigera coleoptrata*." Eur J Biochem **270:** 2860-2868.

Kusche, K., Hembach, A., Milke, C. und Burmester, T. (2003b). "Molecular characterisation and evolution of the hemocyanin from the European spiny lobster, *Palinurus elephas*." J Comp Physiol [B] **173:** 319-325.

Kyhseandersen, J. (1984). "Electroblotting of Multiple Gels - a Simple Apparatus without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide to Nitrocellulose." J Biochem Bioph Meth **10:** 203-209.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227:** 680-685.

Lallier, F., Boitel, F. und Truchot, J. P. (1987). "The Effect of Ambient Oxygen and Temperature on Hemolymph L-Lactate and Urate Concentrations in the Shore Crab *Carcinus Maenas*." Comp Biochem Phys A **86:** 255-260.

Lallier, F. und Truchot, J. P. (1989). "Hemolymph Oxygen-Transport during Environmental Hypoxia in the Shore Crab, *Carcinus Maenas*." Resp Physiol **77:** 323-336.

Larimer, J. L. und Riggs, A. F. (1964). "Properties of Hemocyanins. I. The Effect of Calcium Ions on the Oxygen Equilibrium of Crayfish Hemocyanin." Comp Biochem Physiol **13:** 35-46.

Law, J. H. und Wells, M. A. (1989). "Insects as Biochemical-Models." J Biol Chem **264:** 16335-16338.

Lee, J., Prohaska, J. R., Dagenais, S. L., Glover, T. W. und Thiele, D. J. (2000). "Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant." Gene **254:** 87-96.

Lee, Y. H. W., Chen, B. F., Wu, S. Y., Leu, W. M., Lin, J. J., Chen, C. W. und Lo, S. J. (1988). "A Trans-Acting Gene Is Required for the Phenotypic-Expression of a Tyrosinase Gene in *Streptomyces*." Gene **65:** 71-81.

Levenbook, L. und Bauer, A. C. (1984). "The Fate of the Larval Storage Protein Calliphorin during Adult Development of *Calliphora Vicina*." Insect Biochem **14:** 77-86.

Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, B. L., Sorderhall, I. und Soderhall, K. (2007). "Phenoloxidase is an important component of the Defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*." J Biol Chem **282**.

Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method." Methods **25:** 402-408.

Loewe, R. und Linzen, B. (1975). "Haemocyanins in spiders." J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol **98:** 147-156.

Loewe, R. (1978). "Hemocyanins in Spiders. 5. Fluorimetric Recording of Oxygen Binding Curves, and Its Application to Analysis of Allosteric Interactions in *Eurypelma Californicum* Hemocyanin." J Comp Physiol **128:** 161-168.

Lopez-Serrano, D., Solano, F. und Sanchez-Amat, A. (2004). "Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*." Gene **342:** 179-187.

Lopez-Serrano, D., Solano, F. und Sanchez-Amat, A. (2007). "Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*." Microbiol-Sgm **153:** 2241-2249.

Magee, J., Kraynack, N., Massey, H. C. und Telfer, W. H. (1994). "Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*." Arch Insect Biochem **25:** 137-157.

Magnus, K. A., Hazes, B., Tonthat, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J. und Hol, W. G. J. (1994). "Crystallographic Analysis of Oxygenated and Deoxygenated States of Arthropod Hemocyanin Shows Unusual Differences." Proteins **19:** 302-309.

Mangum, C. P. (1983). Oxygen transport in blood. The biology of crustacea. L. H. Mantel and D. E. Bliss. New York, NY [u.a.], Academic Press**:** 373-429.

Mangum, C. P. (1985). "Oxygen transport in invertebrates." Am J Physiol **248:** R505-514.

Mangum, C. P., Scott, J. L., Black, R. E. L., Miller, K. I. und Vanholde, K. E. (1985). "Centipedal Hemocyanin - Its Structure and Its Implications for Arthropod Phylogeny." P Natl Acad Sci USA **82:** 3721-3725.

Mangum, C. P. und Godette, P. (1986). The hemocyanin of the uniramous arthropods. Berlin; Heidelberg, Springer.

Mangum, C. P. und Joy, P. J. (1997). "Hemocyanin subunit composition in the American lobster *Homarus americanus*." J Crustacean Biol **17:** 1-5.

Markl, J., Hofer, A., Bauer, G., Markl, A., Kempter, B., Brenzinger, M. und Linzen, B. (1979). "Subunit Heterogeneity in Arthropod Hemocyanins. 2. Crustacea." J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol **133:** 167-175.

Markl, J. (1980). "Hemocyanins in spiders." J Comp Physiol [B] **140:** 199-207.

Markl, J. (1986). "Evolution and Function of Structurally Diverse Subunits in the Respiratory Protein Hemocyanin from Arthropods." Biol Bull **171:** 90-115.

Markl, J., Stöcker, W., Runzler, R. und Precht, E. (1986). Immunological Correspondences Between the Hemocyanin Subunits of 86 Arthropods: Evolution of a Multigene Protein Family. Invertebrate Oxygen Carriers. B. Linzen, Springer Berlin Heidelberg**:** 281-292.

Markl, J., Burmester, T., Decker, H., Savelniemann, A., Harris, J. R., Suling, M., . . . Scheller, K. (1992). "Quaternary and Subunit Structure of *Calliphora* Arylphorin as Deduced from Electron-Microscopy, Electrophoresis, and Sequence Similarities with Arthropod Hemocyanin." J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol **162:** 665-680.

Markl, J. und Decker, H. (1992). Molecular Structure of the Arthropod Hemocyanins. Blood and Tissue Oxygen Carriers. C. Mangum, Springer Berlin Heidelberg. **13:** 325-376.

Markl, J., Moeller, A., Martin, A. G., Rheinbay, J., Gebauer, W. und Depoix, F. (2009). "10-A cryoEM structure and molecular model of the Myriapod (*Scutigera*) 6x6mer hemocyanin: understanding a giant oxygen transport protein." J Mol Biol **392:** 362-380.

Marmaras, V. J., Charalambidis, N. D. und Zervas, C. G. (1996). "Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization." Arch Insect Biochem **31:** 119-133.

Maroni, G., Otto, E. und Lastowskiperry, D. (1986). "Molecular and Cytogenetic Characterization of a Metallothionein Gene of *Drosophila*." Genetics **112:** 493-504.

Martin-Duran, J. M., de Mendoza, A., Sebe-Pedros, A., Ruiz-Trillo, I. und Hejnol, A. (2013). "A Broad Genomic Survey Reveals Multiple Origins and Frequent Losses in the Evolution of Respiratory Hemerythrins and Hemocyanins." Genome Biol Evol **5:** 1435-1442.

Martin, A. G. (2007). 10 Å cryo-EM structure of *Drosophila melanogaster* hexamerin and *Limulus polyphemus* hemocyanin. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität.

Martin, A. G., Depoix, F., Stohr, M., Meissner, U., Hagner-Holler, S., Hammouti, K., . . . Markl, J. (2007). "*Limulus polyphemus* hemocyanin: 10 angstrom cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modelling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers." J Mol Biol **366:** 1332-1350.

Martinez, T., Burmester, T., Veenstra, J. A. und Wheeler, D. (2000). "Sequence and evolution of a hexamerin from the ant *Camponotus festinatus*." Insect Mol Biol **9:** 427-431.

Maruyama, K. und Sugano, S. (1994). "Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides." Gene **138:** 171-174.

Marx, R. (1983). Ultrastructural aspects of protein synthesis and protein transport in larvae of *Calliphora vicina*. The larval serum proteins of insects function, biosynthesis, genetic ; 9 tables. K. Scheller and L. Levenbook. Stuttgart [u.a.], Thieme [u.a.]**:** 50-60.

Marxen, J. C., Pick, C., Kwiatkowski, M. und Burmester, T. (2013). "Molecular characterization and evolution of haemocyanin from the two freshwater shrimps *Caridina multidentata* (Stimpson, 1860) and *Atyopsis moluccensis* (De Haan, 1849)." J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol **183:** 613-624.

Mason, H. S. (1948). "The Chemistry of Melanin .3. Mechanism of the Oxidation of Dihydroxyphenylalanine by Tyrosinase." J Biol Chem **172:** 83-99.

Mason, R. P., Mangum, C. P. und Godette, G. (1983). "The Influence of Inorganic-Ions and Acclimation Salinity on Hemocyanin-Oxygen Binding in the Blue-Crab *Callinectes Sapidus*." Biol Bull **164:** 104-123.

Massey, H. C., Jr., Kejzlarova-Lepesant, J., Willis, R. L., Castleberry, A. B. und Benes, H. (1997). "The *Drosophila* Lsp-1 beta gene. A structural and phylogenetic analysis." Eur J Biochem **245:** 199-207.

Meissner, U., Stohr, M., Kusche, K., Burmester, T., Stark, H., Harris, J. R., . . . Markl, J. (2003). "Quaternary structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) 1x6-mer hemocyanin from cryoEM and amino acid sequence data." J Mol Biol **325:** 99-109.

Miller, K., Eldred, N., Arisaka, F. und Holde, K. E. (1977). "Structure and function of hemocyanin from thalassinid shrimp." J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol **115:** 171-184.

Mitra, N., Sharon, N. und Surolia, A. (2003). "Role of n-linked glycan in the unfolding pathway of *Erythrina corallodendron* lectin." Biochemistry-Us **42:** 12208-12216.

Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N. C. und Surolia, A. (2006). "N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function." Trends Biochem Sci **31:** 156-163.

Miyayama, T., Ishizuka, Y., Iijima, T., Hiraoka, D. und Ogra, Y. (2011). "Roles of copper chaperone for superoxide dismutase 1 and metallothionein in copper homeostasis." Metallomics **3:** 693-701.

Monder, C., Williams, J. N. und Waisman, H. A. (1957a). "Studies on the Non-Enzymic Conversion of Dopa to Melanin .1. Studies on Autoxidation." Arch Biochem Biophys **72:** 255-270.

Monder, C., Williams, J. N. und Waisman, H. A. (1957b). "The Non-Enzymic Conversion of Dopa to Melanin .2. The Aerobic Catalysis of Dopa Oxidation by Copper Ions and Copper-Plasma Protein Complexes." Arch Biochem Biophys **72:** 271-292.

Moore, B. M. und Flurkey, W. H. (1990). "Sodium Dodecyl-Sulfate Activation of a Plant Polyphenoloxidase - Effect of Sodium Dodecyl-Sulfate on Enzymatic and Physical Characteristics of Purified Broad Bean Polyphenoloxidase." J Biol Chem **265:** 4982-4988.

Morris, S., Bridges, C. R. und Grieshaber, M. K. (1985). "A New Role for Uric-Acid - Modulator of Hemocyanin Oxygen-Affinity in Crustaceans." J Exp Zool **235:** 135-139.

Morris, S., Bridges, C. R. und Grieshaber, M. K. (1986). "The Potentiating Effect of Purine-Bases and Some of Their Derivatives on the Oxygen-Affinity of Hemocyanin from the Crayfish *Austropotamobius Pallipes*." J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol **156:** 431-440.

Morris, S. und Mcmahon, B. R. (1989). "Potentiation of Hemocyanin Oxygen-Affinity by Catecholamines in the Crab *Cancer Magister* - a Specific Effect of Dopamine." Physiol Zool **62:** 654-667.

Morris, S. (1990). "Organic Ions as Modulators of Respiratory Pigment Function during Stress." Physiol Zool **63:** 253-287.

Mousseron-Grall, S., Kejzlarova-Lepesant, J., Burmester, T., Chihara, C., Barray, M., Delain, E., . . . Lepesant, J. A. (1997). "Sequence, structure and evolution of the ecdysone-inducible Lsp-2 gene of *Drosophila melanogaster*." Eur J Biochem **245:** 191-198.

Muller, H. M., Dimopoulos, G., Blass, C. und Kafatos, F. C. (1999). "A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes." J Biol Chem **274:** 11727-11735.

Nagai, T. und Kawabata, S. (2000). "A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense." J Biol Chem **275:** 29264-29267.

Nagai, T., Osaki, T. und Kawabata, S. (2001). "Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides." J Biol Chem **276:** 27166-27170.

Nakanishi, Y. und Garen, A. (1983). "Selective gene expression induced by ecdysterone in cultured fat bodies of *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci USA **80:** 2971-2975.

Nakano, H. und Yamane, T. (1998). "Cell-free protein synthesis systems." Biotechnol Adv **16:** 367-384.

Nellaiappan, K. und Sugumaran, M. (1996). "On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus*." Comp Biochem Phys B **113:** 163-168.

Neuteboom, B., Sierdsema, S. J. und Beintema, J. J. (1989). "The Relationship between N-Terminal Sequences and Immunological Characterization of Crustacean Hemocyanins." Comp Biochem Phys B **94:** 587-592.

Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. und Deerfield, D. W. (1997). "II GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation." EMBNEWNEWS **4:** 14.

Obenchain, F. D. und Oliver, J. H., Jr. (1975). "The Heart and Arterial Circulatory System of Ticks (Acari: Ixodoidea)." J Arachnol **3:** 57-74.

Palmer, T. D., Hock, R. A., Osborne, W. R. und Miller, A. D. (1987). "Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine deaminase-deficient human." Proc Natl Acad Sci USA **84:** 1055-1059.

Paoli, M., Giomi, F., Hellmann, N., Jaenicke, E., Decker, H., Di Muro, P. und Beltramini, M. (2007). "The molecular heterogeneity of hemocyanin: Structural and functional properties of the 4x6-meric protein of *Upogebia pusilla* (Crustacea)." Gene **398:** 177-182.

Peter, M. G. und Scheller, K. (1991). Arylphorins and the integument. Physiology of the insect epidermis. K. Binnington and A. Retnakaran. East Melbourne, Vic, CSIRO**:** 115-124.

Pick, C., Schneuer, M. und Burmester, T. (2009). "The occurrence of hemocyanin in Hexapoda." Febs J **276:** 1930-1941.

Pick, C., Schneuer, M. und Burmester, T. (2010). "Ontogeny of hemocyanin in the ovoviviparous cockroach *Blaptica dubia* suggests an embryo-specific role in oxygen supply." J Insect Physiol **56:** 455-460.

Pick, C., Scherbaum, S., Hegedüs, E., Meyer, A., Saur, M., Neumann, R., . . . Burmester, T. (2014). "Structure, diversity and evolution of myriapod hemocyanins." Febs J n/a-n/a.

Pifferi, P. G. und Baldassari, L. (1973). "A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorn's hydrazone." Anal Biochem **52:** 325-335.

Powell, D., Sato, J. D., Brock, H. W. und Roberts, D. B. (1984). "Regulation of synthesis of the larval serum proteins of *Drosophila melanogaster*." Dev Biol **102:** 206-215.

Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., . . . OHalloran, T. V. (1997). "Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1." Science **278:** 853-856.

Rehm, P., Meuseman, K., Borner, J., Misof, B. und Burmester, T. "Phylogenetic position of Myriapoda revealed by 454 transcriptome sequencing."

Rehm, P., Pick, C., Borner, J., Markl, J. und Burmester, T. (2012). "The diversity and evolution of chelicerate hemocyanins." BMC Evol Biol **12**.

Richey, B., Decker, H. und Gill, S. (1983). Structure and function of invertebrate respiratory proteins. Life chemistry reports Supplement series. E. J. Wood. Chur; New York, Harwood Academic Publishers**:** 309-312.

Rizki, R. M. und Rizki, T. M. (1984). "Selective Destruction of a Host Blood-Cell Type by a Parasitoid Wasp." P Natl Acad Sci-Biol **81:** 6154-6158.

Roberts, D. B., Wolfe, J. und Akam, M. E. (1977). "The developmental profiles of two major haemolymph proteins from *Drosophila melanogaster*." J Insect Physiol **23:** 871-878.

Roberts, D. B. und Evans-Roberts, S. (1979). "Genetic and Cytogenetic Localization of the 3 Structural Genes-Coding for the Major Protein of *Drosophila* Larval Serum." Genetics **93:** 663-679.

Rosenzweig, A. C. und O'Halloran, T. V. (2000). "Structure and chemistry of the copper chaperone proteins." Curr Opin Chem Biol **4:** 140-147.

Ryu, K. S., Lee, J. O., Kwon, T. H., Choi, H. H., Park, H. S., Hwang, S. K., . . . Kim, S. (2009). "The presence of monoglucosylated N196-glycan is important for the structural stability of storage protein, arylphorin." Biochem J **421:** 87-96.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., . . . Erlich, H. A. (1988). "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase." Science **239:** 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanders, N. K., Morris, S., Childress, J. J. und McMahon, B. R. (1992). "Effects of Ammonia, Trimethylamine, L-Lactate and Co-2 on Some Decapod Crustacean Hemocyanins." Comp Biochem Phys A **101:** 511-516.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." P Natl Acad Sci USA **74:** 5463-5467.

Schaefer, B. C. (1995). "Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends." Anal Biochem **227:** 255-273.

Scheller, K., Fischer, B. und Schenkel, H. (1990). Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. Molecular insect science: [proceedings of the International Symposium on Molecular Insect Science, held October 22 - 27, 1989, in Tuscon, Arizona]
H. H. Hagedorn. New York [u.a.], Plenum Pr.**:** 155–162.

Scherbaum, S., Ertas, B., Gebauer, W. und Burmester, T. (2010). "Characterization of hemocyanin from the peacock mantis shrimp *Odontodactylus scyllarus* (Malacostraca:Hoplocarida)." J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol **180:** 1235-1245.

Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. (1996). "Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin." J Mol Biol **255:** 753-766.

Schmidt, T. G. M. und Skerra, A. (2007). "The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins." Nat Protoc **2:** 1528-1535.

Schneider, I. (1972). "Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*." J Embryol Exp Morph **27:** 353-365.

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. und Peitsch, M. C. (2003). "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server." Nucleic acids research **31:** 3381-3385.

Sezaki, F., Kawamoto, N. und Asada, N. (2001). "Effect of ionic concentration on the higher-order structure of prophenol oxidase in *Drosophila melanogaster*." Biochem Genet **39:** 83-92.

Shirras, A. D. und Bownes, M. (1989). "Cricklet - a Locus Regulating a Number of Adult Functions of *Drosophila Melanogaster*." P Natl Acad Sci USA **86:** 4559-4563.

Soderhall, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S. und Soderhall, K. (2003). "Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*." Dev Comp Immunol **27:** 661-672.

Soderhall, K. und Cerenius, L. (1998). "Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity." Curr Opin Immunol **10:** 23-28.

Solomon, E. I., Baldwin, M. J. und Lowery, M. D. (1992). "Electronic-Structures of Active-Sites in Copper Proteins - Contributions to Reactivity." Chem Rev **92:** 521-542.

Spinozzi, F., Gatto, S., De Filippis, V., Carsughi, F., Di Muro, P. und Beltramini, M. (2005). "Contribution of the copper ions in the dinuclear active site to the stability of *Carcinus aestuarii* hemocyanin." Arch Biochem Biophys **439:** 42-52.

Srinivasan, C., Posewitz, M. C., George, G. N. und Winge, D. R. (1998). "Characterization of the copper chaperone Cox17 of *Saccharomyces cerevisiae*." Biochemistry-Us **37:** 7572-7577.

Stöcker, W., Raeder, U., Bijlholt, M. C., Wichertjes, T., Bruggen, E. J. und Markl, J. (1988). "The quaternary structure of four crustacean two-hexameric hemocyanins: immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits." J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol **158:** 271-289.

Strandberg, L. und Enfors, S. O. (1991). "Factors Influencing Inclusion Body Formation in the Production of a Fused Protein in *Escherichia Coli*." Appl Environ Microb **57:** 1669-1674.

Sugumaran, M. und Nellaiappan, K. (1991). "Lysolecithin - a Potent Activator of Prophenoloxidase from the Hemolymph of the Lobster, *Homarus Americanas*." Biochem Bioph Res Co **176:** 1371-1376.

Sugumaran, M. und Kanost, M. R. (1993). Chapter 14 - Regulation of Insect Hemolymph Phenoloxidases. Parasites and Pathogens of Insects. N. E. Beckage, S. N. Thompson and B. A. Federici. San Diego, Academic Press**:** 317-342.

Sugumaran, M. (1996). Role of insect cuticle in immunity. New directions in invertebrate immunology. K. Söderhäll, S. Iwanaga and G. R. Vasta. Fair Haven, NJ, SOS Publications**:** 355-374.

Sullivan, M. L., Hatfield, R. D., Thoma, S. L. und Samac, D. A. (2004). "Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa(1[w])." Plant Physiol **136:** 3234-3244.

Sundara Rajulu, G. (1969). "Presence of haemocyanin in the blood of a centipede Scutigera longicornis (Chilopoda: Myriapoda)." Curr Sci (Bangalore) **7:** 168-169.

Tang, H. P. (2009). "Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*." Fly **3:** 105-111.

Taveau, J. C., Boisset, N., Lamy, J., Lambert, O. und Lamy, J. N. (1997). "Three-dimensional reconstruction of *Limulus polyphemus* hemocyanin from cryoelectron microscopy." J Mol Biol **266:** 1002-1015.

Telfer, W. H. und Kunkel, J. G. (1991). "The function and evolution of insect storage hexamers." Annu Rev Entomol **36:** 205-228.

Terwilliger, N. B. (1998). "Functional adaptations of oxygen-transport proteins." J Exp Biol **201:** 1085-1098.

Terwilliger, N. B., Dangott, L. und Ryan, M. (1999). "Cryptocyanin, a crustacean molting protein: evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins." Proc Natl Acad Sci USA **96:** 2013-2018.

Terwilliger, N. B., Ryan, M. C. und Towle, D. (2005). "Evolution of novel functions: cryptocyanin helps build new exoskeleton in *Cancer magister*." J Exp Biol **208:** 2467-2474.

Terwilliger, N. B. und Ryan, M. C. (2006). "Functional and phylogenetic analyses of phenoloxidases from brachyuran (*Cancer magister*) and branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans." Biol Bull **210:** 38-50.

Tojo, S., Betchaku, T., Ziccardi, V. J. und Wyatt, G. R. (1978). "Fat body protein granules and storage proteins in the silkmoth, *Hyalophora cecropia*." J Cell Biol **78:** 823-838.

Truchot, J. P. (1975). "Factors controlling the *in vitro* and *in vivo* oxygen affinity of the hemocyanin in the crab *Carcinus maenas* (L.)." Respir Physiol **24:** 173-189.

Truchot, J. P. (1980). "Lactate Increases the Oxygen-Affinity of Crab Hemocyanin." J Exp Zool **214:** 205-208.

Ueno, K. und Natori, S. (1982). "Activation of fat body by 20-hydroxyecdysone for the selective incorporation of storage protein in *Sarcophaga peregrina* larvae." Insect Biochem Mol Biol **12:** 185-191.

Ueno, K., Ohsawa, F. und Natori, S. (1983). "Identification and Activation of Storage Protein-Receptor of *Sarcophaga Peregrina* Fat-Body by 20-Hydroxyecdysone." J Biol Chem **258:** 2210-2214.

Ueno, K. und Natori, S. (1984). "Identification of storage protein receptor and its precursor in the fat body membrane of *Sarcophaga peregrina*." J Biol Chem **259:** 12107-12111.

Uglow, R. F. (1969). "Haemolymph Protein Concentrations in Portunid Crabs. I. Studies on Adult *Carcinus Maenas*." Comp Biochem Physiol **30:** 1083-1090.

Vahtera, V., Edgecombe, G. D. und Giribet, G. (2013). "Phylogenetics of scolopendromorph centipedes: can denser taxon sampling improve an artificial classification?" **27:** 578-602.

Valderrama-Rincon, J. D., Fisher, A. C., Merritt, J. H., Fan, Y. Y., Reading, C. A., Chhiba, K., . . . DeLisa, M. P. (2012). "An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*." Nat Chem Biol **8:** 434-436.

VanGelder, C. W. G., Flurkey, W. H. und Wichers, H. J. (1997). "Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases." Phytochemistry **45:** 1309-1323.

VanHolde, K. E. und Miller, K. I. (1995). "Hemocyanins." Adv Protein Chem **47:** 1-81.

VanHolde, K. E., Miller, K. I. und Decker, H. (2001). "Hemocyanins and invertebrate evolution." J Biol Chem **276:** 15563-15566.

Voit, R., Feldmaier-Fuchs, G., Schweikardt, T., Decker, H. und Burmester, T. (2000). "Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum* - Structure and intramolecular evolution of the subunits." J Biol Chem **275:** 39339-39344.

Volbeda, A. und Hol, W. G. J. (1989). "Crystal-Structure of Hexameric Hemocyanin from *Panulirus Interruptus* Refined at 3.2-a Resolution." J Mol Biol **209:** 249-279.

Volloch, V., Schweitzer, B. und Rits, S. (1994). "Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of beta globin mRNA with an extended 5'-untranslated region." Nucleic Acids Res **22:** 2507-2511.

Wang, A. M., Doyle, M. V. und Mark, D. F. (1989). "Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction." Proc Natl Acad Sci USA **86:** 9717-9721.

Waterhouse, R. M., Kriventseva, E. V., Meister, S., Xi, Z. Y., Alvarez, K. S., Bartholomay, L. C., . . . Christophides, G. K. (2007). "Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes." Science **316:** 1738-1743.

Wheeler, D. E. und Buck, N. A. (1995). "Storage Proteins in Ants during Development and Colony Founding." J Insect Physiol **41:** 885-894.

Whelan, S. und Goldman, N. (2001). "A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach." Mol Biol Evol **18:** 691-699.

Wigfield, D. C. und Goltz, D. M. (1990). "Kinetics of reconstitution of apotyrosinase by copper." Biochem Cell Biol **68:** 476-479.

Wigfield, D. C. und Goltz, D. M. (1993). "Activation parameters for the reconstitution of apotyrosinase by copper." Biochem Cell Biol **71:** 96-98.

Willmer, P., Stone, G. und Johnston, I. A. (2005). Environmental physiology of animals. Malden, Mass ;Oxford, Blackwell Pub.

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. und Meyerowitz, E. (1998). Principles of development. .

Wood, J. M. und Schallreuter, K. U. (1991). "Studies on the Reactions between Human Tyrosinase, Superoxide Anion, Hydrogen-Peroxide and Thiols." Biochim Biophys Acta **1074:** 378-385.

Wormald, M. R., Petrescu, A. J., Pao, Y. L., Glithero, A., Elliott, T. und Dwek, R. A. (2002). "Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: Complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling." Chem Rev **102:** 371-386.

Xylander, W. E. R. und Bogusch, O. (1992). "Investigations on the phenoloxidase of *Rhapidostreptus virgator* (Arthropoda, Diplopoda)." Zool Jahrb Abt Allg Zool Physiol Tiere **96:** 309-321.

Xylander, W. E. R. (1996). The phenoloxidase from the hemolymph of Diplopoda. Acta Myriapodologica - Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. J.-J. Geoffroy. Paris, Éd. du Muséum**:** 411-420.

Yu, X., Mollan, T. L., Butler, A., Gow, A. J., Olson, J. S. und Weiss, M. J. (2009). "Analysis of human α globin gene mutations that impair binding to the α hemoglobin stabilizing protein." Blood **113:** 5961-5969.

Zhou, B. und Gitschier, J. (1997). "hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast." P Natl Acad Sci USA **94:** 7481-7486.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Atox1	engl. antioxidant 1 copper chaperone
Atp7a	engl. copper-transporting ATPase 1
Atp7b	engl. copper-transporting ATPase, beta polypeptide
Atx1	engl. cytosolic copper metallochaperone
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	engl. bovine serum albumin
CCS	engl. copper chaperone for superoxide dismutase
CD	Circhulärer Dichroismus
cDNA	engl. complementary desoxynucleotidacid
CI	Chlorophorm Isoamylalkohol
CIP	engl. calf intestinal phosphatase
CopZ	engl. copper chaperone CopZ
Cox17	engl. cytochrome c oxidase copper chaperone
Ctr1	engl. coppper transporter 1
CuA/B	Kupferionen in Typ3-Kupferbindungszentren
DEPC	DiEthylPyroCarbonate
dest.	destilliert
DmeLSP2	larvales Serumprotein2 von *D. melanogaster*
DmePPO3	Prophenoloxidase 3 von *D. melanogaster*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. desoxynucleotidacid
dNTP(s)	Desoxynucleotidtriphosphat(e)
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
engl.	englisch
EST	engl. expressed sequence tags
et al.	lat. at alii (Maskulinum) oder et aliae (Femininum) oder et alia (neutrum) in deutsch: und andere
fbs	engl. fetal bovine serum
fwd	forward
h	engl. hour
HBS	Holmes Bonner Solution
Hc	Hämocyanin
His-tag	Hexahistidin-tag (Affinitätstag)
HMA	engl. heavy metal-associated
HPLC	engl. high performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-*β*-D-thiogalactopyranosid
L	Luria
LB	Luria Bertani
LSP2	larvales Serumprotein 2
min	Minute

MBTH	3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon
MelC1	engl. tyrosinase co-factor
MelC2	Apotyrosinase
MOPS	(N-Morpholin)-Propansulfon-Säure
mRNA	engl. messenger-RNA
NBT	Nitro Tetrazolium Blue Chloride
N-PTH	N-Phenylthioharnstoff
OD	optische Dichte
ORF	engl. open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelectrophorese
PCI	Phenol Chlorophorm Isoamylalkohol
PCR	engl. polymerase chain reaction
PelHc4	Hämocyanin-Untereinheit 4 von *P. elephas*
pET	engl. plasmid for expression by T7 RNA-Polymerase
PO	Phenoloxidase
PPO	Prophenoloxidase
PPS	(3-(1-Pyridinio)-1-propansulfonat
qRT-PCR	quantitative Realtime PCR
RACE	engl. rapid amplification of cDNA ends
RNA	engl. ribonucleinacid
RPLP0	engl. ribosomal protein, large, P0
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
rev	reverse
SDS	Sodiumdodecylsulphat
S2	Schneider 2
sec	Sekunde
SOD1	Superoxiddismutase 1
SII	Strep-tag II (Streptavidin-tag II, Affinitätstag)
TAP	engl. tobacco acid pyrophosphatase
Taq	*Thermophilus aquaticus*
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	engl. tris buffered saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	engl. transfer-RNA
UTR	engl. untranslated region
UV	ultraviolett
VIS	engl. visible
v/v	engl. volume per volume
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
w/v	engl. weights per volume
x g	Zentrifugalkraft
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

6.2. Primer

Die Schmelztemperatur aller im Ramen dieser Arbeit verwendeten Primer wurde mit der Online Software OligoAnalyser 3.1 (http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/) ermittelt.

Tabelle 6.1: Primer für PelHc4 Zellkulturkonstrukte: gelb: EcoRV-Schnittstelle; oliv: NotI-Schnittstelle; Kozaksequenz ist unterstrichen, bei PelHc4KozakFor wurde ein A durch ein G ersetzt: Grün hinterlegt; Stopp-, bzw. Startcodon sind rot hinterlegt; *Strep*-tag II ist pink hinterlegt, His-tag: blau hinterlegt; sequenzspezifische Primersequenz ist grau hinterlegt; zwischen die Tags und den sequenzspezifischen Primerbereich sind zwei Aminosäuren eingefügt (Serin und Argenin)

Name	Sequenz 5'→3'
PelHc4KozakFor	TAGGATATCATGGAGGTCCTGGTCTTGTGCGCG
PelHc4For	TAGGATATCATGAAGGTCCTGGTCTTGTGCGCG
PelHc4Rev His_NotI	GTAGGCGGCCGCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTGC GCTAGCACGAAGCTCTGGGTC
PelHc4RevStrepIINotI	GTAGCGCCGGCGCTACTTTTCGAACTGCGGGTGTGACCATGCGC TAGCACGAAGCTCTGGGTC

Tabelle 6.2: Primer für das Hämocyanin von *S. dehaani* anhand bekannter EST Daten

Name	Sequenz 5'→3'
ScoHcAFor	GGACTGAACCTATGGCTGAAGGTTACG
ScoHcARev	CTGTCGGCCATTACCCCAACTTCTTCC
ScoHcBFor	GTTGCTACATCTGCTCGTGATCCTC
ScoHcBRev	CACTACGGGCTTGCCAGGTGTC
ScoHcXFor	ATCCTCTTCTGAATCCAGTGCCAC
ScoHcxRev	CTTCTTCGACATTCCCAACAAACCG

Tabelle 6.3: Primer für die 5'RACE zur Vervollständigung der Hämocyanin- und Phenoloxidasesequenzen von *S. dehaani*. Ein „N“ im Primernamen bedeutet, dass es sich um einen Nested Primer handelt.

Name	Für Sequenz	Sequenz 5'→3'
GeneRacer 5′ Primer	alle	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
GeneRacer™ 5′ Nested Primer	alle	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
5` c19061 rev	SdeHc1	TCAATGCCGTCCTCTTCACTAAG
5' N c19061 rev	SdeHc1	CCAGTATGCGGTCTCTCCATTGT
V5`lrc 10806	SdeHc2	AAAGATTCACTGCACTGGCATTCCG
V5`N lrc10806	SdeHc2	GAAGAGCTGAAAGTCAAGACCTTCGT
5` c16444 rev	SdePPO1	GGTCTCTCATAGTCATGTTAGCCG
5' N c16444 rev	SdePPO1	CTTCAGCCATAGGTTCAGTCCAAT
5'lrc16015_r_3	SdePPO2	CAGCCGCATTGATGACTCGGTCGAA
5'Nlrc16015_r_3	SdePPO2	CACTCCACAGTAACTGGCGGCATCTA
5'c30121_r_3	SdePPO3	ACTTCTGCCACGAATTATCGCTAAT
5'Nc30121_r_3	SdePPO3	GTATTCCACAGTAACTTGGAGCAGT

Tabelle 6.4: Primer für die 3'RACE zur Vervollständigung der Hämocyanin- und Phenoloxidasesequenzen von *S. dehaani*. Ein „N“ im Primernamen bedeutet, dass es sich um einen Nested Primer handelt.

Name	Für Sequenz	Sequenz 5'→3'
GeneRacer™ 3′ Primer	alle	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
GeneRacer™ 3′ Nested Primer	alle	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG
3` c19061 for	SdeHc1	CTATGAGGGAACGGAATTTCAAGTCT
3' N c19061for	SdeHc1	GCTATTGTGGCATCCTCTTTGGTA
3` lrc10806 for	SdeHc2	GACAAAGTCAAAGATAAAGTGGAACCG
3' N lrc10806 f	SdeHc2	CGTCAATATTCGGTTTGTTGGGAATGT
3` c16444 for	SdePPO1	GCCATTCCTGTTTCTGTTCGTTAC
3' N c16444 for	SdePPO1	GACAACGCTTCTCTCCAAATGATC
3`lrc16015 for	SdePPO2	GAAGATAGGGTGAAAGGGAAAGGTCA
3' N lrc16015 f	SdePPO2	TGCGGCTGATTGGTCTTCATTCA
3' c30121 for	SdePPO3	GTATCAACGCAGAGTCCATTACGGC
3`N c30121 for	SdePPO3	TGTTGGTAATCGTAAATAGGGCTGTG

Tabelle 6.5: Primer für Real Time RT-PCR der Hämocyanine und Phenoloxidasen sowie der Referenzgene β-Actin und RPLP0 von S. dehaani.

Name	Sequenz 5'→3'
RTSdeHc1F	TCGCACCATTATCATTGGCACGT
RTSdeHc1R	GCATGTAAGCAAAGGCAGCACCA
RTSdeHc2F	TGCCTTGTCTGTGGCGATCC
RTSdeHc2R	TCCGGGAAAACATCCTGTATCCTC
RTSdePPO1F	TCAGGCCAGGACCATTCAGAGA
RTSdePPO1R	TCGCCAATAAGCCAGACGATGTT
RTSdePPO2F	TGGTGTTATGGCGGATACAGCAA
RTSdePPO2R	GTCAGTCTCGATTTGTGTTGCAGAAA
RTSdePPO3F	GGGCCACAATTCCCTTTCACG
RTSdePPO3R	TGGCAACATCTCCCATGACTCC
SdeActinF	GCTGCATCTTCAAGTTCCCTGGA
SdeActinR	GCCACAAGATTCCATGCCCAAGAA
SdeRPLP0F	TCGGTTCGAAACAGATGCAGC
SdeRPLP0R	GAGGGATCAATCTTTCCAATGCAGG

Tabelle 6.6: Vektorspezifische Primer

Name	Sequenz 5'→3'
pET03	GCAGCAGCCAACTCAGCTTC
pET05	ACCACAACGGTTTCCCTCTAG
pET05_pET32b	GGAATAACAATTCCCCTCTAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG
MTFwd	CATCTCAGTGCAACTAAAGG
BGHRev	TTAGAAGGCACAGTCGAGG

6.3. Bakterielle und *in vitro* Expressionskonstrukte und Bakterienstämme

Tabelle 6.7: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen und *in vitro* Expressionskonstrukte und Bakterienstämme

Name	In Bakterienstamm	Antibiotikaresistenz des Konstruktes
DmeLSP2StrepII ohne SP/pET24a	Rosetta2(DE3)pLysS	Kanamycin
PelHc4StrepII ohne SP/pET16b	Rosetta2(DE3)pLysS/ zellfrei	Ampicillin
DmePPO3StrepII/ pET24a	zellfrei	Kanamycin

6.4. Stabil transfizierte Zelllinien

Tabelle 6.8: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten stabil transfizierten Zelllinien

Name	Zelllinie	Antibiotikaresistenz
PelHc4Strep Kozak	S2	Hygromycin
PelHc4Strep	S2	Hygromycin
PelHc4His Kozak	S2	Hygromycin
PelHc4His	S2	Hygromycin

6.5. Modifizierte PelHc4-, DmeLSP2- und DmePPO3-Sequenzen

6.5.1. DmeLSP2

ATGAAGCACCTGGACTCCAAGGTGGCGGACAAGGACTTTCTGATGAAACAGAAGTTCATGTACCAGATCCTG
CAGCACATCTACCAGGACGATGTGTTCACCACGCCCTTCGGGGGCAGCTACGTGGAGTACAAGCCGTGGGAG
CACGTGGCCGACTATGTGCACCCGGAGATGTTGGAGCACTTCTTCGAGCTGTGGCAACACCAACCCTTCACC
GATGACATGGTGTGGTCGGTGATGTACGACAAGCACGAGGAGTATGTGGTGGGTCTGGTGCGTCTCTTCTAC
TTCGCCAAGAACTGGGAGACCTTCCAGCACGTCGTCTACTGGGCCCGCCAGCACGTAAACAAGCAGTTGTTC
GTGTACGCCGTGACCATTGCCAGTTTGTTCCGTGATGATATGCAGGGAGTCGTCCTGCCGGCCCACTACGAG
ATCCACCCATGGAGCTACTTCGATAGCCAGGCACTGGAATGGGCTGAGCACTACAAAATGCACGGCTTCCAT
CATGTCAAGCAGATGGACAACATCTACAACGTGGTGATCCGTACGAACTATTCGAACGTGCACGGTTCCCTG
AACTACGATCACGATTTGGCCTACTACCTGGAGGATGTTGGCTTCAATGCCTTCTACTACTACTTCAATCTG
GACTATCCGTTCTGGACGAAGGGCGGCGAGGAGCATGTCCTTAACAAGGATCGTCGCGGTGAGCTCTACCTG
TATGTCCACTGGCAATTGCTGGCCCGTTGGTACCTGGAGCGTCTGTCCCACGATCTCGGCGAGGTGCCCGCT
TTCAACATGTATGTGCCAACCGAATCCGGCTATGCCAGTAACCTGCGCACCTACTACGGCGTACCCCAATGG
CACCGGGAGAATCACCACAGCTTCTACCACGAGCACAACTACGAGCACATCGAGCATGTGGAGATGTACACG
CAGCGTGTCATGGACTGGATCCACAAGAACGAGAAGTTCGATGTGGAGACCATCAATGTGCTGGGCAACATC
ATCCAGGGCAATGCGGACAGCGTGGACAAGAAGTTCTACGGCAGTCTTGACAAGCTGTACCGCTTCATTGTG
AACGAGGGCCACCATTATGGCCATGGTGACGAGAGCTTCCCTGGCCTTTTCATGCACTACGACACCTCTATG
CGCGATCCGATCTTCTACGAGGTATACAAGACCATTGTCAGCCACTACTGGCATCTGATGGAGACCTATCCG

GAGTACCACAAGAAGGATTACGCCTTCGAGGGTGTCCACATCGATGCCGTCCACATGCCCGAAAGTCTGACC
ACCTACTTCGAGCACTTCGACTCGGACATCAGCAATGCCGTCAATGTGGAGCCCGCCGTTGAGGGATCCGCC
GATCCGTTGTACACCTTCGGCAGGAACTCCCACTACAAGGGATCCAGCTATGTGATCAAGGCCCGCCAGCAG
CGTCTCAACCACAAGCCCTTCGAGTTCACCCTGGACGTGACCTCGGACAAGGCTCAGGATGCCGTTGTGAAG
GTCTTCATTGGACCCAAGTACGATGAGCACGGACACGAGATCCCACTGGAGCACAACTACCAGAACTTCTTC
GAGCTGGAGCACTTCAAGGTGCATCTGGAGGCGGGCGTTAACCACATCAAGCGCGCCAGCGGTGACTTCTCC
TTCTGGGTGAACGATCGCACCACCTACCTGGAGCTCTACCAGAAGCTGATGGACGCCACCAACAGTGACTAC
AAGTTCAAGCTGGATCAGTCGGAGGCCCATTGCGGCGTGCCCAACCGAATGATGCTGCCGCGCGGCAAGAAG
GGCGGCCAGGTGTTCCAGTTCTTCTACATGGTCTACCCGTACCACCAGCCCGAGGTTGCCCAGTTCACTGGC
TACGATCCGGTGGTCAGCTGCGGCGTGGGACACGGTTCCCGCTACGTGGACGCCTTGCCCTTCGGTTTCCCC
TTCAACAGGCCGGTGAAGCATGACTACTACTTCGATGTCCACAACTTCAAGTTCGTCGACGTGAAGATCTTC
CATCGCGACGAGCACACCAATGTGGTCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGTAG

Abb. 6.1: DmeLSP2StrepII ohne SP: Start- und Stoppcodon sind in roter Schrift dargestellt, *Strep*-tag II ist unterstrichen.

6.5.2. PelHc4

atgaaggtcctggtcttgtgcgcgctagtggccacagctgccgcttggccaagcttcagcggtgaacttcct
aacggtttccaaagtgacgtccactcatccgataacgcccataaacaacaggatgtcaaccatctgctggac
aagatctacgagcccataaaagatgaggaactgcacaacatagcacaaacctttgaccctgtggccgacacc
tccatatatgttgacgatggtgcagccgccaaaacgcttatgcaggaacttaacgatcatagactgttggaa
cagcatcattggttctcactttttaacactcgccagagggaagaagcactcatgctttttactgttctgaat
cagtgcaaggattggaactgttttcttaataacgccgccttctttcgtgagaggatgaatgagggagagttt
gtgtatgcactctatgtgagtgtcatccactctaaactgggagatggtattgttctgcctccactctacgaa
gtcacccctcacatgtttacaaacagtgaagtcatcgacaaggcttactccgccaagatgacccacaaagaa
ggtacatttaacatgagcttcacaggaactaaaaagaacaaagaacaacgagtggcctacttcggggaagat
attggcatgaacatccaccacgttacttggcatatggacttccccttctggtgggacgactcctatggttat
catctggatcgcaagggtgagctcttcttctgggtccaccaccagctcactgcccgctttgacgcagaacgt
ctctccaactggatggaacccgttgacgaactacattgggacgacattatccacgagggatttgctccacac
actagttacaagtatggtggtgagttccctgtacgtccagacaacatccgtttcgaaaatgtggacggcgta
gctcatgtgcatgacatggaaatcacagagaaccgcattcgtgacgcaattgctcacggttacatcacggcc
accgatggacacacaatcgacatcaggcaacctaatggcatcgaactcctgggagacatcatcgaatcctcc
atgtacagttctaacccacactattatggttccctgcacaacactgctcacatgatgcttggtcgacagggt
gatcctcatggcaagttcgacatgcctcccggtgttatggagcattttgagactgccacacgcgacccaagt
ttcttcagactgcacagatatatggacaacatcttcaaggaacacacagactctttccctccctacacccat
gaagacctcgagttccccggtgtttcagtggaaaatattgctattgatggacaccttactacattcttcgat
cagttcaaatacagtcttgtaaatgctgtggattcaggtgaaaacgtagaggatgtggcaatctatgccaat
gttcatcgccttaaccatgaagaatttacttatgagattgaggtcaggaaccacaacgaagagaaatttgct
accgtccgcattttcttgtgccctaccgaggataataatggcataaccttgaacttagatgaagcacgttgg
ctttgccttgaaatggacaagttctggaaaaaactggccaatggaaaaaatctaatagaacgcagttctaag
gactcgtcggtgaccgtccctgatatgccaagctttgaatcgctgaagcaccaagctgatgaagcggtaaag
aacggagaagacttggacctgagtgcgtatgaacggtcttgtggcatccccgacagaatgctgctacccaag
agcaagcctcagggtatggaattcaacctatacgtggctgtgactgacggtgacaaggatacagatggaagt
gatggagaccacgatcatcacggcacccacgctcagtgtggcattcacggtgaacagtatccagaccatcgg
cctttgggttatccactggaacgtcgcattcctgatgaacgcgtctttgatggcgtttcaaacatcaagcac
gcactcgtcaagatcgtccatgacccagagcttcgtgcttggtcacacccgcagttcgaaaagtga

Abb. 6.2: PelHc4StrepII ohne SP: Start- und Stoppcodon sind in roter Schrift dargestellt, *Strep*-tag II ist unterstrichen.

taggatatcatggaggtcctggtcttgtgcgcgctagtggccacagctgccgcttggccaagcttcagcggt
gaacttcctaacggtttccaaagtgacgtccactcatccgataacgcccataaacaacaggatgtcaaccat
ctgctggacaagatctacgagcccataaaagatgaggaactgcacaacatagcacaaacctttgaccctgtg
gccgacacctccatatatgttgacgatggtgcagccgccaaaacgcttatgcaggaacttaacgatcataga
ctgttggaacagcatcattggttctcactttttaacactcgccagagggaagaagcactcatgctttttact
gttctgaatcagtgcaaggattggaactgttttcttaataacgccgccttctttcgtgagaggatgaatgag
ggagagtttgtgtatgcactctatgtgagtgtcatccactctaaactgggagatggtattgttctgcctcca

ctctacgaagtcacccctcacatgtttacaaacagtgaagtcatcgacaaggcttactccgccaagatgacc
cacaaagaaggtacatttaacatgagcttcacaggaactaaaaagaacaaagaacaacgagtggcctacttc
ggggaagatattggcatgaacatccaccacgttacttggcatatggacttccccttctggtgggacgactcc
tatggttatcatctggatcgcaagggtgagctcttcttctgggtccaccaccagctcactgcccgctttgac
gcagaacgtctctccaactggatggaacccgttgacgaactacattgggacgacattatccacgagggattt
gctccacacactagttacaagtatggtggtgagttccctgtacgtccagacaacatccgtttcgaaaatgtg
gacggcgtagctcatgtgcatgacatggaaatcacagagaaccgcattcgtgacgcaattgctcacggttac
atcacggccaccgatggacacacaatcgacatcaggcaacctaatggcatcgaactcctgggagacatcatc
gaatcctccatgtacagttctaacccacactattatggttccctgcacaacactgctcacatgatgcttggt
cgacagggtgatcctcatggcaagttcgacatgcctcccggtgttatggagcattttgagactgccacacgc
gacccaagtttcttcagactgcacagatatatggacaacatcttcaaggaacacacagactctttccctccc
tacacccatgaagacctcgagttccccggtgtttcagtggaaaatattgctattgatggacaccttactaca
ttcttcgatcagttcaaatacagtcttgtaaatgctgtggattcaggtgaaaacgtagaggatgtggcaatc
tatgccaatgttcatcgccttaaccatgaagaatttacttatgagattgaggtcaggaaccacaacgaagag
aaatttgctaccgtccgcattttcttgtgccctaccgaggataataatggcataaccttgaacttagatgaa
gcacgttggctttgccttgaaatggacaagttctggaaaaaactggccaatggaaaaaatctaatagaacgc
agttctaaggactcgtcggtgaccgtccctgatatgccaagctttgaatcgctgaagcaccaagctgatgaa
gcggtaaagaacggagaagacttggacctgagtgcgtatgaacggtcttgtggcatccccgacagaatgctg
ctacccaagagcaagcctcagggtatggaattcaacctatacgtggctgtgactgacggtgacaaggataca
gatggaagtgatggagaccacgatcatcacggcacccacgctcagtgtggcattcacggtgaacagtatcca
gaccatcggcctttgggttatccactggaacgtcgcattcctgatgaacgcgtctttgatggcgtttcaaac
atcaagcacgcactcgtcaagatcgtccatGACCCAGAGCTTCGTGCTAGCGCATGGTCACACCCGCAGTTC
GAAAAGtgaCGCCGGCGCTAC

Abb. 6.3: PelHc4Strep Kozak: Start- und Stoppcodon sind in roter Schrift dargestellt, *Strep*-tag II und Kozak-Sequenz sind unterstrichen.

atgaaggtcctggtcttgtgcgcgctagtggccacagctgccgcttggccaagcttcagcggtgaacttcct
aacggtttccaaagtgacgtccactcatccgataacgcccataaacaacaggatgtcaaccatctgctggac
aagatctacgagcccataaaagatgaggaactgcacaacatagcacaaacctttgaccctgtggccgacacc
tccatatatgttgacgatggtgcagccgccaaaacgcttatgcaggaacttaacgatcatagactgttggaa
cagcatcattggttctcactttttaacactcgccagagggaagaagcactcatgctttttactgttctgaat
cagtgcaaggattggaactgttttcttaataacgccgccttctttcgtgagaggatgaatgagggagagttt
gtgtatgcactctatgtgagtgtcatccactctaaactgggagatggtattgttctgcctccactctacgaa
gtcacccctcacatgtttacaaacagtgaagtcatcgacaaggcttactccgccaagatgacccacaaagaa
ggtacatttaacatgagcttcacaggaactaaaaagaacaaagaacaacgagtggcctacttcggggaagat
attggcatgaacatccaccacgttacttggcatatggacttccccttctggtgggacgactcctatggttat
catctggatcgcaagggtgagctcttcttctgggtccaccaccagctcactgcccgctttgacgcagaacgt
ctctccaactggatggaacccgttgacgaactacattgggacgacattatccacgagggatttgctccacac
actagttacaagtatggtggtgagttccctgtacgtccagacaacatccgtttcgaaaatgtggacggcgta
gctcatgtgcatgacatggaaatcacagagaaccgcattcgtgacgcaattgctcacggttacatcacggcc
accgatggacacacaatcgacatcaggcaacctaatggcatcgaactcctgggagacatcatcgaatcctcc
atgtacagttctaacccacactattatggttccctgcacaacactgctcacatgatgcttggtcgacagggt
gatcctcatggcaagttcgacatgcctcccggtgttatggagcattttgagactgccacacgcgacccaagt
ttcttcagactgcacagatatatggacaacatcttcaaggaacacacagactctttccctccctacacccat
gaagacctcgagttccccggtgtttcagtggaaaatattgctattgatggacaccttactacattcttcgat
cagttcaaatacagtcttgtaaatgctgtggattcaggtgaaaacgtagaggatgtggcaatctatgccaat
gttcatcgccttaaccatgaagaatttacttatgagattgaggtcaggaaccacaacgaagagaaatttgct
accgtccgcattttcttgtgccctaccgaggataataatggcataaccttgaacttagatgaagcacgttgg
ctttgccttgaaatggacaagttctggaaaaaactggccaatggaaaaaatctaatagaacgcagttctaag
gactcgtcggtgaccgtccctgatatgccaagctttgaatcgctgaagcaccaagctgatgaagcggtaaag
aacggagaagacttggacctgagtgcgtatgaacggtcttgtggcatccccgacagaatgctgctacccaag
agcaagcctcagggtatggaattcaacctatacgtggctgtgactgacggtgacaaggatacagatggaagt
gatggagaccacgatcatcacggcacccacgctcagtgtggcattcacggtgaacagtatccagaccatcgg
cctttgggttatccactggaacgtcgcattcctgatgaacgcgtctttgatggcgtttcaaacatcaagcac
gcactcgtcaagatcgtccatGACCCAGAGCTTCGTGCTAGCGCATGGTCACACCCGCAGTTCGAAAAGtga
CGCCGGCGCTAC

Abb. 6.4: PelHc4Strep: Start- und Stoppcodon sind in roter Schrift dargestellt, *Strep*-tag II ist unterstrichen.

taggatatcatggaggtcctggtcttgtgcgcgctagtggccacagctgccgcttggccaagcttcagcggt
gaacttcctaacggtttccaaagtgacgtccactcatccgataacgcccataaacaacaggatgtcaaccat
ctgctggacaagatctacgagcccataaaagatgaggaactgcacaacatagcacaaacctttgaccctgtg
gccgacacctccatatatgttgacgatggtgcagccgccaaaacgcttatgcaggaacttaacgatcataga
ctgttggaacagcatcattggttctcactttttaacactcgccagagggaagaagcactcatgctttttact
gttctgaatcagtgcaaggattggaactgttttcttaataacgccgccttctttcgtgagaggatgaatgag
ggagagtttgtgtatgcactctatgtgagtgtcatccactctaaactgggagatggtattgttctgcctcca
ctctacgaagtcacccctcacatgtttacaaacagtgaagtcatcgacaaggcttactccgccaagatgacc
cacaaagaaggtacatttaacatgagcttcacaggaactaaaaagaacaaagaacaacgagtggcctacttc
ggggaagatattggcatgaacatccaccacgttacttggcatatggacttccccttctggtgggacgactcc
tatggttatcatctggatcgcaagggtgagctcttcttctgggtccaccaccagctcactgcccgctttgac
gcagaacgtctctccaactggatggaacccgttgacgaactacattgggacgacattatccacgagggattt
gctccacacactagttacaagtatggtggtgagttccctgtacgtccagacaacatccgtttcgaaaatgtg
gacggcgtagctcatgtgcatgacatggaaatcacagagaaccgcattcgtgacgcaattgctcacggttac
atcacggccaccgatggacacacaatcgacatcaggcaacctaatggcatcgaactcctgggagacatcatc
gaatcctccatgtacagttctaacccacactattatggttccctgcacaacactgctcacatgatgcttggt
cgacagggtgatcctcatggcaagttcgacatgcctcccggtgttatggagcattttgagactgccacacgc
gacccaagtttcttcagactgcacagatatatggacaacatcttcaaggaacacacagactctttccctccc
tacacccatgaagacctcgagttccccggtgtttcagtggaaaatattgctattgatggacaccttactaca
ttcttcgatcagttcaaatacagtcttgtaaatgctgtggattcaggtgaaaacgtagaggatgtggcaatc
tatgccaatgttcatcgccttaaccatgaagaatttacttatgagattgaggtcaggaaccacaacgaagag
aaatttgctaccgtccgcattttcttgtgccctaccgaggataataatggcataaccttgaacttagatgaa
gcacgttggctttgccttgaaatggacaagttctggaaaaaactggccaatggaaaaaatctaatagaacgc
agttctaaggactcgtcggtgaccgtccctgatatgccaagctttgaatcgctgaagcaccaagctgatgaa
gcggtaaagaacggagaagacttggacctgagtgcgtatgaacggtcttgtggcatccccgacagaatgctg
ctacccaagagcaagcctcagggtatggaattcaacctatacgtggctgtgactgacggtgacaaggataca
gatggaagtgatggagaccacgatcatcacggcacccacgctcagtgtggcattcacggtgaacagtatcca
gaccatcggcctttgggttatccactggaacgtcgcattcctgatgaacgcgtctttgatggcgtttcaaac
atcaagcacgcactcgtcaagatcgtccatGACCCAGAGCTTCGTGCTAGCGCACACCACCACCACCACCAC
TAGGCGGCCGCCTAC

Abb. 6.5: PelHc4His Kozak: Start- und Stoppcodon sind in roter Schrift dargestellt, His-tag und Kozak-Sequenz sind unterstrichen.

atgaaggtcctggtcttgtgcgcgctagtggccacagctgccgcttggccaagcttcagcggtgaacttcct
aacggtttccaaagtgacgtccactcatccgataacgcccataaacaacaggatgtcaaccatctgctggac
aagatctacgagcccataaaagatgaggaactgcacaacatagcacaaacctttgaccctgtggccgacacc
tccatatatgttgacgatggtgcagccgccaaaacgcttatgcaggaacttaacgatcatagactgttggaa
cagcatcattggttctcactttttaacactcgccagagggaagaagcactcatgctttttactgttctgaat
cagtgcaaggattggaactgttttcttaataacgccgccttctttcgtgagaggatgaatgagggagagttt
gtgtatgcactctatgtgagtgtcatccactctaaactgggagatggtattgttctgcctccactctacgaa
gtcacccctcacatgtttacaaacagtgaagtcatcgacaaggcttactccgccaagatgacccacaaagaa
ggtacatttaacatgagcttcacaggaactaaaaagaacaaagaacaacgagtggcctacttcggggaagat
attggcatgaacatccaccacgttacttggcatatggacttccccttctggtgggacgactcctatggttat
catctggatcgcaagggtgagctcttcttctgggtccaccaccagctcactgcccgctttgacgcagaacgt
ctctccaactggatggaacccgttgacgaactacattgggacgacattatccacgagggatttgctccacac
actagttacaagtatggtggtgagttccctgtacgtccagacaacatccgtttcgaaaatgtggacggcgta
gctcatgtgcatgacatggaaatcacagagaaccgcattcgtgacgcaattgctcacggttacatcacggcc
accgatggacacacaatcgacatcaggcaacctaatggcatcgaactcctgggagacatcatcgaatcctcc
atgtacagttctaacccacactattatggttccctgcacaacactgctcacatgatgcttggtcgacagggt
gatcctcatggcaagttcgacatgcctcccggtgttatggagcattttgagactgccacacgcgacccaagt
ttcttcagactgcacagatatatggacaacatcttcaaggaacacacagactctttccctccctacacccat
gaagacctcgagttccccggtgtttcagtggaaaatattgctattgatggacaccttactacattcttcgat
cagttcaaatacagtcttgtaaatgctgtggattcaggtgaaaacgtagaggatgtggcaatctatgccaat
gttcatcgccttaaccatgaagaatttacttatgagattgaggtcaggaaccacaacgaagagaaatttgct
accgtccgcattttcttgtgccctaccgaggataataatggcataaccttgaacttagatgaagcacgttgg
ctttgccttgaaatggacaagttctggaaaaaactggccaatggaaaaaatctaatagaacgcagttctaag
gactcgtcggtgaccgtccctgatatgccaagctttgaatcgctgaagcaccaagctgatgaagcggtaaag
aacggagaagacttggacctgagtgcgtatgaacggtcttgtggcatccccgacagaatgctgctacccaag
agcaagcctcagggtatggaattcaacctatacgtggctgtgactgacggtgacaaggatacagatggaagt
gatggagaccacgatcatcacggcacccacgctcagtgtggcattcacggtgaacagtatccagaccatcgg

cctttgggttatccactggaacgtcgcattcctgatgaacgcgtctttgatggcgtttcaaacatcaagcac
gcactcgtcaagatcgtccatGACCCAGAGCTTCGTGCTAGCGCACACCACCACCACCACCACTAGGCGGCC
GCCTAC

Abb. 6.6: PelHc4His: Start- und Stoppcodon sind in roter Schrift dargestellt, His-tag ist unterstrichen.

6.5.3. DmePPO3

ATGGCCGACAAGAAGAATCTGCTCCTTCTGTTCGATCATCCCACGGAGCCCGTGTTCATGGACAAGGGTGGC
AATGGCACCGTCTTCGACGTGCCCGACTCCTACGTGACCGATCGCTACAACCAGATGTGCAAGAAGGTCCAG
CGGCGCGTGAGCAGCGCGTCCGAGAAGAACGTCCAGGTCAAGGAGATCGCCATACCGGATCTCAGTTGCTCC
ATGAGACTGGGCCGCTCGGAGCAGTTCTCGATCTTCCTGAAGTCCCACCGCAAGATGGCCAGCCACCTAATC
GAGATCTTCACCAAAATGCAGACCGTGGATGAGCTGCAGAGCGTGGCGGTGTACGCCAGGGATCGCGTCAAT
CCGGTGCTCTTCAACTACGCCTTGTCGGTGGCCCTGCTCCACCGTCCGGACACCAAGGATCTCGAACTGCCC
GCCTTCGCGCAGACCTTCCCGGATCGCTTCATCGACTCGAAGATGCTTCGCAGCATGCGCGAGGAGTCCTTT
GTGGTGGAGCGCTCCGCCGCCCGCCTGCCCGTCGTCAGTTCGGTCAAGTACACCGCCTCCGATCTCGATGTG
GAGCACCGGCTGTGGTATTTCCGCGAGGACCTGGGCGTCAACCTGCACCACTGGCACTGGCATCTGGTCTAT
CCCATCGAGGCGCCCGACCGCAGCATCGTGGACAAGGACCGTCGTGGCGAGCTGTTCTACTATATGCACCAG
CAGATCATTGCCCGCAACAATGCCGAGCGGCTGAGCAACCACATGGCCCGGGTGCAGCCGTTCAACAACCTG
GACGAACCCATTGCCGAGGGCTACTTCCCCAAGATGGACTCGCTGGTGGCCAGTAGGGCGTATCCTCCGCGC
TTCGACAACACCCGGCTGAGCGACGTGGACCGGCCCAACAACCAGTTGAGGGTTGGCATCGATGATATGAAG
CGCTGGCGCGAACGCATCTACGAGGCCATCCATCAGGGCTACGTTTTGGATACGAACAATGAAAAGATCGTG
CTGGATGACGCTAAGGGCATCGACATCCTGGGCAACATCATCGAGGCTTCCGATCTGACGCCCAACAGTACG
CTGTACGGCGACTTCCACAACATGGGGCACATACTGATTGCCTACTCACACGATCCGACCAACAAGCACCTG
GAGTACGCGGGCGTGATGGGCGACGCCTCCACCGCGATGCGCGATCCGATCTTCTACAAGTGGCACGCCTTC
ATCGACAATATGTTCCAGGAGCACAAACGTCTGCTTTCTCCCTATGAGAAGCAAGAGCTCAGCTTTCCGGAC
GTTCGCGTCGAGAGCATCCAGGTGGAGAGCCAGGGTCAGGTCAACAGGCTAACCACCTTCTGGCAGGAGTCC
GATGTGGACATGTCCCGTGGCCTTGATTTTGTGCCGCGCGGCCATGTCCTCGCTCGGTTCACCCATCTGCAG
CACCACGAATTCAGCTACACCATCAAGGTGGATAACTCCAGCGAGGCCACGCGGTATGGCTACGTGCGCATC
TTCCTGGCGCCCAAGCTGGATGATCGCAATGCACCCATGCTGCTGGAGCAACAGCGCCTGATGATGGTGGAG
CTGGACAAGTTCGTGGTTACCATGCCTCCCGGCAGCCATACGATCACCCGGAACTCCACGGAGTCGAGTGTC
ACCATTCCGTTCGAGCGCACCTTCCGCAACCTGGACAAGCTGGAGGAGCTGCAGAACTTCTTGTGCGGCTGC
GGTTGGCCCCAGCACATGCTGATTCCGAAGGGTCGGCCCGAGGGTCTGCGCTTCGAGCTCTTCGTCATGGTT
TCCAACTACGAAGAGGATAAGGTTGACCAGACGGTCGCAGATTGCGGCTGCAGCATCGCCGCTTCCTACTGC
GGCCTGCGCGATCGCCTCTATCCGGATCGCAAGTCCATGGGCTTCCCCTTCGATCGCAAGCCGCGTCGAGGC
TCCGAGATCCTGGAGAACTTCCTGACGCCCAACATGTGCGCCGTGGAGGTCATCATTACCCACGAGGACCGC
ACCGAGAAGCTTCGCGAGGTACCAGCTCGCTCCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGTGACTCGAGAGAGT

Abb. 6.7: DmePPO3StrepII: Start- und Stoppcodon sind in roter Schrift dargestellt, *Strep*-tag II ist unterstrichen.

6.6. Expressions-, Aufreinigungs- und Rekonstitutionssysteme für Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie

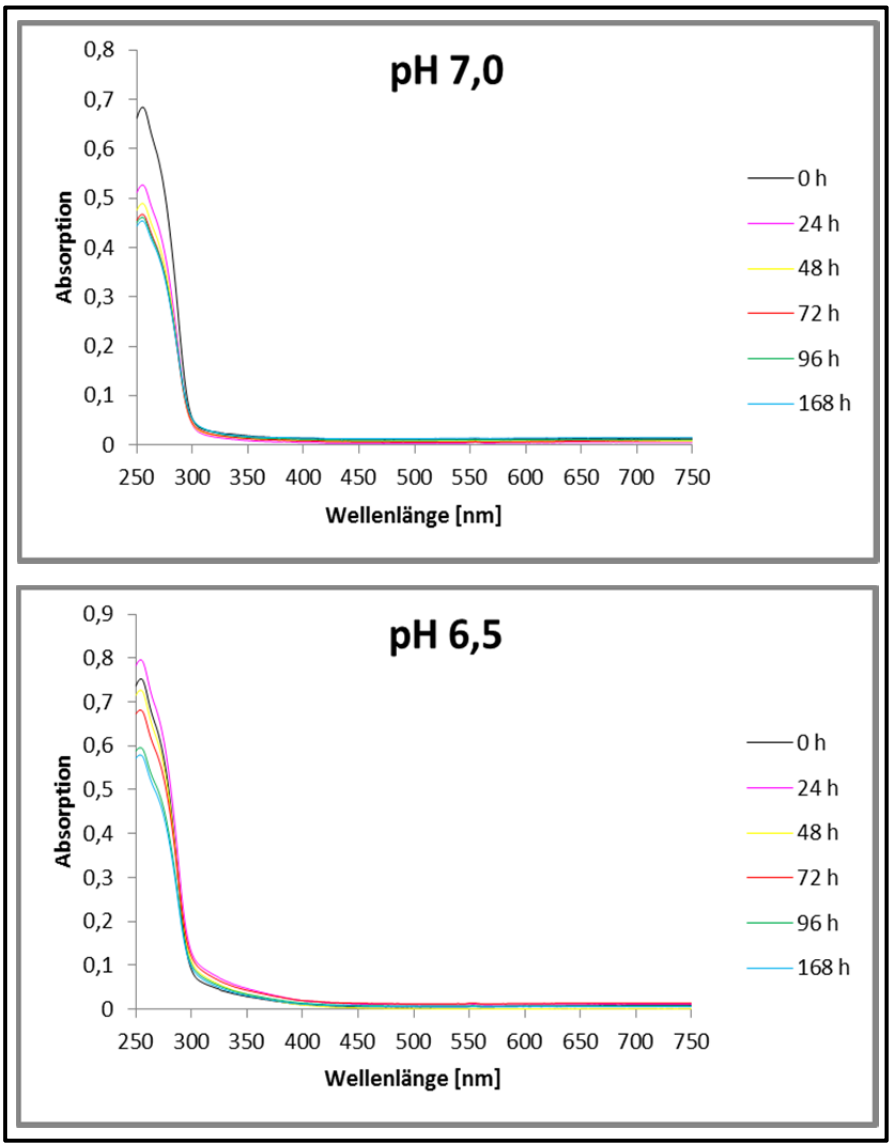


Abb. 6.8a: Absorptionsspektren während eines Kupfereinbauversuchs nach WIGFIELD und GOLTZ (1993) in das rekombinante PelHc4 bei pH 7,0 und pH 6,5.

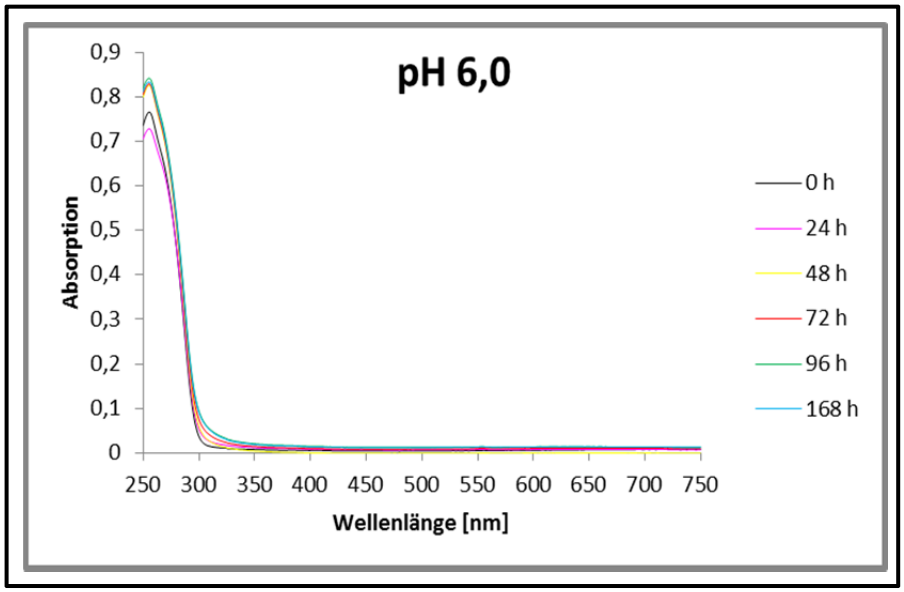


Abb. 6.8b: Absorptionsspektren während eines Kupfereinbauversuchs nach WIGFIELD und GOLTZ (1993) in das rekombinante PelHc4 bei pH 6,5 und pH 7,0.

6.7. Nachweis von Hämocyanin und Phenoloxidase in *S. dehaani*

6.7.1. Sequenzen

6.7.1.1. *S. dehaani* Hämocyanin 1

```
aaagcggtttgtgctgagaagttcatctcagaacagaacatggctgcccttcagtggttc
                                        M  A  A  L  Q  W  F
cttctaggcctcgtggctctgtcacttgttgcaggcgaaaaatgtccaaaaactaatgac
 L  L  G  L  V  A  L  S  L  V  A  G  E  K  C  P  K  T  N  D
attcaagaaaagcaacgtagactcgttgaagctcttagctatgtcaatagaccatacaat
 I  Q  E  K  Q  R  R  L  V  E  A  L  S  Y  V  N  R  P  Y  N
cctaaaccgaaggatcatgaattgacgcctgcagagaaaaaatttctagaatctcatgtt
 P  K  P  K  D  H  E  L  T  P  A  E  K  K  F  L  E  S  H  V
ggatatttacctagaagggaagtttattctgtttttgatgcaagatatttgccagaagcc
 G  Y  L  P  R  R  E  V  Y  S  V  F  D  A  R  Y  L  P  E  A
aatgcatctctttattttctgttagatcctcccaattttgatgggtttatcagagcgatc
 N  A  S  L  Y  F  L  L  D  P  P  N  F  D  G  F  I  R  A  I
gatattctcagtaaacacatcaatgaagacatgctttactacgtagtgtccgtagcagct
 D  I  L  S  K  H  I  N  E  D  M  L  Y  Y  V  V  S  V  A  A
actcatcgtgacgacacacgtggtgtcattctccctcgtatacatgacatctatcccgac
 T  H  R  D  D  T  R  G  V  I  L  P  R  I  H  D  I  Y  P  D
aagttcctcagaagtgaaatcataggccaaatcaaacagaaggcacttgggaatgaaaag
 K  F  L  R  S  E  I  I  G  Q  I  K  Q  K  A  L  G  N  E  K
gatatagttgttgatgatactaagcaacatgttgattatcgagatccttacagccgttta
 D  I  V  V  D  D  T  K  Q  H  V  D  Y  R  D  P  Y  S  R  L
ggttactttcttaatgatattgccatgaattcgcaccattatcattggcacgtgcaaaac
 G  Y  F  L  N  D  I  A  M  N  S  H  H  Y  H  W  H  V  Q  N
```

```
tccttgatttggaaaaatcgaacctatccatcagtagctaatcttttaaaagaacgcatt
 S  L  I  W  K  N  R  T  Y  P  S  V  A  N  L  L  K  E  R  I
ggtgctgcctttgcttacatgcatcacgagatggttaacagatttgatgcagaacttcta
 G  A  A  F  A  Y  M  H  H  E  M  V  N  R  F  D  A  E  L  L
agcaacaagctgccaagagttactccttttgagaattggaatgatcctattctggaggga
 S  N  K  L  P  R  V  T  P  F  E  N  W  N  D  P  I  L  E  G
tatgctgctcatttaatagtagacagataccaatataactacatgtatcggccacctaac
 Y  A  A  H  L  I  V  D  R  Y  Q  Y  N  Y  M  Y  R  P  P  N
ctcaaactcaaagatttgcctgaaacgacaagaaaccaaatgagacaatggagagaccgc
 L  K  L  K  D  L  P  E  T  T  R  N  Q  M  R  Q  W  R  D  R
atactggacagcatccacaagggatatgccatctcaaaagatgggagaaatgttaccctt
 I  L  D  S  I  H  K  G  Y  A  I  S  K  D  G  R  N  V  T  L
agtgaagaggacggcattgatattataggcaacatggtagaatctacagtgaacagcatc
 S  E  E  D  G  I  D  I  I  G  N  M  V  E  S  T  V  N  S  I
aatttacctctgtatggaaacttgcactgttatgcccataccatcgcagctagagtggct
 N  L  P  L  Y  G  N  L  H  C  Y  A  H  T  I  A  A  R  V  A
gatcctgataacacatacggagaggataatggagctatgtatgacgttgctacatctgct
 D  P  D  N  T  Y  G  E  D  N  G  A  M  Y  D  V  A  T  S  A
cgtgatcctctgttctatcgttggcacaaatacattgacaaaattattcaagcatacaga
 R  D  P  L  F  Y  R  W  H  K  Y  I  D  K  I  I  Q  A  Y  R
aattccctcaggagttatacagttgaacagcttacatggccagttgtggttgtagaagga
 N  S  L  R  S  Y  T  V  E  Q  L  T  W  P  V  V  V  V  E  G
ttgacagtcgaaggcgcaaaagtaaataaaattaaaaccttctgggaagatgatgttctc
 L  T  V  E  G  A  K  V  N  K  I  K  T  F  W  E  D  D  V  L
acagtaggaaccggcttcaccttcacaggtccatctgccactgccaaagtgaacgttcgt
 T  V  G  T  G  F  T  F  T  G  P  S  A  T  A  K  V  N  V  R
catcttgaacacgaggaatttagttacaacatccaagtagtcaataatgctggcgaaaac
 H  L  E  H  E  E  F  S  Y  N  I  Q  V  V  N  N  A  G  E  N
aagaaagcagttttccgtattttcttggcaccaaaatatgacgaaaaaggccatgaattt
 K  K  A  V  F  R  I  F  L  A  P  K  Y  D  E  K  G  H  E  F
gatttcaatgaacaacgtcaatcaatgattgaactggataaatttgtaacagaattgaca
 D  F  N  E  Q  R  Q  S  M  I  E  L  D  K  F  V  T  E  L  T
cctggcaagaacgtagtgatcaggaaatcgtcagaatccagtgtaacccaaaaacacgaa
 P  G  K  N  V  V  I  R  K  S  S  E  S  S  V  T  Q  K  H  E
aaaatatacgctaatccaaaagaaagacaacaaaacgatcattgcaactgcggttggccg
 K  I  Y  A  N  P  K  E  R  Q  Q  N  D  H  C  N  C  G  W  P
gataatttgctcgttcctagaggttcctatgagggaacggaatttcaagtctttgtcgtt
 D  N  L  L  V  P  R  G  S  Y  E  G  T  E  F  Q  V  F  V  V
gtcacaaattatgaagaggattacgtaccatccgatgaaagttgtcactgcggcgatggt
 V  T  N  Y  E  E  D  Y  V  P  S  D  E  S  C  H  C  G  D  G
cggagctattgtggcatcctctttggtaaccacccagaccgccgtccttatggttatcct
 R  S  Y  C  G  I  L  F  G  N  H  P  D  R  R  P  Y  G  Y  P
tttgaaaaaagaacagacgcccacactttccaggactttaagacccccaacatgtacgct
 F  E  K  R  T  D  A  H  T  F  Q  D  F  K  T  P  N  M  Y  A
gttgacgtcagcattcaatttactggagtcattaagaagagctcttaagtgtcttgcatt
 V  D  V  S  I  Q  F  T  G  V  I  K  K  S  S  -
aaatgatctttttttttttcaaaacgataagtgagacaacttataaaaaattttgtacaa
aataaatatgatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Abb. 6.9: Nukleotid- und Proteinsequenz der Hämocyanin-Untereinheit 1 von *S. dehaani*: Signalpeptid ist rot hinterlegt, konservierte Histidine sind türkis hinterlegt, putative N-

Glykosylierungsstellen sind grün hinterlegt, Start- und Stoppcodon sind in fett dargestellt, PolyA-Schwanz ist in roter Schrift dargestellt und Polyadenylisierungssignal ist unterstrichen.

6.7.1.2. *S. dehaani* Hämocyanin 2

```
gaaagtcttgaacactctgaccagaaactgtcactctacggtgtcttgtattcgcagaga
tacaagatgcgctgctttgttcttgttttattgattgctgcaacttttgcatctcagtgt
       M  R  C  F  V  L  V  L  L  I  A  A  T  F  A  S  Q  C
ccaaaacctccatctgatgctgaagccaaacaacagcaaatttttcaaatcgtagaatat
 P  K  P  P  S  D  A  E  A  K  Q  Q  Q  I  F  Q  I  V  E  Y
attaacaaagcgcagacaccagaaccagttgttgaaggagtggaggagaaggagttgaag
 I  N  K  A  Q  T  P  E  P  V  V  E  G  V  E  E  K  E  L  K
tacctgggtcatttaccaaaaaatgaaatattttctttatttgatgaacgcaattggccc
 Y  L  G  H  L  P  K  N  E  I  F  S  L  F  D  E  R  N  W  P
gaagctaaagcagcagtgaaataccttcttgaaccaaagactttcgatgacttcattaaa
 E  A  K  A  A  V  K  Y  L  L  E  P  K  T  F  D  D  F  I  K
gcagccaaaattttaatcacccggatcaatgacgaaatcttcctatatgccttgtctgtg
 A  A  K  I  L  I  T  R  I  N  D  E  I  F  L  Y  A  L  S  V
gcgatccttcatagacctgacacaagggggttcaaatcccgaggatacaggatgttttc
 A  I  L  H  R  P  D  T  R  G  V  Q  I  P  R  I  Q  D  V  F
ccggataaatttattccaaatttccttcttcagcagatcagagaagaagccattagaggc
 P  D  K  F  I  P  N  F  L  L  Q  Q  I  R  E  E  A  I  R  G
gatcaaaatcccattgttaatctaaatatttcatccaactacttgaacgttgaaaatagt
 D  Q  N  P  I  V  N  L  N  I  S  S  N  Y  L  N  V  E  N  S
ctcaattatttcaccaatgatttgggcatgaactctcaccattatcactatcacgtggtt
 L  N  Y  F  T  N  D  L  G  M  N  S  H  H  Y  H  Y  H  V  V
caccctgctactggggtccctattcaaacagttaccagagatcgtcatggaagccgattt
 H  P  A  T  G  V  P  I  Q  T  V  T  R  D  R  H  G  S  R  F
gctcatatgcacagtcaattagtcagaagatatgaatctgaaagattgtccagtggtttg
 A  H  M  H  S  Q  L  V  R  R  Y  E  S  E  R  L  S  S  G  L
cctttaacagaatcatttgtcaattgggatgaaccgattcagacgggtttttcgtctcat
 P  L  T  E  S  F  V  N  W  D  E  P  I  Q  T  G  F  S  S  H
ctgacaattttcaaaaagagttattactataatttccgcccagaaggaatcacgctttct
 L  T  I  F  K  K  S  Y  Y  Y  N  F  R  P  E  G  I  T  L  S
gacctcccagagttgactaaaaataagatgctattgtggaaacatcgaatccttttaggc
 D  L  P  E  L  T  K  N  K  M  L  L  W  K  H  R  I  L  L  G
attcacagccaatttttgatatctgctaataacaagaatgtgtccttagagcgtgaagat
 I  H  S  Q  F  L  I  S  A  N  N  K  N  V  S  L  E  R  E  D
ggagaagatttgctagggaatgccgtagaatctagtttactaagcatcaatcgtcagttt
 G  E  D  L  L  G  N  A  V  E  S  S  L  L  S  I  N  R  Q  F
tacggaaaccttcacaattatgcccatgttattgccggccgagcttctgatcccgacggt
 Y  G  N  L  H  N  Y  A  H  V  I  A  G  R  A  S  D  P  D  G
agatatggggctcacaacggtgttatgcatgacgtcgccacttctgctagagatccactt
 R  Y  G  A  H  N  G  V  M  H  D  V  A  T  S  A  R  D  P  L
ttctacaggtggcataaattcatcgaatctttgttccagcaattgagagaacatcttaaa
 F  Y  R  W  H  K  F  I  E  S  L  F  Q  Q  L  R  E  H  L  K
ccttattctcattatgagcttacctatcccgctgttgttgtggaaaaagtagaagttgtt
 P  Y  S  H  Y  E  L  T  Y  P  A  V  V  V  E  K  V  E  V  V
ccagataaacatccagaaactgtaaataaagtccgtactggttacaccaccaataagttg
 P  D  K  H  P  E  T  V  N  K  V  R  T  G  Y  T  T  N  K  L
```

```
aaactgaatccgggttttgatttcactcgtcaaagcactgcaacggtgaatgttcaacat
 K  L  N  P  G  F  D  F  T  R  Q  S  T  A  T  V  N  V  Q  H
ttggatcacgaacccttccattataagttcagaatatacaataacgcacaacaagttcaa
 L  D  H  E  P  F  H  Y  K  F  R  I  Y  N  N  A  Q  Q  V  Q
aacgccgccgtcagaatatttttggctcccaaatacgacgaacagggccaccgactgaag
 N  A  A  V  R  I  F  L  A  P  K  Y  D  E  Q  G  H  R  L  K
gttaatgaccaaagacagctcatgattgaactcgataagtttgtagtccacttgcaacca
 V  N  D  Q  R  Q  L  M  I  E  L  D  K  F  V  V  H  L  Q  P
ggagttaatcagttcttaagatcctcttctgaatccagtgtcactatgccaactaaatat
 G  V  N  Q  F  L  R  S  S  S  E  S  S  V  T  M  P  T  K  Y
tttttcggtgacgtccaagacatagccagaaatcacagttgcaattgtggttggccagaa
 F  F  G  D  V  Q  D  I  A  R  N  H  S  C  N  C  G  W  P  E
tatttactacttcctcgtggctcctacgaaggtcttgactttcagctcttcgtcgcggtg
 Y  L  L  L  P  R  G  S  Y  E  G  L  D  F  Q  L  F  V  A  V
actaattgggatgaagacaaagtcaaagataaagtggaaccggaatgccagtgcagtgaa
 T  N  W  D  E  D  K  V  K  D  K  V  E  P  E  C  Q  C  S  E
tctttgagctattgtggaacaatttctggcaaatatcctgacagacgtcctttcgggtac
 S  L  S  Y  C  G  T  I  S  G  K  Y  P  D  R  R  P  F  G  Y
ccgtttgagcgtccaatcgtcgaatccaactgggaggattttgtcactcaaaacatccat
 P  F  E  R  P  I  V  E  S  N  W  E  D  F  V  T  Q  N  I  H
atcagtgacgtcaatattcggtttgttgggaatgtcgaagaagaaaaacaaatagagaaa
 I  S  D  V  N  I  R  F  V  G  N  V  E  E  E  K  Q  I  E  K
caccattaaatttacaaaactgtagaattattatattatgtgcaatttgaaataaaataa
 H  H  -
atggaatttttcgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Abb. 6.10: Nukleotid- und Proteinsequenz der Hämocyanin-Untereinheit 1 von *S. dehaani*: Signalpeptid ist rot hinterlegt, konservierte Histidine sind türkis hinterlegt, putative N-Glykosylierungsstellen sind grün hinterlegt, Start- und Stoppcodon sind in fett dargestellt, PolyA-Schwanz ist in roter Schrift dargestellt und Polyadenylisierungssignal ist unterstrichen.

6.7.1.3. *S. dehaani* Prophenoloxidase 1

```
                                                gatttcaaaatg
                                                          M
gcagaagtcaaaagtatgcagcgtcttgtgctggatctttttgataacgtttccgaacct
 A  E  V  K  S  M  Q  R  L  V  L  D  L  F  D  N  V  S  E  P
ttggatcaaagacaaccatttcacactgccttcgccagcggcccagtgatcaccagtaga
 L  D  Q  R  Q  P  F  H  T  A  F  A  S  G  P  V  I  T  S  R
gatgcggcagccacagggaccagacttcggcctcagatgaccggcattggaattcttcct
 D  A  A  A  T  G  T  R  L  R  P  Q  M  T  G  I  G  I  L  P
cggggaaggattttctccactttcaatagggatcacatggacgaagctatgagagttgtc
 R  G  R  I  F  S  T  F  N  R  D  H  M  D  E  A  M  R  V  V
cgattgctcatgagactggatgatcgagatttacaactggctttggcttatttacgggat
 R  L  L  M  R  L  D  D  R  D  L  Q  L  A  L  A  Y  L  R  D
aacataaacgaagagttgttcgtatactctattagcgttttgagtactagccagcctacc
 N  I  N  E  E  L  F  V  Y  S  I  S  V  L  S  T  S  Q  P  T
ttaagaagaacaaaacttccaccagtggaagaagttttaccagccaaattcattcctagc
 L  R  R  T  K  L  P  P  V  E  E  V  L  P  A  K  F  I  P  S
tcggcaattagtcaggccaggaccattcagagaagagcatcgcaagaaacacaggaaact
```

```
 S  A  I  S  Q  A  R  T  I  Q  R  R  A  S  Q  E  T  Q  E  T
ataattattgatgtcgatttcactggcaatgatttagacccagaacatcgtctggcttat
 I  I  I  D  V  D  F  T  G  N  D  L  D  P  E  H  R  L  A  Y
tggcgagaagacataggcctcaatgcccatcattggcattggcacattgtttatccctat
 W  R  E  D  I  G  L  N  A  H  H  W  H  W  H  I  V  Y  P  Y
acgtggatccctgaattagggactataagagatagaaaaggagagttgttctattatatg
 T  W  I  P  E  L  G  T  I  R  D  R  K  G  E  L  F  Y  Y  M
catcaacagataattgctagatatgattgtgaacgaatatctctaaatttcccaagagtg
 H  Q  Q  I  I  A  R  Y  D  C  E  R  I  S  L  N  F  P  R  V
aggccacttctaaattggactgaacctatggctgaaggttacgctccacatttaagtaaa
 R  P  L  L  N  W  T  E  P  M  A  E  G  Y  A  P  H  L  S  K
gaaatatcaggcactgtctacgctttcagaccggctaacatgactatgagagacctgcct
 E  I  S  G  T  V  Y  A  F  R  P  A  N  M  T  M  R  D  L  P
tttataactgtagatcgtctacgtacatggtatcaaagaatcattcaagatatacacaaa
 F  I  T  V  D  R  L  R  T  W  Y  Q  R  I  I  Q  D  I  H  K
ggatcttttacgagggatgatggtacgaaagttcagctggataatgatcaaggaatagat
 G  S  F  T  R  D  D  G  T  K  V  Q  L  D  N  D  Q  G  I  D
attgtaggagatgtagtagaagcagcatatacgactcctaatgccactttttatggcgat
 I  V  G  D  V  V  E  A  A  Y  T  T  P  N  A  T  F  Y  G  D
ttccacaacttgggacatcagatcattgctcgagtacacgatcctgacgaaagatacaag
 F  H  N  L  G  H  Q  I  I  A  R  V  H  D  P  D  E  R  Y  K
gaagaagttggggtaatggccgacagtactacagctatgagagatcccattttctatcga
 E  E  V  G  V  M  A  D  S  T  T  A  M  R  D  P  I  F  Y  R
tggcataaattcatcgataatgttttcgtagaacataagatgaagcttaaaccttataca
 W  H  K  F  I  D  N  V  F  V  E  H  K  M  K  L  K  P  Y  T
gaagaggagttaacttttaaagatattgttgtaaatggtatccaagttcaaggaaaaatg
 E  E  E  L  T  F  K  D  I  V  V  N  G  I  Q  V  Q  G  K  M
agtcaaagaccgcatattattggtaccttctggcaagagagaaccattagcttgcaaaga
 S  Q  R  P  H  I  I  G  T  F  W  Q  E  R  T  I  S  L  Q  R
ggaatcactttcaacagtgccattcctgtttctgttcgttaccgtcacttgcaacacgaa
 G  I  T  F  N  S  A  I  P  V  S  V  R  Y  R  H  L  Q  H  E
agcttcacgtggaacatagaagtagaaaacaaaagcaatgcagataaaccggggacagtg
 S  F  T  W  N  I  E  V  E  N  K  S  N  A  D  K  P  G  T  V
agaatatttatggcaccaaccttcaatgatacaagacaacgcttctctccaaatgatcaa
 R  I  F  M  A  P  T  F  N  D  T  R  Q  R  F  S  P  N  D  Q
cgtgttttgatgctggaaatggacaaattcgaattcaattttaaacctggaaaaaatatt
 R  V  L  M  L  E  M  D  K  F  E  F  N  F  K  P  G  K  N  I
attcagcaaagatctgaacagtcaaacataacaataccaactctgagaagctttggagaa
 I  Q  Q  R  S  E  Q  S  N  I  T  I  P  T  L  R  S  F  G  E
ttgatagcagagagtgagagtgacgatttgctggatgcacagagctactgtagctgtggt
 L  I  A  E  S  E  S  D  D  L  L  D  A  Q  S  Y  C  S  C  G
ttacctgaacatcttctggtacctagaggaaaacaggaaggaatgccgttccagactttc
 L  P  E  H  L  L  V  P  R  G  K  Q  E  G  M  P  F  Q  T  F
gttatgattacagatgcagtaaaagatagggtaaacggtgacagcaagcaatgtcatgat
 V  M  I  T  D  A  V  K  D  R  V  N  G  D  S  K  Q  C  H  D
gctaccagctactgtggagtaatcaatgagaagtatcctgacaaaaaaacccatgggatat
 A  T  S  Y  C  G  V  I  N  E  K  Y  P  D  K  K  P  M  G  Y
cctttcgatagggtcattttggctgccgattggtcaactttcaaaacctccaacatgaat
 P  F  D  R  V  I  L  A  A  D  W  S  T  F  K  T  S  N  M  N
ttcggtgatgttacagttacatttaaagaagaagtcataaatgctaatgctggctctctt
```

```
 F  G  D  V  T  V  T  F  K  E  E  V  I  N  A  N  A  G  S  L
gtctttcccaaataacattttttgattttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 V  F  P  K  -
```

Abb. 6.11: Nukleotid- und Proteinsequenz der Phenoloxidase 1 von *S. dehaani*: konservierte Histidine sind türkis hinterlegt, Start- und Stoppcodon sind in fett dargestellt, PolyA-Schwanz ist in roter Schrift dargestellt und Polyadenylisierungssignal ist unterstrichen.

6.7.1.4. *S. dehaani* Prophenoloxidase 2

```
                          tgccgtttgctatcgttggttgttaattcgaagact
agtgtttccaggcataaactaatggaagatcaactaaatttgcaaaagcttgttttggat
                       M  E  D  Q  L  N  L  Q  K  L  V  L  D
cttttcagaaatgtgtctgaacctttaagtgaatccgattttcctgtttttgcaacttcc
 L  F  R  N  V  S  E  P  L  S  E  S  D  F  P  V  F  A  T  S
tatgctggaaataaagacattttctatgaatttgaagagaagattggtatccttcctaag
 Y  A  G  N  K  D  I  F  Y  E  F  E  E  K  I  G  I  L  P  K
ggaagaattttctcgaccttcaaaagggaacacatgaaagaagctattgatattattgaa
 G  R  I  F  S  T  F  K  R  E  H  M  K  E  A  I  D  I  I  E
ttacttacgaaaactgaaacaaataatttggatccgattatgctcaaacttagaaagaaa
 L  L  T  K  T  E  T  N  N  L  D  P  I  M  L  K  L  R  K  K
gtaaatgaagaactattcgtttatgcgactagcgtttttttcattcaaaatcctgactta
 V  N  E  E  L  F  V  Y  A  T  S  V  F  F  I  Q  N  P  D  L
aaaattaaactgcctttgatagaagaagtcttaccacagaaattttgtacaggagatgtt
 K  I  K  L  P  L  I  E  E  V  L  P  Q  K  F  C  T  G  D  V
attagaaaagccgtgaaagaaaacgaaaaagctatgtcaatgataccaatcattattgat
 I  R  K  A  V  K  E  N  E  K  A  M  S  M  I  P  I  I  I  D
gtcgaatacacaagtactcctttggaaccggaacatgcattggcgtattggcgagaagat
 V  E  Y  T  S  T  P  L  E  P  E  H  A  L  A  Y  W  R  E  D
attggactcaatgctcatcactggcattggcacatcgtctatccttatgaatggcctgat
 I  G  L  N  A  H  H  W  H  W  H  I  V  Y  P  Y  E  W  P  D
ggtaacaaaccaaaagacagaagaggggaattgttttattatatgcatcagcaaatgatt
 G  N  K  P  K  D  R  R  G  E  L  F  Y  Y  M  H  Q  Q  M  I
gctagatatgattgcgagagattggctgtggatttaccaagagttgtaccactacacgat
 A  R  Y  D  C  E  R  L  A  V  D  L  P  R  V  V  P  L  H  D
tgggacaatttcatacctgaaggctatgcgccacatttaaataaggaaattgccaatact
 W  D  N  F  I  P  E  G  Y  A  P  H  L  N  K  E  I  A  N  T
atctactgttatagaccatctaatatgatactgaatcaagtgaatatagatgaattacgt
 I  Y  C  Y  R  P  S  N  M  I  L  N  Q  V  N  I  D  E  L  R
cagatgtatgagactattatccaggatttacgctctggtttcttcatacggaatgatgat
 Q  M  Y  E  T  I  I  Q  D  L  R  S  G  F  F  I  R  N  D  D
gctaaaatcccattagacactgagagaggaattgacatagtaggaaatactgtagaagca
 A  K  I  P  L  D  T  E  R  G  I  D  I  V  G  N  T  V  E  A
tcaaatgccagtgcgaatatggacagatatggaagtttacataacaatgggcataatgca
 S  N  A  S  A  N  M  D  R  Y  G  S  L  H  N  N  G  H  N  A
atcgctagaatccatgatccggatggcagatttaaattggaagatggtgttatggcggat
 I  A  R  I  H  D  P  D  G  R  F  K  L  E  D  G  V  M  A  D
acagcaactgctatgagagacccaatttttatcgttggcataaattcatcgacaacatc
 T  A  T  A  M  R  D  P  I  F  Y  R  W  H  K  F  I  D  N  I
tttctgcaacacaaatcgagactgaccccatatactagagaggagctcatgttcgaaaaa
 F  L  Q  H  K  S  R  L  T  P  Y  T  R  E  E  L  M  F  E  K
```

```
gtgattatagacagtatatatatccaaggcaaaacatctaaggcaacagataagatagaa
 V  I  I  D  S  I  Y  I  Q  G  K  T  S  K  A  T  D  K  I  E
actttctggcaagaaagtaagctcaatctagaaaatgggattaacttcaaaaacaaagtc
 T  F  W  Q  E  S  K  L  N  L  E  N  G  I  N  F  K  N  K  V
tcagtttcagttcgctatcgtcatttgcaacatgaaaaatttgaatggaacatagaagtc
 S  V  S  V  R  Y  R  H  L  Q  H  E  K  F  E  W  N  I  E  V
gagaataagtggaatgaaaacgaacaaggaacggtgagaatattcatggcacctatatat
 E  N  K  W  N  E  N  E  Q  G  T  V  R  I  F  M  A  P  I  Y
ggtgaagatggaaaagaattaagtcctaatgaacaacgacttctaatgattgaaatggat
 G  E  D  G  K  E  L  S  P  N  E  Q  R  L  L  M  I  E  M  D
aaatttgaatacactttacgacctggaacgaattacatcagtcgtcgatcggaccaatcc
 K  F  E  Y  T  L  R  P  G  T  N  Y  I  S  R  R  S  D  Q  S
aacgtaacaattcaaacactgaaaagatttagtgaactcgataaggaaacgaaggttacc
 N  V  T  I  Q  T  L  K  R  F  S  E  L  D  K  E  T  K  V  T
aatgaggcttcctgcagttgtggtttgcctgatcatcttctagtacccaggggcaaaaaa
 N  E  A  S  C  S  C  G  L  P  D  H  L  L  V  P  R  G  K  K
gatggaatggcttttcagacgtttgttatgataaccagtgcaatagaagatagggtgaaa
 D  G  M  A  F  Q  T  F  V  M  I  T  S  A  I  E  D  R  V  K
gggaaaggtcaacactgcttagatgccgccagttactgtggagtgatcaatgacaaatat
 G  K  G  Q  H  C  L  D  A  A  S  Y  C  G  V  I  N  D  K  Y
cctgataaaaaacccatgggatttcctttcgaccgagtcatcaatgcggctgattggtct
 P  D  K  K  P  M  G  F  P  F  D  R  V  I  N  A  A  D  W  S
tcattcaaaactcccaatatgggttttggtgttattaagatttgtttcgaagatatagta
 S  F  K  T  P  N  M  G  F  G  V  I  K  I  C  F  E  D  I  V
aaggatagtgatctgcacgatgagaatgatcactgaataatcataagtatcatttagaat
 K  D  S  D  L  H  D  E  N  D  H  -
gtatgctcacataatccttttactataacaattcatttttaacagaaaagttattgaata
ttgaaacaattattctattaatcttataaattttctgttttctttaatattaagagaaaa
taaactaatattcattgcataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Abb. 6.12: Nukleotid- und Proteinsequenz der Phenoloxidase 2 von *S. dehaani*: konservierte Histidine sind türkis hinterlegt, Start- und Stoppcodon sind in fett dargestellt, PolyA-Schwanz ist in roter Schrift dargestellt und Polyadenylisierungssignal ist unterstrichen.

6.7.1.5. *S. dehaani* Prophenoloxidase 3

```
gaaaagtttaattttgacaaataaccagaatcttatccatatccgcaatcaaaaaacatt
atggaaaaaactcgtcagatgcaaggcttcattctcgatatgttcaataaagtatccgaa
 M  E  K  T  R  Q  M  Q  G  F  I  L  D  M  F  N  K  V  S  E
tcgcatcctcgacacaaacatgaacatattctggcaagtcacggaattcagttttcgtct
 S  H  P  R  H  K  H  E  H  I  L  A  S  H  G  I  Q  F  S  S
tattttgaaacagaaacatttttgaaatctgaaggtttaggagttcttaagaagggaaaa
 Y  F  E  T  E  T  F  L  K  S  E  G  L  G  V  L  K  K  G  K
atcttctcgcctttcaataacgaacacatggacgaagcttttaaggctatcaagtatctc
 I  F  S  P  F  N  N  E  H  M  D  E  A  F  K  A  I  K  Y  L
aacgatacaaaactggatacaaaatcgttgataataaaaatcgttggtttacacatgttg
 N  D  T  K  L  D  T  K  S  L  I  I  K  I  V  G  L  H  M  L
ctgaatgaagagttgtttgtgtacgttacaagttacgtcatcataaatcaccctgacttc
 L  N  E  E  L  F  V  Y  V  T  S  Y  V  I  I  N  H  P  D  F
aagacagtccatttacctccttatcaggagattttccccgacaaatttattcataaagag
 K  T  V  H  L  P  P  Y  Q  E  I  F  P  D  K  F  I  H  K  E
```

```
acaattagcaaaatcaaacgccaagttatacataatggaaaagattcaaagaaagaaata
 T  I  S  K  I  K  R  Q  V  I  H  N  G  K  D  S  K  K  E  I
gtaatccctgctgatttcagtggcgataatctggatcctgaacatagattagcttattgg
 V  I  P  A  D  F  S  G  D  N  L  D  P  E  H  R  L  A  Y  W
cgagaagatattcaactgaattcccaccactggaattggcatctcgtctatccaactgat
 R  E  D  I  Q  L  N  S  H  H  W  N  W  H  L  V  Y  P  T  D
tggacaccagatagcggtgaaggtctcagagatcgtaaaggagaattattctattacatg
 W  T  P  D  S  G  E  G  L  R  D  R  K  G  E  L  F  Y  Y  M
catcaacagttagttgccagatacaattgcgaacgattatctgtacactatccaagagtt
 H  Q  Q  L  V  A  R  Y  N  C  E  R  L  S  V  H  Y  P  R  V
acggcatttttgaatgggacgaacccatagttgaggggtataattcacacttattgaaa
 T  A  F  F  E  W  D  E  P  I  V  E  G  Y  N  S  H  L  L  K
gagaattcaggtatcaattatggtccaagaccaggaaatatgattctgcaagatcttcca
 E  N  S  G  I  N  Y  G  P  R  P  G  N  M  I  L  Q  D  L  P
aatctaaccaaaagcattttacgtgcatggtaccagaggatcatgcaaagcatccatttg
 N  L  T  K  S  I  L  R  A  W  Y  Q  R  I  M  Q  S  I  H  L
ggatatcttaccagccgggaatataatactcatattccactaaataatgaaggaggaatt
 G  Y  L  T  S  R  E  Y  N  T  H  I  P  L  N  N  E  G  G  I
gataaaataggagctatagtagaggcatcaagattatctgtcaactacgatttttacgga
 D  K  I  G  A  I  V  E  A  S  R  L  S  V  N  Y  D  F  Y  G
aatttgcacaatatgagccacaattccctttcacgaatacatgatccagatgaaagatac
 N  L  H  N  M  S  H  N  S  L  S  R  I  H  D  P  D  E  R  Y
aagggcgatccaggagtcatgggagatgttgccactactgttagagatcctatctttttt
 K  G  D  P  G  V  M  G  D  V  A  T  T  V  R  D  P  I  F  F
cgatggcataaattcattgatgatatttttcaagaacataaattacaactaccttcttac
 R  W  H  K  F  I  D  D  I  F  Q  E  H  K  L  Q  L  P  S  Y
aatgaagaagggctaatgttcaaagatatcatagtaaaatccgttgataccgaaggaaaa
 N  E  E  G  L  M  F  K  D  I  I  V  K  S  V  D  T  E  G  K
caaaataaccagttacaaacgttttgggaagaaagtactctcgatatgaaatatggcttg
 Q  N  N  Q  L  Q  T  F  W  E  E  S  T  L  D  M  K  Y  G  L
gcttttgaatgtggaagtcccatagttgttcggtatcgtcatttgcaacatgagcaattt
 A  F  E  C  G  S  P  I  V  V  R  Y  R  H  L  Q  H  E  Q  F
aattggtcaattatagtggagaatatatcaaacgaaaaaaagcaaggcatggtgagaata
 N  W  S  I  I  V  E  N  I  S  N  E  K  K  Q  G  M  V  R  I
tttatggcacccaaatatgatgtaactggaaatcagtttacacctaatgagctacggaag
 F  M  A  P  K  Y  D  V  T  G  N  Q  F  T  P  N  E  L  R  K
ctcatgattgaaatggacaaatttgaatttactttcgaagcaaagaagacagttattgtg
 L  M  I  E  M  D  K  F  E  F  T  F  E  A  K  K  T  V  I  V
actcgtaaatcaagagattcaagtgtgattatcccagatgcaaaaacaacccaaaatata
 T  R  K  S  R  D  S  S  V  I  I  P  D  A  K  T  T  Q  N  I
agagaagaacttcaaaaagacgatccctggcaacactattgtgggtgcggattgccaagt
 R  E  E  L  Q  K  D  D  P  W  Q  H  Y  C  G  C  G  L  P  S
caccttctagtaccaagaggtaaacgtgaagggatgaactttatgacattcgtaatgata
 H  L  L  V  P  R  G  K  R  E  G  M  N  F  M  T  F  V  M  I
accgatgctacaaaagataaagtctatgaagaagatgacgatgtatgcaaaactgctcca
 T  D  A  T  K  D  K  V  Y  E  E  D  D  D  V  C  K  T  A  P
agttactgtggaatactcaataagaaatatcccgataaaagagcaatgggatttccattt
 S  Y  C  G  I  L  N  K  K  Y  P  D  K  R  A  M  G  F  P  F
gaccgtcaaattagcgataattcgtggcagaagtttcaaaaaccaaataatgaagtgtgg
 D  R  Q  I  S  D  N  S  W  Q  K  F  Q  K  P  N  N  E  V  W
```

```
agaactTGAatagtgatttgttggtaatcgtaaatagggctgtgaaaaatagtttagcaa
 R  T  -
ttctttaaaaacatggtgctcatgcttaatcttcataaacaatctattttttctatta
attcctttaatgcttatattataatatgccaaattaaattccatgcaaatcttgggtaca
taagttattttcatgaatagtttcataactaacagtgttaattaaatgtaccatattgag
gatatttaattaattttatttaattaaattgatgaaggactaaaatcagatttaaataca
caaatagtagacattagaacttcgtgaataattatattcattacaaagtataaaaaaatt
ttagcatttaaattccgatgttgttaaaatcagaagaaaattaaataaatttaaacatac
cataatgctaatttatccaaataatctaacttataattttattaaatatgaaattcataa
atttttttccttaatttaggatttaaagaaggattttaaatatagtgcatatgttattct
taaaaataaacagtgtaccacaaagttatattatccattgtatttttatttttacaagt
tcaattttcatcttggaaaaaaaatgcaaattgtattagaacttttgtcgttataatcaa
attttcttttatatacattagcgcattatctttgtatttatatgtaaagcattcaaaaaa
taaaagagcaatccttaaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Abb. 6.13: Nukleotid- und Proteinsequenz der Phenoloxidase 3 von *S. dehaani*: konservierte Histidine sind türkis hinterlegt, Start- und Stoppcodon sind in fett dargestellt, PolyA-Schwanz ist in roter Schrift dargestellt und Polyadenylisierungssignal ist unterstrichen.

6.7.2. Phylogenie

6.7.2.1. Abkürzungsverzeichnis der verwendeten Sequenzen

Tabelle .6.9: Für die phylogenetische Analyse verwendete Sequnezen

Abkürzung	Artname	Klasse	Protein	Zugangs-nummer
AaePPO1	*Aedes aegypti*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF292114
AaePPO3	*Aedes aegypti*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF310673
AaePPO4	*Aedes aegypti*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF327409
AauHc6	*Androctonus australis*	Chelicerata	Hämocyanin	P80476*
AfrPPO	*Artemia franciscana*	Crustacea	Prophenoloxidase	AM85010
AgaPPO1	*Anopheles gambiae*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF004915
AgaPPO2	*Anopheles gambiae*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF004916
AgaPPO3	*Anopheles gambiae*	Hexapoda	Prophenoloxidase	L76038
AgaPPO4	*Anopheles gambiae*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AJ010193
AgaPPO5	*Anopheles gambiae*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AJ010194
AgaPPO6	*Anopheles gambiae*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AJ010195
AgaPPO8	*Anopheles gambiae*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AJ459961
AgiHc1	*Archispirostreptus gigas*	Myriapoda	Hämocyanin	HE574799
AgoHcA	*Acanthoscurria gomesiana*	Chelicerata	Hämocyanin	EST
AgoHcB	*Acanthoscurria gomesiana*	Chelicerata	Hämocyanin	EST
AgoHcC	*Acanthoscurria gomesiana*	Chelicerata	Hämocyanin	EST
AgoHcD	*Acanthoscurria gomesiana*	Chelicerata	Hämocyanin	EST
AgoHcE	*Acanthoscurria gomesiana*	Chelicerata	Hämocyanin	EST

AgoHcF	*Acanthoscurria gomesiana*	Chelicerata	Hämocyanin	EST
AgoHcG	*Acanthoscurria gomesiana*	Chelicerata	Hämocyanin	EST
AgoHcX	*Acanthoscurria gomesiana*	Chelicerata	Hämocyanin	EST
AmePPO	*Apis mellifera*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AY242387
AstPPO	*Anopheles stephensi*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF062034
AsuPPO	*Armigeres subalbatus*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF260567
AsuPPO2	*Armigeres subalbatus*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF286468
BduHc1	*Blaptica dubia*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242646
BduHc2	*Blaptica dubia*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242647
BmoPPO1	*Bombyx mori*	Hexapoda	Prophenoloxidase	D49370
BmoPPO2	*Bombyx mori*	Hexapoda	Prophenoloxidase	D49371
BmoPPO3	*Bombyx mori*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF178462
CacHc1	*Chelidurella acanthopygia*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242641
CcsHc	*Cyamus scammoni*	Crustacea	Hämocyanin	ABB59715
CmaHc1	*Cancer magister*	Crustacea	Hämocyanin	AAW57889
CmaHc2	*Cancer magister*	Crustacea	Hämocyanin	AAW57890
CmaHc3	*Cancer magister*	Crustacea	Hämocyanin	AAW57891
CmaHc4	*Cancer magister*	Crustacea	Hämocyanin	AAW57892
CmaHc5	*Cancer magister*	Crustacea	Hämocyanin	AAW57893
CmaHc6	*Cancer magister*	Crustacea	Hämocyanin	U48881
CmaPPO	*Cancer magister*	Crustacea	Phenoloxidase	DQ230981
CmoHc1	*Carausius morosus*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242640
CroHcI	*Carcinoscorpius rotundicauda*	Chelicaerata	Hämocyanin	DQ090484
CroHcII	*Carcinoscorpius rotundicauda*	Chelicaerata	Hämocyanin	DQ090485
CroHcIIIa	*Carcinoscorpius rotundicauda*	Chelicaerata	Hämocyanin	DQ090486
CroHcIIIb	*Carcinoscorpius rotundicauda*	Chelicaerata	Hämocyanin	DQ090487
CroHcIV	*Carcinoscorpius rotundicauda*	Chelicaerata	Hämocyanin	DQ090488
CroHcV	*Carcinoscorpius rotundicauda*	Chelicaerata	Hämocyanin	DQ090489
CroHcVI	*Carcinoscorpius rotundicauda*	Chelicaerata	Hämocyanin	DQ090490
CsaHc	*Callinectes sapidus*	Crustacea	Hämocyanin	AF249297
CsaHc1	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307903
CsaHc2	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307904
CsaHc3	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307905
CsaHc4	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307906
CsaHc5	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307907
CsaHc5x	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307908
CsaHc6	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307909
CsaHc6x	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307910

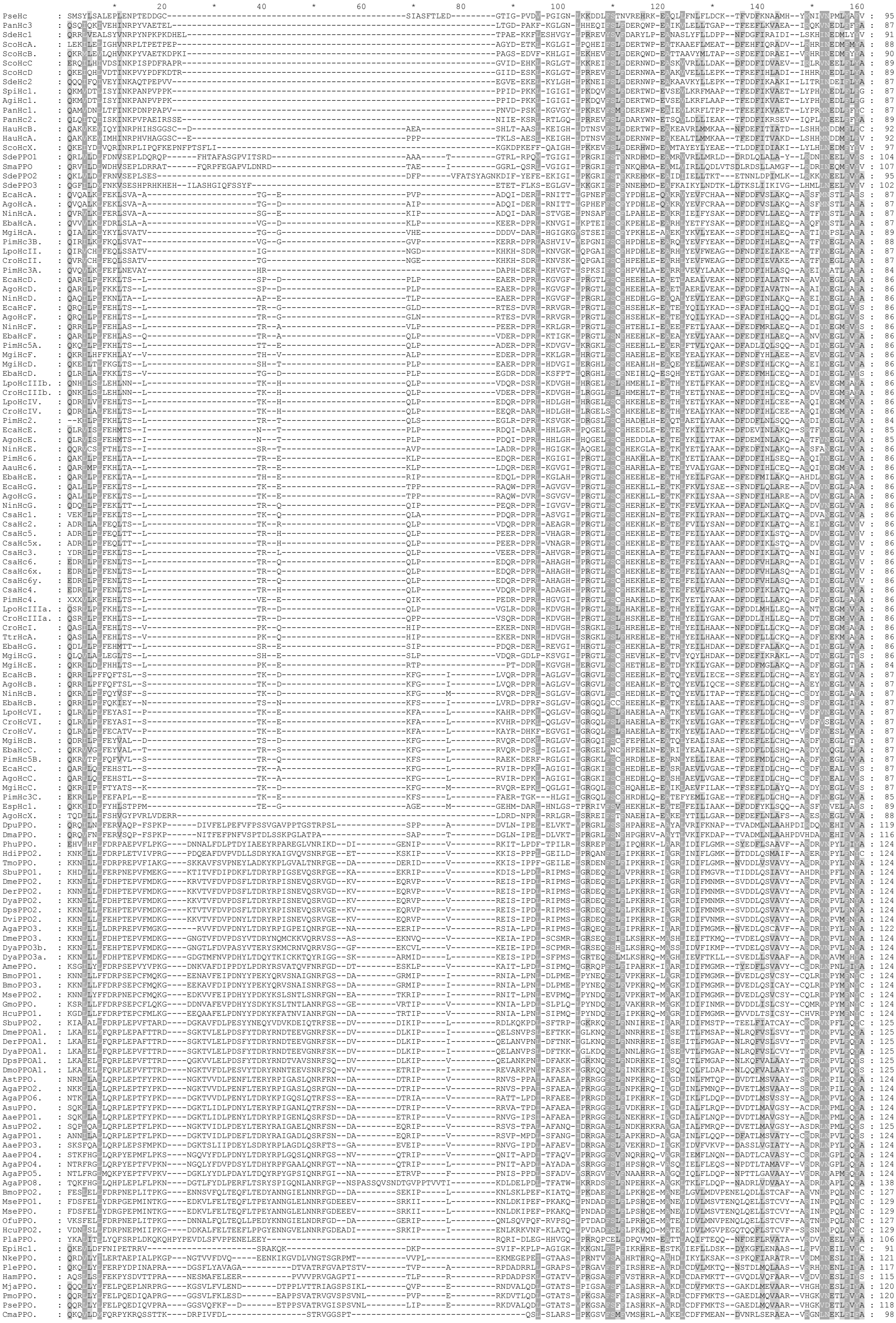
CsaHc6y	*Cupiennius salei*	Chelicaerata	Hämocyanin	AJ307911
CseHc1	*Cryptotermes secundus*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242644
CseHc2	*Cryptotermes secundus*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242645
DerPPO2	*Drosophila erecta*	Hexapoda	Prophenoloxidase	Genom-daten
DerPPOA1	*Drosophila erecta*	Hexapoda	Prophenoloxidase	Genom-daten
DmaPPO	*Daphnia magna*	Crustacea	Prophenoloxidase	FJ381649
DmePPO2	*Drosophila melanogaster*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AC006074
DmePPO3	*Drosophila melanogaster*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AC008352
DmePPOA1	*Drosophila melanogaster*	Hexapoda	Prophenoloxidase	D45835
DmoPPOA1	*Drosophila mojavensis*	Hexapoda	Prophenoloxidase	Genom-daten
DpsPPO2	*Drosophila pseudoobscura*	Hexapoda	Prophenoloxidase	Genom-daten
DpsPPOA1	*Drosophila pseudoobscura*	Hexapoda	Prophenoloxidase	Genom-daten
DpuPPO	*Daphnia pulex*	Crustacea	Prophenoloxidase	EST
DviPPO2	*Drosophila virilis*	Hexapoda	Prophenoloxidase	Genom-daten
DyaPPO2	*Drosophila yakuba*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AAEU0100 4028
DyaPPO3a	*Drosophila yakuba*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AAEU0100 0086
DyaPPO3b	*Drosophila yakuba*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AAEU0100 5851
DyaPPOA1	*Drosophila yakuba*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AAEU0100 4028
EbaHcA	*Euphrynichus bacillifer*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865913
EbaHcB	*Euphrynichus bacillifer*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865914
EbaHcC	*Euphrynichus bacillifer*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865915
EbaHcD	*Euphrynichus bacillifer*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865916
EbaHcE	*Euphrynichus bacillifer*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865917
EbaHcF	*Euphrynichus bacillifer*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865918
EbaHcG	*Euphrynichus bacillifer*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865919
EcaHcA	*Eurypelma californicum*	Chelicerata	Hämocyanin	X16893
EcaHcB	*Eurypelma californicum*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ290429
EcaHcC	*Eurypelma californicum*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ277489
EcaHcD	*Eurypelma californicum*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ290430
EcaHcE	*Eurypelma californicum*	Chelicerata	Hämocyanin	X16894
EcaHcF	*Eurypelma californicum*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ277491
EcaHcG	*Eurypelma californicum*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ277492
EpiHc1	*Epiperipatus sp*	Onynchophora	Hämocyanin	CAD12808
EpuHc1	*Eurydice pulchra*	Crustacea	Hämocyanin	GQ153951
EpuHc2	*Eurydice pulchra*	Crustacea	Hämocyanin	GQ153952

EspHc1	*Endeis spinosa*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865911
FchHc1	*Fenneropenaeus chinensis*	Crustacea	Hämocyanin	FJ594414
GmoPPO	*Galleria mellonella*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF336289
GpuHc1	*Gammarus pulex*	Crustacea	Hämocyanin	EST data
GroHc1	*Gammarus roeseli*	Crustacea	Hämocyanin	AJ937836
HamHcA	*Homarus americanus*	Crustacea	Hämocyanin	AJ272095
HamPPO	*Homarus americanus*	Crustacea	Prophenoloxidase	AY655139
HauHcA	*Hanseniella audax*	Myriapoda	Hämocyanin	HE574800
HauHcB	*Hanseniella audax*	Myriapoda	Hämocyanin	HE574801
HcuPPO1	*Hyphantria cunea*	Hexapoda	Prophenoloxidase	U86875
HcuPPO2	*Hyphantria cunea*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF020391
HdiPPO2	*Holotrichia diomphalia*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AB079665
HmeHc1	*Hierodula membranacea*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242642
HmeHc2	*Hierodula membranacea*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242643
LpoHcII	*Limulus polyphemus*	Chelicerata	Hämocyanin	AM260213
LpoHcIIIa	*Limulus polyphemus*	Chelicerata	Hämocyanin	AM260213
LpoHcIIIb	*Limulus polyphemus*	Chelicerata	Hämocyanin	to do
LpoHcIV	*Limulus polyphemus*	Chelicerata	Hämocyanin	AM260215
LpoHcVI	*Limulus polyphemus*	Chelicerata	Hämocyanin	AM260216
MgeHc1	*Machilis germanica*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242639
MgiHcA	*Mastigoproctus giganteus*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865920
MgiHcB	*Mastigoproctus giganteus*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865921
MgiHcC	*Mastigoproctus giganteus*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865922
MgiHcD	*Mastigoproctus giganteus*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865923
MgiHcE	*Mastigoproctus giganteus*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865924
MgiHcF	*Mastigoproctus giganteus*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865925
MgiHcG	*Mastigoproctus giganteus*	Chelicerata	Hämocyanin	FR865926
MjaHcL	*Marsupenaeus japonicus*	Crustacea	Hämocyanin	EF375711
MjaHcY	*Marsupenaeus japonicus*	Crustacea	Hämocyanin	EF375712
MjaPPO	*Marsupenaeus japonicus*	Crustacea	Prophenoloxidase	AB073223
MsePPO	*Manduca sexta*	Hexapoda	Prophenoloxidase	L42556
MsePPO1	*Manduca sexta*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF003253
MsePPO2	*Manduca sexta*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF003253
NinHcA	*Nephila inaurata madagascariensis*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ547807
NinHcB	*Nephila inaurata madagascariensis*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ547808
NinHcD	*Nephila inaurata madagascariensis*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ547809
NinHcE	*Nephila inaurata*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ547810

	madagascariensis			
NinHcF	*Nephila inaurata madagascariensis*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ547811
NinHcG	*Nephila inaurata madagascariensis*	Chelicerata	Hämocyanin	AJ547812
NkeHc	*Nebalia kensleyi*	Crustacea	Hämocyanin	GQ279108
NkePPO	*Nebalia kensleyi*	Crustacea	Prophenoloxidase	GQ279109
OfuPPO	*Ostrinia furnacalis*	Hexapoda	Prophenoloxidase	DQ333883
OscHc1	*Odontodactylus scyllarus*	Crustacea	Hämocyanin	FM999828
OscHc2	*Odontodactylus scyllarus*	Crustacea	Hämocyanin	FM999829
OscHc3	*Odontodactylus scyllarus*	Crustacea	Hämocyanin	FM999830
OscHc4	*Odontodactylus scyllarus*	Crustacea	Hämocyanin	FM999831
PamHc1	*Periplaneta americana*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242648
PamHc2	*Periplaneta americana*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242649
PanHc1	*Polydesmus angustus*	Myriapoda	Hämocyanin	HE574797
PanHc2	*Polydesmus angustus*	Myriapoda	Hämocyanin	HE574798
PanHc3	*Polydesmus angustus*	Myriapoda	Hämocyanin	EST
PciHc1	*Petrolisthes cinctipes*	Crustacea	Hämocyanin	EST
PciHc2	*Petrolisthes cinctipes*	Crustacea	Hämocyanin	EST
PciHc3	*Petrolisthes cinctipes*	Crustacea	Hämocyanin	EST
PelHc1	*Palinurus elephas*	Crustacea	Hämocyanin	AJ344361
PelHc2	*Palinurus elephas*	Crustacea	Hämocyanin	AJ344362
PelHc3	*Palinurus elephas*	Crustacea	Hämocyanin	AJ344363
PelHc4	*Palinurus elephas*	Crustacea	Hämocyanin	AJ516004
PgrHc1	*Perla grandis*	Hexapoda	Hämocyanin	DQ118369
PgrHc2	*Perla grandis*	Hexapoda	Hämocyanin	DQ118370
PhuPPO	*Pediculus humanus*	Hexapoda	Prophenoloxidase	XP_002429710
PimHc2	*Pandinus imperator*	Chelicerata	Hämocyanin	FN424080
PimHc3A	*Pandinus imperator*	Chelicerata	Hämocyanin	FN424079
PimHc3B	*Pandinus imperator*	Chelicerata	Hämocyanin	FN424082
PimHc3C	*Pandinus imperator*	Chelicerata	Hämocyanin	FN424081
PimHc4	*Pandinus imperator*	Chelicerata	Hämocyanin	FN424085
PimHc5A	*Pandinus imperator*	Chelicerata	Hämocyanin	FN424084
PimHc5B	*Pandinus imperator*	Chelicerata	Hämocyanin	FN424086
PimHc6	*Pandinus imperator*	Chelicerata	Hämocyanin	FN424083
PinHcA	*Panulirus interruptus*	Crustacea	Hämocyanin	P04254*
PinHcB	*Panulirus interruptus*	Crustacea	Hämocyanin	P10787*
PinHcC	*Panulirus interruptus*	Crustacea	Hämocyanin	S21221*
PlaPPO	*Polyxenus lagurus*	Myriapod	Prophenoloxidase	HE574802

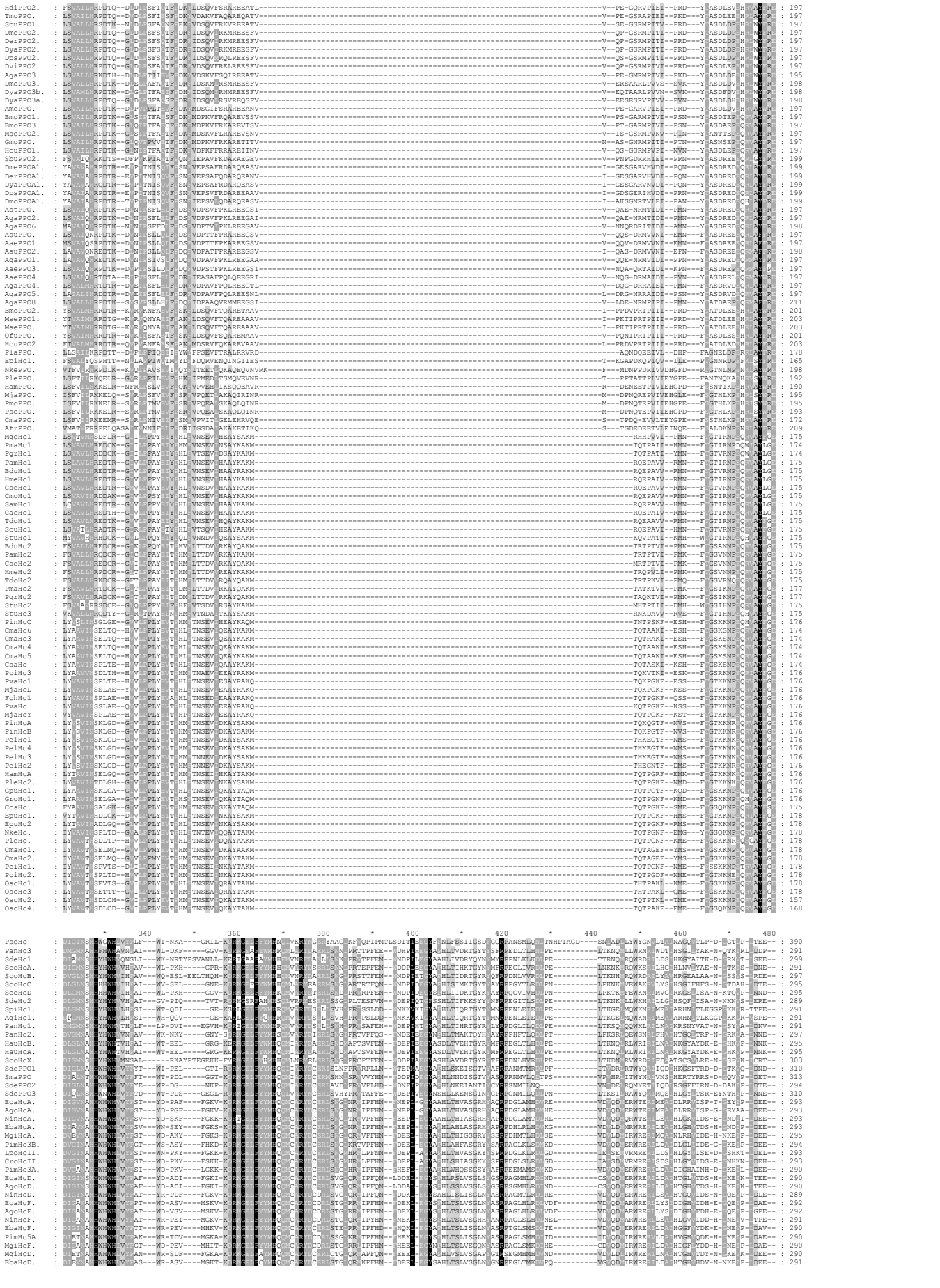
PleHc	*Pacifastacus leniusculus*	Crustacea	Hämocyanin	AF522504
PleHc2	*Pacifastacus leniusculus*	Crustacea	Hämocyanin	AY193781
PlePPO	*Pacifastacus leniusculus*	Crustacea	Prophenoloxidase	X83494
PmaHc1	*Perla marginata*	Hexapoda	Hämocyanin	AJ555403
PmaHc2	*Perla marginata*	Hexapoda	Hämocyanin	AJ555404
PmoPPO	*Penaeus monodon*	Crustacea	Prophenoloxidase	AF521948
PseHc	*Penaeus semisulcatus*	Crustacea	Hämocyanin	AF521949
PsePPO	*Penaeus semisulcatus*	Crustacea	Prophenoloxidase	AF521949
PvaHc	*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*	Crustacea	Hämocyanin	X82502
PvaHc1	*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*	Crustacea	Hämocyanin	AJ250830
SamHc1	*Schistocerca americana*	Hexapoda	Hämocyanin	AF038569
SbuPPO1	*Sarcophaga bullata*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF161260
SbuPPO2	*Sarcophaga bullata*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AF161261
ScoHcA	*Scutigera coleoptrata*	Myriapoda	Hämocyanin	AJ344359
ScoHcB	*Scutigera coleoptrata*	Myriapoda	Hämocyanin	AJ512793
ScoHcC	*Scutigera coleoptrata*	Myriapoda	Hämocyanin	AJ431379
ScoHcD	*Scutigera coleoptrata*	Myriapoda	Hämocyanin	AJ344360
ScoHcX	*Scutigera coleoptrata*	Myriapoda	Hämocyanin	AJ431378
ScuHc1	*Sinella curviseta*	Hexapoda	Hämocyanin	FM242638
SmaPPO	*Strigamia maritima*	Myriapoda	Prophenoloxidase	Genom-daten
SpiHc1	*Spirostreptus sp.*	Myriapoda	Hämocyanin	AJ297738
SdeHc1	*Scolopendra subspinipes*	Myriapoda	Hämocyanin	-
SdeHc2	*Scolopendra subspinipes*	Myriapoda	Hämocyanin	-
SdePPO1	*Scolopendra subspinipes*	Myriapoda	Prophenoloxidase	-
SdePPO2	*Scolopendra subspinipes*	Myriapoda	Prophenoloxidase	-
SdePPO3	*Scolopendra subspinipes*	Myriapoda	Prophenoloxidase	-
StuHc1	*Speleonectes tulumensis*	Crustacea	Hämocyanin	FM863709
StuHc2	*Speleonectes tulumensis*	Crustacea	Hämocyanin	FM863710
StuHc3	*Speleonectes tulumensis*	Crustacea	Hämocyanin	FM863711
TdoHc1	*Thermobia domestica*	Hexapoda	Hämocyanin	FM165288
TdoHc2	*Thermobia domestica*	Hexapoda	Hämocyanin	FM165289
TmoPPO	*Tenebrio molitor*	Hexapoda	Prophenoloxidase	AB020738
TtrHcA	*Tachypleus tridentatus*	Chelicerata	Hämocyanin	-

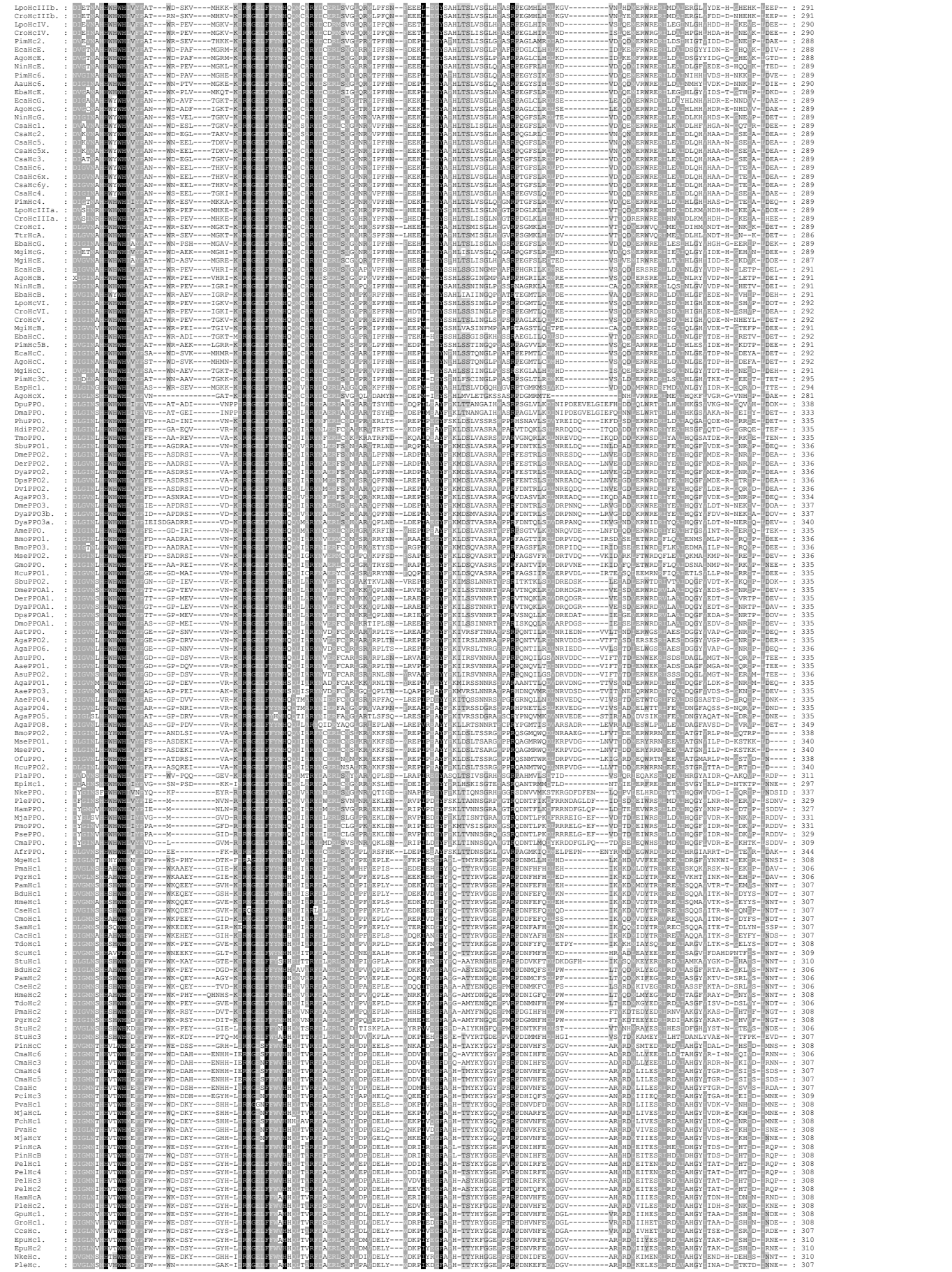
6.7.2.2. Multiples Sequenzalignment der für die phylogenetische Analyse verwendeten Sequenzen

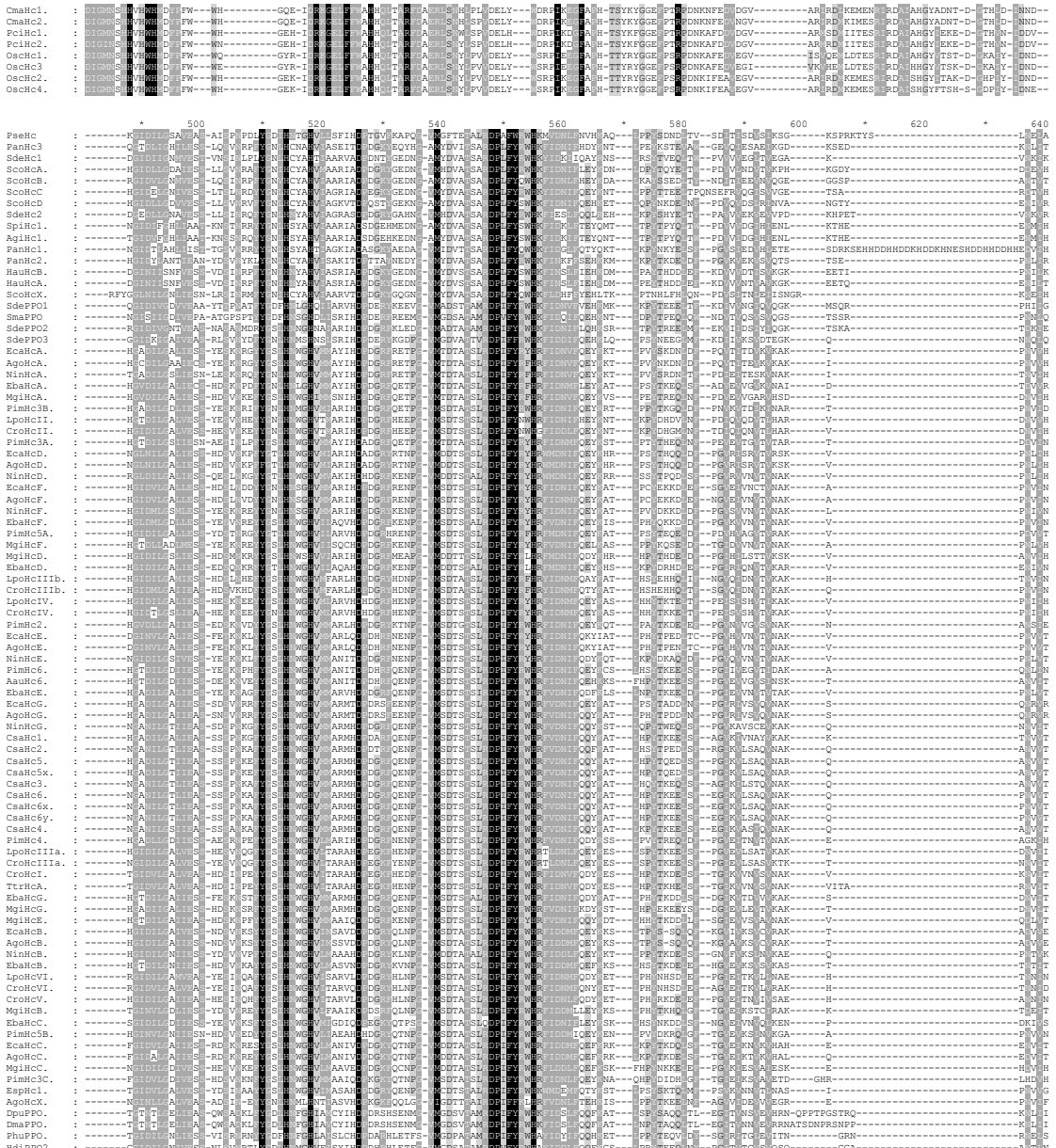


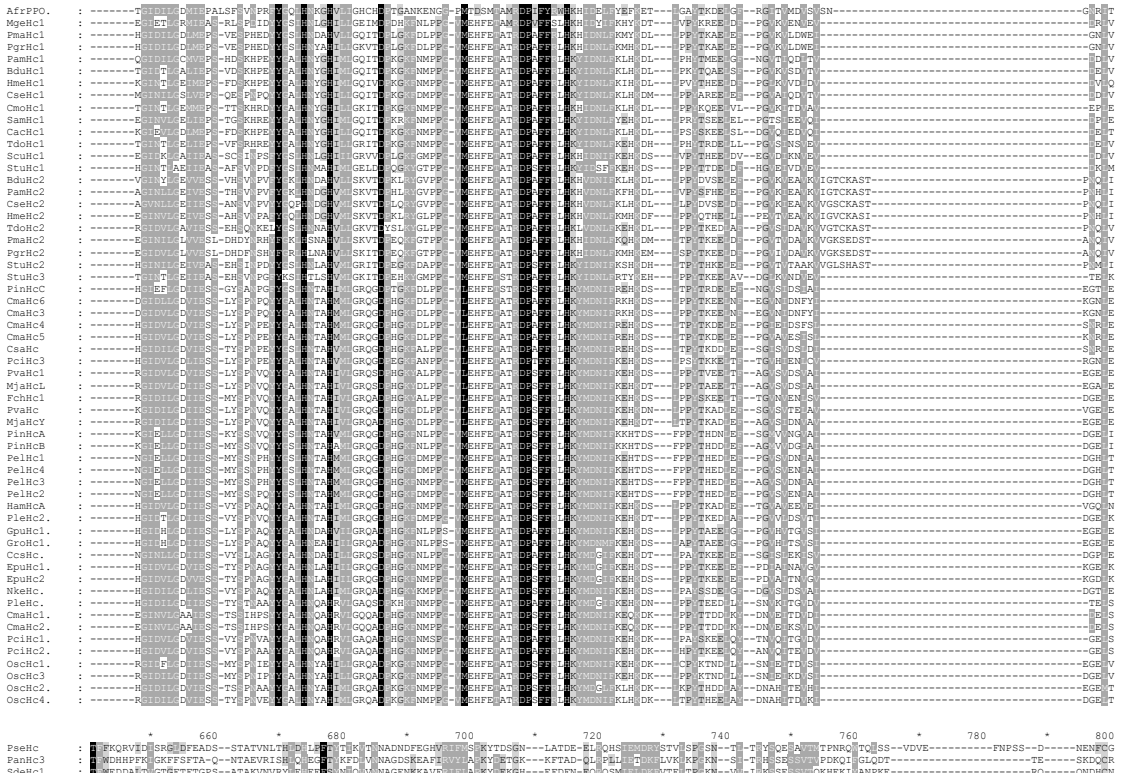
```
AfrPPO.    : QEKFLLETFSEPVFKPKKYK--NEEVYIDVPDKYLQGGFKDLKPILTGGIGLRDGRPG--------KVP-SPLSV---------RGVE-LPD--SPVLT-PRGRFSVYDVDKK-AGNAVKMMNTFK--NIDDLFSFAAL--VDRNEEMGVA : 132
MgeHc1     : QREILRFRAHEPN--ISEDQ--VDIAAKFDIEANLDKFKE-------------------------VDS----------VKEL-YELY-VKKQL-HRGEINTEDKHLE-QMILIETLLSAN--SWDTLYRTACW--ADRNEGQVA : 107
PmaHc1     : QRDIRCMKVHEHN--HYQEQ--VDLVKDYDP-SVAGKFKD-------------------------VTP----------IKRL-MKYY-NAKTL-PRGDILHKEHRE-EMILFESFLFAQ--DWDTFKTAVW--ADRNEGQVA : 106
PgrHc1     : QRDIRCMKVHQHN--HYEEQ--VDLVKDYDP-SVAGKFKD-------------------------VTP----------IKKL-MKYY-NAKTL-PRGDILHKEHRE-EMILFESFLFAQ--DWDTFKTAVW--ADRNEGQVA : 106
PamHc1     : QREILRLNKVHEPN--RFKEQ--AELGRSYDPTAHFSKYKN-----------------------AVP----------VKRM-VKEY-MAGHM-PRGAILNNKHRE-EMITFESFFFAE--DWDTFYRTACW--ADRNEGQIA : 107
BduHc1     : QNEILNKVHEPN--RFKEQ--SELGRSYDPTANDTSDKYKN-----------------------ASP----------VKSL-YKLY-TSGQI-PRGHILNDKHRE-QMITFESLFYAQ--DWDTFYRTACW--ADRNEGQVA : 107
HmeHc1     : QRQILRCNKVHEPN--RFKEQ--AELGKNYEPLKHLDKYKH-----------------------PRS----------VKTL-VKYY-NSGLT-PRGAILNDKHRE-QMITFESLFFAQ--DWDTFRTACW--CDRNEGQVA : 107
CseHc1     : QREILKLNKVHEPN--RFKDQ--ADLGRSYDPTQHLSKYKN-----------------------ALP----------VKTL-VKQY-TSGRL-PRGRILNDRQRE-QMITFESLFYAE--DWDTFYRTACY--VDRNEGQVA : 107
CmoHc1     : QREILKLNKPHEPN--RYKDQ--ADSGSKYEPSNNLNRYKN-----------------------PVP----------VKTL-VKRY-NSHSL-PRGQILDDKHRE-EMVLFESMFYAL--DWDTFYRTACW--ADRNEGQIA : 107
SamHc1     : QREILRFNKVHEPN--RYKEQ--VELGNAYEPLNSLPRYRN-----------------------PAP----------VKQL-VRLY-RAGSL-PRGAILDDTHRE-QMILFESLLYAN--DWETFIRTAAW--ADRNEGQVA : 107
CacHc1     : QYEILKLNKVHEPN--RIKEQ--IEIGNSFDLSTALTGFKN-----------------------PNA----------AKAL-LKGY-KAGSL-PRGSILNEKHRS-EMILFETFFYAN--DWDLLFKTACW--ADRNEGQVA : 107
TdoHc1     : QKEILQLNKVHEPN--RFKEQ--VNLGNSYDPLANLGNYKK-----------------------AAA----------VHQL-VKLY-NNGAL-PRGEILLRERDLE-EMIYFEALFYAN--DWNTFLSTACW--ADRNEGQVA : 107
ScuHc1     : QKEIVKLNKVHELN--FYQDQ--ATIGKDWDPLAHLDSYKN-----------------------VRV----------VKEL-VKEY-KNGKL-PRGEINLNEERR-EMILFETLFFAD--DWDTFHKTACW--ADRNEGQVA : 107
StuHc1     : QSKILKFNKVHEHN--RYNDQ--VDLTSYDPTAHFSKYKN-----------------------RDC----------VLKL-VRKY-KAHRL-PRGHVNLRPRDR-EMVMFEALFYAE--TWDTFKTACW--ADRNEGQLA : 107
BduHc2     : QISILKLQHLNQPL--VDSDL--TAYKESFSPLNNLNRYRD-----------------------AEV----------VKQY-VGLY-ESGKL-PRDGIILGLNPERHQ-QMIVFETLYGAS--DWDTFKTAVW--ADRTPRQLA : 107
PamHc2     : QLQILKLRHLNQPL--SDPEL--TAIKNSFSPLNHLNKFKE-----------------------PET----------VKLL-VGLY-TKGKV-PRDTVILHPRHRY-EMVTFETLYGAT--DYDTFRTAVY--ADRNEGQVA : 107
CseHc2     : QLQILNLRHLNQPL--IDPEL--LVFKNSFSPLNNLNKFKD-----------------------PTA----------VKNF-LKL-TEGKL-PRDAILDARQRA-QMVTFEVLYGAT--DYDTFLKAAAW--ADRTPRQLA : 107
HmeHc2     : QLHILKLRHISEPI--TDPEL--HAKKQSGDPANHLNKFND-----------------------PKA----------VRHF-VNL-RKGSL-PRDTVILDKHRE-QMVAFEVLYSAV--DYDTFFTAVW--ADRNPRQLS : 107
TdoHc2     : QMLILKLRHISEPL--EDPEL--VQIKDSYSPLNSLSVYKD-----------------------PQL----------VQKV-VRKL-ENGQM-PRDNIIVLDPVHRR-QMIDFEILYFAN--DYDTFFKTAVW--LDRNPRQLA : 107
PmaHc2     : QTQILHVENIYEPISSHYEDL--TTIKKTYDPLQHLDNFKD-----------------------GDH----------VKHF-VHD-THGKY-AHDEINIHPHRR-QMVYFEILYGAK--DFDSFFNMAVW--ADRSPRMLA : 109
PgrHc2     : QTQILHVENIYEPISSHYEDL--IYIKKTYDPLQHLDNFKD-----------------------GEQ----------VKHF-VHD-NEGKF-AHDEINIHPHRR-QMVYFEILYGAK--DFDTFFNMAVW--ADRSPRMLA : 109
StuHc2     : QRDILLLRLHQPN--AIPEQ--KSISESYDPLMHLSHFKK-----------------------PEL----------VQEL-VDE-THGTT-PRGEINLNTEHRT-SMIHFEVLFFAK--DFDTFKTAVY--ADRNEFLYA 107
StuHc3     : QKDILTLNHVFSHF--QDAAH--QEDGRTYEPLNHLTSYQD-----------------------PTP----------VKKL-VRMY-KMGDC-KQSEICLTDHHRH-EMILFEALYYAK--DWGTFMKMARW--AVHRNGALVS 107
PinHcC     : QHDINYLVYKLYGDI--RDDHL--KELGETFNPQGDLLLYHDN-----------------------GAS----------VNTL-MADF-KDGRL-QKKHWILNTRQRE-ELMHRVLMNCK--NWHAFVSNAAY--FTNNEGELLA 108
CmaHc6     : QHDINSALWKVYEDI--QDPHL--IQLSQNFDPLS--GHYDDD-----------------------GVA----------AKRL-MKE-NENRL-KQNHWILNTRQRE-ELMYDVLEHST--DWSTFAGNAAF--FVSNEGEVA : 106
CmaHc3     : QHDINSALWKVYEDI--RDTHL--KELSQSFDPLS--GQYDDN-----------------------GVA----------AKRL-MKE-NENRL-EQHHWILNTRQRE-ELMYDILEHST--DWDTFAGNAAF--FVRNEGEVA : 106
CmaHc4     : QHDINSLWKVYEDI--RDPHL--KELSQSFDPLS--GHYDDD-----------------------GVA----------AKRL-MKE-NENRL-EQNHWILNTRQRK-ELMYDVLEHST--DWSTFAGNAAF--FVRNEGEVA : 106
CmaHc5     : QHDINSALWKVYEDI--RDSNL--IQLSQNFDPLS--GHYDDD-----------------------GVA----------AKRL-MKE-NEGKF-AHDEINIHPHRR-QMVYFEILYGAK--DFDTFFNMAVW--ADRSPRMLA : 109
CsaHc      : QHDINSLWKVYEEI--RDPHL--KELSQSFDPLS--GHYDDD-----------------------GVA----------AKRL-MKE-NDHRL-EQKHWILNTRQRE-ELMYDVLEHST--DWETFAGNAAY--FVRNEGEVA : 106
PciHc3     : QHDINFLWKIYEVN--HDPHM--LELEDTFDPQGANAHYND-----------------------GHA----------AKIL-MDE-NSGRL-EQKHWILNTRQRT-ELMYDVLEHST--DWATFVGNAAY--FKRNEGECA : 108
PvaHc1     : QHDINFLHKIYGNI--RYSDL--KAKADSFDPAGRFGSYSDG-----------------------GEA----------VQKL-VRE-KDGKL-QQRHWILNPRQRH-ELMFDVSIHCK--DWNTFVSNAAY--FQRNEGEVA : 108
MjaHcL     : QHDINFLHKIYGDI--RDDAL--KAKADSFDPEADLSHYSDD-----------------------GEA----------VHTL-IRD-KDDRL-QQKHWILNSRQRH-ELMFDVLIHCK--DWDTFVSNAAY--FQRNEGEVNA 108
FchHc1     : QHDINFLHKIYGEI--RDPNL--KGKADSFDPEADLSHYSDS-----------------------GEA----------VHKL-IRD-KDHRL-EQNHWILSPRQRH-ELMFDVLIRCK--DWDTFVSNAAY--FQRNEGEVA 108
PvaHc      : QKDILYLNKIYGDI--QDGDL--LATANSFDPVGNLGSYSDG-----------------------GAA----------VQKL-VQD-NDGKL-EQKHWILNTRHRN-ELMFDVLIHCK--DWASFVGNAAY--FQRNEGEVA 108
MjaHcY     : QKDILYLVHKIYGDI--QDADL--KATANSFDPVADLGIYSDG-----------------------GAA----------AQRL-VKD-NDGKL-QQKHWILNTRHRH-ELMFDVLIHCK--DWASFVGNAAY--FQRNEGEVA 108
PinHcA     : QQDINHLDKIYEPT--KYPDL--KEDAENFNPLGDTSIYNVN-----------------------GAA----------VRTL-MKE-NDHRL-EQRHWILNTRQRE-ELMFAVLNQCK--EWYCFRSNAAY--FERNEGEVA 108
PinHcB     : QQDINHLDKIYEPT--KYPDL--KDIAENFNPLGDTSIYNDH-----------------------GAA----------AEAL-MKE-NDHRL-EQRHWILNTRQRE-ELMFAVLNQCK--EWYCFRSNAAY--FERNEGEVA 108
PelHc1     : QQDINHLDKIYEPI--KDEEL--HNIAQTFDPVADTSIYGDV-----------------------GAA----------AKTL-MQE-NDHRL-EQHHWILNTRQRE-ELMFTVLNQCK--DWNCFLNNAAF--FERNEGEVA 108
PelHc4     : QQDINHLDKIYEPI--KDEEL--HNIAQTFDPVADTSIYVDD-----------------------GAA----------AKTL-MQE-NDHRL-EQHHWILNTRQRE-ELMFTVLNQCK--DWNCFLNNAAF--FERNEGEVA 108
PelHc3     : QQDINHLDKIYEPI--KDEKL--HNTAQTFDPVADTSIYGDD-----------------------GAA----------AKTL-MQE-NDHRL-EQHHWILNTRQRE-ELMFTVLNQCK--DWNCFLNNAAF--FERNEGEVA 108
PelHc2     : QQDINHLDKIYEPI--KDEEL--HNIAQTFDPVADTSIYVDD-----------------------GAA----------AKTL-MQE-NDHRL-EQHHWILNTRQRE-ELMFTVLNQCK--WNNCFRNNAAF--FERNEGEVA 108
HamHcA     : QQDINHLDRIYDHL--HYSDL--KQISETFSPEADTSMYTDG-----------------------GTA----------AHHL-MEE-NDHRF-EQHHWILNPRQRE-ELMFDVLMHCK--SWECFVDNAAF--FERNEGEAA 108
PleHc2     : QCVINHLDYIYEHL--HTYDL--KGAGTFSPEADTSIYTDD-----------------------GAA----------AHVL-MEE-RDGRL-EQHHWILNTRQRE-ELMFDVLIHCK--SWACFRSNAAY--FERNEGEVA 108
GpuHc1     : QQAINHLYRVTEPL--RFDDL--KAAAASFNPVADKSIYTDG-----------------------GVA----------AQHL-VDE-ADHRV-EKHHWILNTRQRE-ELLFDVLIHSK--TWETALNNAAY--FEKNEGEVA 108
GroHc1     : QQAINHLYRVTEPL--RFDDL--KAAAASFNPVADKSIYTDG-----------------------GAA----------AQHL-VDE-ADHRL-EKHHWILNTRQRE-ELMFDVFMHCK--TWEAALNNAAY--FEQNEGEVA 108
CcsHc      : QHDINQLTRITEDL---TGDA--KALAESFDPIADTSIYKDD-----------------------GKA----------AKKL-VQE-KDERV-ERHHWILNTRQRE-ELMFDVFMNCK--TWKAAMGNAAY--FHSNEGEVA 107
EpuHc1     : QQDILRLFKVTEPIRARFEDL--KNSAKSFNPIADLTHYTDG-----------------------GEA----------VKRL-QQE-DDHRV-EHHHWILNNRHRE-ELMFDVFMHCK--DWATAIANAAY--FEKNEGEVVA 110
EpuHc2     : QQDILRLYKVTEHIRERFTDL--KDASKNFDPLADTSLHYTDG-----------------------GAS----------VKTL-MGE-DDHRV-EQHHWILNNRHRE-ELMFDALMHCN--DWHTAVSAAAY--FEKNEGEVVG 110
NkeHc      : QQAILKLFKPTEPIRDRFTDL--KSAAASFDPTADKSQYSDG-----------------------GAA----------AAHL-MEE-NDHRV-EQHHWILNTRQRE-ELMFDVLMSCN--SWDCFKNNAAF--FEKNEGEIA 110
PleHc      : QQAINRLYKVTSHIKSFTDL--KEAAETNNPDHTDKSSDG-----------------------GAA----------IKHL-MEE-DDHRL-EQHHWILLHST--DLEATNNNAAY--FEHNEGEVA 110
CmaHc1     : QQAINRLYKIYSPIPSFAKL--KEHATTFNPRDHISHCNDG-----------------------GNS----------VNHL-MDE-EAHRV-EQKHWILNERQRE-ELMVDVLLNCM--DFETFQGNAAY--FEHNEGEVA 110
CmaHc2     : QQAINRLYKIYSPIPSAFAKL--KEHATTFNPRDHISHCNDG-----------------------GNS----------VNHL-MDE-EANRV-EQKHWILNERQRE-ELMVDVLLNCM--DFETFQGNAAY--FEHNEGEVA 110
PciHc1     : QLGINRVNKITSPLSSSYAEL--KEAATNYDPTAHDDHFSDG-----------------------GAA----------AHNL-VEE-QDHHV-EQHHWILNTRQRE-ELMVDVLLHAT--DSDTFFHCAAY--FEKNEGEIA 110
PciHc2     : QQVINRLNRITSPIPSAYAEL--KNAAETYDPGHDDSHYTDG-----------------------GEA----------ARHL-VQE-NDHRV-EQHHWILNTRQRE-ELMVDVLLHAA--DFDTFEHSAAY--FERNEGEVA 110
OscHc1     : QQTINQLYKSTEPIRSKFSEL--KKISETWQPLDHKHHCSDG-----------------------GKA----------LERL-TRE-SDGHM-EKKHWILNARHRE-EIMVDVLLSCT--DFEYFKKHAAY--FEHNEGEVA 110
OscHc3     : QQAINQLYKSTEPIRSKFAEL--KEISKSWKPLDHKHHCTDG-----------------------GHA----------LERL-VKE-EDGNM-EKKHWILNTRQRE-EIMIEVLLSCT--DFEYFRNHAAY--FEHNEGEVA 110
OscHc2     : ---------------TEPIRSKFTDL--KEASKSFTP----------------------------GTA----------GAKL-DKEH-KDHRL-QQKHWILNPRQRE-ELMVDALLEST--DFDHFKNTAAY--FERNEGEIVA 89
OscHc4     : QQAINRLYKVTEPIRSKFTDL--KEASKSFTP----------------------------TGA----------GAKL-DKEH-KDHRL-QQKHWILNPRQRE-ELMVDALLEST--DFDHFKNTAAY--FERNEGEIVA 100

                     *       180       *       200       *       220       *       240       *       260       *       280       *       300       *       320
PseHc      : FSAFLNRRDTD--TFFVSLDEFTSHYNEKIHKSRRKLRKRRRKEMRKFVKRRRDYKKSRGRKEHFNARHGKKSHNDKSIDHEKKAKEGHHQGSKNQREHEGSSHHGKHRHKRQADVGSNQEPDQNDITQM--PLD---HGDNRNPHRVQTR : 248
PanHc3     : FTTVLRRPDTQ--GQVRIQDVFDKTFQEVAQIKEASHR----------------------------------------------------------G-----EKNPIVN--DTC---HYGNILNVNNRITQT : 157
SdeHc1     : VSVAATRDDTR--GIVRIHDVYDKLRSHIGQIKQKALG----------------------------------------------------------N-----EKDIVVD--DTK---QHVDYRDEYSRCTLN : 161
ScoHcA     : ENVAVLRRDTR--GQVRIHKVYDKLRQDIVEDVEKVNN----------------------------------------------------------G-----EEKIVDT--ATE---LNQVQLDRNYRRTLT : 158
ScoHcB     : FSVAARRDDTR--GNVRIHRIYDKLKHKVIVEVKNSINS----------------------------------------------------------G-----QEDPLID--ATH---EFTDLRDFNSRRTLL : 160
ScoHcC     : FSVAVMRGDTQ--GQVRIHDIFDKLKEDVIHRLLELSNR----------------------------------------------------------G--EHYDRIPIID--ATQ---IHNYLDFNSERRTLL : 162
ScoHcD     : LSVAIARPDCQ--GQVRVLDIYDKLRKEVIHKIKEVSNE----------------------------------------------------------G--AYLDKVPVID--ATE---VDNHLDFNQERRTLL : 162
SdeHc2     : LSVAILRPDTR--GQVRIQDFFDKIPNFLQQIREEAIR----------------------------------------------------------G-----DQNPIV---NLN---ISSNYLNVNSNNTN : 156
SpiHc1     : LSVAIVRPDAN--GHVRVHEVYDKLTNDVINIRKQIIK----------------------------------------------------------G-----HKNPVVK--DTH---YYHNDFDFRVDTI : 157
AgiHc1     : LSVAIVRPDAN--GHVRVHDVYDKLTNDVINIRKQIIK----------------------------------------------------------G-----HKNPVVK--DTH---YYHNDFDFRVDTI : 157
PanHc1     : FSVALNRPDAQ--GRVRQDVYDKLTPEMVDVSIKDKIMT----------------------------------------------------------G-----HKNPVVN--DTH---DFHNHYDEYRTTI : 157
PanHc2     : FSVAFRRQDTH--GHVRVHYLFDKLKTEVQKMKQLTYN----------------------------------------------------------A--ERYGKSAIVEGNDLS---HIHNYYDTHDESTI : 164
HauHcB     : FNVAIVRRDTS--GRPEFHFNSFDKIRHDQVEIRHAVEC----------------------------------------------------------G-----QDNIKVL--ANP---HVFNDTDDAHRLL : 162
HauHcA     : FNVAIVRRDTS--GRPEFHFKTFDKIRHDQVEMRHAVEC----------------------------------------------------------G-----KDNIKVL--ANP---HVFNDTDDAHRLL : 162
ScoHcX     : FSFAVLYRKDTR--NRRQVHDVYDKLKTDINKIKQANYQ----------------------------------------------------------G-----KQHPVID--ATK---EFHDLRNPVSYRHL : 167
SdePPO1    : ISVLSTSQPTLR--RTKRPVEVLLAKIPSSASQARTIQRR----------------------------------------------------------A--SQETQETIII--DVD---FGNDLDFHIAAR : 177
SmaPPO     : TSVLTRQPELR--NRRPIEVLMKVPGPLTDARNTERR----------------------------------------------------------M---PADATEPIVL--SLD---FGNDRDIHIAAR : 180
SdePPO2    : TSVFPQNPDLK---RRLIEVLQKCTGDVRKAVKENE----------------------------------------------------------A---KAMSMIPIII--DVE---YSTPLEPHAAAR : 165
SdePPO3    : TSYVPNHPDTK--THHPVQVFDKIHKETSKIKKQVIH----------------------------------------------------------N---GRDSKEIVI--PAD---FGDNLDFHIAAR : 175
EcaHcA     : AEVALLRRDCR--GIVPVQVFADRIPADSIIKATTLATT----------------------------------------------------------T---QPGDESDIIV--DVK---DGNILDFYKAAR : 160
AgoHcA     : AEVALLRRDCR--GIVPVQVFADRIPADTIRATTLATT----------------------------------------------------------T---QPGDESDIVV--DVK---DGNILDFYKAAR : 160
NinHcA     : AEVALLRADSR--GIVPIQIFADRVPADTIRAFSVATT----------------------------------------------------------K---PAGDESDVII--DVQ---EGNILDFYKAAR : 160
EbaHcA     : AEVALLRRDCK--GSVPIQVFAERIPAASIRATTEATT----------------------------------------------------------R---QPGDERDIVV--DVE---DGNILDFYPAAR : 160
MgiHcA     : TEVALLRRDCK--GSVNIQVFSDKIPAATIRAFIEASV----------------------------------------------------------K---TPGDESDVVV--DVK---EHGTILDFHIAAR : 162
PimHc3B    : CEVALLRSDCN--GSVPIQIFDRVPANTIEVLKKAST----------------------------------------------------------K---PAADESPIVV--DVE---SDGNILDFYNAAR : 161
LpoHcII    : AEVALLRRDCK--GAVPIQIFDSAAPNEATKEAHV----------------------------------------------------------R---PEFDESPILV--DVQ---DGNILDFYKAAR : 160
CroHcII    : CEVALLRRDCK--GHVPVQIFDKIPSIANEAFKKAHI----------------------------------------------------------R---PEFDESPILV--DVH---DGNILDFYKAAR : 160
PimHc3A    : TEVALLRRDCK--GSVPIQIFDKINAVTNKAYFDAYS----------------------------------------------------------R---TAADDRPLIE--EEI---HVGNVLDFYKAAR : 157
EcaHcD     : MSVAISRDDCN--GVVPIQVFDRVPAETNRALKVDKV----------------------------------------------------------S----DPNKDTVV--PIQ---KGNIRDFYNAAR : 157
AgoHcD     : LSVAINRDDCN--GVVPIQVFDRVPAETNRALKVDKL----------------------------------------------------------S----DPNKDTVV--PIQ---KGNIRDFYNAAR : 157
NinHcD     : LSVHVLRRDCR--GIVPIQIFDKIPAETNRALKADK----------------------------------------------------------S----TDESKVI--EIQ---KGNIIDFYNAAR : 156
EcaHcF     : VSVAILRRDCR--GTVPIQIFDRVPAETNQAVKADLK----------------------------------------------------------R--Q--SSDEDVLV--EIQ---EGNILDFYKAAR : 158
AgoHcF     : ASVAILRRDCR--GTVPIQIFDRVPAETNQAVKADLK----------------------------------------------------------R--Q--SPDEDVVI--EIQ---EGNILDFYKAAR : 158
NinHcF     : TSVAILRRDCR--GTVPIQIFDRIPSETNQAIKADLR----------------------------------------------------------R----ADDSPVIV--DVI---QGNILDFYKAAR : 157
EbaHcF     : VSIAVLRRDCR--GTVPIQVFDRIPAETNQAQKADLK----------------------------------------------------------R----TSDDSIVI--KIE---QGNILDSYKAAR : 157
PimHc5A    : VSVAVLRRDCK--GTVPIQIFDRIPAETNQALKSDRQ----------------------------------------------------------R----ESNDPVVV--KIQ---EGNILDFYNAAR : 157
MgiHcF     : MTVAILRSDCD--GIVPIQIFDRIPAESNRALKADIN----------------------------------------------------------R----TSQEPVVV--EIQ---EGNIFDFYHAAR : 157
MgiHcD     : VSVAVLRDDCH--GRVPIQIFDRIPAETNRALKADLQ----------------------------------------------------------R----GDQDVVSV--EIE---HGNIIDFIKAAR : 157
EbaHcD     : VSVAVLRRDCK--GTVPIQIFDRIPAETNLALKADKR----------------------------------------------------------R----DDAAGGIVI--PIQ---HGNILDKYHAAR : 158
LpoHcIIIb  : VSVAVLRRDCK--GAVPIQIFDRIPAETEAIKADHN----------------------------------------------------------R----QDHEALTV--VAH---DGNILNFQHAAR : 157
CroHcIIIb  : ISVAVLRRDCK--GAVPIQIFDRIPAETTQAMKDDHN----------------------------------------------------------R----HDHEVLTV--EAR---DGNILNFQHAAR : 157
LpoHcIV    : ASVAVLRRDCK--GAVPIQIFDRIPAETTQAMKDDHH----------------------------------------------------------R----KEHEDLVV--DIE---EGNILNFQSAAR : 157
CroHcIV    : VSVAILRRDCK--GAVPIQIFDRIPAETTQAMKDDHH----------------------------------------------------------R----KEHEALVV--DME---EGNILNFQSAAR : 157
PimHc2     : VSVAILRRDTR--GHVPIQIFDRITTETNVALKADSR----------------------------------------------------------R----TGEEPIKI--PIK---EGNILDRYNAAR : 155
EcaHcE     : VSVAILRRDCK--GVVAIQIFDRVPTETNLAVKEAAN----------------------------------------------------------H-----PDQDISV--HVV---EGNILDEYKAAR : 155
AgoHcE     : VSVAILRRDCK--GVVAIQIFDRVPTETNLAVKEAAN----------------------------------------------------------H-----PDQDVSV--HVV---EGNILDEYKAAR : 155
NinHcE     : ASVAILRRDCR--GTVPIQIFDRVPSETSLALKEVTN----------------------------------------------------------H-----PDKDIEV--EIE---SGNILDFYKAAR : 156
PimHc6     : VSVAVLRRDCV--GSVPIQIFDRVPTETNLAVKEAAN----------------------------------------------------------H-----PDKDSVV--PVE---SGNILDFYKAAR : 156
AauHc6     : VSVAVLRRDCK--GTVPIQVFDRVPAETNRANKEASN----------------------------------------------------------H-----PDQQSIVV--EAE---EGNILDFYKSAR : 157
EbaHcE     : ISVAILRRDCH--GVVPIEIFDRVSAETNHAVKEAAN----------------------------------------------------------H-----PDKDIVV--KSE---EGNILDFYKAAR : 156
EcaHcG     : FSVAVIRRDCK--GTVPIQVFDRVPSETNLAMKEAKN----------------------------------------------------------D-----PNSDIVV--DVQ---EGNILDFYKAAR : 156
AgoHcG     : LSVAVVRRDCR--GTVPIQVFDRIPAETNLASKEARN----------------------------------------------------------D-----PNSDIVV--DVQ---EGNILDFYKAFR : 156
NinHcG     : LSVAVVRRDCR--GTVPIQVFDRIPAETNLASKEARN----------------------------------------------------------N-----PTEDVVV--EIE---DGNILEFYKAAR : 156
CsaHc1     : LSVAVARRDCR--GTVPIQVFDRIPSETNLAMKEAKN----------------------------------------------------------K-----TYDDVVV--EIE---DGNIDFYKAAR : 156
CsaHc2     : LSSAVVRRDCR--GSVPIQVFARIPAETTGAMKEAKN----------------------------------------------------------K-----PGDDIVV--EIE---DGNIMEFYKAAR : 156
CsaHc5     : FSVAVVRRDCR--GTVPIQVFDRIPAETNLATKEAKN----------------------------------------------------------H-----SNDDVVV--PSQ---TGNILDFYKAAG : 156
CsaHc5x    : FSVAVVRRDCR--GTVPIQVFDRIPAETNLATKEAKN----------------------------------------------------------H-----PNDDVVV--PSQ---TGNILDFYKAAR : 156
CsaHc3     : LSVAVVRRDCR--GTVPIQVFDRVPAETNLAIKESKN----------------------------------------------------------H-----PDIDIEV--EIQ---QGNIMEFYKAAR : 156
CsaHc6     : LSVAVARRDLK--GTVPIQVFDRVPAETNLAIKESKN----------------------------------------------------------H-----PDQDIEV--EIQ---QGNIMEFYKAAR : 156
CsaHc6x    : LSVAVARRDLK--GTVPIQVFDRVPAETNLAIKESKN----------------------------------------------------------H-----PDQDIEV--EIQ---QGNIMEFYKAAR : 156
CsaHc6y    : LSVAVARRDLK--GTVPIQVFDRVPAETNLAIKESKN----------------------------------------------------------H-----PDQDIEV--EIQ---QGNIMEFYKAAR : 156
CsaHc4     : FSVAVVRRDCK--GSVPIQIFDRIPAETNLAIKESKN----------------------------------------------------------H-----PGLDVVV--EIE---KGNIMEFYKAAR : 156
PimHc4     : VSVAILRRDCK--GTVPIQVFDRIPCETNDAIKEVAN----------------------------------------------------------H-----PDKDNVV--SVQ---EGNILDFYKAAR : 156
LpoHcIIIa  : ATVAVLRRDCR--GTVPIEVFDRIPVETRHADKEAAA----------------------------------------------------------H-----PDKDIVV--EFE---EGNILDFYKAAR : 156
CroHcIIIa  : ATVAVLRRDCR--GTVPIEVFDRIPAETRHADKEVTA----------------------------------------------------------H-----PDKDIVV--EFE---EGNILDFYKAAR : 156
CroHcI     : VSVAILRRDCR--GIVPVEVFDRIPVETREAQKEVEL----------------------------------------------------------H-----PGKDIVV--EVE---NGNILDFYKCAR : 156
TtrHcA     : VSVAILRRDCR--GIVPVEVFDRIPVETREAQKEVEL----------------------------------------------------------H-----PGKDI-V--EVE---NGNILDFYKCAR : 155
EbaHcG     : VSVAVLRRDCK--GTVPIQIFDRIPAETNLASKEATL----------------------------------------------------------K-----PNEDVVV--DVE---EGNILDFHTAAR : 156
MgiHcG     : LSVAILRRDCK--GHVPIQIFDRIPAETNLARKEVTR----------------------------------------------------------N-----PKEDIVV--PVE---KGNILDFYKAAR : 156
MgiHcE     : ATVAIFRRDCR--GKVPIQIFDRVSAETVHAIKEAIN----------------------------------------------------------Q-----PQQDIVV--ERE---EGNILDFHSAAR : 154
EcaHcB     : VSVAILRRDCR--GSVPVQVFDKVPSETFKAFKEVRL----------------------------------------------------------H--P--DDEEIIV--DIE---KGNVKDFYNAAR : 158
AgoHcB     : VSVAILRRDCR--GSVPVQVFDKVPSETFTAFKEVRL----------------------------------------------------------H--P--EDEEIIV--DME---KGNIKDFYNAAR : 158
NinHcB     : VSVAILRKDCR--GNVPVQVFDKVPVETYEAYKETKL----------------------------------------------------------H--K--EDEDVII--NIQ---KGNIMDFYNAAR : 158
EbaHcB     : VSVAVLRSDCH--GTVPIEVFDRVPVEAFKTFHESTL----------------------------------------------------------A--P--PEQDVEV--HIE---DGNVLDFYHAAR : 158
LpoHcVI    : VSVAILRPDCK--GSVPIQIFDKVTVQTYDAFKEFWQ----------------------------------------------------------N--P-HKEEDVIV--DMQ---TGNILDFYNAAR : 159
CroHcVI    : VSVAILRPDCK--GSVPIQIFDKMPVQTYDAYKEAWL----------------------------------------------------------N--P-NKEEDIIV--DMQ---SGNILDFYNAAR : 159
CroHcV     : LSVAILRPDCK--GSVPIQIFDKVPTNLAYDTRAFT----------------------------------------------------------N--P-DKEEKMIV--DMQ---LGNIDDFYNAAR : 159
MgiHcB     : VSVAILRPDCK--GSVPLQVFDKIPGETNKAYYESTK----------------------------------------------------------I--P--EDEDVIH--DMQ---EGNILDFYKAAR : 158
EbaHcC     : VSVAILRRDCR--GSVPIQVFDNKIPAETSKALVDAEQ----------------------------------------------------------H--P-DTEVDIIT--DME---FVGNILDFYLSAR : 159
PimHc5B    : VSVAILRADCR--HTVPIQVFEKIPAETFKAFKEAKL----------------------------------------------------------H--E--DEEEVVV--EVE---QGNVLDFYNAAR : 158
EcaHcC     : LSVAILRPDCH--GSVPIQIFDKVPVETYKAFKEATR----------------------------------------------------------H---A-DKTDDIIV--DME---AGTIMDFYNAAR : 159
AgoHcC     : LSVAILRPDCH--GTVPIQIFDKVPVETYKAFKEATR----------------------------------------------------------H---M-DKNDDIIV--DME---AGTIMDFYNAAR : 159
MgiHcC     : LSVAVLRRDCR--GSVPIQVFDKVPVETYNAYKQATI----------------------------------------------------------T--T-DPEKEIIV--ESE---TGNVLDFYNAAR : 158
PimHc3C    : VSVAILRRDCR--GTVPIQIFDKVPVETNSAHSKVYDVH----------------------------------------------------------A---E-KGKDDIIV--DWVMPFHGEVDFSTAAR : 162
EspHc1     : LSVAILRRDCK--GQVSIQIFDKVPFETYNAFRVAQG----------------------------------------------------------G---G-GGKDGIIV--KIA---HGNILDFYKAAR : 161
AgoHcX     : VSWSVNCSLCQ--GLVPIHIFDKVPSVTNRAIKQYLD----------------------------------------------------------R----TTDNPIIV--TAD---PGTPLDFQSITR : 159
DpuPPO     : LSAAVLQRQDSR--SRTPIWIFGKFETRVRSEAQTTVQQ----------------------------------------------------QLNKQFSVTKPIII--DKN---FAATDRVVNKSSR : 195
DmaPPO     : LSAAVLQRKDAR--SRRPIYIFGKFETKVRSEAQINVQQ----------------------------------------------------K--KEPATQEPIII--DKN---FAATNRVVNKSSR : 190
PhuPPO     : LSVAIIRSDTK--NQQPLYNFEKMDDGIFKRAREITSV----------------------------------------------------------L--DP-SERTPIEI--PRD---YASDIDPHVAAR : 197
```









```
HdiPPO2.   : TWQSDVDVSRGVDFQP-R--GSVFARFTHNVQPANTTNASGGNKRGTGTIFIGKTERRT---AWLFK-DQLLHIELDKTVVNRQEN--T-T-NTETSSVTIPFERTRNDL--SRPV----------GGEAL--A-----QFNFCG : 577
TmoPPO.    : TWQSDVDVSRGVDFQP-R--GSVFRFTHNVQPGTKTTKASNGNRKGTGTIFIGKTERGN---PWLYR-DQNMFVELDKTVVNRQ-QN--N-T-ASQSSVTIPFERTRNDL--NRPQ----------GGEEL--A-----QFNFCG : 577
SbuPPO1.   : TWQSDVDVSRGVDFVP-R--GNFARFTHQTPGTTTNNSSGAQRFGTVTIFIGKTERGQ---PMLLS-DQILMIELDKTVVANPQN--T-R-RTDSSVTIPFERTRNDA--NRPA----------AGSAEE--L-----EFNFCG : 579
DmePPO2.   : TWQSDVDVSRGFDFLP-R--GNFARFTHQLPGTTSSNDSGAQRFGYVTIFIAKNERGQ---PMLMR-DQSMMIELDKTVTSNPN--T-R-RTESSVTIPFERTRNDA--NRPA----------AGTPEE--L-----EFNFCG : 579
DerPPO2.   : TWQSDVDVSRGFDFLP-R--GNFARFTHQLPGTTSSNDSGAQRFGYVTIFIAKNERGQ---PMLMR-EQSMMIELDKTVTANPN--T-R-RTESSVTIPFERTRNDA--NRPA----------AGTPEE--L-----EFNFCG : 579
DyaPPO2.   : TWQSDVDVSRGFDFLP-R--GNFARFTHQLPGTTSSNDSGAQRFGYVTIFIAKNERGQ---PMLIR-DQSMMIELDKTVTANPQ--T-R-RTESSVTIPFERTRNDA--NRPA----------AGTPEE--L-----EFNFCG : 579
DpsPPO2.   : TWQSDVDVSRGFDFLP-R--GNFARFSHQLPGTTSSNDGSAQRFGYVTIFIAKNERGQ---PMLLR-EQLMMVELDKTVVSNPN--T-R-RTESSVTIPFERTRNDA--NRPT----------AGSPEE--L-----EFNFCG : 579
DviPPO2.   : TWQSDMDVSRGFDFTP-R--GNFARFTHLPGTTTNNDGSAQRFGYVTIFIAKNERGQ---PMLMR-EQLMMVELDKTVVSNPN--T-R-RTESSVTIPFERTRNET--NRPA----------AGSAEE--L-----EFNFCG : 579
AgaPPO3.   : TWQSDVDVSRGVDFVP-R--GNFARFTHQSPGVTTMEKDSDAQRMAFVVTIFIAKNERGT---PMVFR-DQLFMIELDKTLVARPR-AN--R-R-RKESTVTIPFERTRNDQ--NRPE----------ADTPQE--A-----EFNFCG : 577
DmePPO3.   : TWQESDVDVSRGVDFVP-R--GHLARFTHQHPGSTTKESSEATRYGYVTIFIAKLDRNA---PMLLE-QQLMMVELDKTVVTPFSH--T-T-NTETSSVTIPFERTRNDK----------LEE--L-----QNFLCG : 572
DyaPPO3b.  : TWQESDVDVSRGVDFVP-R--GHLARFTHQHPGSTTKESSEATQYGYVTIFIAKMDRNN---PMPLE-EQLMMVEMDKTVVTPFSQ--T-T-NTETSSVTIPFERTRNDQ----------LEE--L-----ENFMCG : 572
DyaPPO3a.  : TWQESDVDVSRGVDFLP-R--GSVARFTHQNPGTTSSNVSTGATKFGYVTIFMAKLDRNA---PMFMA-DQRMMIELDKTGISPFQH--RF-VQSSTESVTIPFKRTRNDN--NRGA----------ANSPEE--L-----ENFFCG : 582
AmePPO.    : TWTKSVDVSRGVDFTP-R--GALARFTHQAPGTTTNNNTSMKGTVTIFIGKEERGL---PTTFR-EQLMMIELDKTPITQFGN--T-P-KNETSSVTIPFERTRNDE--NRPI----------GGDSL--E-----RFDFCG : 576
BmoPPO1.   : TWEQSTVDVARGVDFLP-R--GSLARFTHQDPGVTTVEKTTGGNLMGTVTIFMAKVDNGQ---PMSFN-KQRLMMIELDKSQARPTN--T-R-RKETSSVTIPFERTRNDA--RPAD----------PGTAGA--A-----EFDFCG : 578
BmoPPO3.   : TWEQSTVDVARGVDFSP-R--GSLARFTHQEDVSVEANTGRSSVMGMFTIFIAKTLENKR---PLNFD-EQRLMIELDKSQGKPNN--T-R-RVDSSVTIPFERTSNQAD--RPGN----------PGSPES--A-----EFDFCG : 578
MsePPO2.   : TWQSTVEVSRGVDFTP-R--GSLARFTHQDPGVTTVEANTTGGNLMGTVTIFMAKVDNGQ---PMSFN-KQRLMMIELDKSQARPTN--T-R-RVDSSVTIPFERTRNQSE--RPGD----------PGTAGA--A-----EFDFCG : 577
GmoPPO.    : TWQQSLVESQGVDFTP-R--GSLAKFTHQEDGTVTEANTSGQSKMGTFVFMAKTERGQ---PLAFE-DQRLMIELDKTRGKPE-NN--T-R-RQRSLDSSVTIPFERTRNQAN--RPGD----------PGSATA--A-----EFDFCG : 577
HcuPPO1.   : TWEESTVEGRGVDFTP-R--GSLAKFTDQEDGNVTEANTSGGGVMATVVFNVNQ-ETGQ---PLSFD-ELKSMIELDKTTTTNANN--T-RQRIDSSVTIPFERTADQST--RPGD----------PGSPET--A-----QFDFCG : 577
SbuPPO2.   : TWMEKSDVNAAGVDFGP-K--GNYATFTHQAPGEVDDTNDKKPKKGTGTIFIGKNERGT---PLSLN-DQQLAIEMDKTVNMPFN--N-RQSKKSSAIPYERTRPGP--DYQP----------VEAERL--A-----EFRFCG : 580
DmePPOA1.  : TWQKSSADAAGVDFGP-TTDRNFASFTHQNAPGTTFNTNN-GARRTGTGTIFIGKVERNQ---ALNLE-EQLLAMIEMDKTVDVPE-N--T-R-RQCTESSAIPFERSRPGA--DYQP----------KAADEL--A-----RFKFCG : 582
DerPPOA1.  : TWQKSSADAAGVDFGP-SADGNFASFTHQNAPGTTFNTNN-GARRTGTGTIFIGKVERNQ---PLSLE-EQLMAIEMDKTVDVPE-N--T-R-RQCTESSAIPFERSRPGA--DYQP----------KAADEL--A-----RFKFCG : 582
DyaPPOA1.  : TWQKSSADAAGVDFGP-SADGNFASFTHQNAPGTTFNTNA-GARRTGTGTIFIGKVERNQ---PLSLE-EQLMAIEMDKTVDVPE-N--T-R-RQCTESSAIPFERSRPGA--DYQP----------KAADEL--A-----RFKFCG : 582
DpsPPOA1.  : TWQKSSADAAGVDFGP-SADGNFASFTHQNAPGTTFNTNN-GARRTGTGTIFIGKVERNQ---PLRLE-DQLMAIEMDKTVELPEN--T-R-RQCTESSAIPFERSRPGA--AYQP----------KAADEL--A-----RFRFCG : 582
DmoPPOA1.  : TWQRSSANAAGVDFGP-VEDENTATFRHQNAPVTTFNTNS-GPRRSGTGTIFIGKTERNQ---PLRLE-EQLLAIEMDKTVEMPEN--T-R-RETDSSAIPFERSRPRA--SYQP----------TAADDL--T-----RFRFCG : 582
AstPPO.    : TWQRSQIDATGVDFGP-Q--GNFASFTHQAPGTTRNTSGAARRGTGTIFIGKTERNT---PLTMD-EQLLMIELDKTRVNTPTN--M-V-RFEQSSVTIPYERTRSAL--SNV----------NLPETT--E-----QFRFCN : 578
AgaPPO2.   : TWQRSQVDATGVDFGP-E--GNFASFTHQAPGTRRTMSGRTRRGTGTIFIGKVERNT---PGLTMD-EQLLMIELDKTVNNPTN--M-V-RFEQSSVTIPYERTRPQ-AL--SNI----------NEPST--E-----QFRFCN : 578
AgaPPO6.   : TWQRSQIDATGVDFGP-Q--GNFASFTHQAPGTRFANTTGAARRGTGTIFIGKTERNI---PLTMD-EQLLMIELDKTRVNTPTN--M-V-RFEQSSVTIPYERTRPAL--SNI----------QFRFCN : 579
AsuPPO.    : TWQRSQIDATGVDFGP-Q--GNFAFTHQAPGTTHQNTSGARRGTGTIFIGKTERNI---PLTMD-EQLLMIELDKTRVNTPTN--M-V-RFEQSSVTIPYERTRPQ-S----------NQPGT--E-----RFRFCN : 575
AaePPO1.   : TWQRSQIDATGVDFGP-Q--GNFASFTHQAPGTRTNTGARRRGTGTIFIGKTERNI---PLTVQ-EQILMIELDKTVTNPTN--S-V-RFEQSSVTIPYERTRSAAP--S----------NQSGT--E-----VYRFCN : 575
AsuPPO2.   : TWQRSQIDAAGVDFGP-Q--GNFAATHQAPGTRTNTSGAVRRGTGTIFIGKTERGI---GLTHQEEQLMFIELDKTNVTNPEN--S-V-RDQSSVTIPYEVTRSLAV--A----------SQPVL--V-----VYRFCG : 577
AgaPPO1.   : TWQRSQVDAAGVDFGP-K--GNFASFTHQAPGSRENSGAVRKGTLIWLAKSERGT---ALTFR-EQRYFIEMDSTSTVTNPMN--T-V-RDQSSVTIPYERTRAGT--KSAP----------TDKDAL--A-----QFRFCG : 580
AaePPO3.   : TWQRSQVDAGVDFGP-Q--GNFATFHQAPGTTRETKSSGSLKRGTAVLFAKVERNT---SLQFR-EQRYFIEDLDKTGVNKPL-N--T-T-RDQSSVTIPYERSRRGT--SELT----------DARQL--A-----EFRFCG : 579
AaePPO4.   : TWQRSQVDGAGVDFGP-E--GNFATFHQAPGTTRETKSRTPKRGTVWLNGRTGEKGN---NIPFG-DQRWMIELDKTVNNPEN--M-V-RFEQSSVTIPYERTRNAM--S----------NQPES--D-----QFRFCN : 577
AgaPPO4.   : TWQRSQVNGTGVDFGP-E--GNFATFHQAPGTTRNRAGDTRRGTVWLEGKTERGQ---TLPFR-EQRLMVELDKTTVTNAN--T-V-RDQSSVSIPYERTRNAA--S----------SLTQN--E-----AFQFCN : 576
AgaPPO5.   : TWQRSQFDGTGVDFVP-E--GNFVTFTHQAPGTRQATNGGSMRRGTVWLFGKVERGQ---VLPFR-DQRLMVELDKTVNRPQ-SN--S-V-RDQSNLTSIPYERTRNAA--S----------SQPGM--E-----VFQFCN : 576
AgaPPO8.   : TWQRSQVDRAGVDFA-A--GSANVSFTHQCAPGTVRPNSTARSRNQGTVWLLSKPDRLLA IELDSPVNRPAT--V-N-RSNSSVTIPYERTRNG--AGN----------AGNPAA--A-----QSRFCN : 589
BmoPPO2.   : TWMLSDVNSRGVDFSD-N--GPVARFTHNYRPGSSNRRTTVTIFIKFERNV---PWIFS-DQKMCIEMDRTVTVNAEN--M-V-QCTESSITIPEQTRDSA--QGND----------PRRDEL--A-----TFNYCG : 580
MsePPO1.   : TWMQSDVNSRGVDFSD-R--GPVARFTHNRPGRVKANTASARRTTVTIFIAKTERNL---PWALS-DQKMFIEMDRTVVPSAEN--T-V-QCTESSITIPEQTRDSI--QGSD----------PRRSEL--A-----AFNYCG : 583
MsePPO.    : TWMQSDVNSRGVDFSD-R--GPVARFTHNRPGRVKANTASARRTTVTIFIAKTERNL---PWALS-DQKMFIEMDRTVVPSAEN--T-T-QCTESSITIPEQTRDSI--QGSD----------PRRSEL--A-----AFNYCG : 583
OfuPPO.    : TWMSSDVDSRGVDFSN-R--GPVARFTHNRPGQVKNNTGNARRTTVTIFISKVERNQ---PWILS-DQKMFIEMDRTVTPNAQN--R-V-QCTEPSFPEQTRDSV--QGED----------PRQVDL--A-----AFNFCG : 580
HcuPPO2.   : TWMSSDVDSRGVDFSE-R--RPVARFTHNTPGRVKNNTGSARRTTVTIFIAKFERNL---TWALA-DQKMFVEMDHTVTPNAEN--T-T-LTQSSVTIPEQRDSP--QSGD----------PRRTNL--A-----AFNFCG : 582
PlaPPO1.   : TWQEKRVDSRGVDFGP-K--NPYVLTRHCEPPLNAANSTDKEVTATVTIFIMAKERFRR---EFRYT-EIRLFPELDQAKAPWQ--T-T-DLEDNVPYTNTWFET--NPEL----------GTRGGG--F-----RETFCG : 555
EpiHc1.    : TWFDTKQLNTKGVDFGNL--QSLIVTITHCEPPLNAANSTDKEVTATVTIFIMAKNDLDLI---PMEIF-EQLMSMIEMDKTQPKPEN--T-R-KDEDVTIHKEMTQPEN--QPDT----------SGP--S-----SGHVCA : 540
NkePPO.    : TGWDRRLIEASRGVDFSE-KRDVPLVRLSRNVRPGRVRDGKTSKLATVVTIFIAKYERGKISGNMTFF-DQRLWAEMDKTVVKNPKN--L-I-ERPLDLYPAEKARDEE--GRVD----------EPGDD--E-----IADFNG : 593
PlePPO.    : TGWSVREFEASRGVDFNS-P--NPYILRITHCEPPLTHQTSHRKPKSVTVTIYMAKKHERGL---EMGFM-EQILWAEMDKTQDKPQN--Q-V-ANLESSNPSGYTRSEA--VNPA--------NPGPPAN--A-----ETNFCG : 577
HamPPO.    : TGWSTREFEASRGVDFNS-P--NPYILRITHDSVPGNTHKETEPKPKVVTVTIFIAKKHERGL---EMGSG--EPFMNTQLIWTMEDKTNHTNPKN--Q-V-SKDSSNPTDITRRDS--KPMT----------SETEA--T-----EFDFCG : 573
MjaPPO.    : TGWNKRGFEASRGVDFNG----RPVLELKHCEPPLNHQNRGRTAEKVTVVTIFIAKFARGLI--KNNFM-EQILWAEMDKTVSKPGN--H-V-TKDSSNPEELTRDEN--SGTD----------PASPEA--T-----AFNFCG : 577
PmoPPO.    : TGWNTREFEASRGVDFSG----KPILRLTHDNKPGDLNRPEKVTVVTIFIAKFGDREK---EMDFM-EQILWAEMDKTVLKPKNQEH--T-S-KESSNLEELTRKD--SG-PG----------PRRTNL--A-----AFNFCG : 578
PsePPO.    : TGWNTREFEASRGVDFLG----KPILRLTHDKPEDLNRPEKVTVVTIFIAKFGQGD---VMNFM-EQILWSEMDKTVHKPKN--H-V-SKESSNLEELTRKD--EN--SGPG----------NSDEQ--V-----AFNFCG : 574
CmaPPO.    : TGWNTRDFEASRGVDFNI-R--RPMVRLTHDEPPLNHQTSHRKPKSVTVTIFIAKFGKGS---PMNFM-EQILWAEMDKTQPKPEN--H-V-SKESSNLANDPTSSDEN--SGPD----------PGADEN--T-----LFNFCG : 559
AfrPPO.    : TGWGKSRLNAQGDLQG-R--RNQAELTHIEPPLARFTRQTRAPRRVCFTMYTIYEVGR---KLTFR-QQTLLAVEMDKTAVTNAPMV--Q-D-TRESSVTIPERFRVYER--RTAN----------TSDALS--N-----YEMFCG : 584
MgeHc1     : TFEPFDIDYNADDDKTVSDIE-KARVQRNKPDTHNESDV--ERKVVVTFTGKYWYHQ---EVPVN-EKWEMVELDKTLTHPAKS--V-E-LTESTVTPDYESRSTVN--RVDE----------ALKGNKEFII----DEEFRH : 548
PmaHc1     : TFEFDFDIDLNADTADLPDVDKARVQRNKPDTAHESDK--EVTAAPVFLGKKWYES---DFTIN-EVPYLIEIDKTVTKVAKS--V-H-KSESSVTIPDRETKVLE--KVEH----------ALEGKETLNV----NKDERH : 546
PgrHc1     : TYEEFDIDLNADNTVDLPNVEKARVQRNKPDTAHESDK--EVTAAPVFLGKQWYGS---DFTIN-TVPYVIEIDKTVAKVAKS--V-H-KSESSVTIPDRETTLLD--RVDL----------ALDGKETLNV----NKDERH : 546
PamHc1     : TFEFDFDIDLNADTAELQDVDKARVRRNKSPDTVQNESDK--NSER--DAMAVVTFLGKYWFGQ---EIPIN-EKLYMIEIDKTVTKNKTT--V-Q-KSESSVTIPDRETKVTK--RVEE----------ALQGKTTYMV----NKDVRH : 547
BduHc1     : TFEFDFDIDLNADTQELDDVEKARVRRNKPDTHNESEL--DATAAVVTFLGKYWFGQ---EIPIN-EKLYMVEIDKTVAKNKTT--V-Q-KSESSVTIPDRETKDVK--KVHD----------ALEGKSSFYV----CKDVRH : 547
HmeHc1     : TFEFDFDIDLNADTQELDDVEKARVRRNKQPDTHNESDV--NANVAVVTFLGKYWFGV---QIPIN-EKLYMVEIDKTVTTNKTT--V-Q-KSESSVTIPDRETTQK--KVED----------AIQGNGAFLV----NKDVRH : 547
CseHc1     : TFEFDFDIDLNADTELKDVEKARVRRNKPDTSTNSNQ--EQMAAVVTFLGKFWFGQ---EIPIN-EKLYMVEIDKTVARNKTA--T-V-QKSESSVTIPDRETKLVR--RVDD----------ALQGKATYTV----NRDVRH : 547
CmoHc1     : TFEDFDADLNADTIDLDDVEKARVRRNKPDTVQNTAESER--ETLATVVTFLGKYWFGQ---EIPLE-EKQYLVEIDKTVTKNSKT--T-Q-KSESSVTIPDRETKLTVA--KVEN----------AINGKATINV----NKDVRH : 547
SamHc1     : TFEYFDVDLNADTEELPDVDSHARVRRNKPDTSRNSEA--ERFVTVVTFLGKYWFGQ---EIPIN-EKHYIVEIDKTVAKNAKT--V-A-KSESSVTIPDRETKVTQ--RVED----------AIAGKVQLTV----NKDVRH : 547
CacHc1     : TFEDFDIDLNADTVELEDVEKARVRRNKPDTNKNSDK--EYTAAVVYLGKYWFGQ---EITLD-EKLYMVEIDKTVTKTAHN--N-F-KSESSVTIPDRETKVHK--KVKD----------ALKNSTPLLV----NKDVRH : 547
TdoHc1     : TFEDFDIDLNADTVELPDVEKARVRRNKPDTSNSDK--DATVIVVTFLGKYWFGQ---EIPLE-KKLYMIEIDKTVAKSAQT--P-Q-KSESSVTIPDRETKVVQ--RVKD----------ALEDKTTWNV----NKDLRH : 548
ScuHc1     : TFEDFDIDLNADAAGLTDVDKARVQRNKPDGIKIANSAA--EKTVTVVTFLGKYWFGR---EVPLD-IQWKFIEIDKTAVKTAEN--A-V-KSESSVTIPDPVTHDRK--LVDD----------AIAGTATLEV----DKDVRH : 549
StuHc1     : TFDDFEIDTMADDTPEIADVEKAISHRNKPDTSLFKSDA--SHVATVVTFLGKYSYGE---ELSLD-TKWMVEMDKTVVHHPNS--H-E-KTESSVTIPDPKGTKVE--AVKS----------AIAGDSEFKV----NKEHRH : 550
BduHc2     : TFDESHIDGNADTAFHKQVVDKAVSRNKPDTSRNSAA--EKTVTVVTFSGKYWFGV---EVPLE-AQWGMVEMDKTVNTNPEN--V-D-KDQSSVTIPDPVNTDVER----------AVRGEVDFVV----DRHHRH : 555
PamHc2     : TFDESHIDNNIADTSGQKEVVDKALVGRNKPDTKVTHSEK--PVRAIVVTFPLGKYWFGQ---MVPLD-EAWGAIEDDKPVSVHDN--I-T-NKEDSTVTIPEPRSPPDMS--DVQK----------AIRGEQDFKY----DIHHRH : 555
CseHc2     : TFDESHIDNNIENVGREQPVDKAVVSRNKPDTVKNTNSKK--PVRGIVVTFLGKYWFGQ---RVPLD-VAWGFIEDDKPVRASDN--I-S-NVDLITVPEPRSFNVSS--DVEK----------AIRGEQVFSY----DKYRRH : 555
HmeHc2     : TFDESHIDGNAYTTGQREQVDKAVVSRNKPDTVKNTNSKK--AVHGVATFLSGKYWFGQ---KIPLH-VAWGMIEDDKPVKEADN--V-T-NKEDITVTIPEPRSFPHIN--YVER----------AINGEEEYVV----DKYHRH : 557
TdoHc2     : TFDEFNIDANAEGHYKEGDVQKASVNRNKPDTKVTTSKDK--VAEGIVVTFLHSDK--VEPLV-IEIDKTWSLIEDDKPVTPNQN--V-V-SQDDSVTIPEPRSYPEIK--EIED----------ALNGQDEYAI----DKYHRH : 555
PmaHc2     : TFDESHINGNMVHTP--EKVGEVTMKRNKEADKVTTATAEK--ETEGIVVTFLSTYWFGQ---EITLQ-DGHWGAIEMDKPVKTAEN--V-T-SGKKVVTIDEPMSPAEHK----------AVADKDATHF----HKEFRH : 551
PgrHc2     : TFDESHINGNMWAHTP--EKVGEVTTKRNKEADKVTTATADK--DTEGIVVTFLSTYWFGQ---EITLQ-DGHWGVIEMDKPVKTAEN--V-T-SGKKVVTIDEPMSPAEHK----------AVADKDATHF----HKEFRH : 551
StuHc2     : TFNNFYIDHNADTTTLGDVDKARIGRNKPDTKVTTSKEK--EGWLAVVTFLSAYWFGE---EVPLE-EHLDMVEIDKTVAKVPKT--L-T-LKKDPSVTIPEPRSLPKDIK--IRKV--EVES----------AIAGLEEYHI----EEHNRH : 555
StuHc3     : TFEDFEFDTQGELTGTGDDAHKAVMARNKPDHTTKNSDVV--KRTGMVVTFLAKYWYGE---EIDIT-HNAWQTVELDKTLVPDPEN--V-V-KDDESVTIPDPPSAQVVK--EVED----------ALSGTSVLKV----HKFHRH : 547
PinHcC     : TFENFEYSVNADTVDIADVELTYIERNKPDSKSLLLTNNNNTEVALTVTFLAWYLRNNGI---EYSFN-EGWRALEDDKWVKKHP--N-Q-TQTESSVTVPDVPLQTID--RADA----------AISSGCALHL----EDYESA : 551
CmaHc6     : TFETFEYSVNADTEDVDDVDTFYISRNKPDSSVGDTELDHDVLATVTFLAWHENNGV---AFSFN-DGWNAIEMDKWVMHPHN--H-E-SKHDSAPDIPSFQIKD--RTNE----------AIAQNKELHI----EEFESG : 549
CmaHc3     : TFETFEYSVNADTEDVDDVDTFYISRNKPDSSVGDTELDHDVLATVTFLAWHENNGV---AFSFN-DGWNAIEMDKWVMHPHN--H-E-SKHDSAPDIPSFQFKD--RTNE----------AIAQNKELHI----EEFESG : 550
CmaHc4     : TFEDFEYSVNADTAEIADVPSTVVKRTKPDTAKCVNNEHDVIATVTFLAWYKYNNHV---EFSFN-DGWNAIEMDKWTKTPPN--T-T-SKMDSVTVPDVPSFLTIE--KTEE----------AVSSGSELHL----EDYVSG : 550
CmaHc5     : TFEDFEYSVNADTAEIADVPSTVVKRAKPDTAECVNNENEVMATVTFLAWYKYNNHV---EFSFN-DGWNAIEMDKWTKTPPN--T-T-SKDESVTVPDVPSFLTIE--KTEE----------AVSSGSELHL----EDYVSG : 550
CsaHc      : THEDYEYSINADTVDVLDVPSTVVSRTNKPDTVKGFTSQNHEVLATVTFLAWYKYNNHV---EFSFN-EGWNAIEMDKWTKNSSN--T-E-SKKDEGVTVPDVPSFQTMD--MTDE----------ALGSGSALHL----EDYESG : 550
PciHc3     : TFEDFEYSINADTVEIPDVASTVIPRTNKPDTSSLTDTQDDHDVLATVTFLAWHLNNGV---EFTFD-EGWNAIEMDKWTFHPHN--H-E-RGADSVTVPDVPSFRPMK--RAEQ----------ALKDHVELDL----DEYSSA : 552
PvaHc1     : TFEDFEYNINADTEQIADVDSTYVPRNKPDSKTKDTSNKGEEVSYRHLAWHLNNGI---KFTFD-EGWNAIEMDKWVKPGTH--H-E-KCSEEAVTVPDVPSFATFE--KTKE----------ALG-GADSGL----KDFESA : 549
MjaHcL     : TFEDFEYNINADTEQIPDVESTYVPRNKPDSKGKGEETLATVTFLAWHLNNGI---EFSFD-EGWHAIEDDKWVKGTVT--E-T-KCSEEAVTVPDVPSFATFE--KTKA----------ALG-GADSGL----TDFESA : 550
FchHc1     : TFEDFEYESINADTEEIADVESTYVPRNKPDSKANFQTNKGSPASAVFTVFLCRKYNGI---LIPLE-ERWLCIEMDKWKTSPGN--T-V-KGESSVTIPDRKHAEMS--ETDA----------AASSGGSLDY----SDLAHS : 553
PvaHc      : TFEDFEYSINADAEGIPDVESTYVPRNKPDTRPDEGG-AERLATVTFLAWHKNNGI---EYTFD-EGWNAIEDDKWVSKGKT--S-E-KTESTVTVPDVPIHDFA--EAEA----------GGA-----GL----AKFESA : 545
MjaHcY     : TFEDFEYSINADAEGIQDVASTYVPRNKPDSTKDTSDA--ARLATVTFLAWHKNNGI---EYTFD-EGWNAIEDDKWVSSSN--A-E-KTESTVTVPDVPIQTFD--KAAA----------GGA-----GL----TEYESA : 544
PinHcA     : TFDEFQYSINADSGENIEDVEDNARVHRNKPDTSKTTSNNDGERLATVTFLCTLENNGI---TETLD-EAWFCIEDDKFQPPSPE--T-E-SKKDSVTVPDMPSFQSKE--QADN----------AVNGGHDLDL----SAYERS : 551
PinHcB     : TFDEFQYSINADSGENIEDVEDNARVHRNKPDTSKTTSNNDSERLATFTFLCTLENNGI---TETLD-EAWFCIEDDKFQSPSPE--T-E-SKKDSVTVPDMPSFQSKE--QADN----------AVNGGHDLDL----SAYERS : 551
PelHc1     : TFDQFKYSVNADSGENVEDVAYNVHRNKPDTEPTPHN-EEKFATVTFLCTENNGI---TLNLD-EEWLCIEDDKWRKANKN--L-E-SKDSSVTVPDMPSFESKH--QADE----------AVKNGEDLDL----SAYERS : 550
PelHc4     : TFDQFKYSVNADSGENVEDVAYNVHRNKPDTEPTPHN-EEKFATVTFLCTENNGI---TLNLD-EAWLCIEMDKWKKANKN--L-E-SKDSSVTVPDMPSFESKH--QADE----------AVKNGEDLDL----SAYERS : 550
PelHc3     : TFDQFKYSVNADSGENVEDVAYNVHRNKPDTEPTPHNEEEKFATVTFLCTENNGI---TLNLD-EAWLCIEMDKWKKGNLN--M-E-SKDSSVTVPDMPSFESKH--QADE----------AVKNGEDLDL----SAYERS : 551
PelHc2     : TFDQFKYSVNADSGENIEDVEYANVHRNKPDTEPTVHESAN-EVHLATVTFLCTENNGI---TLNLD-EEWLCIELDKWTKANKN--L-E-SKDSSVTVPDMPSFESKH--QADE----------AVKNGEDLDL----SAYERS : 550
HamHcA     : TFDEFEFSGNADELEKVHDVASYVHRNKPDSKTKDTSNEGDLATVTFLCTYLNNGI---HIPLS-EGHWTCIEDDKWTKGKTS--N-K-DQKTESSVTVPDSLLAEHE--KTDQ----------AVASSGKLDL----HEYERS : 551
PleHc2     : TFDTFEFSVNADSDKVADVASADVHRNKPDSSNPDSNNDGKVLGTLFTFLCVKSNGV---TPTWE-EGHWHCIEMDKWTKKSAFIN--H-V-KDTDSSVTVPDRPSPNIKS--KTDR----------AVSSHSKLDL----HKFERS : 551
EcaHcA     : TFEDFEFSVNADSEAVAEVEKAHVDRNKPDSKTKDTSNEGDLATVTFLCRKNNGI---EFTFD-EGWNCIEMDKWTKTPPN--T-E-SKDSSVTVPDRPSPNIKTAS--IRTE----------AVASSGSLDL----HEYERS : 550
GroHc1     : TFEDFEYDVNADSSEAVAEVEKAHVDRNKPDAKNFDKSDS-ADQHAVVTFLCRRNNGI---QFTFD-EGWNCIEMDKWTKAADN--H-K-KSESSVTVPDVPSPASIH--DADA----------AVASGSDLHL----EEFDRA : 550
CcsHc.     : TFEDYEFDSNADSSDKIERVANASIKRNKPDNLKFENSNNNDVEKHGVVTFTCRKAHGV---IFSFE-EGWNCIEDDKWTKAPVN--S-T-SKDSSVTVPDVPSFKRIA--DTKA----------ALAEDKEVKF----EEYHRS : 550
EpuHc1     : TFEDFEFDQMADTPEVQDVPTAIVSRNKPDSLTADTNHGGDVFATIVFLCRYANEI---LFDLN-EGWHCIEIDKWRTHSDN--H-E-KSDATVPDIPSYESMK--MADA----------AVASGEELHI----EQFTRS : 553
EpuHc2     : TFEDFELGKMADTQEVQDVPTAIVSRNKPDSLTADTKTHGGDVFATIVFLCRHHNGI---LFTLE-EGWHCIEIDKWRTHADN--H-E-EESDATVPDIPSHTIE--KADA----------AVAAGEELHI----EQFTRS : 553
NkeHc.     : TFEHFKFDTMADTPEIADVESRNKSAINFQTNKGSPASAVFTVFLCRKYNGI---LIPLE-ERWLCIEMDKWKTSPGN--T-V-KGESSVTIPDRKHAEMS--SDLAHS : 553
PleHc.     : TFEDFEFDSNADTTENVNEVSKTHISRNKPDSLNHAHAEH--DDKVTVVYTSAKHENHI---ALDID-ESWGALLTWTEHADN--H-EE-KSESEAPDRVSPQIH--DADE----------AVANGAELPH----KE-SRS : 546
CmaHc1     : TFEDFEFDRNADTSDNVGDVTKAHVSRNKPDTSKTTSNHYNAKQ--DDKVTVVRYSEKGV--KLDIN-DNWSAMLTWTEKATH--NH-R-SGFENAPDRISEIK--ETDE----------AVDNNLELSL----NS-GRS : 546
CmaHc2     : TFEDFEFDRNADTSDGVGDVTYAHVPRNKPDSKNNYHARS--AEKVTVVRYSEKGV--QREME-VGWHALLTWVDEADH-VY-H-DASQNAPDRISEIK--ETDE----------AVANNEELSL----NS-GRS : 546
PciHc1     : TFEDFSFDGNADTTETVEDVKTAHVSRNKPDTSKTTKHHANQ--AEKVTVVFTAKYQNLA---PLEIN-QAWFAALTWVDEAADS--V-E-SSSDNAPDRISPTIH--DTDE----------AVAAGGQLSFSVD-GHNTRG : 550
PciHc2     : TFEDFSVDGNADTTETVEDVKTAHVSRNKATNHNANH--AEKVTVLLAKYENHV---PLDIN-HAWAGIELTWVDEPADS--V-E-SSDNAPDRISPTIH--DTDE----------AVASGSSLSFAT--DHHARG : 549
OscHc1     : TFEDFEFNINADTEQIEDVPSTTVMRNKPDAHDFTAKY--NAIATVVTFLCRKHYNHI---EMTMD-EYWGCIEMDKWIDAHYEN--N-V-HHESSVTIPDRIPDDIK--QADD----------AVANDSEFPR----RD-WRA : 547
OscHc3     : TFEDFEFNINADTEQIDDVPSTSVHRNKPDSKTKHIYNAKY--DAVATVVTFLCRKHYNHI---ELKMD-EYWGCIEMDKWVDAHSEN--H-V-HAHESSVTIPDRIPEDIK--QADE----------AVANDSEFPR----RD-WRA : 547
OscHc2     : TFEDFEIDTNADTEEIDDVASTYVHRNKPDSKTKHNADH--EDTATVVTFLCRKHYNGI---ELHLD-EYWGCIEMDKWTHAASQ--D-V-KASESSVTIPDRVPSEIK--EADE----------AVAAGSDLEH----TD-IRA : 526
OscHc4.    : TFEDFEIDTNADTEEIDDVASTYVHRNKPDSKTKHNADH--EDTATVVTFLCRKHYNGI---ELHLD-EYWGCIEMDKWTHSAS-Q--D-T-KGSESSVTIPDRVPSDIK--EADD----------AVAAGSDLDH----KN-IRA : 537

                     *       820       *       840       *       860       *       880       *       900       *       920
PseHc      : GWDHTLPKGTRNGKKVLFVMLSMWRKEKIGET----------ETYRTCDDSLTMGLL--DKKTPKSSWFLLPIPS------TTSNWS--NRP--WMRQDTI : 728
PanHc3     : GWNYTLPKGKREGKRHIATWADKLHDD----------T-SCMCKGSPAYRLL--YNQVPRPLYYWVEGT-------RKLEDIHQKVQ--WFATDTI : 617
SdeHc1     : GWDNTLPKGSYEGTEQLFVWTNYEEYVFSD----------E-SCHCGDGRSYCGIL--FGNHPRPYYYEERTDA-------HTFQD--KTP--WYAVDSI : 621
ScoHcA.    : GWDYTLPKGKYEGTEQLFVATNYEEHVEDA----------G-E-ECQCRDSMSYCGSV--EHKLNPLGYYTDRDG-------TGFEE--KTQ--WYYGDVI : 616
ScoHcB.    : GWDYTLPKGNHQGNEQVFVATASYDEHVEDS----------G-E-ECQCRDSMSYCGAL--EGKNDPLGYYTDRHA-------TGFEE--KTQ--WYYGDVI : 620
ScoHcC     : GWDYTLPKGNFEGFMEVFVATNYEEKVEGP----------D-E-GCACHDALTYCGGI--DYHPPKAWFFTDRIQ-------RNFNA--KTK--WGKVTDV : 620
ScoHcD     : GWDYTLPKGKYEGTRVAIVTHDEKVSDQ----------E-TCLCGDAVAYCGAH--NQKPPKPWFFTDRIE-------RTFEH--HTP--WIATDII : 619
SdeHc2     : GWEYTLPPGSYEGTDQLFVATNYDEKVKDK----------VEP-ECQCSESLSYCGTI--SGKPPRPFYYEPEVE-------SNWED--VTQ--WHISDNI : 616
SpiHc1.    : GWEYTLPQGYDYGTHELFVATNYDEKAQDT----------DLSCKC-HAHSYCGNI--LGEPLKPLGYYFDKKKA-------TGWAE--KTQ--WCDADVI : 615
AgiHc1.    : GWEYTLPQGYDYGTHELFVATNYDEKDQNA----------DMSCKC-HAHSYCGNI--LGEPLKPLGYYFDKKKA-------AGWEE--KTQ--WCDTDVI : 615
PanHc1.    : GWEYTLPPGNYEGTAKLFVMTNYDQKISDD----------T-SCHCKNSLCYCGTI--FQEPLRPLGYYFDPPPK-------SGWEA--RTP--WFKKDTI : 645
PanHc2.    : GWEDYTLPPGNYEGTAKLFVMTGYMAPENTES----------E-KGHCDSLLCYCGTI--RGEPLRPLGYYFDPPPK-------ETD--WTPDTDI : 617
HauHcB.    : GWQNYLLPKSNYQGTEPLFAVTDADEEHSEIG----------E-NCNCGSALSYCGIV--SGKPPSPAWYFTDHIDA-------HNVED--VTP--WQHVDTI : 611
HauHcA.    : GWQNYLLPKSNYHGTEPLFAVTDADEEHSEIG----------E-NCNCGSALSYCGIV--SGKPPSPAWYFTDHISA-------HSVED--VTP--WNYADTI : 611
ScoHcX.    : GWNYTLPKSSQGTFLAFVTMLLAEDFTPNM----------DDTCFCADSWSHCSL--FIQPENVEKPFTQPIEC-------TKEEF--ALP--WAKQEII : 631
SdePPO1    : GLLEHLPPGKQEGFQLFVMTAVKRVNGD----------SKQCHDATSYCGVI--NEKPPKPMGYFTDVLLA-------ADWST--KTS--WNFGDTV : 640
SmaPPO     : GLDHTLPPGKPEGFQLFVMV
```

```
LpoHcIIIb.  : CGWPQHMLIPRGNHL-GMEFQLFVMLTDWEQDQAGKD---------------L-E-HLTCADAVSYCGAR--DHLYPDKKPMGFPFDRPIKA-------HTVEEF--LTP--NMSLTDIKI : 616
CroHcIIIb.  : CGWPQHMLIPRGNYL-GMEFQLFVMLTDWEQDKAGKD---------------L-E-HLTCADAVSYCGAR--DHLYPDKKPMGYPFDRPIKA-------HTVEEF--LTP--NMSLTDVKI : 616
LpoHcIV.    : CGWPQHMLVPRGNEK-GMDFQLFVMVTDWEGDHVNGE-----------------P-SLICADAVSYCGAR--DHKYPDKKPMGFPFDRPIDA-------RTPSQF--ATP--NMSFTDIRI : 614
CroHcIV.    : CGWPQHMLVPRGNEK-GMDFQLFVMVTDWEDDNVNGA-----------------L-SLICADAVSYCGAR--DHKYPDKRPMGFPFDRPIDA-------RTPSQF--ATP--NMSFTDIRI : 614
PimHc2.     : CGWPQHLLVPRGTHR-GMKFCLFVMVTDWEHDKAGEL---------------A-H-KAICSDAVSYCGAK--DEKFPDKHAMGFPFDRPIHS-------HTLADF--STH--NMATTAVEI : 612
EcaHcE.     : CGWPEHMLIPKGNHR-GMDFELFVIVTDYAQDAVNGH---------------G-E-NAECVDAVSYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRVIEG-------LTLEEF--LTP--SMSCTDVRI : 612
AgoHcE.     : CGWPEHMLIPKGNHR-GMDFELFVILTDYAEDAVNGH---------------G-E-NAECVDAASYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRVIDA-------LTLEEF--LTP--SMSCTDVRI : 612
NinHcE.     : CGWPEHMLIPRGSHK-GSEFDLFVILTDYEQDAVGGE-----------------A-SGVCVDAISYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRVITA-------DTVAEF--LTP--NMSCTDVKI : 615
PimHc6.     : CGWPEYMLVPRGHHR-GMVFQLFVMLTDYEQDKIADI---------------N-E-NAVCRDAISYCGAK--DDKYPDKKAMGFPFDRKIEA-------RTGAEF--LTP--NMAVQDVKI : 615
AauHc6.     : CGWPEHMLIPRGSHK-GMEFELFVMLTDHDEDTVAGL---------------S-E-NAVCSDAVSYCGAR--DDRYPDKKAMGFPFDRKIEA-------RTAAEF--LTP--NMGLTDIKI : 617
EbaHcE.     : CGWPEHMLLPRGNFK-GMEFHLFVILTDHDQDAVEGA---------------T-T-KGSCADAFSYCGVK--DHKYPDSKAMGFPFDRHIVN-------HDIHGF--LPS--NASVTEVKI : 616
EcaHcG.     : CGWPRHMLIPKGTHR-GMEFQLFVMLTDYTVDNPCGG---------------A-G-KIVCADAVSYCGAK--DQKYPDTKPMGFPFDRPTKI-------HTAEEI--LTP--NMSLTDVVI : 616
AgoHcG.     : CGWPKHMLIPKGTHK-GMEFQLFVMLTDYTADNPDGG---------------A-G-KTVCADAVSYCGAK--DQKYPDTKPMGFPFDRPTKI-------HTAEEI--LTP--NMSLTDVVI : 616
NinHcG.     : CGWPEHMLVPRGTHK-GMDFQLFVMLTDYSEDNPEGA---------------N-V-KTICNDAVSYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRPLLS-------SVAAKL--PTE--NTCVTDIKI : 616
CsaHc1.     : CGWPEHMLIPRGTTK-GIEFELFVMATDYTHDNPEGA---------------D-V-KTICGDAVSYCGAK--DQKYPDKKPMGYPFDRPTTA-------RSAQEL--LTD--NMSLTTVKI : 616
CsaHc2.     : CGWPENMLIPKGTHK-GMEFELFVMATDYTLDNPEGA---------------S-V-KTICSDAVSYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRPIVA-------RSAEEL--LTE--NMSLTDVKI : 616
CsaHc5.     : CGWPENMLVPRGTHK-GMEFQLFVMATDYTKDNPEGA---------------S-V-KTICSDAVSYCGAK--DQKYPDRKPMGFPFDRPTTA-------RTAEEL--LTD--NMTLTDVKI : 616
CsaHc5x.    : CGWPENMLVPRGTHK-GMEFQLFVMATDYTKDNPEGA---------------S-V-KTICSDAVSYCGAK--DQKYPDRKPMGFPFDRPTTA-------RTAEEL--LTD--NMTLTDVKI : 616
CsaHc3.     : CGWPEHMLLPKGTHK-GMEYELFVMATDYTQDNPDGA---------------N-V-KTTCADAVSYCGAK--DQKYPDLKPMGFPFDRPVSA-------RTAEEL--LTE--NMSLTDVLI : 616
CsaHc6.     : CGWPEHMLLPRGTHK-GMEYELFVMATDYTKDNPDGA---------------N-V-QTICSDAVSYCGAK--DQKYPDLKPMGYPFDRHLTA-------RNEAEL--LTD--NMVMTDVVI : 616
CsaHc6x.    : CGWPEHMLLPRGTHK-GMEYELFVMATDYTKDNPDGA---------------N-V-QTICSDAVSYCGAK--DQKYPDLKPMGYPFDRHLTA-------RNEAEL--LTD--NMVMTDVVI : 616
CsaHc6y.    : CGWPEHMLLPRGTHK-GMEYELFVMATDYTKDNPDGA---------------N-V-QTICSDAVSYCGAK--DQKYPDLKPMGYPFDRHLTA-------RNEAEL--LTD--NMVMTDVVI : 616
CsaHc4.     : CGWPENMLVPKGTSK-GMDFELFVMCTDYTVDNPEGA---------------N-V-RTICSDAVSYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRHLTA-------RTAEEL--LTD--NMAITDVKI : 616
PimHc4.     : CGWPEYMLIPRGNSK-GLQFQLFVMITDGVQDTAGSA---------------S-D-KLICADALSYCGAK--DHLYPDKKPMGFPFDRPFEA-------HSFQEI--ITP--NINVSNVVI : 615
LpoHcIIIa.  : CGWPKNMLVPRGNNK-GMTFELFVMLTDWEHDNVGGK---------------GSD-NHMCDDAVSYCGAK--DSKYPDKKPMGFPFDRRIDA-------HDIEEF--LTP--NMALTDVKI : 617
CroHcIIIa.  : CGWPKNMLIPRGNHK-GMVFELFVMLTDWEHDNVSGK---------------GQE-SPMCDDAVSYCGAK--DSKYPDKKHMGFPFDRRIDA-------PDIEEF--LTP--NMTLTDIKI : 617
CroHcI.     : CGWPQNMLIPRGNRK-GMVFELFVMLTDWEKDNVNGS-------------------VGFCSDAVSYCGAK--DHKYPDKKPMGFPFARKIKN-------EPLEDF--LTT--NMGVSAIKI : 614
TtrHcA.     : CGWPQNMLIPRGNRK-GMVFELFVMLTDWQKDNVDGG-------------------GGFCSDAVSYCGAK--DHKYPDKKPMGFPFDRKIEN-------EHLEDF--LTT--NMGVSDIKI : 613
EbaHcG.     : CGWPENMLIPRGNHK-GKPFVLFVLLTDFEKDKVPDF-------------------QRICMDAFSYCGTK--TGMYPDLKPMGFPFDRPIDH-------DHADEL--FTD--NHHRSTVTI : 613
MgiHcG.     : CGWPGHMLIPRGTRK-GMDFHLYVVLTDWEKDKVNGG-----------------D-KMTCADAVSYCGAL--DHKYPDKRPMGFPFDRPVVD-------KTEEELTAHVS--NLHRTDVKI : 616
MgiHcE.     : CGWPEHMLIPRGNHR-GMEFDLFVMLTDYTADSALDS---------------T-P-EGVCVDSLSYCGIK--DHKYPDKKPMGYPFDRPIDV-------D-IEEF--LTP--NMTVADVKI : 611
EcaHcB.     : CGWPNDLLVPKGNEH-GMKFRLFVMLTDAVQGQVGDH---------------G-A-TGLCTDAVSYCGAK--DQLYPDRYPMGFPFDRDIKA-------DSIPEW--LHP--NMHFSEVTI : 616
AgoHcB.     : CGWPNDLLVPKGNEH-GMKFRLFVMLTDAVQGQVGDH---------------G-A-TGLCTDAVSYCGAK--DQLYPDRYPMGFPFDRDIKA-------DSILEW--VNP--NMHFSEVTI : 616
NinHcB.     : CGWPDHLLIPKGDSS-GMKFHLFAIFTNYFEDTVNDH---------------G-R-TNECVDAVSYCGAK--DQLYPDKRAMGFPWDREIVA-------NDFNEW--RQP--NMISIPIDI : 618
EbaHcB.     : CGWPNHLLVPKGKEL-GMQYHLFVMLTDYNIDLVGDH---------------G-K-TGRCTEAVSYCGAK--DQLYPDKKAMGFPFDREIEI-------DHLEEW--LTP--NMTQVEVTI : 614
LpoHcVI.    : CGWPDHLLVPRGDEK-GMPFHLFVMLTDWLHDQVGDH---------------G-K-TGMCTDAVSYCGAK--DQLYPDRRPMGFPFDRHIEL-------EHLKDW--VLP--NMKDTLITV : 619
CroHcVI.    : CGWPDHLLVPRGNEN-GMPFHLFVMLTDWLQDQVGDH---------------G-K-TGMCTDAVSYCGAK--DQLYPDRRPMGFPFDRDIEE-------EHLSDW--LLP--NMKDVLITV : 619
CroHcV.     : CGWPDHLLVPRGNEK-GMPFHSFVMLTDWLHDQVGDH---------------G-K-TSICVDAVSYCGAK--DQLYPDRRAMGFPFDRAIES-------DHLEEW--ILP--NMRNTVITV : 619
MgiHcB.     : CGWPDHLLVPKGDEQ-GMKFHLFVMLTDRRMDAVGNH---------------G-K-TGVCFDAVSYCGAK--DQLYPDKRAMGFPFDREVDE-------DHLEKW--LLP--NMSNTIVTI : 618
EbaHcC.     : CGWPQHLLIPKGNSR-GMEFHLFVMVTDWLQDTVTSG---------------H-S-QAICVDAVSYCGAK--DQLYPDRKPMGFPFDRIIEA-------KTMKEW--LYP--NMEDVIVTI : 619
PimHc5B.    : CGWPEHLLVPKGHVN-GMPFHLFVILTDLAHDLVYDH---------------GHR-PTVCREAVSYCGLK--DELYPDKRPMGFPFDRYIAE-------EHLHDW--LLP--NMTSTDITI : 617
EcaHcC.     : CGWPDHLLVPKGNDR-GMPFHLCVMITDYLYDLVGDY---------------G-Y-DTPCVDAVSYCGAK--DSLYPDRRAMGFPFDRPIPE-------GHASNL--HQP--NVSFSQIKI : 618
AgoHcC.     : CGWPDHLLVPKGNDR-GMPFHLGVIITDYLYDLVGDY---------------G-H-DTPCVDAVSYCGAK--DSLYPDRRAMGFPFDRPIPE-------EHASNL--HQP--NIRFTQIKI : 619
MgiHcC.     : CGWPDHLLIPKGNDQ-GMEFNLFVMVTDELRDRVGDY---------------G-H-ADICMDAVSYCGAK--DQFYPDRRPMGFPFDRVIQE-------EEMGQW--QLP--NMSNTHIKI : 618
PimHc3C.    : CGWPEHLLLPKGNEK-GMEFHLFVMLTDWLDDVVGES---------------R-K-EGICVDAVSYCGAR--DDLYPDRRAMGFPFDRRIEA-------DTVEEW--LLP--NMSDTIIKI : 624
EspHc1.     : CGWPEHLLVPRGNHR-GMVFDLVVILTDWEEDKATDT---------------A-S-KCLCKDAVSYCGSK--DEKYPDKKPMGFPFDRKIGF-------NRLSNF--LTP--NMKSTEVRI : 620
AgoHcX.     : CGWPQHFLVPRGTQR-GMEFKLFVMLTDHRDDAVTST---------------VQA-EPKCKESVSYCGLK--DQKYPDKKAMGFPFDRRITD--------TATDF--ATP--NMKFTDIKV : 610
DpuPPO.     : CGWPDHFLVPRGVPNPGMPFTLFVMATSWKEDRVNDETTTATGTHSHCTHTGDDT-KKLCRNAASYCGIL--DDKYPDKRPMGFPFDRPPDKS-----ITTLAKF--VEKSPNITTAEIRI : 703
DmaPPO.     : CGWPDHFLVPRGAPNPGMPFTLFVMATSWKEDRVVNG---------------EDS-KKLCRNAASYCGIL--DEKYPDKRPMGFPFDRPPDKM-----ITTLAKF--IEKSPNIKTTEIRI : 689
PhuPPO.     : CGWPQHMLIPRGATD-GFQCVLFVMISNIDDDRVGAA---------------TSN-QRGFDDAASYCGVK--DSKYPDRRPMGFPFDRPPRNN-----VDTLGEF--LTP--NMRTADVRI : 670
HdiPPO2.    : CGWPQHMLIPKGTPE-GYDCQLFVMISNFDDDQVVQS---------------TEG---ICNDAMSYCGIK--DRLYPDKRSMGYPFDRLPRNN-----VNTLQEF--LTP--NMRVQDCVI : 668
TmoPPO.     : CGWTQHMLIPKGTPE-GMPCQLFVMISNYEDDKVNQS---------------TEG---VCNDAGSYCGIK--DKLYPDRRSMGYPFDRMPRNG-----VDTLQQF--LTS--NMRVQDVTI : 668
SbuPPO1.    : CGWPQHMLIPKGLPE-GMRCELFVMISNYEDDRVDQQ---------------LVG---ACSDAASFCGVR--DRLYPDRRPMGYPFDRLPRAG-----ADRLVNF--LTP--NMSLVDVVI : 670
DmePPO2.    : CGWPNHMLVPKGLPE-GLQCVLFIMVSNYENDRIDQQ---------------LVG---RCSDAASYCGVR--DRLYPDRQSMGFPFDRLPRSG-----VDRLVNF--LTP--NMSIVDVNI : 670
DerPPO2.    : CGWPNHMLVPKGLPE-GLPCVLFIMVSNYENDRVDQQ---------------LVG---RCSDAASYCGVR--DRLYPDRQSMGFPFDRLPRTG-----VDRLVNF--LTP--NMSIVDVNI : 670
DyaPPO2.    : CGWPNHMLVPKGLPE-GLPCVLFIMVSNFENDRIDQQ---------------LVG---RCSDAASYCGVR--DRLYPDRQSMGFPFDRLPRSG-----VDRLVNF--LTP--NMSIVDVNI : 670
DpsPPO2.    : CGWPNHMLIPKGLPE-GLRCDLFVMISNYENDRVDQQ---------------LVG---RCSDAASYCGVR--DRLYPDRQAMGYPFDRLPRTG-----ADRLVNF--LTP--NMSIVDVNI : 670
DviPPO2.    : CGWPNHMLIPKGLPE-GLRCDLFVMVSNYENDRIDQQ---------------LVG---RCSDAASYCGVR--DRLYPDRQSMGYPFDRLPRTG-----ADRLVNF--LTP--NMSIVDVSI : 670
AgaPPO3.    : CGWPAHMLIPKGLPE-GLPADLFIMVSNYEEDRVVQD---------------LVG---TCNDAASYCGVR--DRLYPDRKAMGYPFDRAARSG-----VDSLANF--LTP--NMAVQSITV : 668
DmePPO3.    : CGWPQHMLIPKGRPE-GLRFELFVMVSNYEEDKVDQT---------------VA--DCGCSIAASYCGLR--DRLYPDRKSMGFPFDRKPRRG-----SEILENF--LTP--NMCAVEVII : 664
DyaPPO3b.   : CGWPQHMLIPKGRAE-GLSFELFVMVSNYEDDKVVEQ---------------KAA-DCACSIAASYCGLR--DRLYPDRKSMGYPFDRSIRRG-----SEMLDRF--LTP--NMRAVEVII : 665
DyaPPO3a.   : CGWPNHMLVPKGRVE-GMSFELFVMISNYDNERVDQT---------------LVG---SCSDAASYCGVR--DRLYPDRRSMGFPFDRVPRMS-----AVLLKDF--LTP--NMSTVEVNI : 673
AmePPO.     : CGWPQHMLIPKGNKE-GFAMELFVMVSDYKDDRVEQN---------------EPI---GCKDASSYCGLR--DRKYPDARAMGYPFDRQPRAG-----VETLAQF--LTG--NMAVTEVTV : 667
BmoPPO1.    : CGWPHHMLVPKGTTQ-GYPMVLFVMVSNWNDDRVEQD---------------LVG---SCNDAASYCGIR--DRKYPDRRAMGFPFDRPAPA------ATTLSDF--LRP--NMAVRDCIV : 668
BmoPPO3.    : CGWPQHMLIPKGTTQ-GYPMVLFVMVSNWNDDRVEQD---------------LVG---SCNDAASYCGIR--DRKYPDRRAMGFPFDRPAPA------ATTLSDF--LRP--NMAVRDCIV : 668
MsePPO2.    : CGWPHHMLIPKGTAQ-GYPVVLFVMISNWNNDRIEQD---------------LVG---SCNDAASYCGIR--DRKYPDKQAMGYPFDRKMAND-----AATLSDF--LRP--NMAVRDCSI : 668
GmoPPO.     : CGWPHHMLIPKGTEQ-GYPVVLYVMVSDWNADKIEQD---------------TVG---ACNDAASYCGLR--DRKYPDKRHMGFPFDRRSE-------ARNLTDF--LKP--NMATRDCTI : 666
HcuPPO1.    : CGWPHHMLRPKGTAG-GFPVTLFVMLSNWEDDKVVQD---------------IVG---NCNDAASYCGIP--DRKYPDRRAMGFPFDRPIS-------VNSLSDF--LRP--NMNVSQCTI : 666
SbuPPO2.    : CGWPEHMLLPRGKPE-GMAFDLFVMISDYVGDAVQQT---------------NNT-PDICSDSSSFCGLK--DKLYPDNRTMGYPFDRRLDA-------RTLKDL--TNAFSNMSMTDITI : 673
DmePPOA1.   : CGWPQHLLLPKGNAQ-GMLFDLFVMISDYSQDSVEQP---------------KTP-NDACSTAYSFCGLK--DKLYPDRRTMGYPFDRRLPN-------ANLTEL--VGAFGNMAKTDLRI : 675
DerPPOA1.   : CGWPQHLLLPKGNAQ-GMLFDLFVMISDYSQDSVQQP---------------KTP-NDACSTAYSFCGLK--DKLYPDRRTMGYPFDRRLPN-------ASLSEL--VGAFGNMAKTDLRI : 675
DyaPPOA1.   : CGWPQHLLLPKGNAQ-GMLFDLFVMISDYSLDAVEQP---------------KTP-NDACSTAYSFCGLK--DKLYPDRRTMGYPFDRRLPN-------ANLAQL--VAAFGNMAKTDLRI : 675
DpsPPOA1.   : CGWPQHLLLPKGNAQ-GMLFDLFVMISDYSQDSVQQP---------------NTP-NDACSTAYSFCGLK--DKLYPDRRTMGFPFDRRLPN-------ANLTEL--VGAFQNMAKTDLRI : 675
DmoPPOA1.   : CGWPQHLLLPKGKPE-GMQFDLFVMISDYTQDAVQQH---------------STP-NDACSTAYSFCGLK--DKLYPDKRTMGFPFDRRLPN-------DTLNEL--VGAFSNMAKTDITI : 675
AstPPO.     : CGWPHHLLIPKGSAE-GMKFDLFVMISNFADDTVNQE---------------FDE-NVNCNDSHSFCGIR--DQLYPDKRHMGYPFDRRIPTA-----VRTLADF--TRPNSNMTNIEVQV : 673
AgaPPO2.    : CGWPHHLLIPKGTPE-GMQFDLFAMISNYADDTVNQE---------------FDE-NVNCNDSHSFCGLR--DQLYPDRRPMGYPFDRRMPTA-----VRSLTDF--TRGNTNMATSQVQI : 673
AgaPPO6.    : CGWPHHLLLPKGTAE-GMKFDLFLMISNFADDTVNQE---------------FNE-DINCNDSHSFCGIR--DQLYPDKRHMGYPFDRRIPTA-----TRTLSDF--TRPNSNMTNIEVQI : 674
AsuPPO.     : CGWPSHLLIPKGSPE-GMPFDLFAMISDYTADTVNQE---------------FDE-NVDCNDSHSFCGLR--DRLYPDRRAMGYPFDRRAPNA-----IRTLQDF--ARPNSNMALTNVQI : 670
AaePPO1.    : CGWPSHLLIPKGTPE-GMSFDLFAMISDFTNDTVNQE---------------FDE-NVDCNDSHSFCGLR--DRLYPDRRPMGYPFDRRAPNA-----TRTLQDF--VRPNSNMALTNVQV : 670
AsuPPO2.    : CGWPSQLVIPKGLPE-GMPFDLFAMLTDYTEDSVEQE---------------LDE-NVDCNDSHSFCGLR--DRLYPDRRPMGYPFDRRMPNT-----IRTLQDF--ESPNSNMALTNVQV : 672
AgaPPO1.    : CGWPQHMLVPKGLPE-GVQFDLFAMVTDFEQDSVAQE---------------LDP-NAPCSDAHSFCGLR--DKKYPDRRAMGYPFDRRTADT-----VATLADF--VTPNSNMKTATVQV : 675
AaePPO3.    : CGWPQHMLLPKGAPE-GVQFDLFIMISNFDDDSVEQE---------------FDE-TVDCNDAHSFCGIK--DKLYPDKRTMGFPFDRRTEAN-----VATLTDF--MRPYSNMAATNVQI : 674
AaePPO4.    : CGWPSHMLLPKGTPQ-GQQYDLFVMVSNFNSDTVNQE---------------YNE-NTPCDDSHSFCGLR--DRMYPDARNMGFPFDRVTPSN-----VSSLKEF--VKPYKNMATTPIQI : 672
AgaPPO4.    : CGWPNHMLLPKGSPD-GIEYDFFVMVSDFAQDRVED----------------FDE-NVNCNDAHSFCGLR--DRRYPDSRSMGYPFDRFTPGT-----IGSLLDF--TKPYVNMLVTPVKI : 670
AgaPPO5.    : CGWPSHMLLPKGSAS-GLEYDFFVMISNYNQDRVEE----------------FNE-NDNCNDAHMFCGLR--DRRYPDARSMGYPFDRFTPNS-----VGSLQEF--ARPYRNMATTPVSI : 670
AgaPPO8.    : CGWPAHMLLPKGNAN-GVEFDLFAMVSRFEDDNANVN---------------YDE-NAGCDDSYAFCGLR--DRVYPSRRAMGFPFDRRASNG-----VRSVADF--VAPYKNMRLATVTL : 684
BmoPPO2.    : CGWPQHMLVPKGTEA-GMPFQLFVMLSNYDLDRIDQD---------------DGK-QLTCVEASSFCGLK--DKKYPDRRAMGFPFDRPSSS------ATSLQDF--ILP--NMGLQDITI : 672
MsePPO1.    : CGWPQHMLVPKGTVG-GVAYQLFVMLSNYELDKIEQP---------------DGR-ELSCVEASMFCGLK--DKKYPDARPMGYPFDRPSNS------ATNIEDFS-AMS--NMGLQDIVI : 676
MsePPO.     : CGWPQHMLVPKGTVG-GVAYQLFVMLSNYELDKIEQP---------------DGR-ELSCVEASMFCGLK--DKKYPDARPMGYPFDRPSNS------ATNIEDFS-AMS--NMGLQDIVI : 676
OfuPPO.     : CGWPQHMLVPKGSEA-GSPYVLFVMLSNYEFDAVERT---------------DGR-QATCKEASSFCGIR--DSLYPDKRAMGFPFDRPSNT------ATSIEDF--IQP--NMFLQDINI : 672
HcuPPO2.    : CGWPQHMLVPKGNEA-GVTYQFFVMLSNYELDRIEES---------------SNV-QSNCVEASSFCGLR--DRKYPDRRAMGFPFDRPSTT------AANIEDF--ILP--NMGLQDITI : 674
PlaPPO.     : CGWPNHMLLPKGKPE-GMKFILFAMLTDWNQDKVNGA-----------------T-KQKCCDPTSYCGAK--NQLYPDKKSMGFPFDRPASA-----ATRSLGDF--LRDKSNMLTTDVVL : 648
EpiHc1.     : CGWPHHLLIPKGSAQ-GTAFHCFIMITDWKTDEVKSS-----------------K-KPTCQDAVSYCGII--NDLYPDKKPMGFPFDRLIPS-------DLATFV--SRS--NMKIFDISI : 629
NkePPO.     : CGWPHHNLVPRGMPG-GMDYQVFVMIRDWLKDRLLPD-----------------Q-PPVFPRGSSVCGVL--DRAYPDSRPMGFPFDRYPPE--KETPIQNTQAF--ADAFDNMILQDVSI : 689
PlePPO.     : CGWPEHLLLPRGKPE-GMTYQLFFMLTDLEKDQVDQP---------------A-G-PRRCANAVSFCGIL--DSKFPDKRPMGFPFDRRPPPRLQDAEVTSVADYA-RLS--NMTVQDITI : 675
HamPPO.     : CGWPQHLLLPRGKPE-GMAFQLFYMITDFEKDKVEQA---------------Q-G-ARSCANAVSFCGVL--DAKFPDSRPMGFPFDRRPPPVLLDAGVLTTADYA-RLD--NIMMQDVTI : 671
MjaPPO.     : CGWPQHMLVPRGRPE-GMAFQLFFMLTDYAIDKVTQP-----------------A-ARSCPNGVSFCGIQ--DAKYPDTRPMGFPFDRRPPPMILNRPVEDAADYA-RLD--NAFIHDISI : 674
PmoPPO.     : CGWPQHMLLPRGRPE-GMVFQLFFMLTDYAQDKVSNP---------------G-G-VRRCANGVSFCGMQ--DAKYPDARPMGFPFDRRPAPLLQGLPVNTTADYA-RLG--NAFMHDITI : 676
PsePPO.     : CGWPQHMLLPRGRPE-GMAFQLFFMLTDYAKDKVSNP---------------G-G-VRRCANGVSFCGMQ--DAKYPDARPMGFPFDRVPAPLLQGLPVNMTADYA-RLG--NAFMHDITI : 672
CmaPPO.     : CGWPQHMLLPRGKQE-GMPFEIFVMVTDWAQDKVVQP---------------I-R-ARNCSAAASFCGIL--DARYPDSRPMGFPFDRAPMPMLFNRPLERTRDLT-GLS--NIGMQDITI : 657
AfrPPO.     : CGWPEHMLVPKGSAE-GMQFELIVIATDWSKDEVPVK---------------T-T-NKPCSRGTSYCGVL--DDKYPDKRPMGFPFDRPIEDA-----TTTYEDF--TEGLTNIFKREVVV : 678
MgeHc1      : CGLPDRLLIPKGNEE-GYPVKFFVIVTDWEEDKVNQE-----------------VENHRYGNVYSYCGTYG-DRLYPDKKAFLYPFDRVIKD---------VNVF--KTP--NMFGKYVSI : 637
PmaHc1      : CGYPDRLLLPKGRNT-GMPVQIYVIVTDFEKEKVNDL-----------------PYDYDYGGSLSYCGVVG-GHKYPDTKAMGFPFDRRIYS---------REDF--FTD--NMYTKDVTI : 635
PgrHc1      : CGYPDRLLLPKGRKQ-GMPYQIYVIVTDFEKEKVNDL-----------------PYDYDYGGSLSYCGVVG-GHKYPDTKAMGFPFDRRIYS---------REDF--FTD--NMYTKDVTI : 635
PamHc1      : CGYPDRLLLPKGKKD-GMIFTMYVIVTDYETEKVNDL-----------------PYDYEYGGAISYCGTLA-GHKYPVNKPMGFPFDRQIDG----------DNF--CTP--NMFQKDVII : 635
BduHc1      : CGYPDRLLLPKGKKE-GMPFTLYVIVTDFEKEKVNDL-----------------PWDYDYGGSISYCGVLS-GHKYPDSKPMGFPFDRHIDG----------DHF--FTE--NMYQKEVKI : 635
HmeHc1      : CGYPDRLLLPKGKKD-GMPFTFYVIVTDFDKEKVNDV-----------------PLDYNYGGSISYCGTLA-GHKYPDNKPMGFPFDRRIDE----------DHF--FTP--NMGQKEVTI : 635
CseHc1      : CGYPERLLLPKGKRD-GMPFSLFVILTDFDKEKVNDL-----------------PWDYDYGGSISYCGTVS-GHKYPDSKPMGFPFDRQINS----------DNF--FRS--NIYQKDVVI : 635
CmoHc1      : CGYPDRLLLPKGKKG-GMPFTLYVILTDFNKEKVNDL-----------------PYDYDYGGSLSYCGTI--NHKYPDSRPMGFPFDRRLST----------EEF--SMP--NFCSKDVTI : 634
SamHc1      : CGYPDRLLLPKGRRD-GMPFTLFVVLTDYEKDKVNDL-----------------PFDYDYGGSVSYCGTL--GHRYPDAKPMGFPFDRRIDQ----------DSF--FTK--NIYQRDVTI : 634
CacHc1      : CGYPGRLLLPKGKIE-GMPFPLYAIVTDFEQEKVNDL-----------------PFDYDYGGSISYCGTL--GHKYPDSKPMGYPFDRPIGR-----------EF--YYP--NMFEKDVVI : 633
TdoHc1      : CGFPDRLLLPKGKKE-GMPFTLFVMVTDWEKEKVNDV-----------------PYDYDYGGSISYCGTL--NHKYPDTQPMGYPFDRRIEN---------VEEF--LTP--NMYVKDVVI : 636
ScuHc1      : CGVPDRLLLPKGKTN-GMKYTMFVMLSDFEEDKVNDL-----------------PHDYEYGGFVSYCGTI--NHKYPDKKPMGWPLDRKICK---------DSFH--DVT--NMYFRDVEI : 637
StuHc1      : CGIPDRLLLPKGSKE-GTPFTLFVMVTDFDDDNANTD---------------V-ESTHDYGGSISYCGTLTEGQKYPDKKPMGFPFDRHIED---------VHDF--KTK--NMIVKDVVV : 641
BduHc2      : CGLPHRLLLPKGKPE-GMDFKLYVVISDFDKDVVSSE---------------VNVDDLHHISSLGYCGVL--DGKIPDGKPMGFPFDRRIPS---------EELF--LTP--NMKVVNLVI : 645
PamHc2      : CGFPHRLLLPKGKPE-GMVYRLFVVVTDYDKDVVAPG---------------MSPDDVNTLSSLGYCGVM--DGKMPDGKPMGFPFDRRVPS---------EETF--YTP--NIKTIDLTI : 645
CseHc2      : CGFPRRLLLPKGKPE-GMVYQLYVVVTDYDKDIVEPG---------------IQPEDVENLSSLGYCGVM--DGKIPDGRPMGFPFDRRIVS---------PEQF--LTP--NMEVVDITI : 645
HmeHc2      : CGFPHRLLLPKGKPE-GMTYRIYVIITDYNKDIITSD---------------WKPEDIENLSSLGYCGVL--EGKIPDARPMGFPFDRRITS---------EEEF--FTQ--NMKVVDVTI : 647
TdoHc2      : CGYPHRLLLPKGTSG-GMVFNLYVTITNYEQDKVHPG---------------VTVDEVDNLTSLGYCGVL--DGVIPDGRPMGYPYDRPIPD---------KEVF--NIP--NSKVIEVTI : 645
PmaHc2      : CGFPHRLLVPKGRPE-GMHYKLMVVITDYHKDVVVPD---------------MDVEHMDKLQSVGYCGVM--EGKIPDGKPMGYPFDRRISC---------EESF--ITK--NMKFVDITV : 641
PgrHc2      : CGFPHRLLVPKGRPE-GMHYKLMVVITDYHKDVVVPD---------------MDVEHMDKLQSVGYCGVM--EGKIPDGKPMGFPFDRPVPC---------EETF--ITK--NMKFVDITV : 641
StuHc2      : CGFSQGLLIPKGSEA-GTHFKVFIMLTDWDKDHANAD---------------A-HPEDDYGGSIGYCGAL--WAKYPDKKPMGFPFDRHIQD---------EEDF--FTE--NMKLIDVVI : 644
StuHc3      : CGIPDRMLLPKGKVG-GMEFMLLVVVTDGGADKGVTI-----------------HDDHIYGGSTSLCGIR--GEKYPDKRALGFPFDRYIHS---------VEDF--VTP--NMFCKDVVI : 635
PinHcC      : LGLPNRFLLPKGQAQ-GMEFNLVVAVTDGRTDAALDD-----------------LHE---NTKFIHYGY---DRQYPDKRPHGYPLDRRVDD---------ERIFE-ALP--NFKQRTVKL : 636
CmaHc6      : LGLPNRFLIPKGNVK-GLDMDVMVAITSGEADAAVEG-----------------LHE---NTSFNHYGCP--DGTYPDKRPHGYPLDRHVDD---------ERIIN-DLH--NFKHIQVKV : 635
CmaHc3      : LGLPNRFLIPKGNVK-GLDMDVMVAITSGEADAAVEG-----------------LHE---NTSFNHYGCA--DGTYPDKRPHGYPLDRHVDD---------ERIIN-DLH--NFKHIQVKV : 636
CmaHc4      : LGLPNRFLLSKGTTK-GMDFHLVVFVSDGAKDAAIDG-----------------LLE---NTSFNHYGAH--SGKYPDKQPHGYPLDRRVDD---------KRIIT-GVT--NFKGMDVKV : 636
CmaHc5      : LGLPNRFLLSKGTTE-GMKFHLVVFVSDGAKDAAIDG-----------------LYE---NTSFNHYGAH--NGKYPDKQPHGYPLDRRVDD---------ERIIT-GVT--NFKGVDVKV : 636
CsaHc       : LGLPDRFLLPKGKTE-GMDFHVVVFVSDGAKDAAVDG-----------------LHE---STTYNHYGCH--DGTYPDNQPHGYPLDRRVDD---------ERIIT-GVS--NFKAVDVKV : 636
PciHc3      : LGMPNRFLLPKGSRR-GLSFDLVVAITDGAADAAVED-----------------LHT---NTKFNHYGYH---GQYPDKRPHGYPLDRHVED---------DRIFE-ELP--NFKHVTVKV : 637
PvaHc1      : TGIPNRFLIPKGNEQ-GLEFDLVVAVTDGAADAAVDG-----------------LHE---NTEFNHYGSH---GVYPDKRPHGYPLDRKVPD---------ERVFE-DLP--NFGHIHLKV : 634
MjaHcL      : TGIPNRFLLPKGNEK-GLEFDLVVAVTDGAADAAVDG-----------------LHE---NTEFNHYGAY---GKYPDNRPHGYPLDRSVPD---------ERVFE-DLP--NFGHIQVKV : 635
FchHc1      : TGIPNRFLLPKGNEQ-GLEFDLVVAVTDGEADAAVEG-----------------LHD---NTDFIHYGSH---GKYPDNRPHGYPLDRKVPD---------DRVFE-VLP--NFKHIQVKV : 635
PvaHc       : TGLPNRFLLPKGNDR-GLEFDLVVAVTDGDADSAVPN-----------------LHE---NTEYNHYGSH---GVYPDKRPHGYPLDRKVPD---------ERVFE-DLP--NFKHIQVKV : 630
MjaHcY      : TGLPNRFLLPKGNEQ-GLEFDLVVAVTDGDADAAVAD-----------------LHQ---NTDYNHYGAH---GVYPDKKPHGYPLDRKVPD---------ERVFE-ELS--NFKRIQVKV : 629
PinHcA      : CGIPDRMLLPKSKPE-GMEFNLYVAVTDGDKDTEGHN-----------------GGH-DYGGTHAQCGVH--GEAYPDNRPLGYPLERRIPD---------ERVID-GVS--NIKHVVVKI : 639
PinHcB      : CGIPDRMLLPKSKPE-GMKFNLYVAVTDGDKDTEGHN-----------------GGH-DYGGTHAQCGVH--GEAFPDNRPLGYPLERRIPD---------ERVID-GVS--NIKHVVVKI : 639
PelHc1      : CGIPDRMLLPKSKPQ-GMEFNLYVVVTDGDKDTDGSD-----------------GDH-DHHGTHAQCGIH--GEQYPDHRPLGYPLERRIPD---------ERVFD-GVS--NIKHALVKI : 638
PelHc4      : CGIPDRMLLPKSKPQ-GMEFNLYVAVTDGDKDTDGSD-----------------GDH-DHHGTHAQCGIH--GEQYPDHRPLGYPLERRIPD---------ERVFD-GVS--NIKHALVKI : 638
PelHc3      : CGIPDRMLLPKSKPQ-GMEFNLYVAVTDGDKDTDGSD-----------------GDH-DHHGTHAQCGIH--GEQYPDHRPLGYPLERRIPD---------ERVFD-GVS--NIKHALVKI : 639
PelHc2      : CGIPDRMLLPKSKPQ-GMEFNLYVAVTDGDKDTDGSD-----------------GDH-DHHGTHAQCGIH--GEQYPDHRPLGYPLERRIPD---------ERVFD-GVS--NIKHALVKI : 638
HamHcA      : CGLPARLLLPKGTVN-GMDFDLFVAVTNGDEDKVTDH-----------------PETDEHGGTHAQCGAH--GEKYPDKKPMGYPLERSIPD---------ERVFH-DVA--NINVTHVKV : 640
PleHc2.     : CGIPNRLLLPKGKAR-GMDFALFVGVTNGDEAKTVDD-----------------PE--ELGATHAQCGIH--GEKYPDKKPMGYPVDRSVPD---------NRVFL-ESP--NIKRVYVKV : 638
GpuHc1.     : CGLPQRMLLPKGTEE-GLDFLLVVAVSDGTTDAQHDA-----------------LEA-VDAHGHAQCGVH--GEKYPDHQPMGFPLDRRIPD---------DRIFL-SAD--NIEKLIVTV : 638
GroHc1.     : CGLPQRMLLPKGTEE-GLEFLLVVAVSDGTTDAQHDA-----------------LEA-VDAHGHAQCGVN--GEKYPDHQPMGFPLDRRIPD---------DRIFL-SAD--NIEKLLVTV : 638
CcsHc.      : CGIPNRLLLPKGSSE-GMKFVLAVAVTEASSDAHPEI-----------------LEI-QGAHSHAQCGVQ--GEKYPDSKPMGFPLDRRIED---------ERILL-SSS--NLKYTVVKI : 638
EpuHc1.     : CGIPNRLLIPKGTPE-GMEFALFVAVTDGSKDAAIEG-----------------LEKDEHGGSHAQCGIH--GEVYPDKRPLGFPLDRQIPD---------ERILE-HFP--NLHKSIVVV : 642
EpuHc2      : CGIPNRMLLPKGTPE-GMEFALFVAVTDGSKDAAIEG-----------------LEKDEHGGSHAQCGMH--GEVYPDKRPLGYPLDRHIPD---------ERTLE-HFP--NLHKSVVTI : 642
NkeHc.      : CGQPERLLLPKGKVE-GMEFGLLIAVTDGEHDAAVSG-----------------LEDNEHGSNHGYCGIH--NELYPDKQPMGFPLDRKIED---------RNMFV-GMP--NINYNIVNV : 642
PleHc.      : CGHPQRLLLPKGKEQ-GMDFWLDIIITSGD-DAVQDD-----------------LTVNAHGSTHGYCGIH--GEKYPDKRPMGFPFDRPIPD---------LRVFK--VQ--NQHGQVVKI : 633
```

```
CmaHc1.   : GHQRLLPKGNEE-GQMWNYVSGE-AVHDD----------------LHTDIHG-NHGYCGIQ--GAKVPDKPMFLERVPD---------IRVIK-NLP--FFGKIDV : 633
CmaHc2.   : GHQRLLPKGNEE-GACWFTYVSGG-GVHDD----------------LQTNDYGSNHGYCGIQ--GAKVPDKPMFLERIPN---------KFLVL-GLP--HHSQENV : 634
PciHc1.   : GHQRLLPKGTTN-GDHFDYVSGE-SIHDH----------------VE----DGNHGYCGMH--GQKVPDKPMFYDHISD---------RRMDD-GLK--HHTQTKI : 634
PciHc2.   : GHQRLLPKGTTN-GDHFDYVSGE-SVHDH----------------VE----DGNHGYCGMH--GQKVPDKPMFYDHIPD---------RRLDD-GLK--HHTQTKI : 633
OscHc1.   : GHARLLPKGKTK-GEFLFVASGD-AALSK----------------PTKSEHGSAHGYCGVQ--GEIVPDKPMYLERIPD---------DRLH--VP--NNVSTKV : 634
OscHc3    : GHARLLPKGKSK-GEVLFVASGD-AALSK----------------PTSSEHGSAHGYCGVR--GEIVPDKPMYLERIPD---------DRLH--VP--NHLSTKV : 634
OscHc2.   : GHARLLPKGKTE-GENLFVASGD-AAHPD----------------PASNEHDSNHGYCGTH--GQVVPDKPMYLERIPD---------ERVH--MD--NKITTTV : 613
OscHc4.   : GHARLLPKGKSE-GENLFVASGD-AAHPD----------------LATNEHGSTHGYCGIH--GQVVPDKPMFLERVTD---------EREH--ID--NNVSTKV : 624
```

Abb. 6.13: Multiples Sequenzalignment: schwarz hinterlegte Bereiche weisen 100%, dunkelgrau hinterlegte 75%, hellgrau hinterlegte 50% und weiß hinterlegte weniger als 50% Identität der Aminosäuren auf.

6.7.2.3. Stammbaum

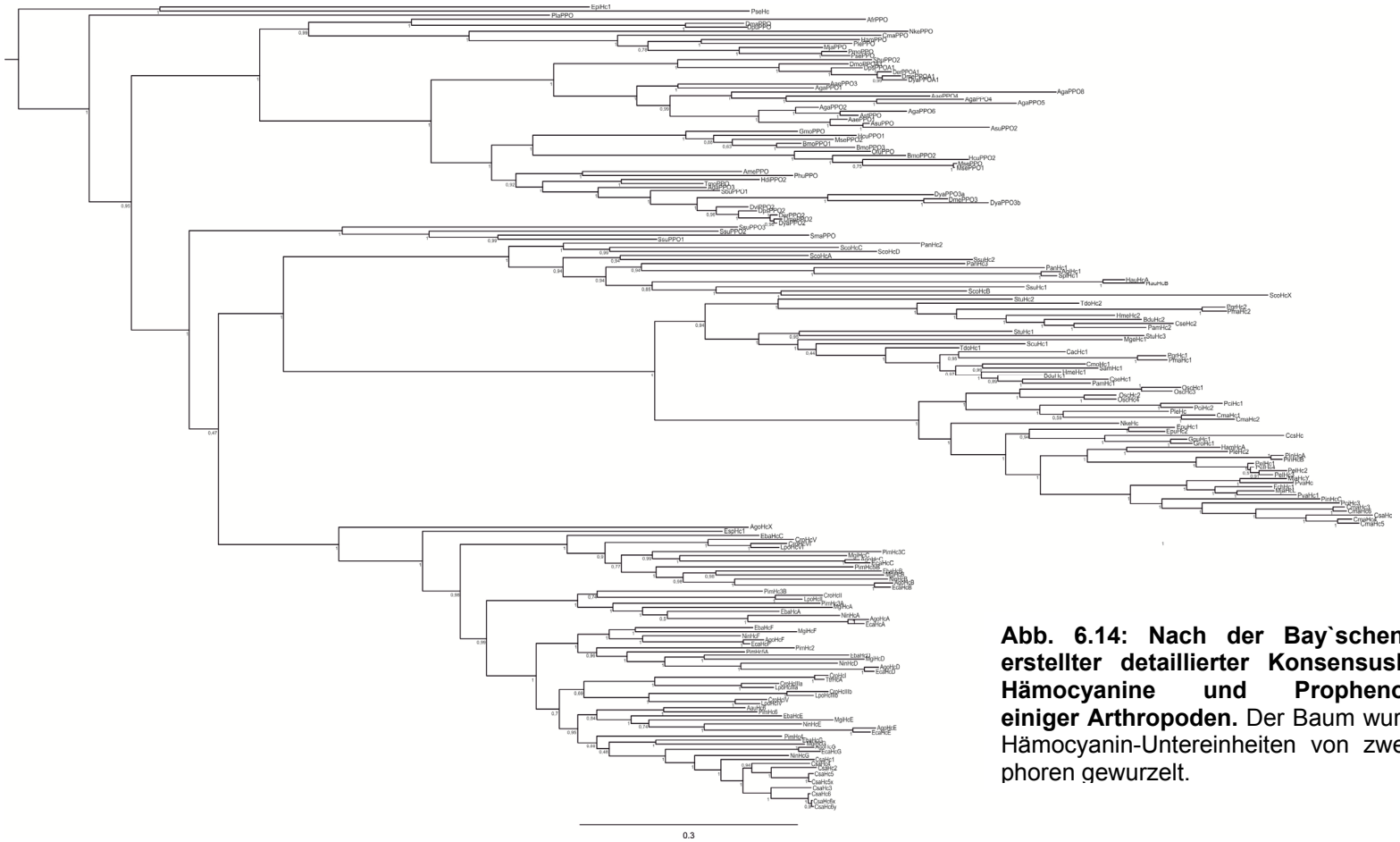


Abb. 6.14: Nach der Bay`schen Analyse erstellter detaillierter Konsensusbaum der Hämocyanine und Prophenoloxidasen einiger Arthropoden. Der Baum wurde mit den Hämocyanin-Untereinheiten von zwei Onychophoren gewurzelt.

6.7.3. Realtime qRT-PCR

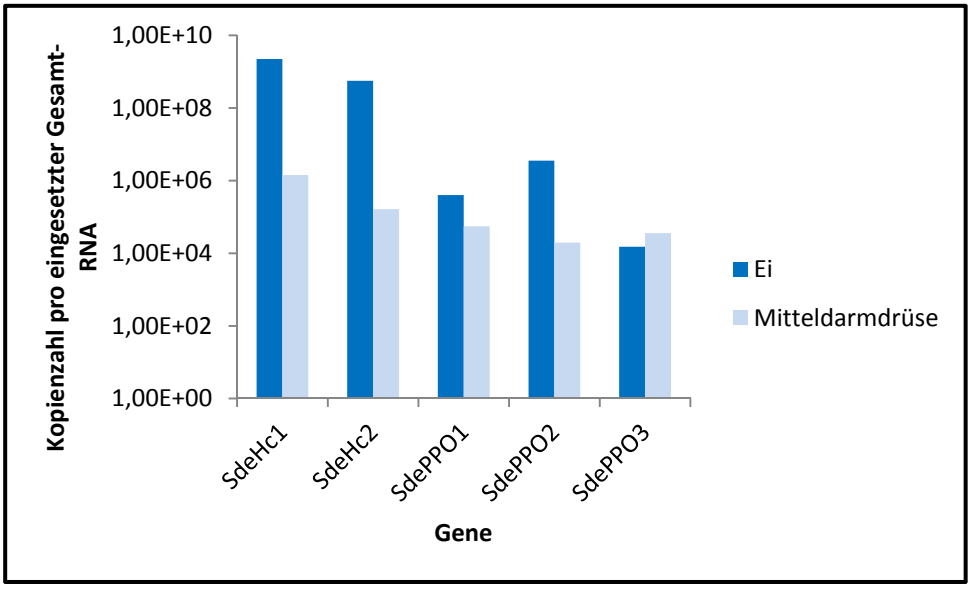


Abb. 6.15: Genexpression auf RNA-Ebene normalisiert auf das Referenzgen β-Actin, bezogen auf das Gewebe Mitteldarmdrüse.

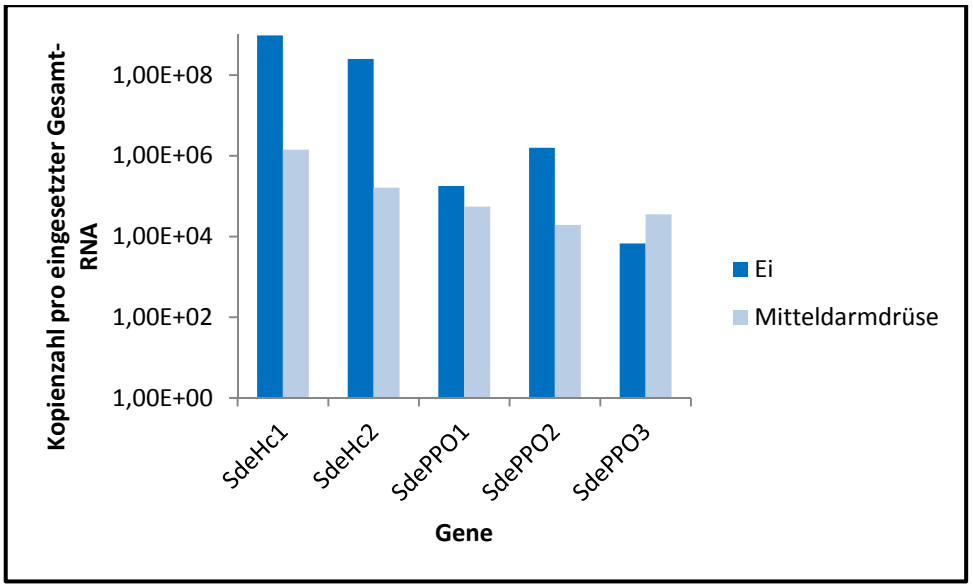


Abb. 6.16: Genexpression auf RNA-Ebene normalisiert auf das Referenzgen RPLP0, bezogen auf das Gewebe Mitteldarmdrüse.