Die Expression respiratorischer Proteine ausgewählter Arthropodenspezies

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Beyhan Ertas
aus Vechta

Hamburg, August 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. Thorsten BURMESTER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. Konrad Wiese
Tag der Disputation: 16. Oktober 2009

Hamburg, den 02. Oktober 2009

Universität Hamburg
64
Fakultät
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung ... 1
1. Metalloproteine mit respiratorischer Funktion ... 1
2. Die respiratorischen Proteine der Arthropoden ... 3
2.1. Hämoglobin ... 3
2.1.1. Aufbau und Struktur ... 3
2.1.2. Charakteristika der Arthropoden-Globine ... 4
2.2. Hämocyanin ... 6
2.2.1. Aufbau und Struktur ... 6
2.2.2. Bedeutung und weitere Funktion(en) von Hämocyanin ... 9
2.2.3. Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden ... 9
2.2.3.1. Phenoloxidasen ... 11
2.2.3.2. Hexamerine ... 12
3. Hämoglobin und Hämocyanin der Crustacea ... 14
4. Zielsetzung ... 16

B. Material und Methoden ... 17
1. Allgemeines ... 17
1.1. Geräte ... 17
1.2. Chemikalien, Kits und sonstige Materialien ... 18
1.3. Klone ... 18
1.4. Primer ... 19
1.5. Versuchstiere ... 19
2. Verwendete Organismen und ihre Kultivierung ... 20
2.1. Bakterien ... 20
2.1.1. Bakterienstämme ... 20
2.1.2. Nährmedien und Antibiotika ... 20
2.1.3. Ansetzen von bakteriellen Übernachtkulturen ... 21
2.1.4. Anlegen von bakteriellen Dauerkulturen ... 21
2.2. Zellkultur ... 22
2.2.1. Zelllinien ... 22
2.2.2. Nährmedien und Zusätze ... 22
2.2.3. Passage von Zellkulturen ... 23
2.2.4. Anlegen von Dauerkulturen ... 23
2.2.5. Auftauen von Dauerkulturen ... 23

3. Molekularbiologische Methoden 24
3.1. Isolierung von Nukleinsäuren 24
3.1.1. Isolierung von genomischer DNA 24
3.1.2. Isolierung von RNA 24
3.1.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit 24
3.1.2.2. Isolierung von Gesamt-RNA mittels Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform 25
3.1.2.3. Isolierung von Gesamt-RNA mit PeqGOLD TriFast™ 26
3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 26
3.3. Elektrophorese von Nukleinsäuren 27
3.3.1. DNA-Gelelektrophorese 27
3.3.2. RNA-Gelelektrophorese 27
3.4. Reverse Transkription 28
3.5. Polymerase-Kettenreaktion 28
3.6. RACE: Rapid amplification of cDNA-ends 29
3.7. Allgemeine Klonierungstechniken 30
3.7.1. TA-Klonierung 30
3.7.2. Klonierung mit Restriktionsendonukleasen 31
3.7.2.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 31
3.7.2.2. Ligation 31
3.7.3. Transformation von *E. coli* 32
3.7.4. Identifizierung positiver Transformanten via Klon-PCR-Screening 32
3.7.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien 33
3.7.6. Sequenzierung 33
4. Sequenzauswertung/Molekulare Phylogenie 34
5. Rekombinante Expression von Proteinen 35
5.1. Expression von Proteinen in Bakterien 35
5.1.1. Durchführung von Testexpressionen 36
5.1.2. Rekombinante Expression von löslichem Hämoglobin 37
5.1.3. Rekombinante Expression von löslichem Hexamerin 37
5.1.4. Rekombinante Expression von löslichen Typ3-Kupferproteinen 38
5.2. Expression von Proteinen in Insektenzellen 38
5.2.1. „Bac-to-Bac Baculovirus Expression System" 38
5.2.1.1. Klonierung des Expressionskonstruktes 39
5.2.1.2. Herstellung von rekombinanten Bacmiden in *E. coli* 39
5.2.1.3. Präparation von Bacmid-DNA 40
5.2.1.4. Herstellung des rekombinanten Primärvirus (P1) 41

5.2.1.5. Amplifikation von Baculoviren 41
5.2.1.6. Rekombinante Proteinexpression in Insektenzellen 42
5.2.2. „Drosophila Expression System“ 43
5.2.2.1. Klonierung des Expressionskonstruktes 43
5.2.2.2. Co-Transfektion von S2-Zellen 43
5.2.2.3. Selektion stabil transfizierter S2-Zellen 44
5.2.2.4. Rekombinante Proteinexpression in S2-Zellen 45
6. Allgemeine proteinbiochemische Methoden 46
6.1. Entnahme von Hämolymphe 46
6.2. Proteinextraktion 47
6.2.1. Proteinextraktion aus frisch präparierten Geweben/Tieren 47
6.2.2. Proteinextraktion aus in RNAlater stabilisierten Tieren 47
6.2.3. Proteinextraktion aus unterschiedlichen Zellkompartimenten 48
6.3. Proteinbestimmung 48
6.3.1. Photooptische Bestimmung von Proteinkonzentrationen 48
6.3.2. Bradford-Assay 48
6.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 49
6.4.1. SDS-PAGE 49
6.4.2. Native PAGE 50
6.5. Reduktion von Met-Hämoglobin 51
6.6. Aufnahme von Absorptionsspektren 52
6.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Proteinen 52
7. Immunologische Techniken 53
7.1. Herstellung von polyklonalen Antikörpern 53
7.2. Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern 53
7.3. Western Blot 54
7.3.1. Elektrophoretischer Transfer 54
7.3.2. Immundetektion 54
7.4. Immunhistochemie 55
7.4.1. Anfertigung von Gefrierschnitten 55
7.4.2. Histologische Kontrollfärbungen 56
7.4.3. Immunhistochemische Lokalisation von Hb 56
7.4.4. Überprüfung der Antikörperspezifität 57
8. Aufreinigung von Proteinen 58
8.1. Ammoniumsulfatfällung 58
8.2. Anionenaustauschchromatographie 59
8.3. Gelfiltrationschromatographie 59

8.4. Strep-Tag/Strep-Tactin-Affinitätschromatographie 60
9. Rekonstitution von Proteinen 61
9.1. Renaturierung von Proteinen aus *inclusion bodies* 61
9.1.1. Hämoglobin 61
9.1.2. Prophenoloxidase 3 62
9.2. Hexamerbildung aus rekombinanten LSP2-Monomeren 63
9.3. Rekonstitution von PPO3 mit Kupfer 63
9.3.1. *in vitro*-Rekonstitution der unaufgereinigten rekombinanten PPO3 63
9.3.2. *in vitro*-Rekonstitution nach Nakamura et al. (2000) 64
9.3.3. *in vitro*-Rekonstitution nach Jensen et al. (1999a, b) 64
10. Phenoloxidase-Aktivitätstests 65
10.1. Tropfentest 67
10.2. Messung der Absorptionsänderung 67
10.3. Färbung von nativen Gelen 68
10.4. *in vivo*-Aktivitätsnachweis in S2-Zellen 68

C. Ergebnisse 70
1. Hämoglobin in *Carcinus maenas* 70
1.1. Ermittlung der Hb-Sequenzen 70
1.2. Lokalisation von CmaHb im Organismus 72
1.2.1. Verteilung von CmaHb im Gewebe 72
1.2.2. (Sub)zelluläre Lokalisation von CmaHb im Kiemengewebe 73
1.3. Biochemische Charakterisierung des rekombinanten CmaHb 75
1.4. Phylogenetische Analysen 78
2. Hämocyanin in *Speleonectes tulumensis* 80
2.1. Nachweis von Hämocyanin in *S. tulumensis* 80
2.2. Phylogenetische Analysen 83
3. Etablierung von rekombinanten Expressionssystemen 85
3.1. Rekombinante Expression funktioneller Typ3-Kupferproteine 85
3.1.1. Expression im Bac-to-Bac Baculovirus-System 86
3.1.2. Expression in *Drosophila* S2-Zellen 87
3.2. Rekombinante Expression in bakteriellen Systemen 92
3.2.1. Rekombinante Expression der Prophenoloxidase 3 92
3.2.1.1. Auswahl geeigneter Bakterienzellen 92
3.2.1.2. Erhalt von löslicher rekombinanter (Thrx-)PPO3 93
3.2.1.3. Aufreinigung der löslichen rekombinanten (Thrx-)PPO3 95
3.2.1.4. Rekonstitution von rekombinanter (Thrx-)PPO3: *in vitro*-Kupfereinbau 96

3.2.2. Rekombinante Expression von Hexamerinen 99
3.2.2.1. Rekombinante Expression von LSP2 im bakteriellen pET-System 99
3.2.2.2. Rekonstitution der LSP2-Quartärstruktur 100

D. Diskussion 104
1. Das Hämoglobin von *Carcinus maenas* 104
1.1. Hämoglobin: Funktion in Entgiftung oder Signaltransduktion? 104
1.2. Implikation für die Evolution der Arthropoden-Globine 106
2. Das Hämocyanin von *Speleonectes tulumensis* 110
2.1. Hämocyanin: Funktion als Sauerstofftransportprotein 110
2.2. Schwestergruppenverhältnis der Remipedia und Insecta? 111
3. Etablierung von rekombinanten Expressionssystemen 113
3.1. Ansätze zum Erhalt rekombinanter Metalloproteine 113
3.2. Rekombinante Expression funktioneller Typ3-Kupferproteine 114
3.2.1. Bedeutung von Chaperonen für die Expression von Kupferproteinen 114
3.2.2. Rekombinante Expression funktioneller PPO3 in Insektenzellen 116
3.2.2.1. Das Baculovirus-System 116
3.2.2.2. Das „Drosophila Expression System“ 118
3.3. Rekombinante Expression in bakteriellen Systemen 120
3.3.1. Expression von Typ3-Kupferproteinen: Prophenoloxidase 3 120
3.3.1.1. Rekombinante Expression der löslichen PPO3-Apoform 120
3.3.1.2. Ermittlung der optimalen Parameter für die in vitro-Rekonstitution 121
3.3.2. Expression eines kupferlosen Vertreters: Hexamerin LSP2 123
3.3.3. Wahl des Testsystems: Phenoloxidasen *vs.* Hämocyanine 124

E. Zusammenfassung 128

F. Literaturverzeichnis 130

G. Anhang 157
1. Abkürzungen 157
2. Codes 159
3. Vektoren 159
4. Primer 159
5. Expressionskonstrukte 163
6. Transformierte bakterielle Expressionsstämme 164
7. Stabil transfizierte Zell-Linien 164

8. Sequenzen 165
8.1. *Carcinus maenas* Hämoglobin 165
8.1.1. Nukleotid- und Aminosäuresequenz 165
8.1.2. Phylogenie 166
8.1.2.1. Verwendete Sequenzen 166
8.1.2.2. Alignment 167
8.2. *Speleonectes tulumensis* Hämocyanin 168
8.2.1. Nukleotid- und Aminosäuresequenzen 168
8.2.1.1. Hämocyaninuntereinheit 1 (StuHc1, FM863709) 168
8.2.1.2. Hämocyaninuntereinheit 2 (StuHc2, FM863710) 169
8.2.1.3. Hämocyaninuntereinheit 3 (StuHc3, FM863711) 170
8.2.2. Phylogenie 172
8.2.2.1. Verwendete Sequenzen 172
8.2.2.2. Alignment 174
8.2.2.3. Detaillierte Stammbäume 182

A. Einleitung

1. Metalloproteine mit respiratorischer Funktion

Alle Organismen, die Sauerstoff als Elektronenendakzeptor in der Atmungskette zur Energiegewinnung nutzen, sind auf eine kontinuierliche Versorgung ihrer Zellen mit Sauerstoff angewiesen. Während bei kleineren Tieren bereits ein Gasaustausch per Diffusion für eine schnelle und ausreichende Sauerstoffversorgung des gesamten Körpers sorgt, ist dieses bei größeren Tieren aufgrund ihres ungünstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses nicht mehr möglich. Hier greifen andere Mechanismen, die die Aufnahme und Verteilung des Sauerstoffs gewährleisten. So entwickelten sich im Laufe der Evolution neben offenen oder geschlossenen Kreislaufsystemen auch respiratorische Oberflächen wie Lungen oder Kiemen, die den Eintritt des Sauerstoffs in das Kreislaufsystem verbessern. Zusätzlich entstanden verschiedene Atmungspigmente, die eine bedeutende Rolle beim Sauerstofftransport und bei der -speicherung spielen. Diese respiratorischen Proteine liegen entweder intrazellulär vor oder flottieren in Form von großen, extrazellulären Molekülaggregaten frei in der Hämolymphe bzw. im Blut der Organismen. Sie werden aufgrund ihrer aktiven Zentren in insgesamt drei große Gruppen unterteilt: die Hämoglobine, die Hämerythrine und die Hämocyanine (Mangum, 1985; Markl, 1996; Terwilliger, 1998; Kurtz, 1999). Jedes einzelne ist dabei in der Lage, mit Hilfe von Metallionen Sauerstoff reversibel zu binden.

Hämoglobine und Hämerythrine zählen zu den eisenhaltigen Proteinen, die im oxygenierten Zustand für eine rote bzw. violette Färbung der Körperflüssigkeit sorgen. Während im Fall des Hämoglobins die Koordination eines einzigen Eisenatoms über eine Hämgruppe erfolgt, besitzen Hämerythrine ein zweikerniges Eisenzentrum, bei dem die Metallionen direkt kovalent mit dem Protein verknüpft sind (Dickerson und Geis, 1983; Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995; Markl, 1996). Von diesen beiden Eisenproteinen sind Hämoglobine am weitesten verbreitetet. Sie kommen nicht nur im gesamten Tierreich, sondern auch in Bakterien, Pilzen und Pflanzen vor (Vinogradov, 1985; Hardison, 1996; 1998). Ihre Lokalisation variiert je nach Organismus von intrazellulär in Geweben, Erythrozyten etc. bis zu einem extrazellulären Vorkommen in der Hämolymphe (Hardison 1996; Terwilliger, 1998; Weber und Vinogradov, 2001; Burmester und Hankeln, 2007). Hämerythrine dagegen liegen nur intrazellulär vor und sind auf wenige Anneliden, Priapuliden, Sipunculiden und Brachyopoden beschränkt (Mangum, 1992). Die dritte Gruppe an Atmungspigmenten bilden die ausschließlich extrazellulär vorkommenden Hämocyanine. Sie binden den Sauerstoff über Kupferionen,

welche die typische Blaufärbung des Proteins im oxygenierten Zustand verursachen. Dagegen erscheint desoxygeniertes Hämocyanin farblos. Dieses Protein erfüllt in der Hämolymphe vieler Mollusken und Arthropoden die respiratorischen Funktionen (Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995) (Abb. A.1).

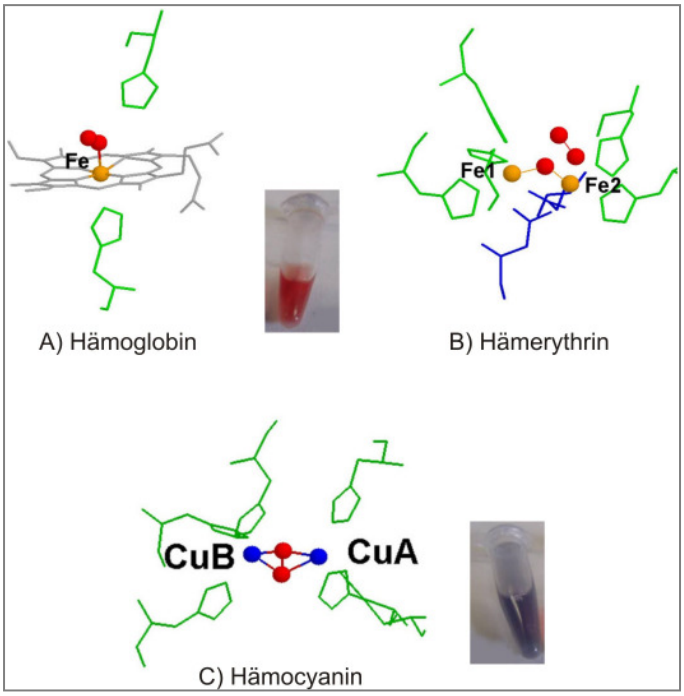

Abb. A.1: Die Sauerstoffbindungszentren der drei respiratorischen Proteine Hämoglobin (A), Hämerythrin (B) und Hämocyanin (C). Dargestellt sind die koordinierenden Aminosäuren (grün), die Hämgruppe im Hämoglobin (grau), die Eisenionen (gelb), Kupferionen (blau) und der Sauerstoff (rot). Abb. verändert nach Burmester, 2002 sowie Dürr, 2008.

Die Aufmerksamkeit dieser Arbeit gilt insbesondere den respiratorischen Proteinen Hämoglobin und Hämocyanin ausgewählter Arthropodenspezies.

2. Die respiratorischen Proteine der Arthropoden

2.1. Hämoglobin

2.1.1. Aufbau und Struktur

Hämoglobine gehören zu der Klasse der Häm-Proteine, die sich alle durch den Besitz eines metallhaltigen Porphyrinkomplexes auszeichnen. Von den verschiedenen Häm-Typen, die sich in ihrer Substitution unterscheiden, ist das auch als Fe-Protoporphyrin IX bezeichnete Häm b in den Globinen zu finden (Hardison, 1996; 1998; Berg et al., 2003). Erst das zentral im Häm b vorliegende, zweiwertige Eisenion ermöglicht die reversible Bindung von Sauerstoff. Bei einer Oxidation dieses Ions zum dreiwertigen Eisen entsteht Metglobin, welches die Eigenschaft der Sauerstoffbindung verloren hat.
Die Hämoglobine der Arthropoden weisen die für Globine charakteristische Proteinfaltung auf, die sie als Mitglieder der Globin-Superfamilie kennzeichnet (Kendrews, 1963; Perutz, 1979; Bolognesi et al., 1997; Milani et al., 2005). Ihre Primärstruktur setzt sich typischerweise aus etwa 150 Aminosäuren zusammen, die sich in der Sekundärstruktur zu acht rechtsgängigen α-Helices falten. Diese mit A-H bezeichneten α-Helices bilden ein „3 über 3 Sandwich“ aus, in dessen hydrophober Tasche die Bindung der Hämgruppe erfolgt (Dickerson und Geis, 1983; Holm und Sander, 1993) (Abb.A.2).

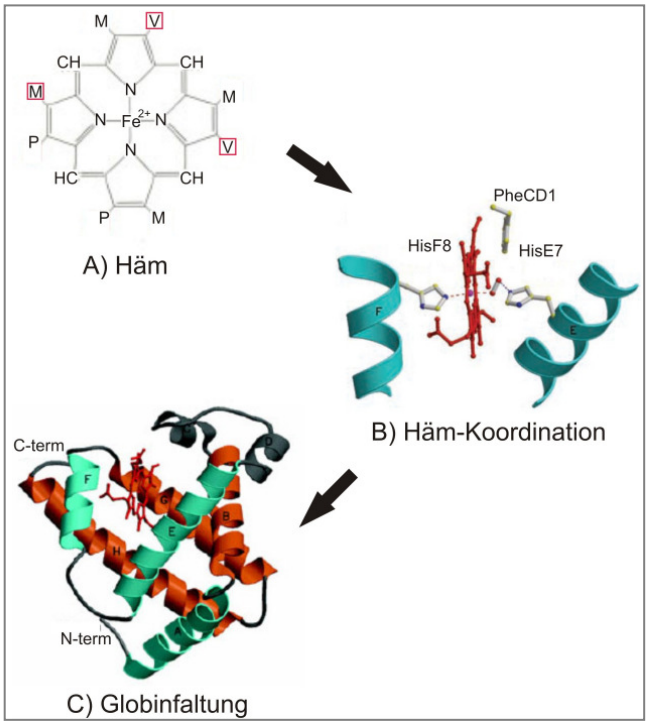

Abb. A.2: Aufbau und Struktur von Globinen. A) Das Häm b bestehend aus einem Protoporphyrinring mit zentralem Eisen(II)ion. Die für das Häm b charakteristischen drei Substituenten sind rot markiert. M = Methyl-, P = Propyl- und V = Vinylrest. B) Dargestellt ist die Koordination der Hämgruppe inklusive einiger der konservierten Aminosäuren. C) Globinfaltung. „3 über 3 Sandwich“ aus den acht α-Helices A bis H. Abb. verändert nach Berg et al., 2003 (A), Pesce et al., 2002 (B und C).

Stabilisiert wird das Häm durch verschiedene konservierte Aminosäuren, die somit einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur des Proteins und die Sauerstoffbindung ausüben. Eine wichtige Rolle hierbei spielen das Phenylalanin an Position CD1, das Leucin F4 sowie die Histidine E7 und F8 (Dewilde et al., 2001; Pesce et al., 2002) (Abb. A.2 und Abb. A.3).

Das Histidin E7 wird auch für die weitere Unterteilung in die beiden Klassen der pentakoordinierten und hexakoordinierten Globine herangezogen. Die jeweilige Bezeichnung richtet sich nach der Anzahl der sechs möglichen Koordinationspartner, die das Eisenion im desoxygenierten Globin besitzt. Vier der Bindungsstellen werden grundsätzlich von den Stickstoffatomen des Porphyrins besetzt, die das Metallion im Häm b fixieren (Abb. A.2). Zwei weitere liegen senkrecht zur Hämebene, wobei das Histidin F8 die fünfte Koordinationsstelle repräsentiert. Bleibt im desoxygenierten Zustand die sechste Stelle frei, so spricht man von pentakoordinierten Globinen. Im Falle der hexakoordinierten Globine geht das Histidin an Position E7 eine Bindung mit dem Eisenion ein (Pesce et al., 2002). Sauerstoff kann das Histidin E7 reversibel verdrängen, wobei die Dissoziation dieser Aminosäure den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt (Dewilde et al., 2001; Pesce et al., 2002) (Abb. A.3).

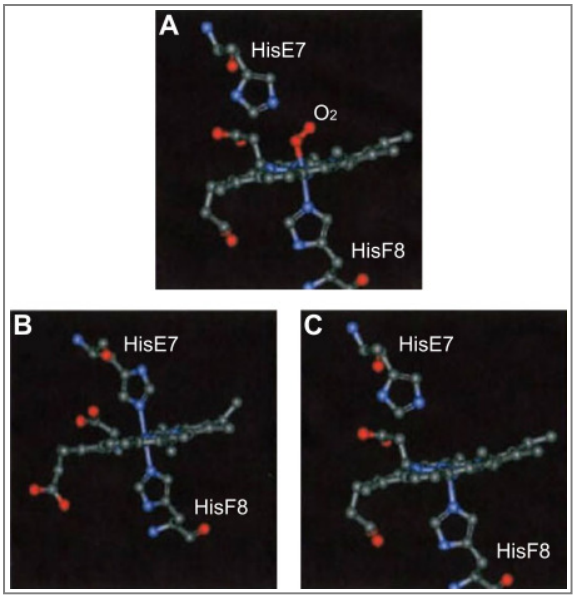

Abb. A.3: Penta- und Hexakoordination von Globinen. Dargestellt ist das Häm b mit Blick auf die fünfte und sechste Koordinationsstelle des Eisenions. A) Sauerstoff als sechster Ligand des Eisenions im oxygnenierten Globin. B) Hexakoordiniertes Globin. HisE7 besetzt die sechste Koordinationsstelle im desoxygenierten Zustand. C) Pentakoordiniertes Globin. Die sechste Koordinationsstelle im desoxygenierten Zustand bleibt unbesetzt. Abb. verändert nach Dewilde et al., 2002.

2.1.2. Charakteristika der Arthropoden-Globine

Innerhalb der Arthropoda wurden Hämoglobine in Insecta[1)] und Crustacea nachgewiesen. In Bezug auf ihre Quartärstruktur und Größe bzw. molekulare Masse zeichnen sich diese Globine durch eine große Diversität aus (Terwilliger, 1998; Terwilliger und Ryan, 2001). Neben einer intrazellulären Lokalisation (Burmester und Hankeln, 2007), bei der

sie biochemischen Analysen zu Folge als Monomere (Hankeln et al., 2002; de Sanctis et al., 2005) oder Dimere (Dewilde et al., 1998; Pesce et al., 2005) auftreten, existieren die Hämoglobine auch in Form von großen, extrazellulären Molekülaggregaten in der Hämolymphe der jeweiligen Organismen (Moens und Kondo, 1977; Dangott und Terwilliger, 1981; Vinogradov, 1985; Weber und Vinogradov, 2001). Letztere setzen sich aus mehreren, in manchen Fällen sogar unterschiedlichen Globinketten zusammen (Hourdez et al., 2000), wobei molekulare Massen von 210-800 kDa erreicht werden (Ilan und Daniel, 1979; Terwilliger, 2001; Weber und Vinogradov, 2001). Bei den Multi-Untereinheiten-Multi-Domänen-Globinen einiger Crustacea, wie z.B. der Globine von *Artemia salina* und *Daphnia magna*, bestehen die einzelnen Kette(n) aus mehreren kovalent gebundenen Globindomänen (Manning et al., 1990; Terwilliger et al., 2001). Einzig die extrazellulären Globine der Chironomidae bilden eine Ausnahme, da diese Proteine keine großen Aggregate bilden, sondern nur als Monomere oder Dimere vorliegen (Walshe, 1951; Bergstrom et al., 1976; Osmulski und Leyko, 1986; Saffarini et al., 1991; Zebe 1991) (Tabelle A.1).

Tabelle A.1: Ausgewählte Hämoglobine der Arthropoda (verändert nach Burmester und Hankeln, 2007)

	Spezies	Struktur	Lokalisation
Insecta[1)]	*Chironomus thummi*	Monomer, Dimer	Hämolymphe
	Drosophila melanogaster	Monomer	Tracheen, Fettkörper
	Gasterophilus intestinalis	Dimer	Trachealzellen Fettkörper, Hypodermis, Muskel
Crustacea	*Artemia salina*	Multimer[1)]	Hämolymphe
	Benthoxymus speculifer	Multimer[2)]	Hämolymphe
	Cyamus scammoni	Multimer[3)]	Hämolymphe
	Daphnia magna	Multimer[4)]	Hämolymphe

[1)] Azam und Daniel, 1992
[2)] Ilan und Daniel, 1979
[3)] Terwilliger, 1991; 1992
[4)] Lamkemeyer et al., 2006

[1)] Wie im deutschen Sprachgebrauch üblich, werden auch in dieser Arbeit die Begriffe Insecta und Hexapoda synonym verwendet. Sie beinhalten somit beide die Entognatha und Ectognatha. Im englischen Sprachgebrauch dagegen bezieht sich die Bezeichnung Insecta nur auf die Ectognatha, während der Begriff Hexapoda für die Entognatha und Ectognatha steht.

2.2. Hämocyanin

2.2.1. Aufbau und Struktur

Die Klassifizierung von Kupferproteinen erfolgt in der Regel abhängig von der Struktur ihres Kupferzentrums (Kaim und Rall, 1996; Gerdemann et al., 2002). Die verschiedenen Typen reichen dabei von einkernigen Kupferzentren (Typ1, Typ2) über zweikernige (Typ3, Typ CuA) und dreikernige Zentren bis hin zu Cysteinato-verbrückten Clustern (6-8 Cu) in kupferhaltigen Metallothioneinen der Hefe (Tabelle A.2).

Tabelle A.2: Charakteristika einiger bekannter Kupferzentren in Biomolekülen

	Aggregation	Funktion	Vorkommen
Typ1	einkernig	Elektronenübertragung	Azurin, Plastocyanin
Typ2	einkernig	Katalyse und Redox-reaktivität	Amin-Oxidasen, Galactose-Oxidase
Typ3	zweikernig	O_2-Aktivierung für den Transport und die Oxy-genierung	Hämocyanine, Phenol-oxidasen, Catechol-oxidasen, Tyrosinasen
Typ(2+3)-Trimer	dreikernig	O_2-Aktivierung für Oxidase-Funktion	Ascorbat-Oxidase, Laccase
CuA	zweikernig	Elektronenübertragung	Cytochrom-c-Oxidase, N_2O-Reduktase
MT-Cu	ein- bis mehrkernig	Regulations-, Speicher- und Transport-Form	Metallothionein, Cu-Transport ATPase

Die Arthropoden-Hämocyanine zählen ebenso wie die Hämocyanine der Mollusken zu den Typ3-Kupferproteinen. Weitere Mitglieder mit solch einem Typ3-Zentrum stellen die sauerstoffumsetzenden Enzyme des Melaninstoffwechsels dar, zu denen die Phenol-oxidasen der Arthropoden ebenso gehören wie die Tyrosinasen und Catecholoxidasen aus unterschiedlichen Organismen (Jaenicke und Decker, 2004). Alle diese Proteine zeichnen sich durch den Besitz von zwei Kupferionen im aktiven Zentrum aus, die durch jeweils drei hoch konservierte Histidine koordiniert werden (Lerch, 1983; Burmester, 2002; Decker, 2005; Claus und Decker, 2006). Trotz der identischen Sauerstoffbin-dungszentren (Ling et al., 1994; Magnus et al., 1994; Cuff et al., 1998) unterscheiden sich die Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanine in ihrer molekularen Struktur erheb-lich. Auch die vorhandenen Sequenzähnlichkeiten sind nicht signifikant. Die Proteine weisen keine nähere Verwandtschaft zueinander auf und sind konvergent entstanden (Markl und Decker, 1992; Burmester, 2001; 2002; van Holde et al., 2001). Mollusken-Hämocyanine zeigen signifikante Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz zu den als Tyrosinasen bezeichneten kupferhaltigen Enzymen aus vielen Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren

(Müller et al., 1988; Markl und Decker, 1992; van Gelder et al., 1997; Klabunde et al., 1998; Lieb et al., 2001; van Holde et al., 2001). Dagegen bilden die Arthropoden-Hämocyanine mit vier weiteren Proteinklassen eine eigene Superfamilie, die sowohl respiratorische als auch verschiedene nicht-respiratorische Proteine der Arthropoden umfasst (Burmester und Scheller, 1996; Burmester, 2001; 2002).

Die reversible Bindung eines Sauerstoffmoleküls erfolgt beim Hämocyanin in „side-on"-Koordination zwischen den beiden, die Valenz wechselnden, mit CuA und CuB bezeichneten einwertigen Kupferatomen (Magnus et al., 1994; Cuff et al., 1998). Im Fall der Arthropoden-Hämocyanine besteht eine solche sauerstoffbindende funktionelle Einheit aus ca. 650 Aminosäuren mit einer durchschnittlichen molekularen Masse von 75 kDa. Diese in Röntgenstrukturanalysen bohnenförmig wirkenden Untereinheiten werden in drei verschiedene Domänen unterteilt (Gaykema et al., 1984; Volbeda und Hol, 1989). Die aus 150-180 Aminosäuren bestehende N-terminale Domäne 1 bildet eine Supersekundärstruktur in Form eines α-Helix-Bündels aus. Die hochkonservierte Sequenz der zweiten Domäne aus 220 Aminosäuren enthält das Sauerstoffbindungszentrum mit den beiden Kupferionen. Dabei wird die Lage der koordinierenden sechs Histidine durch die Sekundärstruktur, einem so genannten „four alpha-helix bundle", stabilisiert (Linzen et al., 1985; Voldeba und Hol, 1989; Hazes et al., 1993). Die dritte C-terminale Proteindomäne des Hämocyanins faltet sich zu einer siebensträngigen, antiparallelen β-Faltblattstruktur, die sich aus ca. 260 Aminosäuren zusammensetzt (Volbeda und Hol, 1989). Domäne 1 und 3 dienen beide vor allem dem Schutz und der Stabilisierung des aktiven Zentrums. Eine wichtige Rolle bei der kooperativen Sauerstoffbindung spielt ein in Domäne 1 vorhandenes Phenylalanin, welches in allen Arthropoden-Hämocyaninen strikt konserviert ist. Zwei weitere in Domäne 2 konservierte Phenylalanine dienen der Stabilisierung der Sauerstoffbindung (Hazes et al., 1993). Insgesamt sechs solcher ähnlichen oder identischen funktionellen Untereinheiten bilden ein Hexamer. Neben der Existenz von einzelnen Hexameren ist die Bildung von multihexameren Komplexen bekannt, wobei in allen Fällen die entsprechende Quartärstruktur größtenteils über nicht-kovalente Bindungen und nur selten mittels Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Untereinheiten sowie den einzelnen Hexameren aufrechterhalten wird (Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995) (Abb. A.4).

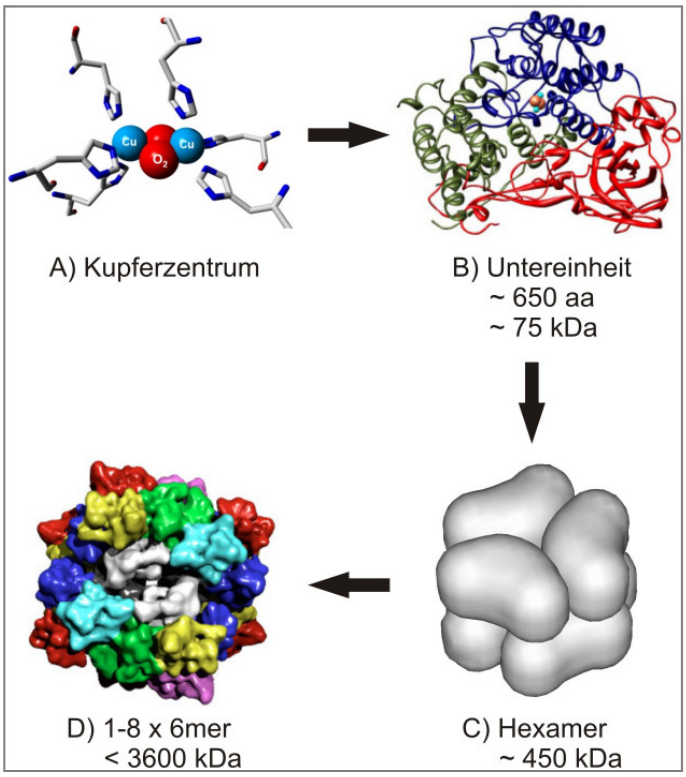

Abb. A.4: Aufbau und Struktur des Arthropoden-Hämocyanins. A) Das Typ3-Kupferzentrum mit den sechs koordinierenden Histidinen, den zwei Kupferionen (hellblau) sowie gebundenem Sauerstoff (rot). B) Untereinheit aus der Domäne 1 (grün), der Domäne 2 (blau) und der Domäne 3 (rot). C) Einzelnes Hexamer aus sechs Untereinheiten. D) Multihexamer. Abb. aus: van Holde et al., 2001 (A); Dürr, 2008, PDB-ID 1NOL (B); Burmester, 2002 (C) und Martin et al., 2007 (D).

Die Assoziation zu einem Hexamer von 1 x 6 sowie zu oligohexameren Strukturen von 2 x 6, 4 x 6 bis hin zu 8 x 6 erfolgt dabei innerhalb der Arthropoden artspezifisch (Markl, 1986; Markl und Decker, 1992; Markl, 1996) (Abb. A.5).

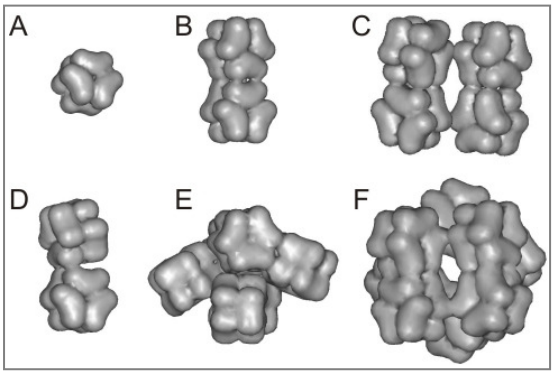

Abb. A.5: Vereinfacht dargestellte Quartärstruktur einiger Arthropoden-Hämocyanine. A) 1 x 6 Hämocyanin vieler Arthropoden. B) 2 x 6 Hämocyanin vieler Spinnen (z.B. *Cupienius salei*). C) 4 x 6 Hämocyanin der Arachniden (z.B. *Eurypelma californicum*). D) 2 x 6 Hämocyanin der Crustacea (z.B. *Homarus americanus*). E) 6 x 6 Hämocyanin der Myriapoden (z.B. *Scutigera coleoptera*). F) 8 x 6 Hämocyanin der Xiphosura (z.B. *Limulus polyphemus*). Abb. aus Burmester, 2002.

Indem sich Hämocyanine stets zu solchen großen multimeren Proteinaggregaten zusammenlagern, werden der osmotische Druck und die Viskosität der Hämolymphe gering gehalten. Sie werden beim Biosyntheseprozess entweder über ein N-terminales Signalpeptid oder durch ein Aufplatzen der synthetisierenden Zellen in die Körperflüssigkeit freigesetzt (Mangum et al., 1985; Markl et al., 1990; Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995; Voit et al., 2000; Burmester, 2002; Pick et al., 2009), wo sie in Konzentrationen von 20-100 mg/ml vorkommen (Uglow, 1969a; Hagermann, 1983).

2.2.2. Bedeutung und weitere Funktion(en) von Hämocyanin

Nicht zuletzt wegen ihrer Größe sind die Hämocyanine schon seit langem Gegenstand verschiedener biochemischer und biophysikalischer Studien, die sich u.a. mit der Struktur und der Sauerstoffbindung befassen (van Holde and Miller, 1995; Markl, 1996; Terwilliger, 1998; Decker and Terwilliger, 2000; Bridges, 2001). Ihre komplexe Quartärstruktur ist für eine hoch kooperative Sauerstoffbindung mit sigmoidalen Sauerstoffbindungskurven verantwortlich, wobei Hämocyanine mit Hill-Koeffizienten bis über 7 die höchste bekannte Kooperativität in der Natur besitzen (Loewe, 1978; Decker et al., 1979; Decker und Sterner, 1990; Erker et al., 2005; Menze et al., 2005; Olianas et al., 2006; Ronda et al., 2007). Hämocyanine reagieren weiterhin sehr flexibel auf Veränderungen in der Körperphysiologie und der Umwelt des Organismus. Die reversible Bindung des Sauerstoffs ist durch verschiedene Effektoren beeinflussbar, so dass eine präzise Versorgung der Körperzellen ermöglicht wird. Entscheidend hierbei sind u.a. das Angebot sowie der aktuelle Bedarf an Sauerstoff, die Konzentration an Stoffwechselprodukten wie Laktat, sowie Veränderungen der Ionenstärke, des pH-Werts oder der Temperatur (Loewe, 1978; Mangum, 1985; Ellerton et al., 1983; Truchot, 1992; Zeis et al., 1992; Bridges, 2001; van Holde et al., 2001). Auch werden Hämocyaninen neben der Funktion als respiratorisches Protein zahlreiche weitere Aufgaben im Organismus zugeschrieben. Dazu zählt neben einer Beteiligung an der Energiespeicherung (Uglow, 1969a, 1969b; Depledge und Bjerregaard, 1989) auch eine Rolle im Metallmetabolismus und bei dem Transport von Metallionen (Zatta, 1984). In Betracht kommen ferner eine Funktion als Pseudophenoloxidase (Decker und Rimke, 1998; Decker und Tuczek, 2000; Decker et al., 2001; Nagai et al., 2001; Decker und Jaenicke, 2004, Decker et al., 2007) sowie eine Rolle bei der Härtung der Kutikula (Paul et al., 1994). Sie wurden als Quelle für antimikrobielle und antifungizide Peptide (Destoumieux-Garzon et al., 2001, Lee et al., 2003) ebenso beschrieben wie als Träger von Häutungshormonen (Jaenicke et al., 1999). Neben oder in Verbindung mit den Studien an Hämocyaninen gilt das Interesse vieler Untersuchungen auch den restlichen Vertretern der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden.

2.2.3. Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden

Die Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden umfasst neben den Hämocyaninen vier weitere Proteinklassen der Arthropoden, die trotz unterschiedlicher Funktionen infolge signifikanter Sequenzähnlichkeiten und evolutiver Verwandtschaft zusammengefasst werden (Burmester und Scheller, 1996; Burmester 2001; 2002). Zu diesen hämocyanin-

ähnlichen Proteinen gehören neben Enzymen (Phenoloxidasen) auch Speicherproteine (Pseudohämocyanine und Hexamerine) sowie bestimmte Rezeptoren (Hexamerinrezeptoren). Die Phenoloxidasen sind die einzigen Mitglieder, die wie die Hämocyanine ein Typ3-Kupferzentrum besitzen (Fujimoto et al., 1993; 1995; Kawabata et al., 1995; Burmester und Scheller, 1996). Dagegen haben die Pseudohämocyanine (Cryptocyanine) einiger dekapoden Krebse (Markl et al., 1979; Burmester, 1999a, Terwilliger et al., 1999) wie die Hexamerine der Insekten (Telfer und Kunkel, 1991; Beintema et al., 1994; Burmester et al., 1998a; 1998b; Burmester, 1999b) und die Hexamerinrezeptoren der Diptera (Burmester und Scheller, 1995a; 1995b; 1999; Burmester et al., 1999) ihre Kupferbindungszentren vermutlich im Laufe der Evolution verloren. Die entsprechenden sechs kupferbindenden Histidine dieser Proteine wurden dabei zumindest teilweise durch andere Aminosäuren ersetzt. Die Ähnlichkeit dieser Proteine spiegelt sich auch in ihrer Proteinstruktur wider. Bis auf die Hexamerinrezeptoren und die Phenoloxidasen der Insekten, deren Quartärstruktur noch unbekannt ist, bilden alle Vertreter hexamere Strukturen aus sechs Untereinheiten (Tabelle A.3).

Tabelle A.3: Übersicht über die Hämocyanin-Superfamilie (verändert nach Burmester, 2002)

	Hauptfunktion	Vorkommen	Kupfer	Struktur	Signalpeptid
Hämocyanine	O_2-Transport	Onychophora	+	unbekannt	-
		Chelicerata	+	1-8 x 6	-
		Crustacea	+	1-4 x 6	+
		Myriapoda	+	6 x 6	+
		Insecta	+	1 x 6	+
Phenoloxidasen	Tyrosinase	Crustacea	+	1 x 6	-
		Myriapoda	+	1 x 6	unbekannt
		Insecta	+	unbekannt	-
Pseudohämocyanine	Speicherung	Decapoda	-	1 x 6	+
Hexamerine	Speicherung	Insecta	-	1 x 6 oder 2 x 6	+
Hexamerinrezeptoren	Hexamerin-bindung	Insecta (nur Diptera)	-	unbekannt	+

Die Evolution der gesamten Hämocyanin-Superfamilie wird hauptsächlich auf Ebene diverser molekularphylogenetischer Studien nachvollzogen (Burmester, 2002; 2004). Dabei wird angenommen, dass die Phenoloxidasen einen Funktionswandel von einem sauerstoffumsetzenden Enzym über das respiratorische Protein Hämocyanin zu den Speicherproteinen durchlaufen haben. Mit solch einem Funktionswandel ist auch ein Wandel der Proteinstruktur verbunden. Sequenzvergleiche zeigten tatsächlich, dass nur sehr wenige Aminosäuren in allen Vertretern der Superfamilie strikt konserviert sind (Burmester und Scheller, 1996), wohingegen in den einzelnen Proteinklassen eine Vielzahl von konservierten Aminosäuren zu finden sind (Burmester et al., 1998b).

Informationen über die funktionelle und strukturelle Bedeutung dieser Aminosäuren fehlen allerdings in den meisten Fällen. Alle bisherigen Studien zur Proteinanalytik wurden unter Verwendung der nativen, aus dem jeweiligen Organismus aufgereinigten Proteine durchgeführt (Markl et al., 1979; Mousseron-Grall et al., 1997; Burmester, 1999a, Jaenicke und Decker, 2003; Martin et al., 2007). Weitergehende *in vitro*-Studien wie Mutageneseexperimente und viele Modellierungsversuche scheitern immer noch an dem Fehlen etablierter, rekombinanter Expressionssysteme.

2.2.3.1. Phenoloxidasen

Phenoloxidasen sind sauerstoffumsetzende Enzyme des Melaninstoffwechsels, die je nach ihrer katalytischen Funktion in Tyrosinasen [EC 1.14.18.1] und Catecholoxidasen [EC 1.10.3.1] unterteilt werden. Die Tyrosinasen katalysieren die o-Hydroxylierung von Monophenolen zu o-Diphenolen, welche anschließend von demselben aktiven Zentrum zu o-Chinonen oxidiert werden. Die erste Reaktion wird als Monophenoloxidase-, letztere als Diphenoloxidase-Aktivität bezeichnet. Catecholoxidasen dagegen sind nur in der Lage, den zweiten Reaktionsschritt zu katalysieren (Abb. A.6).

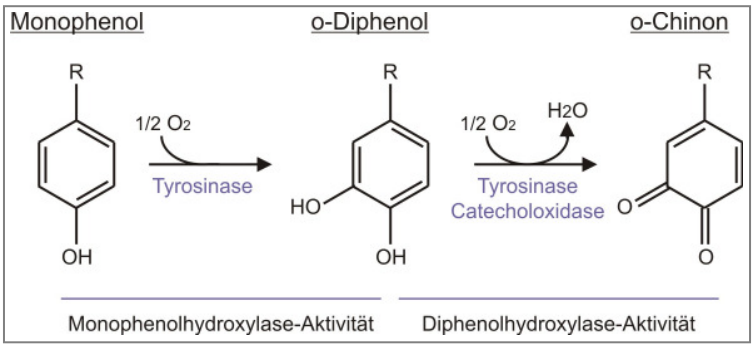

Abb. A.6: Jeweils katalysierte Reaktion(en) von Tyrosinasen und Catecholoxidasen. Sowohl im Rahmen der Monophenol- als auch der Diphenolhydroxylase-Aktivität wird molekularer Sauerstoff verbraucht.

Alle Arthropoden-Phenoloxidasen werden grundsätzlich als sogenannte Zymogene (Prophenoloxidase, PPO) synthetisiert und erst bei Bedarf durch Abspaltung eines N-terminalen Peptids aktiviert (Aspán et al., 1995; Kawabata, 1995; Chosa et al., 1997; Söderhall und Cerenius, 1998). Innerhalb der Arthropoda erfüllen diese Enzyme vielfältige Aufgaben. Sie sind an der Sklerotisierung der Kutikula, der humoralen Immunantwort und der Wundheilung beteiligt (Söderhall und Cerenius, 1998; Cerenius und Söderhall, 2004). Eine wichtige Rolle hierbei spielt das Melanin, welches in einer nichtenzymatischen Reaktion aus den o-Chinonen entsteht (Monder et al., 1957a; 1957b). So werden nicht nur Pathogene durch Melanin abgekapselt, auch am Wundverschluss ist Melanin beteiligt, indem es am Ort der Verwundung abgelagert wird (Lai-Fook, 1966; Söderhall et al., 1990; Gillespie et al., 1997; Sugumaran, 2002).

Phenoloxidasen der Insekten sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Heyneman, 1965; Ashida et al., 1971; Pau und Eagles, 1975; Aso et al., 1985; Tsukamoto et al., 1986; Andersson et al., 1989; Durrant et al., 1993; Aspan et al., 1995; Yasuhara et al., 1995). Dabei wurde nachgewiesen, dass manche Spezies sogar bis zu sechs verschiedene Phenoloxidasen exprimieren (Müller et al., 1999). Der in dieser Arbeit untersuchte Modellorganismus *D. melanogaster* besitzt insgesamt drei verschiedene Gene für Phenoloxidasen (Chase und Sugumaran, 2001), wobei bislang nur zwei der entsprechenden Enzyme für weitergehende biochemische Analysen aus dem Tier aufgereinigt werden konnten (Fujimoto et al., 1993; 1995). Bisherige Untersuchungen zur Strukturaufklärung von Insekten-Phenoloxidasen liefern ein sehr heterogenes Bild über den Aggregationszustand. Die beschriebenen Quartärstrukturen reichen von Monomeren (Hall et al., 1995; Chase et al., 2000) über Dimere (Fujimoto et al., 1993; Burks und Fuchs, 1995) bis hin zu Tetrameren (Aspan und Söderhall, 1991; Kopáček et al., 1995) und Pentameren (Hara et al., 1993). Für die Prophenoloxidase des Tabakschwärmers *Manduca sexta* wurde gezeigt, dass sich abhängig von der Ionenstärke Quartärstrukturen von Monomeren bis hin zu multimeren Strukturen ausbilden (Jiang et al., 1997). Nichtsdestotrotz weisen konservierte intrahexamere Kontaktstellen auf eine mögliche Hexamerbildung der Insekten-Phenoloxidasen hin, wie sie auch für die restlichen Mitglieder der Hämocyanin-Superfamilie charakteristisch ist (Burmester und Scheller, 1996; Burmester, 2000). Eine Bestätigung auf Ebene der Proteinanalytik steht allerdings noch aus.

2.2.3.2. Hexamerine

Wie Sequenzvergleiche zeigen, besteht ein enges Verwandtschaftsverhältnis zwischen Hexamerinen und Hämocyaninen (Willot et al., 1989; Burmester und Scheller, 1996; Burmester et al., 1998b). Die in den letzten Jahren auf molekularphylogenetischer Ebene durchgeführten Studien offenbaren, dass die Hexamerine die Schwestergruppe der Hämocyaninuntereinheit 1 der Insekten bilden (Burmester, 2001; Hagner-Holler et al., 2004; Burmester und Hankeln, 2007; Pick et al., 2009). Im Vergleich zu den Hämocyaninen besitzen Hexamerine aber aufgrund der höheren Variabilität ihrer Sequenz eine viel größere Formenvielfalt (Burmester et al., 1998b). Sie sind innerhalb der Insekten weit verbreitet und kommen in hohen Konzentrationen in der Hämolymphe der Tiere vor (Telfer und Kunkel, 1991; Burmester, 1999b). Neben einer Hauptrolle als Speicherprotein für nahrungsarme Zeiten wurden zahlreiche zusätzliche Funktionen vorgeschlagen (Telfer und Kunkel, 1991; Haunerland, 1996; Burmester, 1999b). So könnten Hexamerine beispielsweise als Carrierprotein fungieren, da in einigen Fällen die Bindung von

Juvenilhormonen (Braun und Wyatt, 1996) und Riboflavin (Telfer und Massey, 1987; Magee et al., 1994) beobachtet wurde. Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* besitzt insgesamt zwei Hexamerine (Roberts et al., 1977; Wolfe et al., 1977; Akam et al., 1978; Mousseron-Grall et al., 1997). Dabei bildet das Hexamerin LSP1 (Larval serum protein 1) ein Hexamer aus den drei nahe verwandten Untereinheiten α, β und γ, wohingegen das zweite Hexamerin LSP2 (Larval serum protein 2) nur aus einer einzigen Untereinheit besteht.

3. Hämoglobin und Hämocyanin der Crustacea

Innerhalb der Crustacea lassen sich viele Beispiele für die Existenz von respiratorischen Proteinen finden.

In verschiedenen „Entomostraca“[2)], wie z.B. den Branchiopoda, Ostracoda, Copepoda und Cirripedia, sorgt extrazelluläres Hämoglobin für die ausreichende Sauerstoffversorgung des Organismus (Fox, 1957; Mangum, 1983; Terwilliger, 2001; Weber und Vinogradov, 2001). Außerhalb der „Entomostraca“ ist die Existenz eines extrazellulären Hämoglobins mit respiratorischer Funktion nur für den Amphipoden *Cyamus scammoni* bekannt. Dieser Organismus bildet zudem in einem weiteren Punkt eine besondere Ausnahme. *C. scammoni* ist der bislang einzige bekannte Vertreter der Crustacea, für den eine Koeexistenz zweier respiratorischer Proteine beschrieben ist (Terwilliger, 1991; Terwilliger und Ryan, 2006). Neben dem Hämoglobin weist er zusätzlich Hämocyanin in seiner Hämolymphe auf (Terwilliger, 1991; Terwilliger und Ryan, 2006), wobei letzteres vermutlich eher eine Funktion als Pseudophenoloxidase ausübt (Terwilliger, 2008).

In den Malacostraca, d.h. den Hoplocarida, Eucarida (Decapoda, Euphausiacea) und Pericarida (Isopoda, Amphipoda, Mysidacea), übernimmt Hämocyanin die Funktion des Sauerstofftransporters in der Hämolymphe der Tiere (Mangum, 1983; Markl, 1986, Markl und Decker, 1992; Burmester, 2002). Charakteristisch für diese Hämocyanine ist eine hohe Variabilität in ihrer Organisation. Die Quartärstruktur und Zusammensetzung der Untereinheiten können sich sogar bei nahe verwandten Crustacea und wahrscheinlich sogar innerhalb von Populationen unterscheiden (Markl, 1986; Markl et al., 1986; Stöcker et al., 1988; Mangum und Joy, 1997). Auch werden einige der Untereinheiten vermutlich nur unter spezifischen physiologischen Bedingungen und in bestimmten Entwicklungsstadien exprimiert (Markl und Decker, 1992; Durstewitz und Terwilliger, 1997; Terwilliger, 1998). Insgesamt existieren innerhalb der Malacostraca drei immunologisch unterschiedliche Typen von Hämocyaninuntereinheiten, die mit α, β oder γ bezeichnet werden (Markl und Kempter, 1981; Markl, 1986; Stöcker et al., 1988). Bei den Decapoda sind alle drei Typen vertreten, wobei je nach Spezies Quartärstrukturen in Form von einzelnen Hexameren oder Dihexameren ausgebildet werden (Markl, 1986; Markl et al., 1986; Markl und Decker, 1992). Das Hämocyanin der in dieser Arbeit betrachteten Strandkrabbe *Carcinus maenas* beispielsweise setzt sich aus vier Untereinheiten unterschiedlicher molekularer Masse zusammen, die in ihrer Gesamtheit ein Dihexamer ausbilden (Markl et al., 1979; Markl, 1986). Bislang ist noch in keinem Fall ein eindeutiger Nachweis von Hämocyanin außerhalb der Malacostraca gelungen. Zwar postulierten Herberts und de Frescheville (1981) das Vorkommen von Hämocyanin im Parasiten *Sacculina carcini* (Cirripedia),

doch ist fraglich, ob dieses tatsächlich ein endogenes Protein ist und nicht vom Wirtstier *Carcinus maenas* stammt. Auch im Fall der Remipedia, einer erst 1979 entdeckten Klasse der Crustacea mit bislang 20 beschriebenen Taxa (Yager, 1981; Koenemann et al., 2007b), wird über ein Vorkommen von hämocyanin-ähnlichen Partikeln spekuliert (Yager, 1991; van der Ham und Felgenhauer, 2007). Ein eindeutiger Nachweis dieses respiratorischen Proteins stand zu Beginn meiner Arbeit allerdings noch aus.

[2)] Die Bezeichnung „Entomostraca“ steht nicht für ein Monophylum. Dieser Begriff wird in dieser Arbeit verwendet, um alle nicht zu den Malacostraca zugehörigen Crustacea (Branchiopoda, Cephalocarida, „Maxillopoda“, Ostracoda und Remipedia) zusammenzufassen.

4. Zielsetzung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Expression respiratorischer Proteine ausgewählter Arthropodenspezies. Die hierbei bearbeiteten Fragestellungen lassen sich in drei Themengebiete gliedern.

Zwei unabhängige *in vivo*-Studien bilden die ersten beiden Projektschwerpunkte, die sich hauptsächlich auf die Identifizierung respiratorischer Proteine in Krebsen konzentrieren. Eine Koexistenz zweier respiratorischer Proteine unterschiedlicher Funktion ist bislang nur für einen Vertreter der Malacostraca bekannt (Terwilliger, 1991; Terwilliger und Ryan, 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen sollten klären, ob weitere Beispiele für solche Koexpressionen innerhalb der Malacostraca existieren.
Ein weiterer Fokus lag auf der Klasse der Remipedia. Hier sollten anhand von molekularbiologischen und biochemischen Methoden Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob diese Krebse tatsächlich Hämocyanin exprimieren.

Die Gewinnung biologisch aktiver, rekombinanter Proteine ist für die Klärung verschiedenster Fragestellungen unerlässlich. Während hierbei den Studien an Hämoglobinen kaum Grenzen gesetzt sind, werden die Untersuchungen der Hämocyanine und verwandter Proteine durch das Fehlen etablierter, rekombinanter Expressionssysteme limitiert. Im letzten Projektschwerpunkt dieser Arbeit wurde daher das Ziel verfolgt, eine geeignete Vorgehensweise für die rekombinante Expression von Vertretern der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden zu entwickeln. Dabei wurden diverse pro- und eukaryotische Expressionssysteme auf ihre Eignung überprüft, diese Proteine in funktionsfähiger Form herzustellen.

B. Material und Methoden

1. Allgemeines

1.1. Geräte

Folgende in Tabelle B.1 aufgeführte Geräte wurden im Rahmen der Arbeiten verwendet:

Tabelle B.1: Geräteliste

Autoklav	3850 ELV (Tuttnauer, Breda Niederlande)
Brutschränke	Innova 4200 incubator shaker Innova 4230 refrigerated incubator shaker (beide: New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Elektronenmikroskop	Transmissionselektronenmikroskop EFTEM 912 (Zeiss, Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus DP71 Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg)
FPLC-Anlage	BioLogic HR System (BioRad, München)
Geldokumentationssystem	Dark Hood DH-40/50 (Biostep, Jahnsdorf)
Heizblöcke	Bio TDB-100 (Hartenstein, Würzburg) Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)
Kryostat	Mikroton-Kryostat Serie HM 500 (Microm, Walldorf)
pH-Meter	InoLab pH 720 (WTW, Weilheim)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
Spannungsgerät	Consort EV243 (Jencons, Bedfordshire GB)
Speed Vac	Speed Vac SC110 (Thermo/Savant, Dreieich)
Spektrometer	Lambda 2S Spektrometer (Perkin Elmer, Fremont, USA)
Thermocycler	LabCycler Gradient (SensoQuest GmbH, Göttingen) PCR Sprint Thermal Cycler (Hybaid GmbH, Heidelberg) T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
Ultraschallgerät	KLN Ultraschall GmbH (Heppenheim)
Waagen	SPO 51 (Scaltec, Göttingen) Sartorius BP210S (Sartorius AG, Göttingen)
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5804 mit Rotor A-4-44 (Eppendorf AG, Hamburg) Sigma 1-14 Mikrozentrifuge (Sigma, Osterode am Harz) Heraeus Labofuge 400R (Heraeus, Hanau) Heraeus Varifuge 3 OR mit Rotor 8080C (Heraeus, Hanau)

1.2. Chemikalien, Kits und sonstige Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in Analysequalität von den Firmen Boehringer (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Darmstadt) und Stratagene (Heidelberg) erworben.

Die Kits stammten von den Firmen IBA (Göttingen), Invitrogen (Groningen), PeqLab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Promega (Mannheim), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Sigma-Aldrich (Darmstadt) und Stratagene (Heidelberg).

Alle weiteren Komponenten wie z.B. Enzyme, Antikörper, Marker und Blotmembranen wurden von folgenden Firmen geliefert: Amersham Biosciences (Freiburg), Carl Roth (Karlsruhe), Dianova GmbH (Hamburg), Eppendorf AG (Hamburg), Eurogentec Proteomics GmbH (Köln), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), GE Healthcare (München), GENterprise Genomics GmbH (Mainz), Hartenstein (Würzburg), IBA (Göttingen), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), New England Biolabs (Frankfurt), Operon Biotechnologies GmbH (Köln), PeqLab GmbH (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Darmstadt).

Die benötigten Utensilien wie Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) sowie Zentrifugenröhrchen („Falcons“; 15 ml und 50 ml), Petrischalen, Zellkulturflaschen (T25, T75 und T175), sterile Einmalpipetten und Pipettenspitzen wurden von ABgene (Epsom, UK), Brand (Wertheim), Carl Roth (Karlsruhe), Greiner (Frickenhausen), Sarstedt (Nürnbrecht) und Starlab (Ahrensburg) bezogen.

1.3. Klone

Die cDNA-Konstrukte des *Drosophila melanogaster* Hexamerins „larval serum protein 2“ (LSP2) sowie der Prophenoloxidase 3 (PPO3) wurden vom „Drosophila Genomics Resource Center“, Bloomington, USA (https://dgrc.cgb.indiana.edu/) bezogen. Dabei wurden für eine beabsichtigte rekombinante Expression ausnahmslos Konstrukte mit der vollständigen cDNA-Sequenz aus der „BDGP Gold cDNA Collection“ bzw. der Reihe „BDGP DGC Release 1, 2 und 3“ verwendet (Tab. B.2).

Tabelle B.2: DGRC-Klone im Vektor pOT

Name	Stock	Sammlung	Resistenz
LSP2	LP03332	Gold	Chloramphenicol
	LP06260	EST	Chloramphenicol
	LP14586	EST	Chloramphenicol
PPO3	SD09866	DGC1	Chloramphenicol

1.4. Primer

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden im Kundenauftrag von der Firma Operon Biotechnologies GmbH (Köln) synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Zur Herstellung von Stocklösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/µl wurden diese in dem geeigneten Volumen HPLC-H_2O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Bei der Auswahl der entsprechenden Primersequenzen wurde zuvor darauf geachtet, dass diese eine ausgewogene Schmelztemperatur T_M von etwa 55-80 °C und einen G/C-Gehalt von etwa 40-60% besaßen. Zusätzlich sollten die Primer keine selbst-komplementären Bereiche besitzen und beide Primer eines Paares möglichst wenig Komplementarität zueinander aufweisen, um die Bildung von Primer-Konkatameren zu vermeiden. Die Primer wurden in der Regel mit dem Programm „OligoAnalyzer 3.1“ (http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx) auf alle diese Eigenschaften überprüft. Alternativ wurde der „Oligonucleotide Properties Calculator“ (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) verwendet.

1.5. Versuchstiere

Tabelle B.3 gibt die in dieser Arbeit verwendeten Tiere samt ihrer Bezugsquelle wieder.

Tabelle B.3: Versuchstiere und ihre Bezugsquellen

Tier		Bezugsquelle
Drosophila melanogaster **(Taufliege)**	Lebende Exemplare	AG Prof. Dr. Schneider, Biozentrum Grindel (Hamburg)
Carcinus maenas **(Gemeine Strandkrabbe)**	Lebende Exemplare	Biologische Anstalt Helgoland
Speleonectes tulumensis **(Remipedia)**	Stabilisiert in RNAlater	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wägele, Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig (Bonn)

2. Verwendete Organismen und ihre Kultivierung

2.1. Bakterien

2.1.1. Bakterienstämme

Es wurde ausnahmslos mit *Escherichia coli* K12-Bakterienstämmen gearbeitet, die in Form von kompetenten Zellen bei Invitrogen, Merck Biosciences und Promega bezogen wurden (Tabelle B.4). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Tabelle B.4: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung
JM109	e14$^-$(McrA$^-$) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (r_K^- m_K^+) *supE44 relA1* Δ(*lac-proAB*) [F$'$ *traD36 proAB lacI^{q}ZΔM15*]	Klonierungsstamm
TOP10	F$^-$ *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G	Klonierungsstamm
BL21(DE3)pLysS	F$^-$ *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)	Expressionsstamm
Rosetta(DE3)pLysS	F$^-$ *ompT hsdS$_B$ ($r_B^-m_B^-$) gal dcm, lacY1 (*DE3*)* pLysSRARE (Cam^R) Tuner-Stamm	Expressionsstamm
DH10Bac	F$^-$ *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara*, *leu*)7697 *gal*U *gal*K λ$^-$ *rps*L *nup*G/pMON14272/pMON7124	Klonierungsstamm, für die Herstellung von rekombinanten Bacmiden

2.1.2. Nährmedien und Antibiotika

Alle in Tabelle B.5 aufgeführten flüssigen und festen Medien wurden mit steril filtriertem, deionisiertem Wasser aus einer Millipore-Q-Anlage angesetzt und vor Gebrauch für 20 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert.

Tabelle B.5: Medien für die Bakterienkultivierung

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5 mit NaOH
L-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5 mit NaOH
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 10 ml 250 mM KCl, pH 7,0 mit NaOH; vor Gebrauch Zugabe von 5 ml einer 2 M autoklavierten $MgCl_2$-Lösung sowie 20 ml einer 1 M steril filtrierten Glucose-Lösung
LB-Platten	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5 mit NaOH, 15 g/l Agar

Agarhaltige LB-Medien wurden im Anschluss im Wasserbad auf ca. 60 °C abgekühlt, bevor sie unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (ø 85 mm) gegossen und nach dem Auskühlen bei 4 °C gelagert wurden. Alle flüssigen Medien dagegen wurden bis zum Gebrauch bei RT aufbewahrt.

Die verschiedenen Antibiotika wurden nach Sambrook et al. (1989) in der Regel als Stammlösungen in dest. H_2O angesetzt, durch einen 0,22-µm-Filter (Hartenstein) steril filtriert und in den angegebenen Endkonzentrationen in den Kulturen verwendet bzw. auf LB-Platten ausplattiert (Tabelle B.6). Chloramphenicol und Tetrazyklin wurden direkt in 100% Ethanol gelöst und verwendet. Die Lagerung aller Stocklösungen erfolgte grundsätzlich bei -20 °C.

Tabelle B.6: Antibiotika

	Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in dest. H_2O	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	34 µg/ml
Gentamicin	7 mg/ml in dest. H_2O	7 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml in dest. H_2O	10 µg/ml
Tetrazyklin	10 mg/ml in Ethanol	10 µg/ml

2.1.3. Ansetzen von bakteriellen Übernachtkulturen

Bakterielle Übernachtkulturen (üN-Kulturen) wurden in der Regel in einem 5 ml Volumen angesetzt, wobei das verwendete LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde. Angeimpft wurde unter sterilen Bedingungen entweder direkt mit Bakterienkolonien von LB-Platten oder aus Dauerkulturen.

2.1.4. Anlegen von bakteriellen Dauerkulturen

Beim Anlegen einer bakteriellen Dauerkultur wurden je 700 µl einer üN-Kultur mit 300 µl Glycerin versetzt und gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Um eine lange Haltbarkeit der Dauerkultur zu gewährleisten, wurde das Auftauen dieser - z.B. beim Animpfen von üN-Kulturen aus Dauerkulturen - weitgehend vermieden.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den drei verschiedenen Insektenzelllinien S2, Sf9 und High Five von Invitrogen gearbeitet (Tabelle B.7). Die Handhabung und Kultivierung aller Linien erfolgte im Wesentlichen entsprechend der Beschreibungen in den Anleitungen „*Growth and maintenance of insect cell lines*“, „*Guide to baculovirus expression vector systems and insect cell culture techniques*“ sowie „*Drosophila expression system*“ (alle: Invitrogen).

Tabelle B.7: Insektenzellen

	Organismus	Wachstumseigenschaft
S2	*Drosophila melanogaster*	schwach adhärent, Suspension
Sf9	*Spodoptera frugiperda*	adhärent
High Five	*Trichoplusia ni*	schwach adhärent

2.2.2. Nährmedien und Zusätze

Mit Ausnahme des Kälberserums (Biowest) wurden alle für die Zellkultur benötigten Medien und Zusätze von Invitrogen bezogen. Das so genannte „conditioned“ Medium bezeichnet dabei bereits gebrauchtes Vollmedium. Das Kälberserum wurde ausnahmslos kurz vor Zugabe in die Medien durch einen 0,22-µm-Filter steril filtriert. Während Einfriermedien für die Herstellung von Dauerkulturen kurz vor Gebrauch frisch angesetzt, ebenfalls durch einen 0,22-µm-Filter filtriert und sofort verwendet wurden, konnten Vollmedien einige Wochen lang bei 4 °C aufbewahrt werden (Tabelle B.8).

Tabelle B.8: Verwendete Nährmedien

	Vollmedium	Einfriermedium (steril filtriert)
S2	Schneider’s *Drosophila* Medium 10% fetales Kälberserum 50 units/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin	45% Vollmedium 45% conditioned Medium 10% DMSO
Sf9	Grace’s Insect Medium 10% fetales Kälberserum 50 units/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin	70% Vollmedium 20% fetales Kälberserum 10% DMSO
High Five	Express Five SFM 50 units/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 4 mM Glutamin	42,5% Vollmedium 42,5% conditioned Medium 5% fetales Kälberserum 10% DMSO

2.2.3. Passage von Zellkulturen

Alle Linien wurden in sterilen Zellkulturflaschen mit Belüftungsfunktion bei 27 °C im Brutschrank gehalten. Die verwendeten Flaschen mit einer Grundfläche von 25 cm^2, 75 cm^2 oder 175 cm^2 enthielten dabei jeweils 5 ml, 15 ml bzw. 25 ml Vollmedium. Konfluent gewachsene Sf9- und High Five-Zellen wurden bei einer Dichte von ca. 80% abgelöst und in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:5 umgesetzt. Hierfür wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen wurden mechanisch durch Spülen mit frischem Vollmedium abgelöst. Die schwach adhärent wachsenden S2-Zellen dagegen wurden alle 2-4 Tage in dem alten Medium resuspendiert, bei 100 x g für 5-10 min pelletiert und ein Mal mit frischem Vollmedium gewaschen. Nach Aufnahme in das doppelte Ausgangsvolumen an Vollmedium wurde die Zellzahl unter dem Mikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden anschließend mit Vollmedium auf mindestens 5 x 10^5 Zellen/ml verdünnt und in neue Flaschen überführt. Die Bestimmung der Vitalität aller Zelllinien erfolgte regelmäßig unter dem Mikroskop mit 0,2% Trypanblau gefärbten Zellen.

2.2.4. Anlegen von Dauerkulturen

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde die Zellzahl bestimmt, das alte Medium abgezogen und die Zellen einmal mit Vollmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Einfriermedium (Tabelle B.8) auf > 1 x 10^7 Zellen/ml verdünnt und je 1,9 ml der Zellsuspension in sterile 2 ml Kryoröhrchen (Sarstedt) pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden sofort in einem Kryo-Einfriergerät (Roth) üN bei -80 °C weggefroren und zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.5. Auftauen von Dauerkulturen

Eingefrorene Insektenzellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort in Falkons, in die 4 ml Vollmedium vorgelegt wurde, überführt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 100 x g wurde der DMSO-haltige Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 5 ml Vollmedium resuspendiert und anschließend in 25 cm^2-Zellkulturflaschen bei 26 °C im Brutschrank gehalten. Bei Bedarf konnte nach 24 h das Medium gewechselt werden.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1. Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Geweben erfolgte unter Verwendung des „DNeasy Blood & Tissue Kits“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Etwa 20 mg Gewebe wurden mechanisch mit Mörser und Pistill unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff zermahlen. Durch die Aufnahme in einen guanidinhaltigen Puffer wurden die Zellen lysiert und in einem folgenden Schritt die im Lysat befindlichen Proteine und die RNA verdaut. Nach einer anschließenden selektiven Bindung der genomischen DNA an eine Silikamatrix und der Elution mit 100 µl dest. H_2O konnte so eine Ausbeute von bis zu 40 µg erhalten werden. Die Probe wurde nach Möglichkeit sofort verwendet bzw. bis zum Gebrauch kurzzeitig bei -20 °C aufbewahrt. Eine Langzeitlagerung der DNA erfolgte nur bei -80 °C.

3.1.2. Isolierung von RNA

Durch die Allgegenwart und extreme Stabilität RNA-degradierender Enzyme, sogenannter RNasen, wurden bei Arbeiten mit RNA im Vorfeld besondere Maßnahmen getroffen. Alle hitzebeständigen Materialien wurden üN bei 200 °C gebacken, nicht hitzebeständige mit RNase AWAY® (Roth) gereinigt. Weiterhin wurden ausschließlich RNase-freie Filtertips (Starlab) sowie sterile, autoklavierte Eppendorf- und Falcon-Gefäße (Sarstedt) benutzt. Um RNase-freie Lösungen herzustellen, wurde ausschließlich mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes dest. H_2O verwendet. DEPC modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carbethoxyhistidin und ist dadurch ein starker RNase-Inhibitor (Fedorcsak und Ehrenberg, 1966). Das Wasser wird dabei mit 0,1% DEPC versetzt und üN unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgt ein Autoklavierschritt, um das DEPC vollständig zu zersetzen.

3.1.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus durchschnittlich 20-30 mg Gewebe wurde das „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) verwendet, welches auf der reversiblen Bindung von RNA an eine Silikamembran beruht. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei

das Gewebe zu Beginn in Stickstoff zermörsert wurde. Die Elution der RNA von der Säule erfolgte mit 30 µl RNase freiem H_2O. Die RNA wurde nach Möglichkeit sofort für weitere Versuche eingesetzt bzw. bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.2.2. Isolierung von Gesamt-RNA mittels Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus größeren Mengen Gewebe wurde auf eine Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion zurückgegriffen. Diese von Chirgwin et al. (1979) beschriebene und von Chomczynski et al. (1987) modifizierte Methode basiert auf dem starken Denaturierungsmittel Guanidinthiocyanat (GTC), welches zelluläre RNasen inaktiviert und selbst eine Extraktion intakter RNA aus sehr RNase-reichen Geweben ermöglicht. Das in Stickstoff zermörserte Gewebe wurde in 10 ml frisch angesetztem GTC-Puffer aufgenommen und nacheinander mit 1 ml 2 M Natriumacetat, 10 ml Phenol und 10 ml CIA versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe 30 min bei 4.500 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit einem Volumen 100%igem Isopropanol gemischt. Die Präzipitation der RNA erfolgte für mindestens 1 h bzw. üN bei -20 °C. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4500 x g und 4 °C wurde das Pellet in 10 ml GTC-Puffer aufgenommen und die Präzipitation unter denselben Bedingungen mit einem Volumen Isopropanol wiederholt. Das Pellet wurde mit einem Volumen 80%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 5-10 ml DEPC-H_2O gelöst. Die Lösung wurde bei 10.000 x g und 4 °C erneut zentrifugiert. Die RNA befand sich danach im Überstand. Sollte die RNA in hochreiner Qualität vorliegen, so wurde die RNA-Lösung mit einem Zehntel Volumen 8 M Lithiumchlorid und 0,7 Volumen 100%igem Isopropanol gemischt. Die Präzipitation erfolgte entweder für 1 h bei -80 °C oder üN bei -20 °C. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 x g für 60 min bei 4 °C wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, für 5 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert und bei RT getrocknet. Die gefällte RNA wurde anschließend in 5-10 ml H_2O aufgenommen und sofort für weitere Versuche verwendet bzw. bei -80 °C gelagert.

GTC-Puffer	100 g Guanidinthiocyanat in 117 ml DEPC-H_2O gelöst
	7 ml 0,75 M Natriumcitrat, pH 7
	10,6 ml N-Laurylsarcosinat
	1,52 ml β-Mercaptoethanol
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1

3.1.2.3. Isolierung von Gesamt-RNA mit PeqGOLD TriFast™

Für die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen aus einem einzigen Versuchstier wurde das Reagenz „PeqGOLD TriFast™“ (PeqLab) verwendet. Diese Methode beruht auf einer Einschritt-Flüssigphasen-Separation, wobei sich das Homogenat nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation in drei Phasen auftrennt: die wässrige Phase beinhaltet die RNA, wohingegen sich die DNA in der organischen Phase und der Interphase befindet. Die organische Phase enthält zusätzlich auch alle Proteine. Die Durchführung der RNA-Extraktion erfolgte im Wesentlichen nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde das Versuchstier abweichend vom Protokoll zuerst in flüssigem Stickstoff zermörsert und anschließend in das entsprechende Volumen PeqGOLD TriFast™ aufgenommen. Die aus der wässrigen Phase präparierte RNA wurde abschließend in ca. 20 µl HPLC-H_2O gelöst und sofort weiterverwendet bzw. bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung von DNA sowie RNA wurde eine Absorptionsmessung bei 260 nm mit einem Spektralphotometer durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Für die Absorption sind die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich, wobei nicht basengepaarte Nukleinsäuren eine höhere Absorption besitzen. Für die Messung wurden die Nukleinsäuren so mit dest. H_2O verdünnt, dass die Extinktion bei A_{260} zwischen 0,1-1 lag. Der Null-Abgleich erfolgte mit dest. H_2O. Mit den gemessenen Extinktionswerten konnte die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung mit folgenden Relationen errechnet werden:

A_{260} = 1,0 entspricht 50 µg/ml für doppelsträngige Nukleinsäuren
A_{260} = 1,0 entspricht 40 µ g/ml für einzelsträngige Nukleinsäuren

Des Weiteren wurde auch das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt, damit die Reinheit der DNA bzw. RNA abgeschätzt werden konnte. Der entsprechende Quotient sollte für reine DNA Werte von 1,8-1,9 sowie für reine RNA Werte von 1,9-2,0 aufweisen (Sambrook et al., 1989).

3.3. Elektrophorese von Nukleinsäuren

3.3.1. DNA-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Gelelektrophorese (Gelsystem MINI, CTI GmbH) in 1%igen Agarosegelen, welche durch das Aufkochen der entsprechenden Agarosemenge in TBE-Puffer hergestellt wurden. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes von 5 V/cm Elektrodenabstand konnten die zuvor mit 6 x Loading Dye (Fermentas) versetzten DNA-Proben ihrer Molekularmasse nach aufgetrennt werden. Als Größenstandard diente der Marker „Gene Ruler DNA Ladder Mix“ der Firma Fermentas. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 min in Ethidiumbromid gefärbt und 1 min in dest. H_2O gespült. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Beleuchtung (λ= 312 nm).
Für eine sich bei Bedarf anschließende Extraktion von gewünschten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „Mini Elute Gel Extraction Kit“ von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Kit erlaubt die Aufreinigung von 0,1-10 kb DNA-Fragmenten aus Agarosegelstücken, wobei über eine Säule mit immobilisierter Glasmilch bis zu 10 µg DNA isoliert werden können. Die Ausbeute beträgt typischerweise 70-80%.

10 x TBE	0,89 M Tris
	0,89 M Borsäure
	0,5 M EDTA, pH 8,0
E-Puffer	0,36 M Tris
	0,3 M NaH_2PO_4
	0,1 M Na_2-EDTA
Ethidiumbromid	10 mg Ethidiumbromid auf 1 Liter E-Puffer

3.3.2. RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität extrahierter RNA wurden Agarosegelelektrophoresen im Gelsystem MINI (CTI GmbH) durchgeführt. Aufgrund der Eigenschaften von RNA, stabile Sekundärstrukturen wie z.B. Doppelstränge oder Loops auszubilden, erfolgten diese Elektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen unter Zusatz von Formaldehyd. Das Agarosegel wurde vorbereitet, indem 0,4 g Agarose in 30 ml dest. H_2O und 4 ml 10 x MOPS-Puffer aufgekocht wurden. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 6,8 ml Formaldehyd hinzugegeben und das Gel wurde gegossen. Die RNA-Proben wurden 1:1

mit 2 x RNA-Loading Dye (Fermentas) versetzt, 5 min bei 65 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Nach erfolgter Elektrophorese bei 4-5V/cm Elektrodenabstand mit 1 x MOPS als Laufpuffer konnte die RNA durch das im Loading Dye bereits enthaltene Ethidiumbromid sofort photographiert werden.

10 x MOPS-Puffer	0,2 M MOPS, pH 7
	0,05 M NaAcetat, pH 7
	0,1 M EDTA, pH 8

3.4. Reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurde auf das „SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit“ von Invitrogen zurückgegriffen. Dabei wurde die Reaktion mit 2 µg RNA unter Verwendung von Oligo$(dT)_{18-25}$-Primern im Wesentlichen nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei allerdings die Reverse Transkription (RT) bei 50 °C auf 90 min verlängert wurde. Die so gewonnene cDNA wurde umgehend als PCR-Template verwendet bzw. bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.5. Polymerase-Kettenreaktion

Um definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren und dabei bei Bedarf Modifikationen am 5’- bzw. 3’-Ende durch die Verwendung entsprechender Primer einzufügen, wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki et al. (1988) verwendet. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden die Template-DNA, je 10 pmol Primer, ca. 40 nmol dNTPs und Polymerase-spezifischer Puffer mit HPLC-H_2O gemischt. Je nach Fragestellung wurden verschiedene Polymerasen nach Herstellerangaben verwendet. Bei der Herstellung von Expressionskonstrukten, bei der die Amplifikation der exakten Ausgangssequenz wichtig ist, wurde mit der „Phusion High Fidelity Polymerase“ von Finnzymes (Vertrieb NEB) gearbeitet. Für eine beabsichtigte TA-Ligation des Amplifikats in den Vektor pGEM®-T Easy (Promega) bzw. TOPO (Invitrogen) wurde aufgrund ihrer matrizenunabhängigen Terminalen Transferase-Aktivität eine Taq-Polymerase aus dem „PCR Selection Kit - High Specificity“ von Invitrogen eingesetzt. In allen Fällen, in denen größere Amplifikate aus Bacmid-DNA bzw. genomischer DNA gewonnen werden sollten, wurde das „Expand Long Template PCR System“ (Roche) verwendet. Das Temperaturprofil der PCR wurde individuell - abhängig von der Größe der zu amplifizierenden

Sequenz, der Primer-Annealing-Temperaturen sowie der verwendeten Polymerase - angepasst (Tabelle B.9).

Tabelle B.9: Profil der PCR

	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	98/94 °C	5-10 min	
Denaturierung	98/94 °C	20-60 sec	30-35 x
Primer-Annealing	50-62 °C	20-60 sec	30-35 x
Elongation	68/72 °C	1-5 min	30-35 x
Finale Elongation	68/72 °C	5-10 min	

Zur Erhöhung der Ausbeute bzw. Spezifität der Reaktion wurde bei Bedarf eine so genannte *nested*-PCR unter Verwendung von zwei Primerpaaren durchgeführt, bei der das in der ersten PCR erzeugte Amplifikat als Template für eine weitere PCR diente. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte in einem 1%igen Agarosegel, gewünschte Banden wurden anschließend unter UV-Licht ausgeschnitten und aufgereinigt (B.3.3.1.).

3.6. RACE: Rapid amplification of cDNA-ends

Die Ermittlung von unbekannten 5'- bzw. 3'-Nukleotidabschnitten einer cDNA-Sequenz wird durch die Methode der *Rapid amplification of cDNA ends* (RACE) ermöglicht. Dieses Verfahren basiert auf einer abgewandelten RT-PCR, die erst durch die Anlagerung von Oligonukleotid-Adaptern an die Enden von mRNA-Strängen ermöglicht wird (Maruyama und Sugano, 1994; Schaefer, 1995; Volloch et al., 1994). Ausgehend von einer bekannten cDNA-Teilsequenz können somit durch den Einsatz entsprechender adapter- und genspezifischer Primer im Rahmen einer PCR fehlende Sequenzabschnitte amplifiziert und entsprechende Transkripte vervollständigt werden. Die Durchführung der RACE erfolgte im Wesentlichen nach Herstellerangaben unter Verwendung des „*GeneRacer® Kit with SuperScript™ III RT and TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing*“ (Invitrogen). Zur Ermittlung unbekannter 5'-Enden wurde eine 5'-RACE mit etwa 4 µg RNA durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass der 5'-RACE-Adapter selektiv nur an freie 5'-Monophosphatgruppen intakter mRNA-Stränge ligiert wird, wurde die RNA zuvor einigen essentiellen Schritten unterzogen. Zu Beginn erfolgte die Behandlung mit einer Phosphatase (hier: CIP, engl.: *calf intestinal phosphatase*), um die Dephosphorylierung degradierter mRNA sowie von tRNA und rRNA zu erreichen. Intakte mRNA ist dabei durch die CAP-Struktur an seinem 5'-Ende vor dem Angriff des Enzyms geschützt. Die Abspaltung dieser CAP-Struktur wurde durch die nachfolgende Inkubation mit einer

Pyrophosphatase (hier: TAP, engl.: *tobacco acid pyrophosphatase*) erreicht und anschließend der 5'-GeneRacer®-RNA-Oligo-Adapter mit Hilfe einer T4-RNA-Ligase an die nun freiliegenden 5'-Monophosphatgruppen der mRNA-Stränge ligiert**.** Die so aufbereitete mRNA wurde in einer Reversen Transkription unter Verwendung von Random Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Eine Amplifikation der gewünschten Sequenzabschnitte aus der cDNA erfolgte mit den entsprechenden adapter- sowie genspezifischen Primern im Rahmen einer so genannten *nested*-PCR, bei der das in der ersten PCR erzeugte Amplifikat als Template für eine weitere PCR diente. Für die 3'-RACE dagegen wurden 4 µg RNA sofort ohne weitere Aufbereitung mit dem GeneRacer® Oligo dT-Primer in cDNA umgeschrieben. Die weitere Vorgehensweise folgte dem Protokoll der 5'-RACE und beinhaltete ebenfalls eine *nested*-PCR zur Amplifikation des jeweils gewünschten Sequenzabschnittes. Standardmäßig erfolgte die Analyse der RACE-Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese, wobei gewünschte Banden unter UV ausgeschnitten und aufgereinigt wurden (B.3.3.1.). Die Produkte wurden anschließend für eine TA-Klonierung eingesetzt und sequenziert (B.3.7.).

3.7. Allgemeine Klonierungstechniken

3.7.1. TA-Klonierung

Basierend auf der Terminalen Transferase-Aktivität von Taq-Polymerasen weisen die von ihnen in einer PCR amplifizierten DNA-Fragmente am 3'-Ende ein Adenosin auf. Dieses überhängende Adenosin ermöglicht die Ligation der Amplifikate in lineariserte Vektoren, die einen einfachen Thymidin-Überhang besitzen. Für die Methode dieser sogenannten TA-Klonierung wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Vektor-Systeme verwendet. Das „pGEM®-T Easy-System" (Promega) ermöglicht die Ligation von Amplifikat und Vektor unter Verwendung der T4-Ligase. Hierfür wurden 25 ng des pGEM®-T Easy-Vektors mit dem PCR-Produkt in 3-6-fachem molaren Überschuss, 2 x Ligasepuffer sowie dest. H_2O auf ein Volumen von 9 µl aufgefüllt und mit 1 µl T4-Ligase versetzt. Die Ligationsreaktion wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Alternativ wurde als zweites System das „TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing" von Invitrogen (Groningen) nach Herstellerangaben verwendet. In diesem Fall liegen die 3'-Desoxythymidin-Überhänge der linearisierten TOPO-Vektoren kovalent an die Topoisomerase I des *Vaccina*-Virus gebunden vor. Die Ligationsreaktion erfolgt erst, wenn die 5'-Hydroxylgruppen der PCR-Produkte diese Bindung zwischen Vektor und Enzym

angreifen, was schließlich zu einer Abspaltung der Topoisomerase führt.

3.7.2. Klonierung mit Restriktionsendonukleasen

Für eine beabsichtigte Ligation eines PCR-Produktes in einen Expressionsvektor wurde auf die Klonierung mit Restriktionsendonukleasen zurückgegriffen. Dabei erfolgte nach der Amplifikation der gewünschten Sequenz mittels PCR (B.3.5.) sowie dem Verdau von Amplifikat und Vektor (B.3.7.2.1.) die Ligation beider mittels T4-Ligase (B.3.7.2.2.). Bei der Erstellung der entsprechenden PCR-Primer wurden zuvor jeweils die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen an den 5'-Enden der Primer angefügt, die in den Polylinkern der jeweiligen Vektoren zur Verfügung standen. Zusätzlich wurde mit dem Programm „Webcutter 2.0“ (http://users.unimi.it/~camelot/tools/cut2.html) sichergestellt, dass die zu amplifizierenden Sequenzen keine entsprechenden internen Schnittstellen für die gewählten Enzyme besaßen. Um eine gerichtete Ligation zu ermöglichen, wurden zwei unterschiedliche Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen verwendet. Da die meisten Typ II-Endonukleasen keine direkt am Ende liegenden Erkennungssequenzen schneiden, wurde am 5'-Ende der Primer vor die Erkennungssequenz die Basenabfolge TACTCA angehängt. Alle im Rahmen dieser Arbeit für die Klonierungen verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle G.11 aufgeführt.

3.7.2.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Behandlung der DNA mit Restriktionsendonukleasen diente der Vorbereitung von Ligationen. Die hierbei verwendeten Typ II-Endonukleasen bakteriellen Ursprungs sind in der Lage, doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen zu spalten. Der Verdau von Plasmid-DNA sowie PCR-Produkten erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurde die zu analysierende DNA mit dem/den gewünschten Enzym(en) unter definierten Pufferbedingungen für ca. 3 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Bei Bedarf wurde die gespaltene DNA mit Hilfe des „QiaQuick PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die DNA mit 30 µl dest. H_2O von der Säule eluiert wurde. Die Ausbeute betrug dabei typischerweise 90-95%.

3.7.2.2. Ligation

Es wurden ausschließlich DNA-Fragmente mit komplementären überhängenden Enden (*sticky ends*) ligiert. Ligationen erfolgten in einem 10 µl Ansatz, der etwa 50-100 ng Vektor-DNA, Insert in 3-6fachem molaren Überschuss, Ligationspuffer und T4-Ligase

enthielt. Der Ligationsansatz wurde mindestens 1 h bei 8 °C inkubiert, die Ligase schließlich durch 10minütiges Erhitzen bei 72 °C inaktiviert und mit dem Ansatz ein Klonierungsstamm transformiert (B. 3.7.3.).

3.7.3. Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Stämmen mit Ligationsprodukten bzw. Plasmiden erfolgte grundsätzlich unter Verwendung von speziellen Klonierungsstämmen wie z.B. TOP10 (Invitrogen) oder JM109 (Promega). Für rekombinante Proteinexpressionen in Bakterien wurde anschließend der Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS (Stratagene) bzw. der Stamm Rosetta(DE3)pLysS (Novagen) mit dem sequenzierten Plasmid transformiert. Hierzu wurden die entsprechenden kompetenten Zellen bei RT aufgetaut und mit bis zu 6 µl Ligationsansatz bzw. mit 50 ng des Expressionskonstruktes versetzt. Nach einer Inkubation auf Eis von bis zu 30 min gefolgt von einem 30 sec dauernden Hitzeschock bei 42 °C wurde der Ansatz 2 min auf Eis abgekühlt und mit SOC-Medium auf 300 µl aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 150 rpm. Anschließend wurden je 50, 100 und 150 µl der Kultur auf vorgewärmten LB-Platten ausgestrichen. Zur Selektion von positiven Transformanten wurden vorher die entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Im Falle einer Blau-Weiß-Selektion wurden zusätzlich IPTG in einer Endkonzentration von 40 µg/ml sowie in DMF angesetztes X-Gal in einer Endkonzentration von 100 µg/ml ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte üN bei 37 °C.

3.7.4. Identifizierung positiver Transformanten via Klon-PCR-Screening

Zur Identifizierung von positiven Transformanten auf LB-Platten wurde die Methode des Klon-PCR-Screenings unter Verwendung des „RedTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix“ (Sigma-Aldrich) genutzt. Dieser Mix enthält bereits - mit Ausnahme von Primern und Template-DNA - alle die für die PCR benötigten Komponenten. Indem einzelne Bakterienkolonien als Template-DNA eingesetzt wurden, konnten mittels geeigneter Vektorprimer erfolgreich transformierte Kolonien identifiziert werden, die ein Insert der erwarteten Größe enthielten. Durch die Größe der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte so ebenfalls die Aussortierung von Kolonien mit religierten Vektoren. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde der PCR-Ansatz halbiert, die weitere Vorgehensweise entsprach den Vorgaben. Hierfür wurden die Ansätze mit je 10 pmol der einzelnen Primer versetzt. Anschließend wurde je eine Bakterienkolonie von der LB-Platte gepickt, kurz im Reaktionsansatz abgestreift und zum Animpfen einer üN-Kultur in 5 ml LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika (B.2.1.2., Tabelle B.6) überführt. Nach erfolgter

PCR bestehend aus 35 Zyklen und einer Annealing-Temperatur von 54 °C wurden die entstandenen Amplifikate via Agarosegelelektrophorese (B.3.3.1.) ausgewertet. Zum Anlegen von Dauerkulturen (B.2.1.4.) wurden positive Klone üN bei 37 °C und 150 rpm angezogen. Bei Bedarf wurde eine Plasmidisolierung (B.3.7.5.) durchgeführt und das jeweilige Insert sequenziert (B.3.7.6.).

3.7.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli*-Stämmen erfolgte mit dem „E.Z.N.A Miniprep Kit“ der Firma PeqLab nach Angaben des Herstellers. Grundprinzip des Systems ist die reversible Denaturierung von Plasmiden, die nach einer alkalischen Lyse unter geeigneten Bedingungen renaturieren und unter Hochsalzbedingungen selektiv an eine Silikamatrix binden. Die Elution erfolgt unter Niedrigsalzbedingungen mit dest. H_2O. Aus einer 5 ml (*high copy* Plasmide) bzw. 10 ml (*low copy* Plasmide) üN-Kultur konnten so bis zu 10 µg Plasmid-DNA gewonnen werden.

3.7.6. Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmiden wurden mit den vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten 2’-,3’-Didesoxynukleosid-5’-triphosphaten (ddNTPs) auf der Basis der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) nach einem modifizierten Protokoll (Prober et al., 1987; Carothers et al., 1989) durchgeführt. Verwendet wurde das „*ABI Big Dye Terminator v.3.1. Cycle Sequencing Kit*“ (Applied Biosystems), wobei je Sequenzieransatz ca. 170-350 ng Plasmid-DNA mit 10 pmol Primern, 5 x Sequenzierungspuffer sowie 2 µl Big Dye Premix 3.1 versetzt und mit HPLC-H_2O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt wurden. Die Reaktion wurde in Thermocyclern in einem 35 Zyklen umfassenden Zwei-Schritt-Protokoll durchgeführt, welches aus einer Denaturierung der Proben für 15 sec bei 96 °C sowie dem Primer-Annealing und der Synthese für 4 min bei 55 °C bestand. Die anschließende Aufreinigung und Auftrennung der Sequenzierprodukte wurde von einem kommerziellen Sequenzierservice (Genterprise Genomics Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz) durchgeführt.

4. Sequenzauswertung/Molekulare Phylogenie

In Sequenzierungsreaktionen (B.3.7.6.) ermittelte Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm Chromas 1.55 (Technylesium) editiert. Die Identifizierung dieser Sequenzen erfolgte durch einen Abgleich mit den Informationen aus den Online-Datenbanken (http://www.ncbi.nlm.nih.gov./BLAST/), welche mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) durchsucht wurden. Dieser Algorithmus wurde auch verwendet, um EST-Datenbanken nach gewünschten Sequenzen zu durchsuchen. Durch einen mit dem Programm Spidey (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/) durchgeführten Abgleich von genomischer und cDNA-Sequenz wurden Introns/Exons identifiziert. Für diverse weitere Analysen wurden bei Bedarf verschiedene Programme der ExPASy Tools verwendet (http://www.expasy.org/tools/): Während mit dem Programm PSORT II (Horton und Nakai, 1996; 1997) Sequenzen auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht wurden, wurde die Präsenz eines hydrophoben Signalpeptids mit SignalP 1.1 (Nielsen et al., 1997; Emanuelsson et al., 2007) überprüft. Mögliche N-Myristoylierungsstellen wurden mit dem Myristoylater (Bologna et al., 2004), mögliche N-Glykosylierungsstellen mit NetNGlyc 1.0 (Gupta et al., 2004) vorausgesagt.

Alignments aus Sequenzen wurden entweder mit MAFFT (http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/) unter der Verwendung des L-INS-i-Algorithmus und der BLOSUM 62 Matrix (Katoh et al., 2005) oder manuell mit Genedoc 2.6 (Nicholas et al., 1997) erstellt und konnten anschließend als Grundlage für Stammbaumanalysen dienen. Zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen wurde auf diverse Programme zurückgegriffen. Neighbor-joining Stammbäume wurden mit PHYLIP 3.66 (Felsenstein, 2004) oder dem BioNJ-Algorithmus (Gascuel, 1997) erstellt. Die Zuverlässigkeit der erhaltenen Bäume wurde mittels Bootstrapping mit 100 „Pseudosamples“ überprüft (Felsenstein, 1985). Bayesianische Analysen erfolgten mit MrBayes 3.1 (Huelsenbeck und Ronquist, 2001) unter Annahme des WAG-Modells (Whelan und Goldman, 2001) und einer Gamma-Verteilung der Substitutionsraten. Es wurde dabei ein „Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) sampling“ mit einer *cold chain* und drei *heated chains* durchgeführt. Maximum likelihood Analysen wurden mit RAxML 7.0.3 (Stamatakis, 2006) unter Verwendung des WAG Modells erstellt, wobei auch hier die Zuverlässigkeit der Bäume mittels Bootstrapping überprüft wurde. Die Darstellung aller molekularen Stammbäume erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit dem Programm Treeview 1.6.6 (http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html).

5. Rekombinante Expression von Proteinen

5.1. Expression von Proteinen in Bakterien

Die bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen erfolgte im T7-Expressionssystem (Novagen) unter Verwendung einer Kombination aus pET-Vektoren und den Chloramphenicol-resistenten Expressionsstämmen BL21(DE3)pLysS sowie Rosetta(DE3)pLysS. In allen pET-Vektoren steht das Zielgen unter Kontrolle von starken Promotoren wie T7 bzw. T7*lac*, welche von der viralen T7-RNA-Polymerase erkannt werden und eine hohe Transkriptionseffizienz vermitteln. Dabei werden erst durch die Zugabe von IPTG sowohl die Transkription des Zielgens als auch die der in das Bakteriengenom integrierten T7-RNA-Polymerase induziert. Mit diesem ursprünglich von Studier et al. (1986) und Rosenberg et al. (1987), sowie Studier et al. (1991) entwickelten T7-Promotor-System können Expressionsniveaus von etwa 50% des Gesamtzell-proteins erreicht werden. Beide hier verwendeten Bakterienstämme besitzen zusätzlich ein eigenes Plasmid (pLysS), welches das Enzym T7-Lysozym codiert. Dies ist besonders bei der Expression toxischer Genprodukte von Vorteil, da das Lysozym mit der T7-Polymerase assoziiert und deren Aktivität inhibiert, so dass eine Basalexpression vor Induktion verhindert wird. Weiterhin kann durch die hohe Lysozymkonzentration der Zellaufschluss durch einfaches Einfrieren und Auftauen der Zellpellets erfolgen. Alle im Rahmen dieser Arbeit angelegten Dauerkulturen aus transformierten Bakterienstämmen sind tabellarisch im Anhang (G.5.) mit den jeweils für die Proteinexpression benötigten Antibiotika verzeichnet.

Zur Durchführung der rekombinanten Proteinexpression wurden aus den einzelnen bakteriellen Dauerkulturen üN-Kulturen in LB-Medium mit den jeweils benötigten Antibiotika angeimpft und üN bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Expressionskulturen wurden anschließend in einem Volumen von 50, 100, 800 ml sowie 1 L L-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben angesetzt, wobei deren Füllvolumen maximal bei 30% lag, um einen ausreichenden Gasaustausch zu gewährleisten. Sie wurden dabei mit maximal 0,5% der üN-Kulturen versetzt und bei 30-37 °C und 150 rpm bis zur exponentiellen Phase bei einer OD_{600}= 0,5-0,8 inkubiert. Die Expression wurde durch die Zugabe von 0,4 mM steril filtriertem IPTG induziert und die Kulturen wurden bei 150 rpm für 3 h bei 37 °C bzw. 16 h bei 26 °C oder mindestens 20 h bei 18 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen bei 4000 x g und 4 °C für 20-30 min geerntet und in einem geeigneten Volumen an Tris-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden grundsätzlich mindestens üN bei -20 °C weggefroren, bevor sie am Folgetag durch Sonifizieren auf Eis bei mittlerer

Beschallungsintensität aufgeschlossen wurden. Dabei wurde nach jedem Beschallungsintervall eine 30-sekündige Pause eingelegt, um eine zu starke Erwärmung des Ansatzes zu vermeiden.

5.1.1. Durchführung von Testexpressionen

Zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen sowie der Analyse der Proteinlöslichkeit wurden wie zuvor beschrieben Testexpressionen bei verschiedenen Expressionstemperaturen in je 50 ml-Ansätzen durchgeführt. Dabei wurde für die spätere Auswertung 1 ml als „Induktionskontrolle“ vor Zugabe von IPTG abgenommen. Analog dazu erfolgte die Abnahme von 1 ml als „Expressionskultur“ nach Beendigung der Expression. Beide Proben wurden 5 min bei 4.000 x g abzentrifugiert und das Zellpellet wurde je nach Größe in 50-200 µl 2 x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Diese Kontrollen wurden 5 min bei 95 °C gekocht und kurz auf Eis abgekühlt. Die Restkultur wurde abzentrifugiert und je nach Größe des Zellpellets in 1-5 ml 20 mM Tris/HCl, pH 8,5 aufgenommen. Nach einer Lagerung bei -20 °C üN wurde die Probe bei RT aufgetaut und 2-3 x je 1 min bei mittlerer Beschallungsintensität auf Eis sonifiziert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10.000 x g für 20 min wurde der lösliche „Überstand“ abgenommen und das unlösliche „Pellet“ in 1 ml 1 x PBS resuspendiert. Die Lagerung aller Proben bis zur Auswertung mittels SDS-PAGE erfolgte bei -20 °C.

4 x Lämmli	1,25 ml Tris/HCl, pH 6,8
	2 ml 10% SDS
	1 ml Glycerin
	0,25 ml dest. H_2O
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	(vor Gebrauch 10% β-Mercaptoethanol frisch zusetzen)
10 x PBS, pH 7,5	1,4 M NaCl
	27 mM KCl
	81 mM Na_2HPO_4
	15 mM K_2HPO_4

5.1.2. Rekombinante Expression von löslichem Hämoglobin

Die Expression von Hämoglobinen erfolgte in Anwesenheit von 5'-Aminolaevulinsäure (ALA), einer Vorstufe der Hämgruppe. Aus insgesamt acht dieser ALA-Moleküle wird über mehrere Zwischenreaktionen das Protoporphyrin IX gebildet und die Synthese des Häms anschließend durch den Einbau von zweiwertigem Eisen vervollständigt.
Die Kulturen wurden dabei in einem Volumen von je 800 ml L-Medium mit den entsprechenden Antibiotika und 1 mM ALA angesetzt, mit 1 ml üN-Kultur angeimpft und bei 26 °C bis zu einer OD_{600}= 0,5 inkubiert. Nach Induktion mit 0,4 mM IPTG erfolgte die Expression üN bei 26 °C. Die Bakterienzellen wurden geerntet und anschließend jeder Kulturansatz in ca. 30 ml eines Puffers bestehend aus 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 1 mM DTT, 1 mM $MgCl_2$, 8 µg/ml DNase und 4 µg/ml RNase resuspendiert. Zugesetzt wurden weiterhin die Proteasehemmer „Pefabloc SC protease inhibitor" (Roth) und „Complete protease inhibitor mixture" (Roche Applied Science) in den jeweils von den Herstellern empfohlenen Konzentrationen. Die Ansätze wurden aliquotiert und in 5 ml-Proben üN bei -20 °C weggefroren. Am Folgetag wurden die Zellen in Eiswasser aufgetaut und durch Sonifizieren auf Eis aufgeschlossen. Dabei wurde jede Probe maximal 5 x je 1 min bei mittlerer Intensität beschallt. Der nach Zellaufschluss anstehende DNase/RNase-Verdau erfolgte für 2 h bei 37 °C und der lösliche Proteinüberstand wurde durch 20minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C von der Zelldebris abgetrennt. Nach Möglichkeit wurde der erhaltene Überstand sofort für die sich anschließende Proteinaufreinigung eingesetzt bzw. bis zur weiteren Bearbeitung kurzzeitig bei 4 °C gelagert.

5.1.3. Rekombinante Expression von löslichem Hexamerin

Die Expression von Hexamerinen erfolgte in Kulturansätzen von 1 Liter L-Medium mit den benötigten Antibiotika. Angeimpft wurde dabei mit je 5 ml üN-Kultur gefolgt von einer Inkubation der Ansätze bei 30 °C bis zu einer OD_{600}= 0,5-0,8. Nach Zugabe von 0,4 mM IPTG erfolgte die weitere Inkubation üN bei 26 °C. Die Bakterien wurden geerntet und das entstehende Zellpellet jedes 1 Liter-Expressionsansatzes wurde in maximal 20 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 aufgenommen. Nach Zugabe des Proteasehemmers „*Complete protease inhibitor mixture*" (Roche Applied Science) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration wurden die Proben aliquotiert und in 5 ml-Ansätzen üN bei -20 °C weggefroren. Am Folgetag wurden die Zellen in Eiswasser aufgetaut und durch Sonifizieren auf Eis aufgeschlossen. Jede Probe wurde maximal 5 x 1 min bei mittlerer Intensität beschallt. Der nachfolgende DNase/RNase-Verdau erfolgte für 2 h bei 37 °C, wonach der lösliche Proteinüberstand durch 20-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g

und 4 °C von der Zelldebris abgetrennt wurde. In der Regel wurde der erhaltene Überstand sofort für die sich anschließende Proteinaufreinigung eingesetzt bzw. kurzzeitig bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C gelagert.

5.1.4. Rekombinante Expression von löslichen Typ3-Kupferproteinen

Die Expression von löslichen Typ3-Kupferproteinen erfolgte in der Regel in einem 50-100 ml-Kulturvolumen. Eine Ausnahme dabei bildet die Expression als Thioredoxin-Fusionsprotein, bei der der Erhalt von löslichem Protein auch aus größeren Expressionsvolumina von bis zu 1 Liter L-Medium möglich war. Die entsprechenden Kulturen bestehend aus L-Medium mit den benötigten Antibiotika wurden bei Bedarf mit der entsprechenden Endkonzentration an steril filtriertem Kupfersulfat versetzt, mit bis zu 0,5% der üN-Kulturen angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600}= 0,6 inkubiert. Nach Zugabe von 0,4 mM IPTG erfolgte die Expression für 3 h bei 37 °C. Die Zellen wurden geerntet und pro 100 ml Ausgangskultur durchschnittlich in 1 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 resuspendiert. Nach Lagerung der Proben üN bei -20 °C wurden sie in Eiswasser aufgetaut, ca. 2-3 x je 1 min auf Eis sonifiziert und anschließend bei 10.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der erhaltene lösliche Überstand mit dem rekombinanten Protein wurde ausnahmslos sofort für weitere Versuche bzw. Aufreinigungsschritte verwendet.

5.2. Expression von Proteinen in Insektenzellen

5.2.1. „Bac-to-Bac Baculovirus Expression System"

Das „*Bac-to-Bac Baculovirus System*" ermöglicht eine transiente, virusvermittelte Expression in Insektenzellen mit einer hohen Expressionsrate des rekombinanten Proteins. Basierend auf den von Luckow et al. (1993) sowie Ciccarone et al. (1997) entwickelten Methoden werden via Tn7-Transposition schnell und effizient rekombinante Baculoviren generiert, die das zu exprimierende Gen enthalten. Mit diesen Viren werden Insektenzellen infiziert, wobei in diesen Zellen daraufhin nicht nur die Amplifikation von neuen Baculoviren erfolgt, sondern auch die Expression des im Virengenom codierten rekombinanten Proteins. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Schritte zur Generierung von rekombinanten Baculoviren folgten im Wesentlichen den Empfehlungen des Manuals „*Bac-to-Bac Baculovirus System*" von Invitrogen. Hierbei wurde allerdings die zu exprimierende Sequenz durch gentechnische Methoden so modifiziert, dass eine Sekretion des rekombinanten Proteins in das Medium erreicht wurde.

5.2.1.1. Klonierung des Expressionskonstruktes

Die Amplifikation der Zielsequenz via PCR sowie die Klonierung des Expressionskonstruktes erfolgten gemäß der Beschreibung B.3.5. und B.3.7.2. Dabei wurde dem PPO3-Gen durch die Verwendung entsprechend modifizierter Primer (Anhang, Tabelle G.11) mittels PCR N-terminal das hydrophobe Sekretionssignal des humanen Meprin α sowie C-terminal der Strep-Tag II angefügt. Um später bei der Sekretion des rekombinanten Proteins ein korrektes Abspalten der N-terminalen Signalsequenz zu gewährleisten, wurde bei der Erstellung der Primer die Spaltstelle mit dem Programm SignalP (www.expasy.org bzw. http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) bestimmt und durch das zusätzliche Einfügen von Aminosäuren optimiert. Das Amplifikat wurde anschließend über die Schnittstellen NotI und XhoI in die sogenannte Expressionskassette des pFASTBac1-Vektors ligiert, wo es unter Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors des *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) steht. Diese Kassette wird beiderseits von bakteriellen Tn7-Transpositionselementen flankiert und enthält zusätzlich eine Gentamicin-Resistenz sowie ein SV40 Polyadenylierungssignal (SV40pA) zur effizienten Transkriptions-Termination und Polyadenylierung der mRNA.

5.2.1.2. Herstellung von rekombinanten Bacmiden in E. coli

Die Integration der Expressionskassette des pFASTBac1-Konstruktes in das Virengenom (Bacmid) erfolgte in dem *E. coli*-Stamm DH10Bac. Diese Zellen enthalten nicht nur das ca. 136 kb große Bacmid mit der benötigten Tn7-Sequenz innerhalb des *LacZ*-Gens, sondern auch ein Helferplasmid, welches alle die für den Transpositionsvorgang benötigten Proteine codiert. Nach Transformation von kompetenten DH10Bac-Zellen mit dem Expressionskonstrukt wird durch die Integration der Kassette in das Bacmid das Leseraster des *LacZ* zerstört, so dass positive Konstrukte mittels Blau-Weiß-Selektion leicht identifiziert werden können. Für die Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente MAX Efficiency DH10Bac-Zellen (Invitrogen) mit 50 ng des Expressionskonstruktes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C wurden die Ansätze 2 min auf Eis abgekühlt und mit 900 µl SOC-Medium versetzt. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 42 °C und 175 rpm, wonach 50-250 µl der Ansätze auf LB-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetrazyklin, 100 µg/ml X-Gal sowie 40 µg/ml IPTG ausplattiert und für mindestens 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden bis zu zehn weiße Kolonien in LB-Medium mit den zuvor angegebenen Antibiotika in den entsprechenden Endkonzentrationen üN bei 37 °C und 150 rpm hochgezogen. Nach dem Anlegen von Dauerkulturen (2.1.4.) wurde die Restkultur für die Präparation der Bacmid-DNA verwendet.

5.2.1.3. Präparation von Bacmid-DNA

Die Isolierung der rekombinanten Bacmide nach dem Prinzip der alkalischen Lyse erfolgte entsprechend den Angaben von Invitrogen nach einem Alternativprotokoll zu kommerziellen Kits. Dabei wurden alle benötigten Puffer kurz vor Gebrauch frisch angesetzt. Zur Isolierung der über 100 kb großen rekombinanten Bacmide wurden jeweils 1,5 ml der üN-Kultur für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 300 µl Lösung I aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Lösung II wurde der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig mit 300 µl einer kalten 3 M Kaliumacetat-Lösung, pH 5,5 versetzt. Die Probe wurde für 10 min auf Eis gestellt, 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein frisches Eppendorf-Gefäß mit 0,8 ml kaltem Isopropanol überführt. Der Ansatz wurde einige Male invertiert und erneut für 10 min auf Eis gelagert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 14.000 x g für 15 min wurde der Überstand verworfen und die gefällte Bacmid-DNA zwei Mal durch die Zugabe von 500 µl 70%igem Ethanol und mehrmaligem Invertieren gewaschen, wobei die DNA nach jedem Waschschritt durch einen Zentrifugationsschritt bei 14.000 x g für 5 min pelletiert wurde. Nach dem gründlichen Entfernen des Überstandes wurde das Pellet bei RT in einer Sterilbank für 5-10 min luftgetrocknet. Etwa 40 µl steril filtrierter 1 x TE-Puffer, pH 8,0 wurden vorsichtig auf das Bacmid-Pellet pipettiert und die DNA dabei gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten DNA photometrisch bestimmt (B.3.2.). Zum Nachweis einer erfolgreichen Transposition des Expressionskonstruktes in das Bacmidgenom wurde die Größe des integrierten Abschnittes bestimmt. Dabei wurden mittels PCR (B.3.5.) unter Einsatz von 100 ng isolierter Bacmid-DNA sowie den bacmidspezifischen Primern M13 Forward (~40) und M13 Reverse (Anhang, Tabelle G.9) zusätzlich zum erwarteten Insert etwa 2300 bp des Bacmid-Genoms amplifiziert (vgl. Manual „*Bac-to-Bac Baculovirus System*“, Invitrogen). Bacmide mit der erwarteten Größe des Integrates konnten anschließend für die Herstellung des rekombinanten Primärvirus eingesetzt werden. Da wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen das Scheren dieser großen Bacmide fördern, wurde die isolierte DNA bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert und nur für eine Langzeitlagerung bei -20 °C eingefroren.

Lösung I	15 mM Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
	(steril filtriert, bei 4 °C gelagert)
Lösung II	0,2 M NaOH
	1% SDS

	(steril filtriert)
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA
	(steril filtriert)

5.2.1.4. Herstellung des rekombinanten Primärvirus (P1)

Die Transfektion von Insektenzellen mit Bacmid-DNA zur Generierung von rekombinanten Baculoviren erfolgte unter Verwendung des Nanofectin Kits (PAA, *The Cell Culture Company*) nach Anleitung des Herstellers. Aufgrund ihrer hohen Transfektionsrate wurden hierfür Sf9-Zellen verwendet (vgl. Manual „*Bac-to-Bac-Baculovirus System*“, Invitrogen). Zu Beginn wurden 5 µg der rekombinanten Bacmid-DNA mit 150 mM NaCl auf ein Gesamtvolumen von 250 µl aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Parallel dazu wurden in einem zweiten Ansatz 16 µl Nanofectin mit 234 µl 150 mM NaCl versetzt. Der Nanofectin-Ansatz wurde anschließend auf den Bacmid-Ansatz pipettiert, durch Invertieren gut gemischt und für ca. 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden ca. 60% konfluente Sf9-Zellen in einer 25 cm^2-Kulturflasche einmal mit 5 ml Vollmedium gewaschen und letztendlich mit 3 ml frischem Vollmedium überschichtet. Der Bacmid-Nanofectin-Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen aufgegeben und der Transfektionsansatz 48 h bei 27 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium, welches den sogenannten rekombinanten Primärvirus P1 enthielt, abgenommen und durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4.000 x g von Zellen bzw. Zellresten abgetrennt. Der Überstand mit den Primärviren wurde in 1 ml-Fraktionen aliquotiert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

5.2.1.5. Amplifikation von Baculoviren

Um einen ausreichend hohen Titer an Baculoviren für die späteren rekombinanten Proteinexpressionen zu erhalten, wurde der Primärvirus in der Regel durch zwei bis vier Amplifikationsprozesse vervielfältigt. Dabei wurden ausnahmslos 80% konfluente Sf9-Zellen eingesetzt, die kurz zuvor einmal mit frischem Vollmedium gewaschen wurden. Das Medium wurde anschließend komplett abgenommen. Im ersten Amplifikationszyklus wurden Zellen in einer 75 cm^2-Zellkulturflasche verwendet, auf die 1 ml des P1-Virus aufgetropft und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturflasche verteilt wurde. Nach 1 h bei 27 °C wurde der Ansatz mit Vollmedium auf 15 ml aufgefüllt und für 3-4 Tage bei 27 °C inkubiert. Zum Ernten der Viren wurde das Medium abgenommen, für 10 min bei 500 x g abzentrifugiert und der Überstand mit den entstandenen P2-Viren in 5 ml-Fraktionen aliquotiert sowie bis zum Gebrauch bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die zweite

Virusamplifikation erfolgte mit bis zu 5 ml P2-Virus auf Zellen in 75 cm^2-Zellkulturflaschen unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. Bei der dritten und vierten Amplifikation wurden jeweils bis zu 5 ml des Virusstocks der vorangegangenen Amplifikationsrunde auf Zellen in 175 cm^2-Zellkulturflaschen aufgegeben und diese anschließend nach Ablauf der einstündigen Inkubation mit Vollmedium auf 25 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Alle Virenstocks wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

5.2.1.6. Rekombinante Proteinexpression in Insektenzellen

Für die rekombinante Proteinexpression wurde sowohl die Sf9- als auch die High Five-Zelllinie verwendet, wobei vor allem letztere im Falle einer gewünschten Sekretion des Proteins in das Medium höhere Expressionsraten liefert (Manual „*Bac-to-Bac Baculovirus System*“). Die Expressionen wurden jeweils in 175 cm^2-Zellkulturschalen in einem Volumen von 25 ml sowie einer Zelldichte von etwa 1-2 x 10^6 Zellen/ml durchgeführt. Zur Infektion wurden die Ansätze mit jeweils 2-3 ml dreifach amplifizierten bzw. 0,5-1 ml vierfach amplifizierten Baculoviren versetzt und für 48-72 h bei 27 °C inkubiert, um eine maximale Expression des sezernierten Proteins zu gewährleisten. Anschließend wurde der gesamte Ansatz 15 min bei 1.000 x g zentrifugiert, das Medium vorsichtig abgenommen und zum Nachweis des sezernierten rekombinanten Proteins direkt weiterverarbeitet bzw. kurzzeitig bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert. Bei Bedarf wurde zusätzlich aus den Zellen ein Lysat hergestellt, indem diese drei Mal mit einem Volumen 1 x PBS gewaschen und 5 min bei 2.000 x g pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde in einem Volumen detergenzhaltigem Lysepuffer aufgenommen und zum Aufschließen 30 min auf Eis inkubiert. Zum Abtrennen der Zelltrümmer und anderer unlöslicher Bestandteile wurde die Probe für 10 min bei 13.000 x g abzentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand enthielt das Zelllysat und wurde bis zur weiteren Auswertung bei -20 °C aufbewahrt. Die unlöslichen Zellreste wurden ebenfalls in einem Volumen Lysispuffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

10 x PBS, pH 7,5	1,4 M NaCl
	27 mM KCl
	81 mM Na_2HPO_4
	15 mM K_2HPO_4
Lysispuffer	1 x PBS
	1% Triton X 100

5.2.2. „Drosophila Expression System“

Das Drosophila-Expressionssystem (DES) der Firma Invitrogen erlaubt eine stabile Überexpression von rekombinanten Proteinen in der Zelllinie Schneider-2 *Drosophila* (S2). Durch die speziell für S2-Zellen entwickelten konstitutiven bzw. induzierbaren DES-Vektoren werden hohe Proteinausbeuten erzielt, da diese ausnahmslos starke *Drosophila*-Promotoren wie den Metallothionin- oder den Actin 5c-Promotor tragen. Dabei können im Rahmen einer Co-Transfektion der S2-Zellen mit einem Selektionsvektor nach Wahl mehrere hundert Kopien des Expressionsvektors stabil in das Genom integriert werden, wenn ein geeignetes Verhältnis von Expressions- zu Selektionsvektor gewählt wird (Johansen et al., 1989). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf das induzierbare DES-System mit dem Selektionsvektor pCoHygro zurückgegriffen. Alle durchgeführten Schritte zur Expression von rekombinanten Proteinen im DES-System folgten im Wesentlichen den Empfehlungen des Manuals „*Drosophila Expression System*“ von Invitrogen.

5.2.2.1. Klonierung des Expressionskonstruktes

Die Amplifikation der Zielsequenz mittels PCR und die Klonierung des Expressionskonstruktes erfolgten gemäß der Beschreibung B.3.5 und B.3.7.2. Dabei wurde die Sequenz durch die Wahl geeigneter Primer gentechnisch modifiziert: Für eine korrekte Initiation der Translation wurden alle Zielsequenzen N-terminal mit der Kozak-Sequenz (G/A)NNATGG ausgestattet, wobei ATG das Start-Codon bezeichnet (Kozak 1987, 1990, 1991). Zusätzlich wurde dem Gen statt des vektoreigenen C-terminalen His-Tags der Strep-Tag II angefügt. Für eine intrazelluläre Expression des rekombinanten Proteins wurde das erhaltene Amplifikat über die Schnittstellen SpeI und XhoI in den Expressionsvektor pMT/V5-His B ligiert, wo es unter Kontrolle des starken *Drosophila* Metallothionin-Promotors steht.

5.2.2.2. Co-Transfektion von S2-Zellen

Die Transfektion von Insektenzellen erfolgte unter Verwendung des Nanofectin Kits (PAA, *The Cell Culture Company*) nach Anleitung des Herstellers. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden am Vortrag die S2-Zellen aus einer zu 80% konfluenten 25 cm^2-Kulturflasche abgelöst und bei 100 x g für 5 min pelletiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Vollmedium auf ca. 10^6 Zellen/ml verdünnt. Je 5 ml dieser Zell-Suspension wurde in eine neue 25 cm^2-Flasche überführt und für mindestens 16 h bei 27 °C inkubiert. Zur Generierung von stabil transfizierten S2-Zellen erfolgte eine Co-

Transfektion mit dem Selektionsvektor pCoHygro in einem Verhältnis von 19:1, wobei der Expressionsvektor im Überschuss eingesetzt wurde. Hierfür wurden etwa 5 µg des Expressionskonstruktes mit 263 ng des Selektionsvektors pCoHygro versetzt, mit 150 mM NaCl auf ein Gesamtvolumen von 250 µl aufgefüllt und vorsichtig gemischt. In einem weiteren Ansatz wurden 5 µg des leeren DES-Vektors wie zuvor beschrieben für die Co-Transfektion vorbereitet. Parallel dazu wurden je Transfektionsansatz 16 µl Nanofectin mit 234 µl 150 mM NaCl versetzt. Der Nanofectin-Ansatz wurde anschließend jeweils auf den Vektor-Ansatz pipettiert, durch Invertieren gut gemischt und für ca. 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen einer Zellkulturflasche gegeben. Als Negativkontrolle für die spätere Selektion wurde eine weitere 25 cm^2-Flasche mit S2-Zellen mit 500 µl 150 mM NaCl überschichtet. Nach Inkubation aller Transfektionsansätze für mindestens 48 h bei 27 °C wurden die Zellen abgelöst und durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 100 x g von dem Transfektionsmedium abgetrennt. Die Zellen wurden 2 x mit Vollmedium gewaschen, in 5 ml frischem Vollmedium aufgenommen und wieder zurück in die alte 25 cm^2-Zellkulturflasche überführt. Nach Inkubation der Zellen für zwei Tage bei 27 °C wurde mit der Selektion begonnen.

5.2.2.3. Selektion stabil transfizierter S2-Zellen

Die Selektion der stabil transfizierten S2-Zellen erfolgte durch den Zusatz von 300 µg/ml Hygromycin (Invitrogen) zum Vollmedium. Hierfür wurden die Zellen aus den 25 cm^2-Kulturflaschen abgelöst, 10 min bei 100 x g pelletiert und anschließend in 5 ml hygromycinhaltigem Vollmedium gelöst. Der Wechsel des Mediums erfolgte regelmäßig alle 4-5 Tage, wobei die Zellen weiterhin in 25 cm^2-Flaschen bei 27 °C gehalten wurden. Parallel dazu wurde eine untransfizierte Negativkontrolle unter denselben Bedingungen mitgeführt, um durch Vitalitätsvergleiche der Ansätze mittels Trypanblau-Färbung den Erfolg der Selektion zu überprüfen. Die Selektion wurde durchschnittlich 2-3 Wochen durchgeführt, bis eindeutig resistente Kolonien in den transfizierten Ansätzen sichtbar wurden. Sobald der Kontrollansatz keine vitalen S2-Zellen mehr enthielt, wurden die transfizierten Ansätze einmal mit Vollmedium gewaschen, in 15 ml hygromycinhaltigem Vollmedium resuspendiert und in 75 cm^2-Kulturflaschen überführt. Mit dem Erreichen einer Zelldichte von ca. 20 x 10^6 Zellen/ml wurde damit begonnen, die Zellen in einer Verdünnung von 1:5 zu passagieren (B.2.2.3.) sowie Dauerkulturen für die Langzeitlagerung anzulegen (B.2.2.4.). Wie von Invitrogen empfohlen, konnte bei den stabil transfizierten Zelllinien ab diesem Zeitpunkt auf eine Zugabe von Hygromycin in das Vollmedium verzichtet werden.

5.2.2.4. Rekombinante Proteinexpression in S2-Zellen

Die rekombinante Proteinexpression in S2-Zellen wurde in der Regel in einem Volumen von 25 ml in 175 cm^2-Kulturflaschen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen gezählt, einmal mit Vollmedium gewaschen und mit frischem Medium auf eine Dichte von etwa 2 x 10^6 Zellen/ml verdünnt. Nach einer Inkubation für 6 h bei 27 °C wurde die Expression durch die Zugabe von 500 µM steril filtriertem $CuSO_4$ in das Medium induziert. Die Expression wurde je nach Versuchsansatz 24-96 h bei 27 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 100 x g abzentrifugiert und in 3 ml Phosphatpuffer aufgenommen. Alternativ wurde in manchen Fällen ein 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 bzw. 1 x PBS verwendet. Zum Aufschluss der Zellen wurden die Ansätze ca. 2 x je 1 min auf Eis sonifiziert und 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde abgenommen und bei Bedarf für eine Ammoniumsulfatfällung (B.8.1.) eingesetzt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden in 3 ml 1 x PBS resuspendiert und mit den restlichen Proben bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert.

6. Allgemeine proteinbiochemische Methoden

6.1. Entnahme von Hämolymphe

Die Entnahme der Hämolymphe aus dem Krebs *Carcinus maenas* erfolgte direkt mit einer sterilen Kanüle am Schreitbein, nachdem die einzelnen Tiere zur Betäubung etwa 10 min auf Eis gelegt wurden. Die entnommene Hämolymphe wurde mit einem Volumen 2 x Stabilisierungspuffer I gemischt und anschließend zur Abtrennung von Blutzellen und Geweberesten 20 min bei 13.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, zur Hemmung von Serinproteasen mit 1 mM Pefabloc versetzt und nach Möglichkeit sofort weiter verwendet bzw. bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.
Zur Gewinnung von Hämolymphe aus *Drosophila melanogaster* wurden jeweils 30 Larven des 3. Entwicklungsstadiums eingesetzt, die vor Präparation mit dest. H_2O gespült wurden. Anschließend wurde ca. 20 µl Stabilisierungspuffer II auf einen Parafilmstreifen, der auf Eis gelegt wurde, getropft. Zur Entnahme der Hämolymphe wurden alle Tiere nacheinander einzeln in diesem Tropfen präpariert, indem der Kopf der Larven vorsichtig mit einer Uhrmacherpinzette abgetrennt wurde. Die so frei werdende Hämolymphe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofort verwendet bzw. maximal 1 Woche bei 4 °C gelagert.

2 x Stabilisierungspuffer I	100 mM Tris/HCl, pH 7,8
	10 mM $CaCl_2$
	10 mM $MgCl_2$
Kaliumphosphatpuffer, pH 4,8	140 mM NaCl
	15 mM KH_2PO_4
Natriumphosphatpuffer, pH 9,0	140 mM NaCl
	18,81 mM Na_2HPO_4
Stabilisierungspuffer II, pH 6,8	1 Liter Kaliumphosphatpuffer, pH 4,8
	ca. 300 ml Natriumphosphatpuffer, pH 9,0
	10 mM $MgCl_2$
	0,01% N-Phenylthioharnstoff
	(filtriert, autoklaviert)

6.2. Proteinextraktion

6.2.1. Proteinextraktion aus frisch präparierten Geweben/Tieren

Zur Isolierung der gesamten Proteine aus einzelnen Geweben bzw. aus vollständigen Tieren wurden diese in der Regel in einem Volumen mit Proteasehemmern versetztem 1 x PBS aufgenommen und mit einem Micropistill homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 15 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen vorsichtig abgenommen und bei -20 °C gelagert. Alternativ wurde in manchen Fällen statt des 1 x PBS ein detergenzhaltiger Lysepuffer verwendet.

10 x PBS, pH 7,5	1,4 M NaCl
	27 mM KCl
	81 mM Na_2HPO_4
	15 mM K_2HPO_4
Proteasehemmer	1 mM Pefabloc
Lysepuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,4
	10 mM NaCl
	5 mM $MgCl_2$
	0,1% Nonidet P40
	1 mM DTT
	1 mM Pefabloc
	Bei Bedarf : Complete Proteaseinhibitor

6.2.2. Proteinextraktion aus in RNAlater stabilisierten Tieren

Die Proteinextraktion aus in RNAlater stabilisierten Tieren erfolgte mit dem Reagenz PeqGOLD Trifast™, welches die gleichzeitige Extraktion von Nukleinsäuren und Proteinen erlaubt (B.3.1.2.3.). Hierfür wurde die Probe wie beschrieben homogenisiert und bis zur Phasentrennung weiterbearbeitet. Die Proteinextraktion aus der organischen Phase erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Dabei wurde im ersten Schritt durch die Zugabe von 0,3 ml 100% Ethanol pro ursprünglich eingesetztem ml PeqGOLD TriFast™ die DNA präzipitiert und durch einen folgenden Zentrifugationsschritt von den Proteinen abgetrennt. Die Extraktion der Proteine aus dem Phenol-Ethanol-Überstand sowie die nachfolgenden Waschschritte wurden nach Protokoll durchgeführt, wobei das erhaltene Proteinpellet schließlich in 200 µl 1% SDS aufgenommen und durch eine etwa 30-minütige Inkubation bei 50 °C gelöst wurde. Die Probe wurde sofort für weitere Versuche eingesetzt bzw. kurzzeitig bei -20 °C gelagert.

6.2.3. Proteinextraktion aus unterschiedlichen Zellkompartimenten

Für die Proteinisolierung aus den unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten von Geweben wurde auf das kommerzielle Kit „*Qproteome Cell Compartment*“ von Qiagen zurückgegriffen. Indem je Extraktion ca. 20 mg des gewünschten, frisch präparierten Gewebes nach Herstellerangaben bearbeitet wurden, erfolgte so nacheinander die Isolierung von vier Proteinfraktionen aus unterschiedlichen Kompartimenten: Fraktion 1 enthielt alle cytosolischen, Fraktion 2 dagegen alle Membranproteine inklusive der Proteine aus dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien. Mit der Fraktion 3 wurden alle löslichen und membrangebundenen nukleären Proteine extrahiert, während alle restlichen Proteine - größtenteils Proteine des Zytoskeletts - Bestandteil der Fraktion 4 waren. Die erhaltenen Fraktionen wurden alle ausnahmslos durch eine sich anschließende Aceton-Präzipitation entsalzt und aufkonzentriert. Dabei wurden die Ansätze jeweils mit dem vierfachen Volumen an eiskaltem Aceton versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet an der Luft getrocknet. Je nach Größe wurde das Pellet in 60-120 µl 1 x PBS resuspendiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

6.3. Proteinbestimmung

6.3.1. Photooptische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach Sambrook et al. (1989) bei einer Wellenlänge von 280 nm spektroskopisch bestimmt. Die Messung beruht darauf, dass eine Proteinlösung entsprechend seines Gehaltes an aromatischen Aminosäuren Licht im ultravioletten Bereich zwischen 200-300 nm absorbiert. Dabei geht man davon aus, dass bei Proteinen mit einer durchschnittlichen Verteilung dieser Aminosäuren eine optische Dichte von 1 bei einer Küvetten-Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 280 nm etwa 1 mg/ml Protein entspricht.

6.3.2. Bradford-Assay

Alternativ konnte die Proteinkonzentration über den Bradford-Assay (Bradford, 1976) unter Verwendung der Fertiglösung Roti-Quant (Roth) ermittelt werden. Dieser Nachweis beruht auf dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250, welcher je nach seinem Zustand (kationisch, neutral, anionisch) bei drei unterschiedlichen Wellenlängen absor-

biert. Durch Bindung an Proteine erfolgt ein Wechsel vom kationischen in den anionischen Zustand, der sich in einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm zeigt. Diese Absorptionsänderung ist über weite Bereiche zur Proteinkonzentration proportional, so dass in diesem Assay unbekannte Proteinkonzentrationen durch einfache Messungen bei 595 nm ermittelt werden können. Die Durchführung des Proteinnachweises nach Bradford erfolgte nach Angaben des Herstellers als Mikroansatz, wobei die Eichgerade mit bekannten Konzentrationen an BSA erstellt wurde.

6.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

6.4.1. SDS-PAGE

Für die analytische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde in dieser Arbeit standardmäßig eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem angewendet (Laemmli, 1970). Die Porengröße der Gele lässt sich dabei durch die Gesamtacrylamidkonzentration T und den Vernetzungsgrad C exakt und reproduzierbar einstellen, wobei folgende Formeln gelten:

$$T = \frac{((a+b) \times 100)}{V} \; [\%] \qquad\qquad C = \frac{(b \times 100)}{(a+b)} \; [\%]$$

Dabei ist a die Masse Acrylamid [g], b die Masse Methylenbisacrylamid [g] sowie V das Volumen [ml]. Verwendet wurden Trenngele mit einer Gesamtacrylamidkonzentration T von 7,5-15% und einem Vernetzungsgrad C von 2,6% in 330 mM Tris/HCl (pH 8,5) und 0,1% SDS sowie Sammelgele mit T = 4% und C = 2,6% in 125 mM Tris/HCl (pH 6,8) mit 0,1% SDS. Die einzusetzenden Proteinproben wurden mit 4 x Lämmli-Probenpuffer, dem kurz vor Gebrauch 10% (v/v) β-Mercaptoethanol zugesetzt wurde, auf einfache Probenpufferkonzentration eingestellt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach Auftragen eines Proteinlängenstandards (Fermentas) und der jeweiligen Probe(n) wurde die Elektrophorese in vertikalen Gelkammern (BioRAD) in einem Tris/Glycin-Laufpuffer bei 10 mA/Gel gestartet. Nach dem Einlaufen der Proteinproben in das Trenngel wurde die Elektrophorese bei etwa 20 mA/Gel fortgeführt. Im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte in der Regel eine Färbung der Gele mit Coomassie Blau für mindestens 1 h. Für die Entfärbung wurde das Gel 1 h in Entfärbelösung und anschließend üN in der Aufbewahrungslösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation eingescannt.

Rotiphorese Gel 30	Mischung Acrylamid-Bisacrylamid 37,5:1 (Roth)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,5
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Katalysatoren	10% Ammoniumperoxodisulfat
	Temed
4 x Lämmli	1,25 ml Tris/HCl, pH 6,8
	2 ml 10% SDS
	1 ml Glycerin
	0,25 ml dest. H_2O
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	(vor Gebrauch 10% β-Mercaptoethanol frisch zusetzen)
10 x Laufpuffer	230 mM Tris
	1,9 M Glycin
	2% SDS
Färbelösung	40% Ethanol
	10% Essigsäure
	0,2% Coomassie Brilliant Blau R 250
	(filtriert)
Entfärbelösung	10% Essigsäure
	25% Isopropanol
Aufbewahrungslösung	7,5% Essigsäure

6.4.2. Native PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter Erhalt ihrer Konformationen und somit der jeweiligen Funktionen bzw. Enzymaktivitäten wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen durchgeführt. Da das Interesse hauptsächlich auf Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt < 9,5 lag, wurde auf die leicht modifizierte Form der Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) zurückgegriffen, wobei auf die Zugabe von SDS in das Trenn- und Sammelgel sowie in den Laufpuffer verzichtet wurde (B.6.4.1.). Die gesamte Durchführung erfolgte gekühlt bei 4 °C. Die Proteinproben wurden in einem nicht-denaturierenden, zweifach konzentrierten Probenpuffer bestehend aus 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 40% (v/v) Glycerin sowie 0,02% (w/v) Bromphenolblau aufgenommen und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel entweder in Coomassie Blau gefärbt (B.6.4.1.) oder zum Nachweis von Enzymaktivitäten in der entsprechenden Substratlösung inkubiert (B.10.3.).

6.5. Reduktion von Met-Hämoglobin

Die enzymatische Reduktion von Met-Hämoglobin wurde im Wesentlichen nach Hayashi et al. (1973) durchgeführt. Dabei wurden etwa 180 nmol Met-Globin mit den in Tabelle B.10 angegebenen Stoffmengen an Ferredoxin, Ferredoxin-NADP-Reduktase, Katalase, NADP und Glucose-6-Phosphat versetzt sowie mit Kaliumphosphatpuffer auf ein Volumen von 2,97 ml aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 30 µl einer 66,6 µM Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Lösung gestartet und der Ansatz für durchschnittlich 2-3 h bei RT inkubiert, bevor die Probe für weitere Messversuche verwendet wurde.

Tabelle B.10: Enzymatisches Reduktionssystem für Met-Hämoglobin (Hayashi et al., 1973)

	Stoffmenge (für 3 ml-Ansatz)
Substrat	
Häm-Protein in Fe^{3+}-Form	0,18 µmol
NADPH-generierendes System	
NADP	0,135 µmol
Glucose-6-phosphat	2,0 µmol
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	1,0 µg
Elektronen-übertragendes System	
Ferredoxin (aus *Spinacea oleracea*)	0,52 nmol
Ferredoxin-NADP-Reduktase (aus *Spinacea oleracea*)	0,233 nmol
H_2O_2-Entferner	
Katalase	5,0 µg
Puffer	
Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0	0,3 mmol

Alle in diesem Reduktionssystem benötigten Komponenten wurden bei Sigma-Aldrich bezogen und in der Regel in einem 300 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 (K-Puffer) angesetzt. Alle glycerinhaltigen Stocklösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt, die glycerinfreien dagegen bei 4 °C.

0,3 M K-Puffer, pH 7,0	184,5 ml 1 M K_2HPO_4 + 115,5 ml 1 M KH_2PO_4, mit 700 ml dest. H_2O auf 1 L Volumen auffüllen
Ferredoxin (Fd)	aus *Spinacea oleracea* 0,1 mM Fd-Lösung in K-Puffer, Glyceringehalt 30%
Ferredoxin-NAD^+-Reduktase (FNR)	aus *Spinacea oleracea* 5 µM FNR-Lösung in K-Puffer, Glyceringehalt 30%
Katalase (K)	aus Rinderleber 4 µM K-Lösung in K-Puffer, Glyceringehalt 30%
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	aus *Saccharomyces cerevisiae* 0,1 g/l in K-Puffer
Glucose-6-Phosphat	100 mM Lösung in K-Puffer
NADP	10 mM Lösung in K-Puffer

6.6. Aufnahme von Absorptionsspektren

Die Aufnahme von Absorptionsspektren im gewünschten nm-Bereich erfolgte im Lambda 2S Spektrometer der Firma Perkin Elmer unter Verwendung von Quarzküvetten (Roth). Gemessene Spektren wurden mit dem Computer aufgezeichnet und mit Excel ausgewertet. Für die Messung von Globinspektren wurde ein 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,5 eingesetzt, in welchem die Probe verdünnt wurde. Zur Ermittlung des desoxy-Globinspektrums erfolgte kurz vor der Messung der Zusatz von einer Spatelspitze Dithionit in die Probe. Bei Bedarf wurde vorhandenes Met-Globin vor der Messung enzymatisch reduziert (B.6.5.).

6.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Proteinen

Für elektronenmikroskopische Aufnahmen von Proteinen wurden 10 µl einer 0,1-3 mg/ml konzentrierten Proteinlösung auf ein mit Mowital beschichtetes 300 mesh Kupfergrid (Storck Veco B.V.) getropft. Nach einer Inkubation von bis zu 30 sec wurde die restliche Flüssigkeit mit Filterpapier (Kimtech, Kimberly-Clark Professional) vom Rand abgezogen und der Grid unter dem Abzug mit 10 µl des Kontrastmittels beschichtet. Nach einer 10sekündigen Inkubation wurde das überschüssige Kontrastmittel abgesaugt und der Grid bis zur Auswertung bei RT aufbewahrt. Die Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop EFTEM 912 der Firma Zeiss erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Quader im Biozentrum Klein Flottbek in Hamburg, wobei die Aufnahmen in der Regel mit einer 46.600-fachen Vergrößerung ausgewertet wurden.

Kontrastmittel	1% Uranylacetat

7. Immunologische Techniken

7.1. Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Polyklonale CmaHb-Antikörper gegen synthetisch hergestellte Peptide wurden im Kundenauftrag von der Firma Eurogentec durch Immunisieren von Kaninchen produziert. Geeignete antigene Bereiche des CmaHbs für die Immunisierung wurden mit Hilfe des Programms „*Predicting antigenic peptides*“ (http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl) bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die ausgewählten Peptide nicht in helikalen Regionen des Proteins liegen. Um die Immunogenität der synthetischen Peptide zu steigern, wurden diese mit einem Immunstimulanz - dem Hämocyanin der Schnecke *Megathura crenulata* (KLH) - gekoppelt. Zur Gewinnung der Antiseren wurde ein Kaninchen mit den folgenden zwei Antigenen immunisiert:

Peptid 1	H_2N-FKGFAGKSIEELKNC-$CONH_2$	(an KLH gekoppelt)
Peptid 2	H_2N-AMVDNLEDVSVLVEL-$CONH_2$	(an KLH gekoppelt)

Die Seren wurden nach Erhalt in 5 ml-Fraktionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

7.2. Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern

Zur Affinitätsreinigung der Antiseren wurden „*HiTrap NHS-activated HP*“-Säulen von GE Healthcare nach Herstellerangaben benutzt. Das Prinzip dabei ist die Kopplung eines Antigens über ein freies primäres Amin an die Säulenmatrix. Sobald das Antiserum aufgegeben wird, binden alle antigenspezifischen Antikörper an diesen Liganden und können nach einigen Waschschritten von der Säule eluiert werden. Die Vorbereitung der Säule sowie die Kopplung von 1 mg Peptid an das Säulenmaterial erfolgten nach Protokoll. Für die Aufreinigung wurden 5 ml Antiserum mit einem Volumen 150 mM Tris/HCl, pH 8 versetzt und aufgegeben. Der entsprechende Durchlauf wurde aufgefangen und ein zweites Mal auf die Säule pipettiert. Nach den sich anschließenden Waschschritten erfolgte die Elution der Antikörper mit 5 ml 100 mM Glycin, pH 2,5. Dabei wurden fraktioniert 5 x 900 µl des Eluats in Eppendorfgefäßen aufgefangen, in die zuvor je 100 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,0 vorgelegt wurde. Nach Bestimmung der einzelnen Extinktionswerte (B.6.3.) wurden die Antikörper-Fraktionen entweder kurzzeitig bei 4 °C aufbewahrt oder für eine gewünschte Langzeitlagerung mit 1% BSA versetzt und sofort bei -20 °C eingefroren.

7.3. Western Blot

7.3.1. Elektrophoretischer Transfer

Die Übertragung der in einer SDS-PAGE (B.6.4.1.) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Macherey-Nagel) erfolgte nach der Semidry-Methode von Khyse-Anderson (1984) mit dem Elektroblotter der Firma Hartenstein. Dabei werden die Proteine direkt nach Abschluss der Elektrophorese durch das Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf die Membran transferiert. Hierfür wurden mehrere Lagen Whatman 3MM-Papier (Hartenstein), die Nitrocellulosemembran und das SDS-Gel für ca. 5 min in Transferpuffer inkubiert und anschließend wurde der Blot luftblasenfrei aufgebaut. Der elektrophoretische Transfer erfolgte für 90 min bei 35 mA/SDS-Gel. Nach Abschluss konnten die Proteine auf der Membran reversibel mit Ponceau S angefärbt werden, um die Transfereffizienz zu überprüfen.

Transferpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	10% (v/v) Methanol
Ponceau S-Lösung	0,2% Ponceau S
	5% Essigsäure

7.3.2. Immundetektion

Zum Nachweis transferierter Proteine auf Membranen dienten verschiedene spezifische Antikörper. Für die Immundetektion von Hämoglobinen (Hb) bzw. Hämocyaninen (Hc) wurden verschiedene Antiseren verwendet, die in geeigneten Verdünnungen eingesetzt wurden (Tabelle B.11).

Tabelle B.11: Antiseren

Antikörper	Wirt	Verdünnung
Anti-CmaHb (*Carcinus maenas*)	Kaninchen	1:10.000
Anti-BduHc1 (*Blaptica dubia*)	Kaninchen	1:5000
Anti-BduHc2 (*Blaptica dubia*)	Kaninchen	1:5000
Anti-TdoHc1 (*Thermobia domestica*)	Kaninchen	1:5000
Anti-TdoHc2 (*Thermobia domestica*)	Kaninchen	1:5000
Anti-PinHc (*Panulirus interruptus*)	Kaninchen	1:5000
Anti-CpaHc (*Cancer pagurus*)	Kaninchen	1:5000
Anti-HamHc (*Homarus americanus*)	Kaninchen	1:4500

Vor Beginn der jeweiligen Nachweisreaktion wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch eine Inkubation für 1 h bei RT in Blockpuffer abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem in Blockpuffer aufgenommenen primären Antikörper für mindestens 2 h bzw. üN bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10-15 min mit TBS schloss sich eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper in einer 1:10.000 Verdünnung in TBS für 1 h bei RT an. Verwendet wurde dabei der Zweitantikörper „*Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)*“ von Dianova. Die Membran wurde anschließend drei Mal mit TBS gewaschen, 2 min in AP-Puffer äquilibriert und das Substratgemisch bestehend aus NBT/BCIP in AP-Puffer aufgegeben. Die Farbreaktion wurde mit dest. H_2O gestoppt, die Membran zwischen zwei Lagen Whatman-Papier getrocknet und anschließend zur Dokumentation eingescannt.
Für den Nachweis der Affinitätstags His-Tag und Strep-Tag II wurden kommerziell erhältliche Antikörper der Firmen IBA und Qiagen verwendet. Dabei erfolgte der Nachweis des His-Tags mit dem monoklonalen Penta-His-Antikörper (Qiagen) im Wesentlichen nach Herstellerangaben, wobei der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper „Anti-Mouse-HRP“ (Dianova) verwendet wurde. Im Falle des bereits Peroxidase-gekoppelten Anti-Strep-Tag II-Antikörpers „Strep-MAB-classic-HRP“ erfolgte die Immundetektion entsprechend der Empfehlung des Herstellers. Als Peroxidase-Substrat wurde in beiden Fällen das „NOVADetect AEC-Substrat Kit“ der Firma Dianova nach Herstellerangaben eingesetzt.

10 x TBS	100 mM Tris/HCl, pH 7,5
	750 mM NaCl
Blockpuffer	2% Milchpulver in 1 x TBS
AP-Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5
	100 mM NaCl
NBT	75 mg/ml in 70% (v/v) DMF
BCIP	50 mg/ml in 100% (v/v) DMF

7.4. Immunhistochemie

7.4.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden frisch präparierte *C. maenas* Kiemen in 4% PFA für ca. 48 h bei 4 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen für je 15 min mit 1 x PBS wurden die Gewebe je 4 h bei RT in einer 10%igen und 20%igen sowie üN bei 4 °C in einer 30%igen (w/v) Saccharoselösung inkubiert. Vor dem Schneiden wurde das

jeweilige Gewebe in der gewünschten Orientierung in „*Frozen Section Medium Neg-50*“ (Microm International) eingebettet, auf dem Objekttisch aufgefroren und mit einer Rasierklinge auf die gewünschte Größe und Form getrimmt. Anschließend wurden die Kiemen in einer Dicke von durchschnittlich 6 µm mit einem Mikroton-Kryostat (Serie HM 500, Microm International GmbH) bei einer Boxtemperatur von -20 °C und einer Objekttemperatur von -24 °C geschnitten und auf einen Objektträger (SuperFrost Plus Gold, Menzel-Gläser, VWR) aufgezogen. Um ein besseres Anheften an die Objektträgerfläche zu gewährleisten, wurden die Schnitte vor der weiteren Verwendung für mindestens 2 h bei RT staubgeschützt getrocknet.

7.4.2. Histologische Kontrollfärbungen

Zur Anfertigung von Übersichtsfärbungen und zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild wurden Gefrierschnitte der gewünschten Gewebe angefertigt (B.7.4.1.) und einer Zellkernfärbung mit Hämalaun unterzogen. Verwendet wurde dabei standardmäßig die Fertiglösung „Mayers Hämalaunlösung“ nach Angaben des Herstellers (Carl Roth). Bei Bedarf wurde eine Gegenfärbung mit 0,5%iger Eosin G-Lösung (Carl Roth) nach Herstelleranleitung angeschlossen, mit welcher alle anderen Strukturen im Schnitt mit unterschiedlicher Intensität rötlich angefärbt werden. Durch eine anschließende lichtmikroskopische Auswertung der Präparate konnte so ebenfalls die für die spätere immunhistochemische Lokalisation geeignete Schnittebene und -dicke bestimmt werden.

7.4.3. Immunhistochemische Lokalisation von Hb

Zur Lokalisation des *C. maenas* Hämoglobins im Kiemengewebe wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie unter Anfertigung von Gefrierschnitten verwendet. Die Gewebeschnitte (B.7.4.1.) wurden hierfür 3 x mit 1 x PBS gewaschen und anschließend wurde der aufgereinigte, 1:10 in Blockpuffer verdünnte Anti-CmaHb-Antikörper aufgegeben. Die Inkubation erfolgte üN bei 4 °C. Hiernach wurden drei Waschschritte für je 15 min mit 1 x PBS durchgeführt, bevor anschließend die Visualisierung des primären Antikörpers mittels Cy3-konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper („*Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)*“, Dianova) erfolgte. Dieser fluoreszenzfarbstoffgekoppelte sekundäre Antikörper wurde 1:500 in 1 x PBS verdünnt eingesetzt. Nach einer 90-minütigen - lichtgeschützten - Inkubation bei RT wurden die Kryoschnitte drei Mal mit 1 x PBS gewaschen. Die Präparate wurden in Mowiol 4-88 (Calbiochem) eingedeckelt und üN bei 4 °C gelagert. War eine Zellkernfärbung er-

wünscht, wurde dem Mowiol kurz vor Gebrauch Hoechst 33258 (Invitrogen) in einer 1:100 Verdünnung zugesetzt. Um unspezifische Bindungen zu erkennen, wurden parallel Kontroll-Reaktionen ohne den Einsatz von primären Antikörpern mitgeführt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Olympus DP71 Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswelle von 535 nm und dem SWG Filterset (Olympus).

10 x PBS	1,4 M NaCl, 15 mM KH_2PO_4, 81 mM Na_2HPO_4, 27 mM KCl
4% PFA	4 g Paraformaldehyd in 50 ml dest. H_2O lösen, dabei auf ca. 50 °C erwärmen. Mit 50 ml 2 x PBS auffüllen, ggf. mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.
Blockpuffer	0,1-0,4% Triton X 100 und 1% BSA in 1 x PBS
Hoechst 33258	10 mg/ml Hoechst in dest. H_2O oder Dimethylformamid
Mowiol 4-88 Reagent	2,4 g Mowiol 4-88 mit 6 g Glycerol rühren; 6 ml dest. H_2O zugeben und üN bei RT rühren; 12 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 8,5 hinzugeben und 10 min bei 50 °C unter Rühren inkubieren. Sobald das Mowiol 4-88 gelöst ist, die Lösung bei 5.000 x g für 15 min zentrifugieren. Lösung aliquotieren und bei -20 °C lagern.

7.4.4. Überprüfung der Antikörperspezifität

Nach jeder erfolgreichen immunhistochemischen Lokalisation von Proteinen (B.7.4.3.) erfolgte standardmäßig die Überprüfung der erhaltenen Signale auf ihre Spezifität. Hierfür wurde ein so genannter Präadsorptionstest durchgeführt, bei dem der Erstantikörper vor seiner Verwendung mit dem jeweiligen rekombinanten Protein - d.h. seinem Antigen - inkubiert wurde. Im Vergleich mit ungeblocktem Antikörper sollte solch ein vorbehandelter spezifischer Erstantikörper schwächere bzw. keine Signale mehr in Geweben verursachen.

Für den Test wurde der Antikörper in seiner standardmäßig eingesetzten Verdünnung in Blockpuffer aufgenommen, mit 1-80 µg des aufgereinigten rekombinanten Proteins versetzt sowie üN bei 4 °C inkubiert. Gefrierschnitte wurden wie zuvor beschrieben angefertigt, getrocknet und nach drei 10-minütigen Waschschritten mit 1 x PBS mit dem Präadsorptionsansatz überschichtet. Nach einer Inkubation üN bei 4 °C wurde erneut 3 x mit 1 x PBS gewaschen und der Zweitantikörper aufgegeben. Die weitere Vorgehensweise folgte dem Protokoll für die immunohistochemische Lokalisation (B.7.4.3.).

8. Aufreinigung von Proteinen

Am Anfang eines klassischen Reinigungsverfahrens steht häufig das selektive Ausfällen von Proteinen aus einer Lösung, wobei dieses häufig durch ansteigende Salzkonzentrationen geschieht. Ein weiterer fast immer unverzichtbarer Bestandteil des Trennungsgang sind verschiedene säulenchromatographische Trennmethoden wie z.B. die Ionenaustauscher-, Gelfiltrations- oder auch die Affinitätschromatographie, die in der Regel an die Fällung angeschlossen werden. Dabei muss für jedes Protein eine eigene Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, die nach Bedarf mehrere dieser Trennmethoden beinhaltet. In der Regel erfolgten alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aufreinigungsschritte bei 4 °C. Die Chromatographien wurden, falls nicht anders erwähnt, unter FPLC-Bedingungen als Hochleistungschromatographie durchgeführt. Verwendet wurde dabei die computergesteuerte Anlage „*BioLogic HR System*“ der Firma BioRad, wobei an dieses System neben einem Fraktionssammler auch ein Photometer angeschlossen ist. Somit wurde die Extinktion aller Fraktionen bereits nach dem Austreten aus der Säule bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und anschließend graphisch in einem Chromatogramm festgehalten.

8.1. Ammoniumsulfatfällung

Proteinlösungen wurden nach der Tabelle aus „*Methods in Enzymology*“ (Deutscher, 1990) mit dem antichaotropen Salz Ammoniumsulfat fraktioniert ausgefällt, wobei die Ammoniumsulfatsättigung in der Regel in 10% Schritten von 10% bis 100% erhöht wurde. Nach Zugabe der jeweiligen Menge an Ammoniumsulfat wurde die Proteinlösung zur vollständigen Fällung 20 min auf Eis gerührt und anschließend 10 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in einem Volumen 1 x PBS resuspendiert und der Überstand weiter ausgesalzt. Nach Abschluss der Fällung wurden zur Analyse je 100 µl der einzelnen resuspendierten Pellets mittels Roti-Spin Mini-10 Säulen (Carl Roth) nach Herstellerangaben entsalzt und in einem Endvolumen von 100 µl 1 x PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt (B.6.3.) und diese mittels einer SDS-PAGE (B.6.4.1.) auf das Vorhandensein des rekombinant exprimierten Proteins überprüft. Die restlichen salzhaltigen Ammoniumsulfatfraktionen mit dem gewünschten Protein wurden anschließend gepoolt und zur Entfernung eventuell vorhandener Schwebstoffe, die die Filtermembran verstopfen könnten, 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Amicon Ultra-15

Zentrifugenfiltern (Millipore) nach Herstellerangaben entsalzt und auf 1-3 ml aufkonzentriert sowie bei Bedarf weiteren Aufreinigungsschritten unterzogen.

8.2. Anionenaustauschchromatographie

Zur weiteren Aufreinigung von Proteinen wurde eine Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer „HiPrep™ 16/10 Q XL-Säule“ mit positiv geladener Q Sepharose XL als Trägermaterial (GE Healthcare) durchgeführt. Diese Auftrennung beruht darauf, dass im basischen Milieu Proteine aufgrund der negativen Ladungen ihrer Aspartat- und Glutamatseitenketten zunehmend als Anionen auftreten, welche an die positiv geladene funktionelle Gruppe der Säulenmatrix binden. Folglich ist im pH-Bereich nahe zum pI des aufzureinigenden Proteins die Wechselwirkung mit dem Anionenaustauscher schwach; sie wird stärker, je mehr sich der pH in den basischen Bereich verschiebt. Um eine optimale Auftrennung zu erhalten, wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert der verwendeten Puffer größer war als der pI + 1. In ausnahmslos allen Fällen der im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten Proteine wurde mit einem 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,5 gearbeitet. Dabei wurde die Säule mit einem Säulenvolumen dieses Puffers äquilibriert und die Probe aufgegeben. Anschließend wurden die Proteine bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min durch Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0-1 M NaCl in 20 mM Tris/HCl, pH 8,5 eluiert und fraktioniert (1,4 ml/Fraktion) aufgefangen. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (B.6.4.1.) auf Vorhandensein und Reinheit des gewünschten Proteins überprüft und die Fraktionen mit einem angemessenen Verhältnis von rekombinant exprimiertem Protein zu Restprotein vereinigt. Bei Bedarf wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (B.6.3.).

8.3. Gelfiltrationschromatographie

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte unter Verwendung einer „*HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade*“-Säule von GE Healthcare unter FPLC-Bedingungen (Biologic HR System, BioRad). Als Laufpuffer wurde standardmäßig 20 mM Tris/HCl, pH 8,5 verwendet. Nur in Fällen, bei denen hexamere Proteine aufgereinigt werden sollten, wurde stattdessen auf den sogenannten Stabilisierungspuffer II (B.6.1.) als Laufpuffer zurückgegriffen. Vor Gebrauch wurde die Säule mit einem Säulenvolumen des jeweiligen Laufpuffers gespült. Die entsprechende Proteinprobe wurde zur Abtrennung von ausgefallenen Proteinen 5 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Für eine optimale Auftrennung via Größenfraktionierung wurde sie weiterhin mittels Amicon Ultra-15

Zentrifugenfiltern (Millipore) nach Herstellerangaben auf ein Volumen von maximal 3% des Säulenvolumens eingeengt. Nach der Injektion der Probe erfolgte die Chromatographie bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min und maximal 40 psi bei 4 °C. Die aufgefangenen 3 ml-Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (B.6.4.1.) auf das Vorhandensein des gewünschten Proteins sowie auf den Reinheitsgrad überprüft.

8.4. Strep-Tag/Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung von Proteinen über sogenannte Affinitätstags wurde auf das Strep-Tag/Strep-Tactin-System der Firma IBA (Göttingen) zurückgegriffen. Diese Strep-Tag-Technologie wurde basierend auf der starken Interaktion von Biotin und Streptavidin entwickelt, wobei der acht Aminosäuren umfassende Strep-Tag II (WSHPQFEK) eine hohe Affinität zum Streptavidin-Derivat Strep-Tactin besitzt. Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine kann somit über eine einfache Affinitätschromatographie erfolgen, in der die Zielproteine über den zuvor mittels gentechnischer Methoden N- oder C-terminal fusionierten Strep-Tag II an das Strep-Tactin-Säulenmaterial binden und in einem Folgeschritt mit D-Desthiobiotin eluiert werden. Zur Reinigung von rekombinanten Proteinen über den Strep-Tag II wurde die gepackte Säule „*Strep-Tactin Superflow*“ in Verbindung mit dem Strep-tag Starter Kit 3C (IBA) verwendet. Die Durchführung der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie erfolgte im Wesentlichen entsprechend dem „*Strep*-tag® *Purification Protocol*“ (IBA), wobei alle die für die Aufreinigung benötigten Puffer ohne EDTA angesetzt wurden.

9. Rekonstitution von Proteinen

9.1. Renaturierung von Proteinen aus *inclusion bodies*

Die rekombinante Expression von Proteinen in Form von *inclusion bodies* kann von Vorteil sein, wenn eine Renaturierung dieser Proteinaggregate zu nativem Protein möglich ist. Da *inclusion bodies* eine hohe Dichte von 1,3 g/ml (Lottspeich und Zorbas, 1998) besitzen, können sie nach Aufbrechen der jeweiligen Zellen durch einen simplen Zentrifugationsschritt pelletiert werden. Die Isolierung der *inclusion bodies* ist dabei ein erster Reinigungsschritt, da sie zu etwa 90% aus dem überexprimierten Protein bestehen. Zur Gewinnung von nativem Protein werden die Aggregate unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert und bei der nachfolgenden Dialyse wird für eine Renaturierung der rekombinanten Proteine gesorgt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Solubilisierung und Rückfaltung von *inclusion bodies* im Wesentlichen nach Anleitung des „*Protein Refolding Kits*“ (Novagen). Verwendet wurden dabei Dialyseschläuche der Firma Serva mit der gewünschten Ausschlussgröße, die vor Gebrauch zur Entfernung von Metallionen für 15 min in einer 10 mM EDTA-Lösung gekocht wurden. Nach dreimaligem Spülen in Millipore-Wasser wurde der Schlauch bis zum Gebrauch in dem für die Dialyse verwendeten Puffer gelagert.

9.1.1. Hämoglobin

Für die Solubilisierung und Renaturierung von Hämoglobin aus *inclusion bodies* wurden die induzierten Bakterienzellen wie unter B.5.1.2. beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Das Pellet, welches die gereinigten *inclusion bodies* enthielt, wurde zweimal in Waschpuffer gewaschen und gewogen. Anschließend wurden die Aggregate in dem detergenzhaltigen Solubilisierungspuffer resuspendiert und auf eine Konzentration von 20 mg/ml eingestellt. Die Lösung wurde 15 min bei RT inkubiert und die unlöslichen Bestandteile wurden bei 10.000 x g und RT für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurde bis zu 24 h gegen das 50-fache Volumen an Dialysepuffer mit 0,1 mM DTT sowie weitere 24 h gegen Dialysepuffer ohne DTT dialysiert, wobei jeweils nach 3 h, 6 h sowie 24 h ein Pufferaustausch erfolgte. Abschließend wurde die Lösung bei 10.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um unlösliches Material von den renaturierten Apo-Hämoglobinen zu trennen. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

10 x Waschpuffer	100 mM EDTA, 10% Triton X 100, 200 mM Tris/HCl, pH 7,5
Solubilisierungspuffer	0,3% N-Laurylsarcosin, 50 mM CAPS, pH 11,0
50 x Dialysepuffer	1 M MOPS, pH 7,0 mit KOH, bei Bedarf Zusatz von 5 mM DTT

9.1.2. Prophenoloxidase 3

Im Falle der rekombinanten PPO3 wurden die Bakterienzellen wie unter B.5.1.4. beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Entsprechend der Vorgehensweise beim Hämoglobin (B.9.1.1.) wurde das die Proteinaggregate enthaltende Pellet zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und gewogen. Anschließend wurden die Aggregate in dem gewünschten Solubilisierungspuffer aufgenommen, wobei eine Konzentration von 20 mg/ml eingestellt wurde. Die Lösung wurde in der Regel 15 min bei RT inkubiert bzw. alternativ schonend auf 37 °C oder 50 °C erhitzt. Ungelöste Restbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 10.000 x g und RT für 10 min von den solubilisierten Proteinen abgetrennt. Der Erfolg der Solubilisierung wurde in einer denaturierenden PAGE (B.6.4.1.) überprüft.

Die Renaturierung der solubilisierten PPO3-Proteine erfolgte mittels Dialyse über den schrittweisen Austausch des Solubilisierungspuffers. Dabei wurde in der Regel die Proteinprobe gegen das 50fache Volumen an Dialysepuffer dialysiert. Abschließend wurde die Probe bei 10.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um unlösliches Material von den renaturierten Proteinen zu trennen. Die Auswertung der Proben erfolgte im Rahmen einer SDS-PAGE (B.6.4.1.).

Solubilisierungspuffer 1	0,3% N-Laurylsarcosin, 50 mM CAPS, pH 11,0
Solubilisierungspuffer 2	8 M Harnstoff (optional: 1 mM DTT bzw. β-Mercaptoethanol)
Solubilisierungspuffer 3	6 M Guanidiniumhydrochlorid (optional: 1 mM DTT)
Solubilisierungspuffer 4	10% SDS
50 x Dialysepuffer 1	1 M MOPS, pH 7,0 mit KOH, bei Bedarf Zusatz von 5 mM DTT
1 x Dialysepuffer 2	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

9.2. Hexamerbildung aus rekombinanten LSP2-Monomeren

Zur Assoziation der rekombinanten LSP2-Monomere zu einem Hexamer wurde ausschließlich das Dialyseverfahren verwendet. Hierfür wurden die aufgereinigten LSP2-Untereinheiten mittels der Amicon Ultra-15 Filter (Millipore) nach Herstellerangaben auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml eingeengt. Pro Versuchsansatz wurde je 1 ml der LSP2-Probe in vorbereitete Dialyseschläuche der Firma Serva (B.9.1.) gegeben und zwischen 24-160 h gegen das 100-fache Volumen an Dialysepuffer bei 4 °C inkubiert.

Stabilisierungspuffer II, pH 6,8	1 Liter Kaliumphosphatpuffer, pH 4,8 ca. 300 ml Natriumphosphatpuffer, pH 9,0 10 mM $MgCl_2$ (filtriert, autoklaviert)
Dialysepuffer	Stabilisierungspuffer II 0,01% N-Phenylthioharnstoff 1 mM DTT

9.3. Rekonstitution von PPO3 mit Kupfer

9.3.1. *in vitro*-Rekonstitution der unaufgereinigten rekombinanten PPO3

Nach rekombinanter Expression wurden die Bakterienzellen wie beschrieben (B.5.1.4.) in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 oder in einem 50 mM Tris/HCl-Puffer mit dem gewünschten pH-Wert (pH 5,5-9,0) aufgeschlossen. Je Versuchsansatz wurde 1 ml der löslichen Zellüberstände eingesetzt. Die Proben wurden mit der gewünschten Konzentration an Kupfer versetzt und bei 4 °C, RT oder 40 °C inkubiert. Zusätzlich zu der Verwendung von $CuSO_4$ als Cu^{2+}-Donor wurde parallel mit einem Angebot an Cu^{+}-Ionen aus einem Cu(I)-GSH-Komplex gearbeitet. Letztere wurden durch Komplexierung mit Glutathion (GSH, reduzierte Form) kurz vor Gebrauch hergestellt, wobei das GSH im 5-fachen bzw. 10-fachen Überschuss eingesetzt wurde. Um den Erfolg der Rekonstitution zu überprüfen, wurden in regelmäßigen Abständen (1 h, 3 h, 24 h, 48 h und 72 h) Phenoloxidase-Aktivitätstests (B.10.) durchgeführt. Als Negativkontrolle in dieser Versuchsreihe wurden die löslichen Zellüberstände des untransformierten Bakterienstammes verwendet. Dagegen dienten je Versuch 200 ng der kommerziell erhältlichen Champignon-Tyrosinase *Agaricus bisporus* (Sigma-Aldrich) als Positivkontrolle, um einen möglichen inhibierenden Effekt der Pufferbestandteile bzw. der Versuchsbedingungen auf die Enzymaktivität ausschließen zu können.

9.3.2. *in vitro*-Rekonstitution nach Nakamura et al. (2000)

Anhand der Vorgehensweise von Nakamura et al. (2000) bei der erfolgreichen Rekonstitution der rekombinanten Pilz-Tyrosinase *Aspergillus oryzae* mit $CuSO_4$ wurden 5 x 100 ml Expressionskulturen wie unter B.5.1.4. beschrieben induziert. Die Zellen wurden bei 2700 x g für 10 min geerntet, mit 20 ml eines 50 mM Tris/HCl-Puffers, pH 7,5 gewaschen und abschließend in 20 ml dieses Tris-Puffers aufgenommen. Nach Zellaufschluss wurden die löslichen Zellüberstände mit 10 µM $CuSO_4$ versetzt und für 14 h bei 4 °C inkubiert. Dem Ansatz wurde im Folgenden EDTA in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt. Es folgte eine vierstündige Dialyse bei 4 °C gegen einen Liter 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,0. In einem Alternativansatz erfolgte die Dialyse unmittelbar nach der Inkubation mit $CuSO_4$ ohne jegliche EDTA-Zugabe. Nach Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (B.8.4.) wurde der Erfolg der Rekonstitution überprüft (B.10.).

9.3.3. *in vitro*-Rekonstitution nach Jensen et al. (1999a, b)

Für die Rekonstitution des Kupferzentrums der PPO3 wurde ein Tris-$CuCl_4^{3-}$-Puffer verwendet, bei dem durch das Zusammenwirken von $Cu(II)Cl_2$ und dem reduzierenden Vitamin C (L-Ascorbinsäure) $CuCl_4^{3-}$ entsteht (Jensen et al., 1999a, b). Für die Ansätze wurden durchschnittlich 1 mg des aufgereinigten PPO3 bzw. Thrx-PPO3 in dem Puffer 1 bzw. Puffer 2 so verdünnt, dass die Proteinendkonzentration jeweils 0,1 mg/ml betrug. Alternativ wurde nach rekombinanter Expression das unaufgereinigte Protein verwendet. Hierfür wurden die Bakterien direkt in 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 aufgeschlossen (B.5.1.4.) und die löslichen Zellüberstände anschließend 1:1 mit Puffer 3 verdünnt. Als Negativkontrolle dienten die verwendeten Puffer ohne Protein. Während der zweitägigen Inkubation bei 4 °C wurden die Proben in regelmäßigen Abständen auf eine Phenoloxidase-Aktivität (B.10.) überprüft.

Puffer 1	50 mM Tris/HCl, pH 7,4
	1 M NaCl
	200 µM $CuCl_2$
	10 mM Ascorbinsäure
Puffer 2	Puffer 1 mit 1 M Sulfobetain PPS
Puffer 3	50 mM Tris/HCl, pH 7,4
	2 M NaCl
	400 µM $CuCl_2$
	20 mM Ascorbinsäure

10. Phenoloxidase-Aktivitätstests

Für einen Nachweis der Phenoloxidase-Aktivität bieten sich der „Dopachrom-Assay“ (Mason; 1948) und „MBTH“-Assay (Pifferi und Baldassari, 1973; Winder und Harris, 1991; Rodriguez-Lopez et al., 1993; Jaenicke, 2002) an. Während im Dopachrom-Assay die nicht-enzymatische Bildung von Dopachrom aus dem Phenoloxidase-Produkt Dopachinon anhand einer Zunahme der Absorption bei 475 nm verfolgt werden kann, reagiert im MBTH-Test das Dopachinon mit dem Färbereagenz 3-Methyl-2-Benzo-thiazolinon-Hydrazon (MBTH) zu einem stabilen rot gefärbten Reaktionsprodukt, welches ein Absorptionsmaximum bei etwa 500 nm aufweist (Abb. B.1).

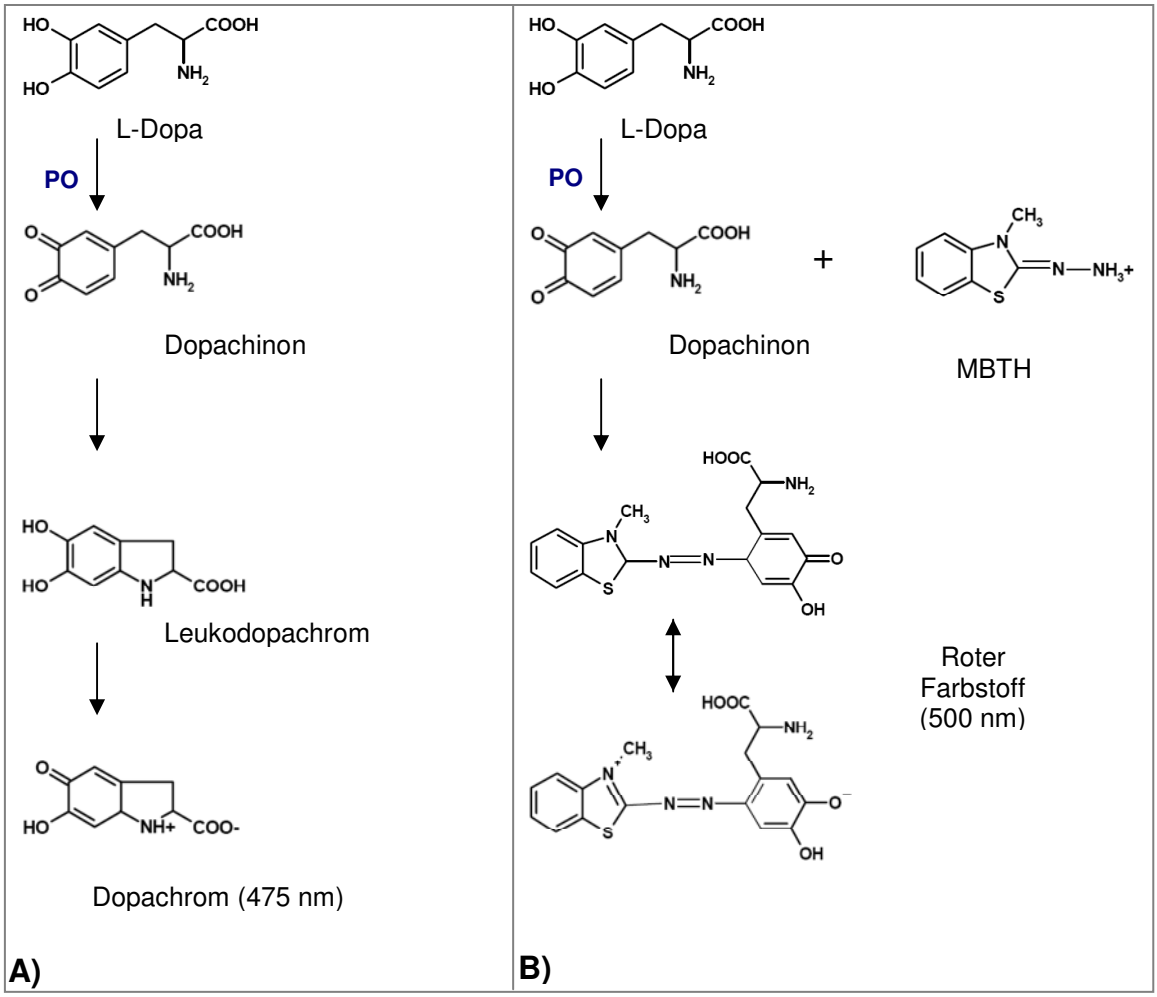

Abb. B.1: Reaktionsschemata der verwendeten Assays für den Nachweis von Phenoloxidase-Aktivitäten. A) Dopachrom-Assay. Das Substrat L-Dopa wird durch die Phenoloxidase (PO) zu Dopachinon oxidiert, welches spontan zu Leukodopachrom zyklisiert und schließlich in einer weiteren nicht-enzymatischen Reaktion zum rot-braun gefärbten Dopachrom oxidiert wird. Die Bildung von Dopachrom kann anhand der Absorptionszunahme bei 475 nm verfolgt werden. B) MBTH-Assay. Das PO-Reaktionsprodukt Dopachinon reagiert mit MBTH zu einem roten Farbstoff. Dessen Absorptionsmaximum liegt bei etwa 500 nm.

Prinzipiell können beide Tests aufgrund der beobachteten Absorptionsänderung für eine Quantifizierung der Aktivität in Form von kinetischen Messungen verwendet werden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass nur der MBTH-Assay über einen längeren Zeitraum ein konstantes Signal liefert, da das rot gefärbte Produkt nicht weiterreagiert. Im Dopachrom-Assay dagegen bleibt die Zunahme der Absorption bei 475 nm nur in den ersten 3-4 min konstant, weil das sich bildende Dopachrom langsam zu Melanin reagiert und dadurch nicht mehr zur Absorption beiträgt. Ein weiterer Nachteil ist, dass nicht das gesamte Dopachinon in Dopachrom umgewandelt wird: ein Teil des Dopachinons und des Zwischenproduktes Leukodopachrom wird direkt in das Melanin eingebaut (Winder und Harris, 1991). Der gravierende Vorteil des Dopachrom-Assays liegt jedoch darin, dass der Reaktionslösung keine weiteren Substanzen wie z.B. Färbereagenzien oder Lösungsmittel zugesetzt werden müssen, die einen unbekannten Einfluss auf die Phenoloxidase haben könnten. Der molare Extinktionskoeffizient von Dopachrom ist aber mit 3700 M^{-1} cm^{-1} relativ klein und somit dieser Assay deutlich weniger empfindlich als der MBTH-Assay, der mit einem Färbereagenz arbeitet. Bedingt durch den größeren molaren Extinktionskoeffizienten des bei der Reaktion entstehenden Farbstoffs von 29.000 M^{-1} cm^{-1} ist der MBTH-Test etwa achtmal empfindlicher als der Dopachrom-Nachweis. Somit eignet sich der MBTH-Assay wegen seiner höheren Sensitivität und dem sichtbaren rot gefärbten Reaktionsprodukt besonders gut für einen ersten schnellen Aktivitätsnachweis mittels Dot Blot.

Als Konsequenz wurden in dieser Arbeit beide Assays zum Nachweis von Phenoloxidase-Aktivität eingesetzt. In allen Versuchen wurde ausschließlich das o-Diphenol Dopamin (Sigma-Aldrich) verwendet. o-Diphenole beschleunigen die Umwandlung der Phenoloxidasen vom Met-Zustand in den deoxygenierten Zustand erheblich, so dass das Substrat direkt nach Zugabe mit maximaler Geschwindigkeit umgesetzt werden kann (Pomerantz und Warner, 1967). Um die Autooxidation zu verzögern, wurde das Substrat kurz vor Gebrauch frisch als 10 mM Stocklösung in kaltem Phosphatpuffer angesetzt und bis zur Messung kühl und dunkel gelagert. Für eine möglicherweise notwendige Aktivierung der Phenoloxidase wurde allen Versuchsansätzen standardmäßig 0,01-0,3% SDS aus einer 10% Stammlösung zugesetzt (Decker et al., 2001; Jaenicke, 2002). Alternativ wurde Trypsin in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet.

0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0	d.h. 61,5 mM Na_2HPO_4 38,5 mM NaH_2PO_4 (vor Gebrauch steril filtrieren)
10 mM Dopamin	Dopamin in kaltem 0,1 M Phosphatpuffer
13,9 mM MBTH	d.h. 3 mg/ml MBTH in dest. H_2O

10.1. Tropfentest

Aufgrund seiner einfachen Durchführung und des geringen Zeitaufwandes wurde der Tropfentest basierend auf dem MBTH-Assay vor allem bei einer Vielzahl von gleichzeitig zu testenden Proben eingesetzt. Hierfür wurden 5 µl der Färbelösung mit 5 µl der entsprechenden Proteinfraktion auf einem Streifen Parafilm gemischt. Als Positivkontrolle dienten 30 ng der Champignon-Tyrosinase *Agaricus bisporus* (Sigma-Aldrich). Als Maßstab für die Autooxidation des Substrats Dopamin, welches nach einiger Zeit zu einer deutlichen Hintergrundfärbung führt, wurde eine Kontrolle bestehend aus 5 µl Färbelösung mitgeführt. Da die Autooxidation des Dopamins eine Detektion von geringen Phenoloxidase-Aktivitäten unmöglich macht, wurde zusätzlich zum Tropfentest ein weiterer Aktivitätsnachweis basierend auf dem Dopachrom-Assay angeschlossen.

Färbelösung	5 mM Dopamin
	0,45 mM MBTH
	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0
	10 mM SDS

10.2. Messung der Absorptionsänderung

Messungen zur Verfolgung von Absorptionsänderungen wurden in der Regel in Quarzglasküvetten (Roth) in einem Gesamtvolumen von 1 ml im Lambda 2S Spektrometer durchgeführt. Während als Positivkontrolle je Reaktionsansatz 0,015-0,03 nmol (=200-400 ng) der Champignon-Tyrosinase *Agaricus bisporus* (Sigma-Aldrich) eingesetzt wurden, war die verwendete Menge des rekombinanten Enzyms bedingt durch die unterschiedliche Herkunft der Proben bzw. der Proteingemische mit unterschiedlichem Enzym-Anteil sehr variabel. In der Regel wurden daher mehrere Ansätze mit steigenden Mengen an rekombinantem Protein vermessen. Basierend auf dem Dopachrom-Assay wurde hierfür jeweils die entsprechende Menge an Protein mit Phosphatpuffer sowie 1 mM Substrat gemischt und die Reaktion durch die Zugabe der entsprechenden Menge des Aktivators gestartet. Die Messung erfolgte sofort im Anschluss bei 505 nm für durchschnittlich 5-10 min. Als Maß für die Autooxidation des Dopamins wurde zudem eine Kontrolle ohne Enzym mitgeführt, wobei in der Regel der lösliche Zellextrakt untransformierter Bakterien bzw. untransfizierter Insektenzellen verwendet wurde. Die Spezifität der in den Assays erhaltenen Signale wurde bei Bedarf durch den Einsatz eines typischen Inhibitors von Phenoloxidasen bestätigt. Hierfür wurden alle Ansätze wie

zuvor beschrieben mit dem gewünschten Aktivator sowie 70 nM-5 µM des Inhibitors Phenylthioharnstoff versetzt und vor Beginn der Messung für 5 min bei RT vorinkubiert.

10.3. Färbung von nativen Gelen

Für die Färbung auf Phenoloxidase-Aktivität wurde eine native PAGE unter Verwendung von 10%igen Trenngelen durchgeführt (B.6.4.2.). Als Positivkontrolle wurde neben den zu analysierenden Proben jeweils 50 ng der Champignon-Tyrosinase *Agaricus bisporus* (Sigma-Aldrich) auf das Gel aufgetragen. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele für 15 min in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer inkubiert, um den alkalischen Trenngel-Puffer (pH 8,6) aus dem Gel zu entfernen, der bei Dopamin zu einer starken Hintergrundfärbung bedingt durch Autooxidation führt (Herlinger et al., 1995). Im Anschluss darauf erfolgte die Inkubation in einer Färbelösung, bis eine Farbreaktion deutlich sichtbar war. Die Gele wurden daraufhin zur Dokumentation sofort eingescannt.

Färbelösung für

MBTH-Assay	5 mM Dopamin
	0,45 mM MBTH
	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0
	10 mM SDS
Dopachrom-Assay	5 mM Dopamin
	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0
	10 mM SDS

10.4. *in vivo*-Aktivitätsnachweis in S2-Zellen

Alternativ zu allen bislang aufgeführten Tests konnte im Fall der S2-Zellen der Nachweis von Enzymaktivitäten bereits *in vivo* erfolgen (vgl. Manual „*ß-Gal staining Kit*“, Invitrogen). Nach einem von Invitrogen für das Enzym ß-Galaktosidase entwickelten Protokoll wurde eine alternative Vorgehensweise abgeleitet, die auf dem Dopachrom-Assay beruht. Hierfür wurde die Expression wie unter B.5.2.2.4. beschrieben durchgeführt und die Zellen wurden in dem alten Medium abgelöst. Etwa 10 ml dieser Zellsuspension wurde mit einem Volumen der Fixierlösung gemischt und 1 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal mit 10 ml dest. H_2O gewaschen und abschließend für 10 min bei 200 x g pelletiert. Nach Aufnahme des Zellpellets in 250 µl 5% BSA-Lösung wurden je 25 µl auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern ausgestrichen und

üN bei 4 °C staubgeschützt getrocknet. Vor der weiteren Verwendung wurden die Zellausstriche 10 min in 1 x PBS rehydriert, bevor sie in der Substratlösung üN im Dunkeln inkubiert wurden. Nach mehrmaligem Waschen mit dest. H_2O wurden die Proben getrocknet, mit 30%iger Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt und bei RT gelagert. Die Auswertung der Präparate erfolgte 24 h später lichtmikroskopisch.

0,01% Poly-L-Lysin	Objektträger 20 min in dieser Lösung inkubieren, 5 min in dest. H_2O waschen und üN trocknen
Fixierlösung	5% Formol in 1 x PBS, pH 7,5
0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,0	100 ml 0,1 M Na-Cacodylat, pH 8,2 sowie 20 ml 0,1 M Cacodylsäure, pH 4,26
Färbelösung	5 mM Dopamin Cacodylatpuffer, pH 7,0 1 mg/ml Trypsin

C. Ergebnisse

1. Hämoglobin in *Carcinus maenas*

In dieser Arbeit wurden die Malacostraca auf das Vorhandensein von Hämoglobin überprüft. Dabei konnten tatsächlich durch Datenbanksuchen sechs ESTs („*expressed sequence tags*“) identifiziert werden, die für ein Hämoglobin (Hb) in der Strandkrabbe *Carcinus maenas* kodieren. Alle nachfolgenden Untersuchungen konzentrierten sich auf die molekularbiologische und biochemische Charakterisierung dieses Hb.

1.1. Ermittlung der Hb-Sequenzen

Nach Erstellung eines Alignments aus den sechs in der Datenbank identifizierten EST-Sequenzen DN635027, DN551432, DN551331, DN161664, DN161580, DN1611354 und DN161266 war ersichtlich, dass die gesamte codierende Region des *C. maenas* Hämoglobins (CmaHb) bestehend aus 567 bp abgeleitet werden konnte (Anhang G.8.1.1.). Die entsprechende Hb-cDNA wurde mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA amplifiziert, welche zuvor aus dem kompletten Gewebe eines Tieres isoliert wurde. Nach der Klonierung und Sequenzierung des Amplifikats ergab ein Vergleich mit der aus den ESTs abgeleiteten codierenden Sequenz eine 100%ige Übereinstimmung. Die cDNA wurde anschließend in die Aminosäuresequenz translatiert und ein Alignment erstellt. Dieses verdeutlichte, dass das CmaHb die typische Globinstruktur bestehend aus 140 bis 150 Aminosäuren und die als A bis H bezeichneten acht α-Helices aufweist. Zusätzlich besitzt CmaHb eine N-terminale Verlängerung, so dass sich ein Protein aus insgesamt 189 Aminosäuren mit einer errechneten molekularen Masse von 20,7 kDa ergibt. Innerhalb der Primärstruktur sind die für die Sauerstoffbindung wichtigen Aminosäuren wie beispielsweise das proximale und distale Histidin an den Positionen E7 und F8 konserviert (Abb. C.1).

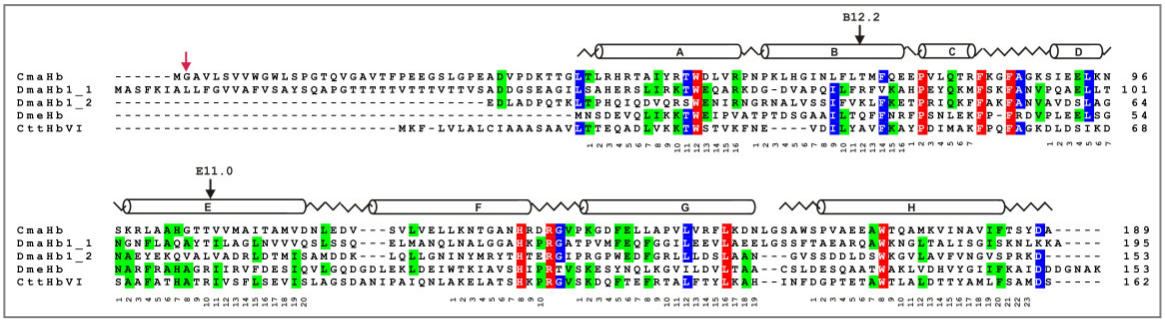

Abb. C.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen des CmaHb mit anderen Hämoglobinen der Arthropoden. Konservierte Aminosäuren sind farbig gekennzeichnet (Konservierung: rot: 100%; blau: 80%, grün: 60%) Die Sekundärstruktur des *Drosophila melanogaster* Globins 1 mit den acht α-Helices A bis H ist in der obersten Reihe angegeben. Die Intronpositionen B12.2 und E11.0 sind mit schwarzen Pfeilen markiert, das potentielle Glycin für eine N-Myristoylierung mit einem roten Pfeil. DmaHb_1: *Daphnia magna* Hämoglobin Domäne 1, DmaHb_2: *D. magna* Hämoglobin Domäne 2, DmeHb: *Drosophila melanogaster* Globin 1, CttHbVI: *Chironomus thummi thummi* Hämoglobin VI.

Um die Intron-Positionen innerhalb des codierenden Abschnittes bestimmen zu können, erfolgte die Amplifikation von Teilen des Hb-Gens aus genomischer DNA via PCR. Dabei wurden die zur Klonierung der cDNA verwendeten äußeren Primer mit verschiedenen, neu konstruierten kombiniert, welche sequenzintern binden (Anhang, Tabelle G.8). Durch die Amplifikation unterschiedlicher Teilabschnitte der Hb-Sequenz mit überlappenden Bereichen konnten die einzelnen Genomabschnitte durch mehrfaches Sequenzieren verifiziert und zusammengefügt werden. Ein anschließend durchgeführter Abgleich von cDNA und genomischer Sequenz zeigte, dass CmaHb insgesamt zwei Introns besitzt. Diese befinden sich in der B-Helix an Position B12.2 (d.h. zwischen der zweiten und dritten Base des 12. Codons der B-Helix) und in der E-Helix an Position E11.0 (d.h. vor der ersten Base des Codons 11 der Helix E). Dabei beträgt die Größe des ersten Introns 690 bp, während ein 491 bp langes Intron den kodierenden Bereich in der E-Helix unterbricht.

Erste Lokalisationsvoraussagen erfolgten computergestützt mit verschiedenen Online-Programmen. Mit dem Programm PSORT II (http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/; Horton und Nakai, 1996; 1997) konnte definitiv die Präsenz eines hydrophoben Signalpeptids für die Sekretion des CmaHb in den Extrazellulärraum ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde mit dem Myristoylater (http://www.expasy.org/tools/myristoylator/) für das N-terminale Glycin an Position 2 eine N-Myristoylierung vorausgesagt (Abb. C.1). Die im letzteren Fall berechnete hohe Wahrscheinlichkeit von 93% deutet somit sehr stark auf ein membrangebundenes Globin hin.

1.2. Lokalisation von CmaHb im Organismus

Zur Überprüfung der computergestützten Voraussagen zur Lokalisation sollte das CmaHb hauptsächlich unter Anwendung diverser immunologischer Techniken nachgewiesen werden. Für die Versuche wurden daher polyklonale Peptidantikörper gegen zwei ausgewählte antigene Bereiche des CmaHb kommerziell erstellt (B.7.1.). Erst nach Affinitätsreinigung (B.7.2.) der erhaltenen, in Western Blots (B.7.3.) auf Funktion und Spezifität getesteten Antiseren wurden die gereinigten Antikörper für alle nachfolgend beschriebenen Experimente eingesetzt.

1.2.1. Verteilung von CmaHb im Gewebe

Ein zu Beginn durchgeführter Western Blot schloss definitiv aus, dass es sich bei CmaHb um ein in der Hämolymphe vorliegendes, extrazelluläres Protein handelt. Statt in der Körperflüssigkeit wurde das Protein eindeutig in dem aus Gesamtgewebe isolierten Proteinextrakt nachgewiesen. Die molekulare Masse des detektierten Proteins deckte sich dabei in etwa mit der erwarteten Masse von 20,7 kDa (Abb. C.2).

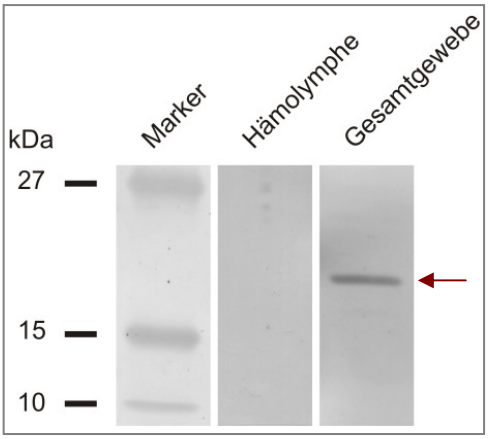

Abb. C.2: Nachweis des Hb via Western Blot. Eingesetzt wurden jeweils 70 µg der Proben. Die Immundetektion erfolgte mit aufgereinigten CmaHb-Antikörpern.

Zur Untersuchung der Gewebespezifität wurden die fünf ausgewählten Gewebe Kiemen, Mitteldarmdrüse, Gonaden, Muskeln und das Herz präpariert. Aus einem Teil erfolgte die Isolierung von Gesamt-RNA, während der Rest für eine Proteinextraktion eingesetzt wurde. Die Methode der RT-PCR identifizierte die Kiemen als den hauptsächlichen Ort der Biosynthese von CmaHb. Der parallel dazu durchgeführte immunologische Nachweis mittels Western Blot wies das Protein ebenfalls eindeutig in den Kiemen nach, wohingegen kein Protein in den anderen Geweben detektiert werden konnte (Abb. C.3).

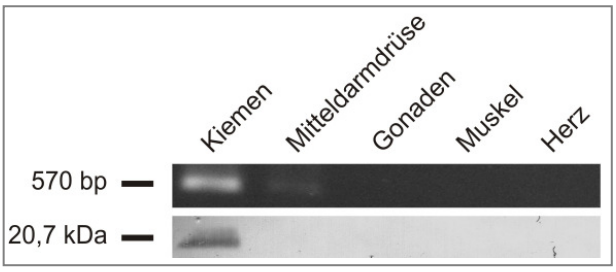

Abb. C.3: Gewebelokalisation des CmaHb via RT-PCR und Western Blot. Oben: Amplifikation des Hb via RT-PCR. Unten: Western Blot unter Verwendung von je 100 µg der Proteinproben.

1.2.2. (Sub)zelluläre Lokalisation von CmaHb im Kiemengewebe

Aus den unterschiedlichen Kompartimenten frisch präparierter Kiemen wurden vier verschiedene Proteinfraktionen selektiv isoliert und für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Die Immundetektion resultierte in einem starken Signal der erwarteten molekularen Masse von etwa 20,7 kDa in der Fraktion, die die Membranproteine enthielt. Zusätzlich wurden geringe Mengen des CmaHb in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert (Abb. C.4).

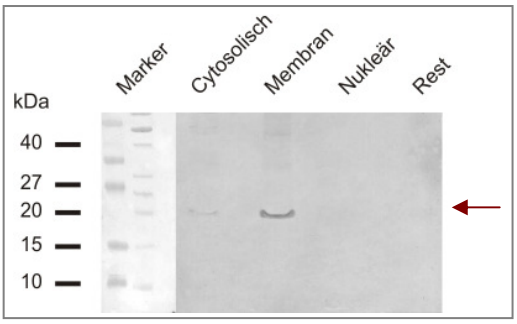

Abb. C.4: Untersuchung der subzellulären Lokalisation von CmaHb im Kiemengewebe via Western Blot. Aufgetragen sind jeweils 70 µg der extrahierten cytosolischen Proteine, Membranproteine, nukleäre Proteine und alle Restproteine.

Zur Verifizierung einer möglichen membrangebundenen Lokalisation von CmaHb wurde auf die Methode der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie unter Anfertigung von Gefrierschnitten zurückgegriffen. Für die Bestimmung der dafür optimalen Schnittebene sowie Schichtdicke wurden die ersten Kiementestschnitte mit Hämatoxylin angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Dabei erwiesen sich vor allem Längsschnitte mit einer Dicke von 6 µm als ideal, um einen groben Überblick über den histologischen Aufbau der Blattkiemen (Phyllobranchiae) von *C. maenas* zu erhalten. Deutlich erkennbar in den angefertigten Schnitten sind neben dem medianen Septum die angeschnittenen Kiemenlamellen sowie die Hemocoel-Regionen im Gewebe. Die äußere, dem Wasser in der Kiemenhöhle zugewandte Zellschicht der Lamellen setzt sich u.a. aus den sogenannten Hauptzellen sowie den Stütz- bzw. Pfeilerzellen zusammen. Die Letzteren sind auch ein Bestandteil des inneren Abschnittes jeder Lamelle, da sie das gesamte Hemocoel überspannen und somit die proximale und distale Seite der Lamellen miteinander verbinden

(Abb. C.5). Weitere Zelltypen waren mit dieser Methode nicht eindeutig zuzuordnen.

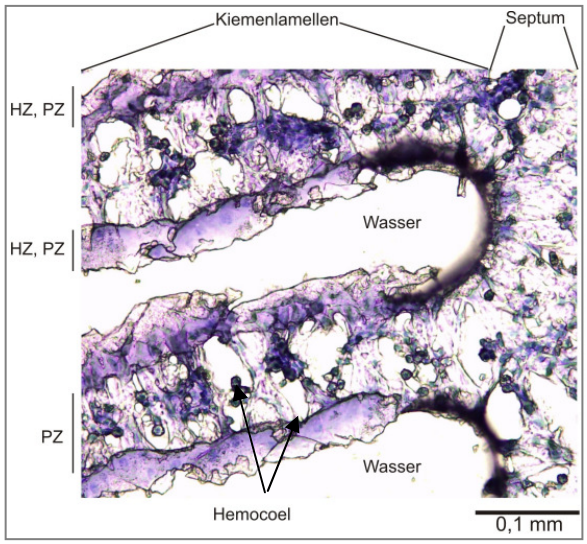

Abb. C.5: Histologische Kontrollfärbung. Die Gefrierschnitte (6 µm) der Kieme wurden mit Hämatoxylinlösung angefärbt. HZ: Hauptzellen, PZ: Stütz- und Pfeilerzellen.

Obwohl die Auswertung der angefertigten Immunfluoreszenzpräparate durch eine vorhandene hohe Autofluoreszenz der Kiemen erschwert wurde, war es letztendlich doch möglich, innerhalb der Kiemen die Regionen mit den spezifischen Immunsignalen zu identifizieren. Das CmaHb scheint generell in den äußeren, dem Wasser zugewandten Bereichen der Kieme in der Nähe der Hauptzellen vorzuliegen. Dabei wiesen die sowohl im medianen Septum (Abb. C.6, A) als auch in den einzelnen Lamellen (Abb. C.6, B) erhaltenen Signale stark auf ein membrangebundenes Globin hin. Die zur Kontrolle durchgeführten Kompetitionsversuche, in denen der entsprechende Antikörper erst nach Inkubation mit seinem rekombinanten Antigen auf den Präparaten verwendet wurde, zeigten keine Signale mehr und bestätigten somit die Spezifität der erhaltenen Immunreaktionen (Abb. C.6, C+D).

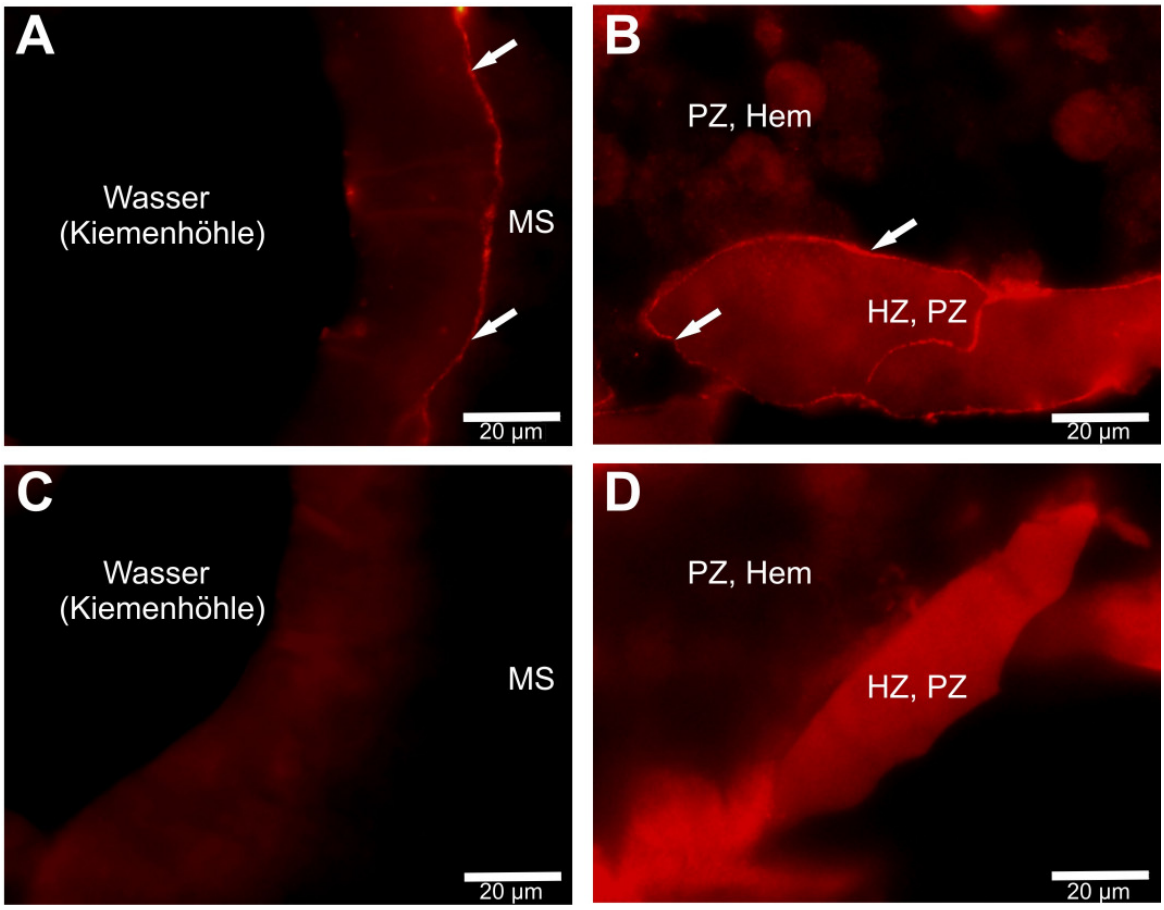

Abb. C.6: (Sub)zelluläre Lokalisation des CmaHb in den Kiemen von *C. maenas* via Immunfluoreszenzmikroskopie. A + B) Immundetektion mit aufgereinigten CmaHb-Antikörpern. C + D) Überprüfung der Spezifität der Signale in einem Kompetitionstest. A + C) Region des medianen Septums. B + D) äußere Zellschicht der Lamelle. MS: Medianes Septum, PZ: Stütz- und Pfeilerzellen, Hem: Hemocoel, HZ: Hauptzellen.

1.3. Biochemische Charakterisierung des rekombinanten CmaHb

Um Aussagen über biochemische und biophysikalische Eigenschaften des CmaHb treffen zu können, wurde das Protein im bakteriellen pET-System unter Verwendung des Stammes BL21(DE3)pLysS rekombinant exprimiert. Dabei war für alle beabsichtigten Experimente der Erhalt von funktionellem Protein von Bedeutung. Insgesamt wurden drei Expressionskonstrukte im Vektor pET3a konstruiert. Während der erste Klon den gesamten codierenden Bereich bestehend aus 189 Aminosäuren enthielt (Hb), wurde ein weiterer Klon für eine beabsichtigte Expression der Globindomäne bestehend aus den acht konservierten Helices hergestellt (HbΔN1-40). Mit dem dritten Konstrukt wurde das Hb am N-Terminus nur um ca. 21 Aminosäuren verkürzt (HbΔN1-21). Die ersten Versuche zeigten, dass alle drei Formen des Hb prinzipiell in den Bakterien exprimiert werden konnten. Allerdings lag nach Zellaufschluss sowohl das gesamte rekombinante

Hb als auch das HbΔN1-40 nur in Form von *inclusion bodies* im Pellet vor (Abb. C.7, A + C). Im Falle des HbΔN1-21 dagegen konnte auf diesem Weg ein Anteil an löslichem Protein gewonnen werden (Abb. C.7, B).

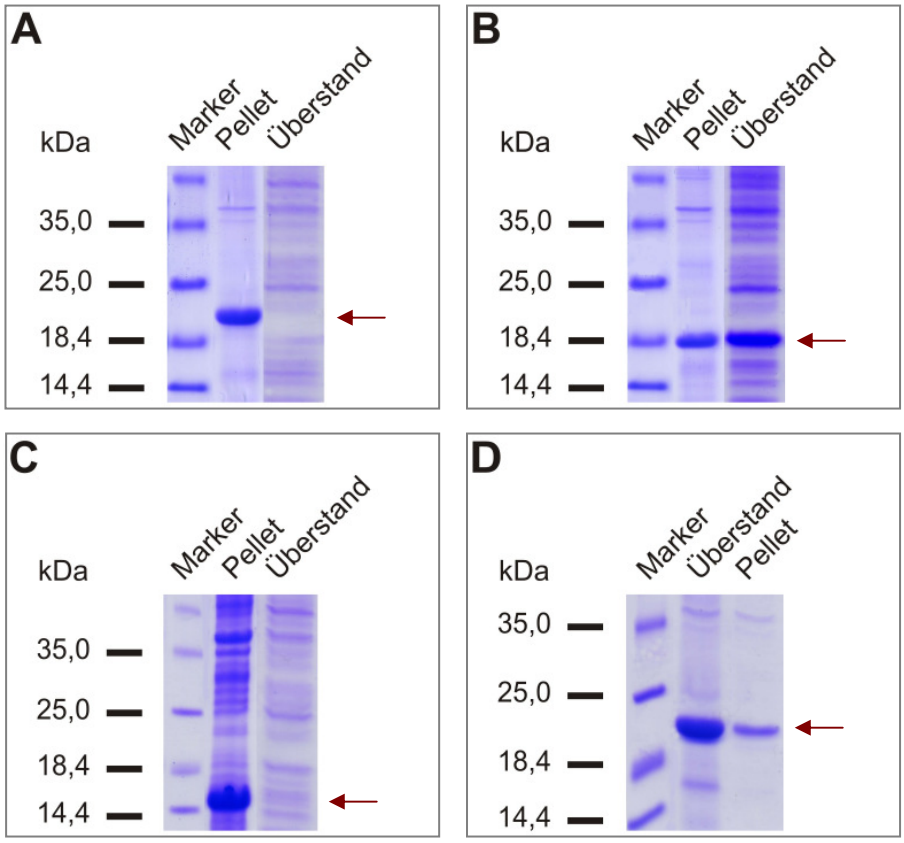

Abb. C.7: Rekombinante Expression von Hb im pET-System. Analyse der Proteinlöslichkeit nach Zellaufschluss via 10%iger SDS-PAGE. A) Hb (~ 20,7 kDa). B) HbΔN1-21 (~ 18,6 kDa), C) HbΔN1-40 (~ 16,7 kDa), D) Hb (~ 20,7 kDa) nach Solubilisierung der *inclusion bodies* und Renaturierung.

Zwar konnte letztendlich auch das in *inclusion bodies* vorliegende rekombinante Hb solubilisiert werden, doch gestaltete sich die Optimierung der Renaturierungsbedingungen mittels Dialyse schwieriger. Letztendlich führte erst die Verwendung eines Dialysepuffers bestehend aus 20 mM MOPS, pH 7,0 sowie 0,1 mM DTT zu einem Teilerfolg: nach Abschluss der Rückfaltung und einer Zentrifugation der Probe zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen der Großteil der Hb-Proteine löslich im Überstand verbleibt (Abb. C.7, D). Nichtsdestotrotz konnten die geeigneten Bedingungen für einen nachträglichen erfolgreichen Häm-Eisen-Einbau nicht gefunden werden. Weder die Renaturierung des rekombinanten Hb in Anwesenheit von Eisen und der Häm-Gruppe noch der nachträgliche Einbau in das bereits lösliche Apoprotein führten zu dem gewünschten Ergebnis. Aus diesem Grund wurde für alle folgenden Messversuche auf das lösliche HbΔN1-21 zurückgegriffen, welches zuvor in einem klassischen Drei-Schritt-Protokoll

bestehend aus Ammoniumsulfatfällung gefolgt von einer Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt wurde (Abb. C.8).

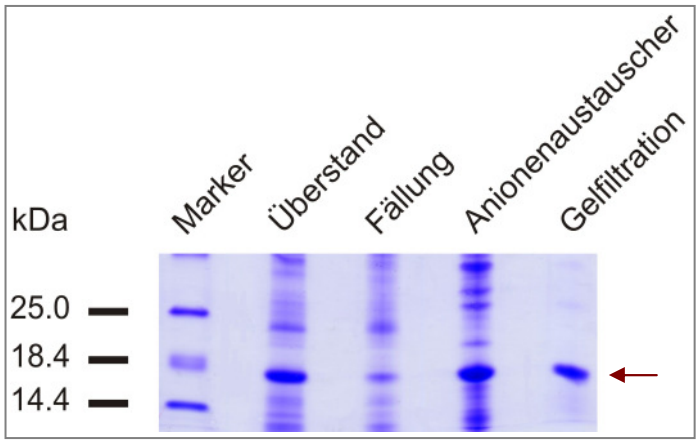

Abb. C.8: Aufreinigungserfolg von CmaHbΔN1-21 dargestellt in einer 15%igen SDS-PAGE.

Die anschließend aufgenommenen Absorptionsspektren von oxygeniertem und desoxygeniertem Protein ließen deutlich erkennen, dass es sich bei CmaHb um ein hexakoordiniertes Globin handelt. Nach der enzymatischen Reduktion des rekombinanten CmaHb (Hayashi et al., 1973) zeigte die oxygenierte Form neben dem Maximum der Soret-Bande bei 411 nm lediglich zwei schwache Nebenmaxima (536 nm und 552 nm). Das desoxygenierte HbΔN1-21 dagegen wies neben der Verschiebung der Soret-Bande zu 421 nm die für diese Koordination typischen zwei weiteren Maxima auf, die in diesem Fall bei etwa 527 nm sowie 556 nm liegen (Abb. C.9).

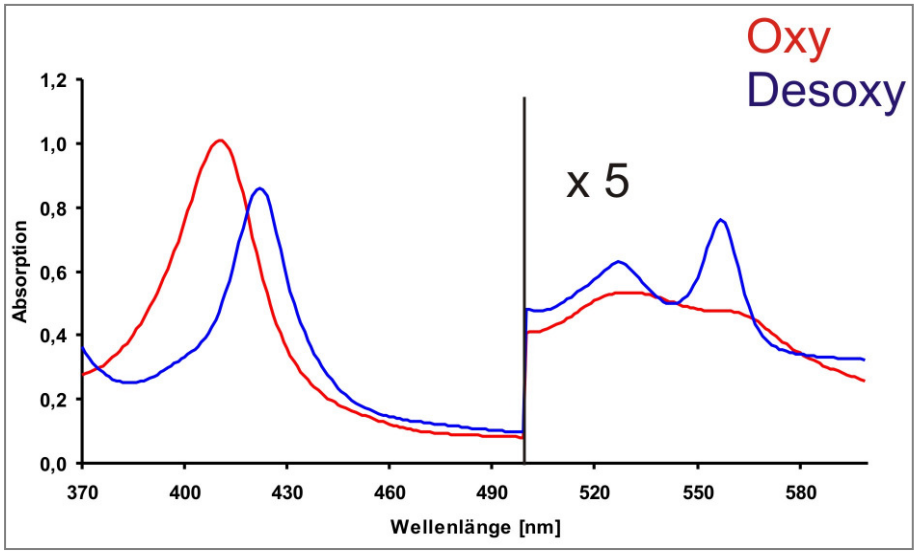

Abb. C.9: Spektren des aufgereinigten HbΔN1-21. Absorptionsspektren des oxygenierten und desoxygenierten HbΔN1-21.

Bei weiterführenden Untersuchungen zur Sauerstoffbindung stellte sich heraus, dass das rekombinante CmaHb sehr schnell oxidierte und somit in der Met-Konformation vorlag. Daher konnte z.B. der Halbsättigungsgrad der Sauerstoffbindung nicht ermittelt werden.

1.4. Phylogenetische Analysen

Für die phylogenetischen Analysen wurde die Aminosäuresequenz des CmaHb in ein Alignment bestehend aus verschiedenen Hämoglobinen der Insekten und Krebse eingefügt. Als Außengruppe wurden die aus ESTs ermittelten Sequenzen der Hämoglobine der zwei Zecken *Ixodes scapularis* und *Rhipicephalus appendiculatus* verwendet. Der anhand dieses Alignments mit Hilfe der Bayes'schen Analyse berechnete Stammbaum zeigt, dass CmaHb ein sehr gut unterstütztes Monophylum mit den übrigen Hämoglobinen bildet (Bayes'sche posterior probability: 1,0). Dabei stellt CmaHb die Schwestergruppe zu den Hämoglobinen der Insekten und Branchiopoda (Crustacea) dar (Abb. C.10).

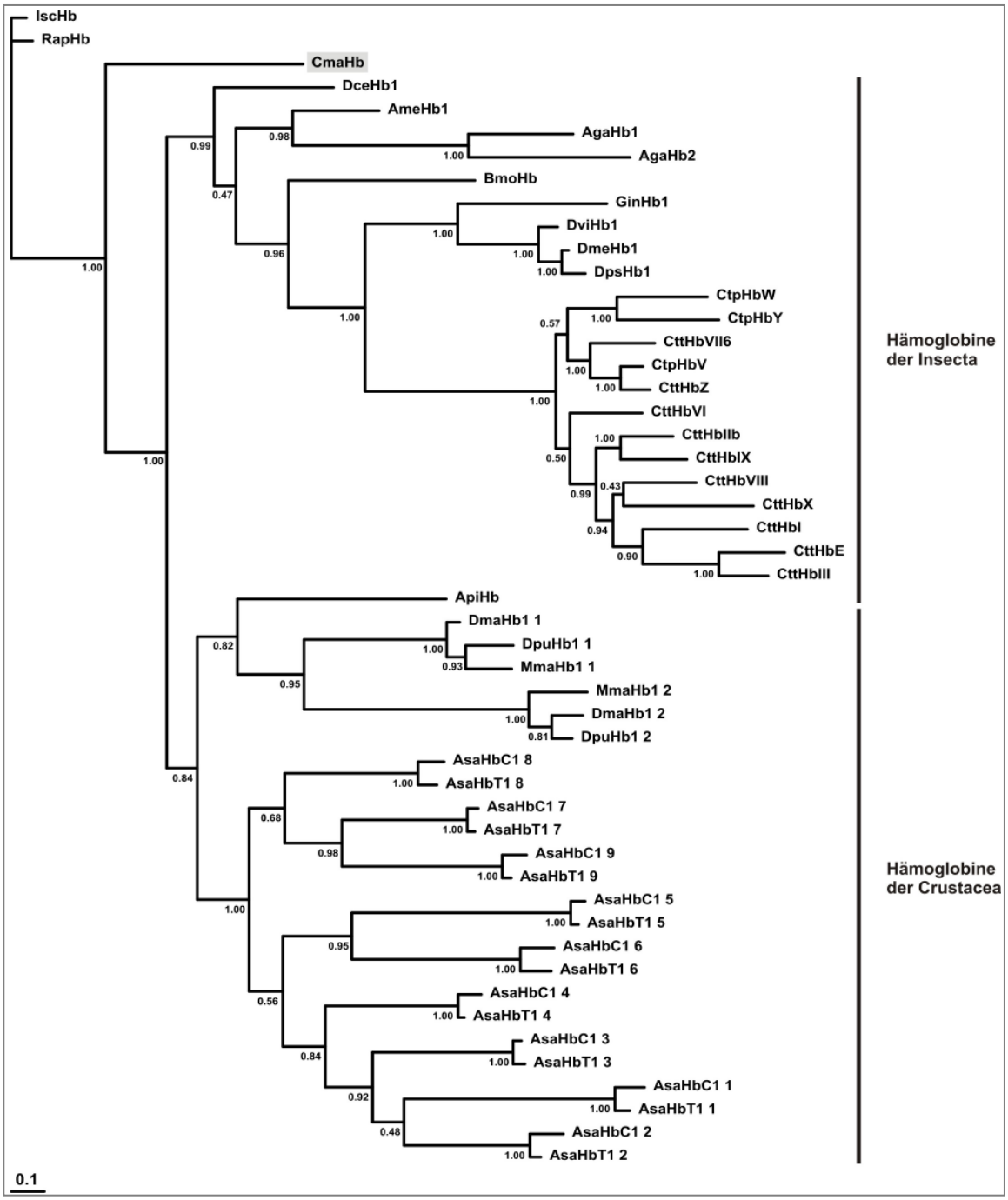

Abb. C.10: Phylogenetische Analyse des CmaHb basierend auf der Bayes'schen Analyse. Für die Analyse wurde die Aminosäuresequenz des CmaHb in ein Alignment bestehend aus verschiedenen Hämoglobinen der Insekten und Krebse eingefügt. Als Außengruppe dienten die Hämoglobine der Arachnida *Ixodes scapularis* (Isc) und *Rhipicephalus appendiculatus* (Rap). Alle verwendeten Sequenzen samt ihrer Zugangsnummern und das erstellte Alignment sind im Anhang G.8.1. dargestellt. Die phylogenetischen Analysen basierend auf MrBayes 3.1 erfolgten für 2.000.000 Generationen unter Annahme des WAG-Modells und einer Gammaverteilung der Substitutionsraten. Das Sampling der Bäume fand alle 100 Generationen statt, wobei von den letzten 15.000 (burnin = 5.000) die „posterior probabilities“ abgeschätzt wurden. Die „Bayes'sche posterior probability“ ist an den jeweiligen Knotenpunkten im Stammbaum angegeben.

2. Hämocyanin in *Speleonectes tulumensis*

In dieser Arbeit wurden die Remipedia erstmals durch molekularbiologische und biochemische Analysen auf das Vorkommen von Hämocyanin untersucht. Hierfür erfolgte wie unter B.3.1.2.3. beschrieben die gleichzeitige Extraktion von RNA und Proteinen aus einem Versuchstier der Art *Speleonectes tulumensis*.

2.1. Nachweis von Hämocyanin in *S. tulumensis*

Zur Ermittlung der Hämocyaninsequenzen wurden mehrere degenerierte Primer (Anhang G.4.) gegen konservierte Regionen der Arthropoden-Hämocyanine erstellt und in verschiedenen Kombinationen für die RT-PCR-Experimente eingesetzt. Unter Verwendung von Gesamt-RNA aus *S. tulumensis* wurde dabei mit den Primern MDF und MEH ein Fragment von ca. 550 bp amplifiziert. Nach Klonierung dieses Amplifikats und Sequenzierung von insgesamt 14 verschiedenen Klonen zeigte sich, dass die Teilsequenzen von insgesamt drei distinkten Hämocyaninuntereinheiten ermittelt werden konnten. Die im Folgenden als StuHc1, StuHc2 und StuHc3 bezeichneten Sequenzen wurden mit der Methode der RACE (B.3.6.) an ihren 5'- und 3'-Enden vervollständigt. Eine anschließende Auswertung aller Sequenzen zeigte, dass die vollständigen Transkripte 2422, 2531 und 2506 bp umfassen (Anhang G.8.2.1.). Die über einen 2058, 2016 bzw. 2013 bp langen offenen Leserahmen translatierten Proteine bestehen aus 686, 672 sowie 671 Aminosäuren. Jedes einzelne besitzt eine N-Glykosylierungsstelle sowie ein hydrophobes N-terminales Signalpeptid für die Sekretion in die Hämolymphe. Nach Abspaltung dieses Sekretionssignals ergeben sich für die Untereinheiten Polypeptidketten aus 656-667 Aminosäuren mit einer errechneten molekularen Masse von 75,7-77,1 kDa. (Tabelle C.1 und Abb. C.11).

Tabelle. C.1: Sequenzinformationen

	StuHc1	**StuHc2**	**StuHc3**
Transkript	2422 bp	2531 bp	2506 bp
Aminosäuren	686	672	671
Signalpeptid (Aminosäuren)	19	17	15
N-Glykosylierungsstellen	1	1	1
Natives Hc (Aminosäuren)	667	655	656
Molekulare Masse	77,1 kDa	75,8 kDa	75,7 kDa

```
                    *        20         *        40         *        60         *        80
StuHc1 : MKSFIFLLVVGVAWAGTLSDQMVGDSPVFIPGDADFLQKQSKILKLFNKIHEHNR--YNDQVDIATSFNPLDHLG-DFKH :  77
StuHc2 : MRSLAVLLLLLVAASAA---------------DEVFLKRQRDILLLLLRLHQPNA--IPEQKSISESYDPLMHLS-HFKK :  62
StuHc3 : MKFLLVLLVAGFAAA---------IHREVIDADKGFLKRQKDVLTLLNHVFSHFQ--DAAHQEDGRTYEPLNHLT-SYQD :  68
PmaHc1 : MKWLLTLGLVMVLASLAQA----KLTRGSVPADQDFLTRQRDVIRLCMKVHEHNH--YQEQVDLVKDYDPS--VAGKFKD :  72
PmaHc2 : MKFALVLIGLCALAAA-------------DTVDDTFYKHQTQVLHLVEHIYEPISSHYEDLTTIKKTYDPLQHLD-NFKD :  66
PinHcA : ----------------------------DALGTGNAQKQQDINHLLDKIYEPTK--YPDLKEIAENFNPLGDTSIYNDH :  49
                                                 aaaaa1.1aaaaa            aa1.2aa
                    *       100         *       120         *       140         *       160
StuHc1 : RDCVLKLVKKYKAHRLLPRGHVFNLFRPRDREEMVMFFEALFYAKTWDTFYKIACWARDKINENQFLYAMYVAVHHRHDC : 157
StuHc2 : PELVQELVDEITHGTTLPRGEIFNLFNTEHRTSMIHVFEVLFFAKDFDTFFKTAVYARDRVNEFLFYYAFSVAAVRRSDC : 142
StuHc3 : PTPVKKLVRMYKMGDCLKQSEIFCLFTDHHRHEMILLFEALYYAKDWGTFMKMARWARVHLNGALFVYSVKVALLHRQDT : 148
PmaHc1 : VTPIKRLMKYYNAKTLLPRGDIFSLFHKEHREEMILLFESFLFAQDWDTFFKTAVWARDRINEGQFVYALSVAVLHREDC : 152
PmaHc2 : GDHVKHFVHDVTHGKYLAHDEIFNIFHPHHRRQMVYLFEILYGAKDFDSFFNMAVWARDHMSPRMFLYAFSVAVLHRTDC : 146
PinHcA : GAAVETLMKELNDHRLLEQRHWYSLFNTRQRKEALMLFAVLNQCKEWYCFRSNAAYFRERMNEGEFVYALYVSVIHSKLG : 129
              aaaaaa1.3aaaaa      aaaaaaa1.4aaaaaa   aaa1.5aaaaaa        aaaa1.6aaaa

                    *       180         *       200         *       220         *       240
StuHc1 : KGVLLPPQYEIYPQLFVNNDVIQEAYSAKMKQVPATIKMHWTGTIRNPEQHVAYFGEDLGLNSHHSHWHMDFPFWWK-KA : 236
StuHc2 : EGLQLPPPYEIFPHFFVTSDVIRSAYKAKMMHTPTIIDMHWTGSIHNPEQRVAYYGEDVGLNSHHSHWHKDFPFWWK-PE : 221
StuHc3 : YGIRLTPAYELNPHMFVTNDAITKAYSAKMRNKDAVVRVEFTGTIHNPEQHVAYYGEDIGMNSHHSHWHMDFPFWWK-KD : 227
PmaHc1 : KGIILPPAYEIYPHMFVNSEVINSAYKAKMTQTPAIIHMNFTGTIRNPDQWIAYLGEDVGLNSHHAHWHMDFPFWWKAAE : 232
PmaHc2 : KGITLPPAYEITPDMFLTTDVMRKAYQAKMTATKTVIPMKFTGSIKNPEQRVAYFGEDIGVNSHHSHWHMDFPFWWK-RS : 225
PinHcA : DGIVLPPLYEITPHMFTNSEVIDKAYSAKMTQKQGTFNVSFTGTKKNREQRVAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWWE-DS : 208
         bbb1Abbbb        aaaaa1.7aaaaa   bbb1Bbbb                aaaaaa2.1aaaaaa

                    *       260         *       280         *       300         *       320
StuHc1 : YGTEKDRKGELFFYSHELTTRYDLQRLSNNLPIVGPLAWDKPIHNGFYPQAAYRNGHEFPARPDDVKFTDLDKDGFHIK : 316
StuHc2 : YGIELDRKGELFFYNHHQMTSRFDLERLSNDLTISKPLAWYRPVVEGFSPDAIYKHGFQFPMRPDNTKFHDLST----VT : 297
StuHc3 : YPTQMDRKGELFWYAHHQLTTRFDLERLSNNLDVVKPLAWDKPIEHGFSPETVYRTGDEFPVRPDDMMFHDIHG---IVS : 304
PmaHc1 : YGIEKDRKGELFYMHHQMIARYDFERLSNWLHFVEPISFEDEIEHGFYPQTTYRVGGEFPARPDNFHFHDLEH----IK : 308
PmaHc2 : YDVTKDRRGELFFYMHHQMVNRFDAERLSNWLPQVEPLNWHHEIEEGFAPAAMYFNGQEFPMRPDGIHFHDLPW----FT : 301
PinHcA : YGYHLDRKGELFFWVHHQLTARFDFERLSNWLDPVDELHWDRIIREGFAPLTSYKYGGEFPVRPDNIHFEDVDG---VAH : 285
                aaaaaaaaaa2.2aaaaaaaaaa    bb2Abb   bbbbb2Bbbbb  bbbbb2Cbbbbb

                    *       340         *       360         *       380         *       400
StuHc1 : VSQMKEYERRIRDAIAMKAVYGKDGHAISLNNTHGINTLAEIIEASAFSVNPDFYGSIHNMAHIMLGELDDPQGKYGTPP : 396
StuHc2 : VNHMRAYESRIHESIDFGHVYSTNGTEVSLNDEHGINILGEIVEASEHSINPDYYGSLHNLAHVMLGRITDPEGKFDAPP : 377
StuHc3 : VTDMKAMEYRILHTIDANLYVAENGTFPKLEVDTGINTLGEIIEASEHSVNPGFYKSIHTLSHVMLGKITDPEHKYGMPP : 384
PmaHc1 : IKDMLDYTRRIKEAISKQKVRSKNGEKIPLDAVHGIDILGDLMEPSVESPHEDYYGSLHNDAHVLLGQITDPLGKFDLPP : 388
PmaHc2 : VKDTEDYEDRIRNVIAKGYVKASDGHTIFLNGTEGINILGLVVESLDHDYNRHYFGKLHSNAHVLLSKVTDPEQKFGTPP : 381
PinHcA : VHDLEITESRIHEAIDHGYITDSDGHTIDIRQPKGIELLGDIIESSKYSSNVQYYGSLHNTAHVMLGRQGDPHGKFNLPP : 365
          aaaaaaa2.3aaaaaabb2Db   bb2Eb    aaa2.4aa             aaaaa2.5aaaaa

                    *       420         *       440         *       460         *       480
StuHc1 : GVMEHFETATRDPSFFRLHKYIDSFFKEHKDSLPPYTTDELDFHGVEIVDVEVDK---------LMTFFDDFEIDLTMAL : 467
StuHc2 : GVMEHFETATRDPSFFRLHKYIDNIFKSHKDHLTPYTHKELEFPGVTVTAAKVVGLSHASTPNMLITHFNNFYIDLHNAL : 457
StuHc3 : GVMEHFETSTRDPAFFRLHKYIDNLFRTYKEHLPPYTKEELAVDGLKVNDVEVTE---------LKTFFEDFEFDLTQGM : 455
PmaHc1 : GVMEHFETATRDPAFFRLHKHIDNLFKMYKDLLPPYTKAELEFPGVKVLDWEIGN---------LVTYFEDFDIDMLNAL : 459
PmaHc2 : GVMEHFETATRDPAFFRLHKHIDNLFKQHKDMLTPYTKEELDFPGVTVDAVKVVGKSEDSTANQIVTFFDESHINLG--N : 459
PinHcA : GVMEHFETATRDPSFFRLHKYMDNIFKKHTDSFPPYTHDNLEFSGMVVNGVAIDG--------ELITFFDEFQYSLINAV : 437
                     aaaa2.6aaa aaa2.7aa    aa3.1a  bbbbbbbb3Ab        bbbbb b3Bb

                    *       500         *       520         *       540         *       560
StuHc1 : DDTPELADVPIKAISHRLNHAPFTYLLKMKS--DASHVATVRIFLGPKYNSYGEELSLDTKRWMMVEMDKFVVHLHSGNS : 545
StuHc2 : DTTTTLGDVDIKARIGRMAHEPFKYTINVNS--ERPVTATVRIFLAPAYNWYGEEIHLDEGRWLAVELDKFAVKLHEGEN : 535
StuHc3 : ELTGTGDDAHIKAVMARINHKPFHYTIKVNS--DVKRTGMVRIFLAPKYDWYGEEIDITHNAWQTVELDKFLVPLDPGEN : 533
PmaHc1 : DDTADLPDVDVKARVQRLNHEPFTWALHMES--DKEVTAAFRVFLGPKKDWYESDFTINEVRPYLIEIDKFVTKVVAGKS : 537
PmaHc2 : MWVHTPEKVGIEVTMKRLNHEAFKYVITATA--EKETEGIVRIFLSPTYNWFGQEITLQDGHWGAIEMDRFPVKLTAGEN : 537
PinHcA : DSGENIEDVEINARVHRLNHKEFTYKITMSNNNDGERLATFRIFLCPIEDNNGITLTLDEARWFCIELDKFFQKVPKGPE : 517
              bbb3Cbbb   bbbbbbb3Dbbbbbb    bbbbbb3Ebbbbbb   3Fb aa3.2aa bbbb3Gbbbb bbbb

                    *       580         *       600         *       620         *       640
StuHc1 : EILRKSTESSVTIPDPKGYKGMVEAVKSAIAGDSEFKVNKEHRHCGIPDRLLLPKGSKEGTPFTLFVMVTDFDDDNANTD : 625
StuHc2 : VITRLSKDSTITIPDMKSHKDMIREVESALAGELEYHIDEHHRHCGFSQGLLIPKGSEAGTHFKVFIMLTDWDKDHANAD : 615
StuHc3 : VIVRKSDESTVTIPDPPSYAQLVKEVEDALSGTSVLKVHKFHRHCGIPDRMLLPKGKVGGMEFMLLVVVTDGGADKGVTI : 613
PmaHc1 : VIHRKSSESSVTIPDRETTKVLLEKVEHALEGKETLNVNKDERHCGYPDRLLLPKGRNTGMPVQIYVIVTDFEKEKVNDL : 617
PmaHc2 : VITRSGKKSVVTIDEP----MSFAEIHKAVADKDATHFHKEFRHCGFPHRLLVPKGRPEGMHYKLMVVITDYHKDVVVPD : 613
PinHcA : TIERSSKDSSVTVPDMPSFQSLKEQADNAVNGGHDLDLSAYERSCGIPDRMLLPKSKPEGMEFNLYVAVTDGDKDTEGHN : 597
         3Hbbbb    bbb3Ibbbaaaaa3.3aaaa                aa3.4aa     bbbbb3Jbbbbb a3.5a

                    *       660         *       680         *       700
StuHc1 : VES-THDYGGSISYCGTLTEGQKYPDKKPMGFPFDRHIEDVHDFKTKNMIVKDVVVTHKSDH--- : 686
StuHc2 : AHP-EDDYGGSIGYCGALWA--KYPDKKPMGFPFDRHIQDEEDFFTENMKLIDVVIKNIK----- : 672
StuHc3 : HDD--HIYGGSTSLCGIRGE--KYPDKRALGFPFDRYIHSVEDFVTPNMFCKDVVITHVPHA--- : 671
PmaHc1 : PYD--YDYGGSLSYCGVVGG-HKYPDTKAMGFPFDRRIYSREDFFTDNMYTKDVTITFKENHHH- : 678
PmaHc2 : MDVEHMDKLQSVGYCGVMEG--KIPDGKPMGYPFDRRISCEESFITKNMKFVDITVKTRV----- : 671
PinHcA : GGH---DYGGTHAQCGVHGE--AYPDNRPLGYPLERRIPDERVIDGVSNIKHVVVKIVHHLEHHD : 657
                              bb  b3Kbbb           aaa3.6aa bbbbbb3Lbbbbbb
```

Abb. C.11: Alignment von StuHc1-3 mit ausgewählten Hämocyaninen. PmaHc1 und PmaHc2: *Perla marginata* Untereinheiten 1 und 2, PinHcA: *Panulirus interruptus*. Die Sekundärstruktur des PinHcA ist in der unteren Reihe dargestellt. Gekennzeichnet sind weiterhin: Signalpeptide (unterstrichen), zu 100% konservierte Aminosäuren (grau), Histidine für Kupferbindung (blau) und die stabilisierenden Phenylalanine (rot). Computergestützte Voraussagen für N-Glykosylierungsstellen sind gelb unterlegt.

Ein Alignment der abgeleiteten StuHc-Aminosäuresequenzen mit den Hämocyaninuntereinheiten 1 und 2 der Steinfliege *Perla marginata* sowie dem Hämocyanin der Languste *Panulirus interruptus* zeigt die innerhalb dieses respiratorischen Proteins konservierten Aminosäuren (Abb. C.11). Alle drei Untereinheiten besitzen in der zweiten Domäne die für die Koordination der zwei Kupferionen benötigten sechs Histidine. Weiterhin sind auch die drei Phenylalanine in der ersten und zweiten Domäne vorhanden, die der Stabilisierung der Sauerstoffbindung dienen. Dieses multiple Sequenzalignment sowie die Berechnung anhand der Dayhoft PAM 250 Matrix zeigen entsprechende Identitäten und Ähnlichkeiten der einzelnen Hämocyaninuntereinheiten. Die Aminosäuresequenzen von StuHc1, 2 und 3 sind zu 51,6-55,6% identisch und zu 68,1-72% ähnlich (Tab. C.2).

Tabelle C.2: Identitäten und Ähnlichkeiten der Hämocyaninuntereinheiten

	StuHc1	StuHc2	StuHc3	PmaHc1	PmaHc2	PinHcA	
StuHc1		72,01%	68,26%	72,69%	62,91%	62,52%	Ähnlichkeit
StuHc2	55,65%		68,10%	72,07%	67,26%	62,89%	
StuHc3	52,60%	51,62%		66,47%	62,99%	58,94%	
PmaHc1	53,28%	53,24%	48,57%				
PmaHc2	46,99%	50,60%	46,81%				
PinHcA	46,35%	44,70%	42,30%				
	Identität						

Das Vorkommen von Hämocyanin in *S. tulumensis* wurde weiterhin durch einen Western Blot bestätigt. Unter Verwendung verschiedener polyklonaler Antikörper gegen diverse Hämocyanine der Insekten und Krebse konnten mindestens zwei distinkte Banden der erwarteten molekularen Masse von 75-80 kDa im Proteinextrakt detektiert werden (Abb. C.12).

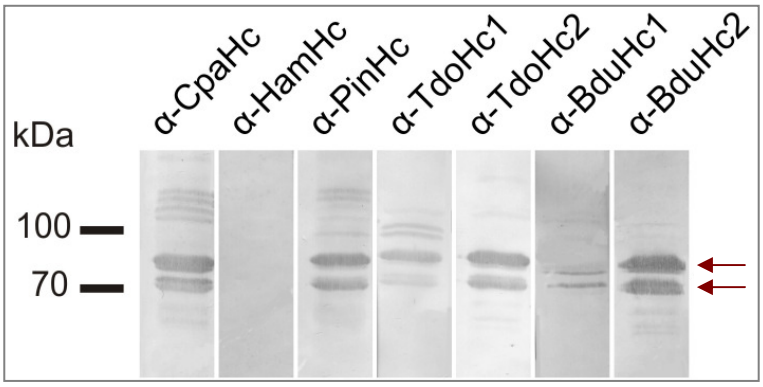

Abb. C.12: Nachweis von Hämocyanin in *S. tulumensis* via Western Blot. Verwendete Antikörper gegen die Hämocyanine der Crustacea: anti-*Cancer pagurus* (α-CpaHc), anti-*Homarus americanus* (α-HamHc), anti-*Panulirus interruptus* (α-PinHc). Verwendete Antikörper gegen die Hämocyanine der Insekten: anti-*Thermobia domestica* Untereinheit 1 und 2 (α-TdoHc1 und α-TdoHc2), anti-*Blaptica dubia* Untereinheit 1 und 2 (α-BduHc1 und α-BduHc2).

2.2. Phylogenetische Analysen

Phylogenetische Analysen wurden auf Ebene der Aminosäuresequenzen durchgeführt, wobei die ermittelten Sequenzen der drei StuHc-Untereinheiten in ein Alignment bestehend aus verschiedenen Arthropoden-Hämocyaninen sowie weiteren Proteinen der Hämocyanin-Superfamilie eingefügt wurden (Burmester und Scheller, 1996; Burmester, 2002; Hagner-Holler et al., 2004; Pick et al., 2009). Anhand dieses Alignments wurden Stammbäume mit Hilfe der Neighbor-Joining- (NJ) und der Bayes'schen Analyse (BA) sowie der Maximum Likelihood (ML) Methode berechnet. Als Außengruppe diente jeweils das Hämocyanin eines Onychophoren. Alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten Bäume schlossen eindeutig eine Zuordnung der drei StuHc-Untereinheiten in die Gruppe der Crustaceen-Proteine aus (Anhang. G.8.2.2.3.). Während die Hämocyanine und Pseudohämocyanine der Crustaceen zusammen ein sehr gut unterstütztes Monophylum bilden (NJ Bootstrap-Wert: 1,0; ML Bootstrap-Wert: 100%; Bayes'sche posterior probability: 1,0), gruppieren die StuHc-Untereinheiten mit den Proteinen der Insekten (0,65; 65%; 0,99). StuHc2 bildet ein Monophylum mit der Hämocyaninuntereinheit 2 der Insekten, wohingegen StuHc1 und StuHc3 ein Monophylum mit der Hämocyaninuntereinheit 1 und den Hexamerinen bildet. StuHc1 und StuHc3 stellen dabei die Schwestergruppe zu den Proteinen der Insekten dar (Abb. C.13).

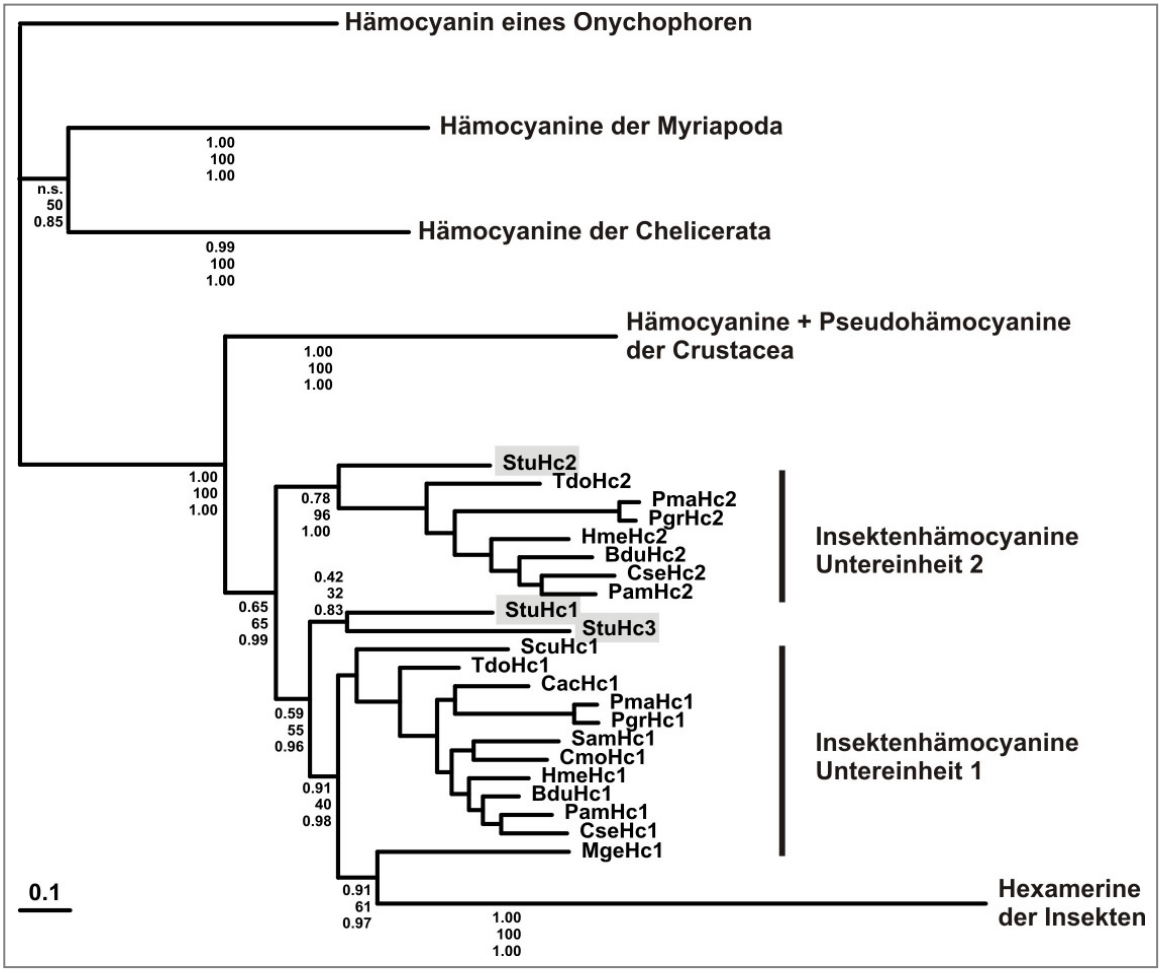

Abb. C.13: Vereinfachter Stammbaum der Arthropoden-Hämocyanine sowie verwandter Proteine. Dargestellt ist ein vereinfachter Stammbaum basierend auf der Bayes'schen Analyse. Folgende Unterstützungswerte sind an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben: NJ Bootstrap-Werte (oben), ML Bootstrap-Werte (mitte) sowie die Bayes'sche posterior probability (unten). Als Außengruppe dient das Hämocyanin eines Onychophoren (*Epiperipatus sp.*). Eine umfassende Darstellung der drei einzelnen Bäume sowie der im Aminosäurealignment verwendeten Sequenzen inklusive ihrer Zugangsnummern sind im Anhang G.8.2.2 zu finden.

3. Etablierung von rekombinanten Expressionssystemen

Der dritte Projektschwerpunkt beschäftigte sich mit der Etablierung von rekombinanten Expressionssystemen für die Proteine der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden. Der Fokus wurde hauptsächlich auf die Herstellung der kupferhaltigen Vertreter gelegt, wobei im Laufe der Arbeiten auf eine Reihe von Expressionssystemen zurückgegriffen wurde. Die jeweiligen systemspezifischen, zur Klonierung der Expressionskonstrukte verwendeten Vektoren wurden bei Bedarf modifiziert, um u.a. die für die Immobilisierung notwendigen Affinitätstags zu entfernen, zu ersetzen bzw. neu einzuführen. Bevorzugt wurde mit dem acht Aminosäuren langen Strep-Tag II (WSHPQFEK) gearbeitet, welcher besonders gebräuchlich bei der Reinigung von Metalloproteinen ist (Schmidt und Skerra, 1994; Hengsakul und Cass, 1997; Voss und Skerra, 1997; Skerra und Schmidt, 2000). In der Regel wurden für jedes zu exprimierende Protein zwei Konstrukte kloniert, wobei eines davon zusätzlich mit einem Strep-Tag II ausgestattet wurde. Jedes einzelne wurde vor der weiteren Verwendung sequenziert (B.3.7.). Alle im Rahmen dieser Studien erstellten Expressionskonstrukte für ausgewählte Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst (Anhang G.5.).

3.1. Rekombinante Expression funktioneller Typ3-Kupferproteine

Die Arbeiten zur Entwicklung und Etablierung einer Methodik zur Herstellung rekombinanter Typ 3-Kupferproteine der Hämocyanin-Superfamilie erfolgten mit einer Insekten-Phenoloxidase. Verwendet wurde dabei das Zymogen Prophenoloxidase 3 (PPO3) aus *D. melanogaster*, wobei die entsprechende cDNA als Plasmid-Klon vom „*Drosophila Genomics Resource Center*“ bezogen und für alle Klonierungsarbeiten eingesetzt wurde. Bei den anschließenden Proteinexpressionen wurde versucht, bereits durch die Auswahl geeigneter homologer Expressions- bzw. Wirtssysteme biologisch funktionsfähige, rekombinante PPO3 zu erhalten. Hierbei wurde auf verschiedene Insektenzellen zurückgegriffen. Bei der Sichtung aller insektenzellabhängiger Systeme wurden das Baculovirus-System sowie das *Drosophila*-Expressionssystem ausgewählt. Beide besitzen den Vorteil, dass sie zwar hohe Expressionsraten und folglich hohe Proteinausbeuten der rekombinanten Proteine versprechen, trotzdem aber auf eine unterschiedliche Weise die Kontrolle der Expressionsrate erlauben.

Als Indikator für die korrekte und vollständige Faltung der rekombinanten PPO3 diente jeweils die katalytische Aktivität. Mittels enzymatischer Tests wurden so alle Versuchs-

ansätze auf eine Enzymaktivität der rekombinanten Phenoloxidase überprüft. Die Aktivierung der zymogenen PPO3 erfolgte dabei mit SDS oder Trypsin (B. 10.).

3.1.1. Expression im Bac-to-Bac Baculovirus-System

Bei der virusvermittelten Expression im Baculovirus-System ist die Expressionsrate des rekombinanten Proteins nur bedingt durch die Infektionsrate der Insektenzellen mit den Baculoviren sowie durch die Expressionsdauer kontrollierbar. Für eine weitere Erniedrigung und somit Kontrolle der Expressionsrate wurde eine Sekretion der rekombinanten PPO3 in das Medium angestrebt. Da die PPO3 aus *D. melanogaster* kein eigenes hydrophobes Signalpeptid besitzt, wurde mittels gentechnischer Methoden N-terminal das Signalpeptid der Zink-Metalloprotease Meprin β angefügt. Zusätzlich wurde C-terminal die Sequenz des Strep-Tag II ergänzt. Die so modifizierte codierende Sequenz wurde in das Baculovirus-Genom integriert, mit dem die Transfektion der Insektenzellen erfolgte. Die daraufhin von den Zellen produzierten rekombinanten Baculoviren konnten zur Infektion von Insektenzellen und somit Proteinexpression verwendet werden. Die Expression der PPO3 wurde in den Sf9-Zellen von *Spodoptera frugiperda* sowie in den High Five-Zellen von *Trichoplusia ni* durchgeführt, wobei vor allem letzterer als Expressionsstamm für die Sekretion von Proteinen empfohlen wird (Invitrogen). Eine Analyse der ersten Testexpressionen zeigte, dass in beiden verwendeten Zelllinien die PPO3 nicht nur exprimiert wurde, sondern auch die Sekretion des rekombinanten Proteins in das Medium erfolgreich war. Der Western Blot-Nachweis zeigte allerdings zusätzlich zu der Bande mit der erwarteten molekularen Masse von etwa 79-83 kDa (mit Signalpeptid ~83 kDa, nach korrekter Abspaltung des Signalpeptids ~79 kDa) eine zweite, die entweder ein Degradationsprodukt der PPO3 darstellt oder der reifen Phenoloxidase nach proteolytischer Abspaltung des Propeptids entsprechen könnte (Abb. C.14).

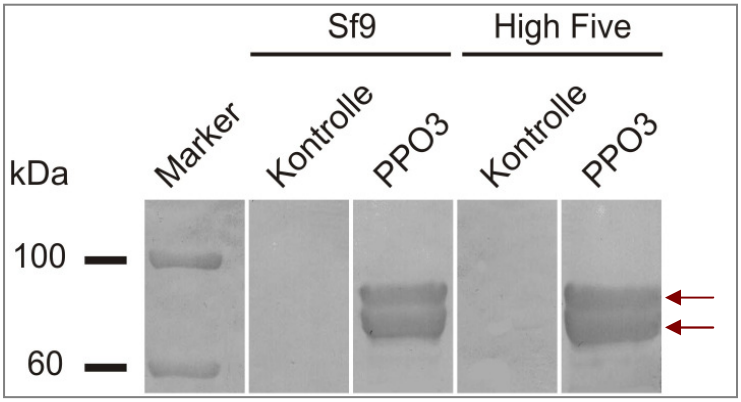

Abb. C.14: Nachweis der PPO3 im Zellmedium mittels Western Blot. Verwendet wurde ein Antikörper gegen den C-terminalen Strep-Tag II (vgl. C.7.3.2.). Dabei wurde das rekombinante Protein vor der Analyse mit 30% Ammoniumsulfat gefällt. Als eine Kontrolle diente jeweils das Medium untransfizierter Zellen.

Eine Phenoloxidase-Aktivität im Zellmedium konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch bei einer Expression unter Zugabe von 5 µM, 10 µM sowie 100 µM $CuSO_4$ in das Medium wurde zwar wie zuvor eine Sekretion der rekombinanten PPO3 beobachtet, katalytisch aktiv war das Protein jedoch nicht. Geplante Aktivitätsassays mit der ankonzentrierten PPO3 scheiterten an einer möglichen Aufreinigung, da die mit Ammoniumsulfat gefällten rekombinanten Proteine nicht mehr erfolgreich in Lösung zu bringen waren. Der Versuch, die in ein serumfreies und somit proteinärmeres Zellmedium sezernierte rekombinante PPO3 mittels Zentrifugenfilter anzukonzentrieren, führte ebenfalls zu einer Aggregation der PPO3 während der Zentrifugationsschritte. Da eine schnelle Einschritt-Aufreinigung via Affinitätschromatographie über den Strep-Tag II aufgrund des zu großen Volumens an Zellmedium (~75 ml) nicht in Frage kam, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.1.2. Expression in *Drosophila* S2-Zellen

Alternativ zum Baculovirus-System wurde eine rekombinante Expression der PPO3 in Zellen des ursprünglichen Wirtes unter Verwendung der Linie *Drosophila* S2 angestrebt. Für die induzierbare Expression von rekombinanter PPO3 in stabil transfizierten S2-Zellen wurde bei der Klonierung der Expressionskonstrukte die PPO3 am N-Terminus mit einer für die Initiation der Proteintranslation notwendigen Kozak-Sequenz ausgestattet. Zusätzlich wurde ein weiteres Konstrukt erstellt, mit der die PPO3 in einer modifizierten Version mit einem C-terminalen Strep-Tag II exprimiert werden sollte (PPO3-SII). Nach Optimierung eines geeigneten Transfektions- und Selektionsprotokolls wurden so letztendlich *Drosophila* S2-Zelllinien erhalten, die die entsprechende PPO3- bzw. PPO3-SII-Sequenz stabil in ihr Genom integriert hatten. Die ersten Analysen des löslichen Zellüberstandes nach einer 48 h Expression bestätigten, dass die PPO3 auch tatsächlich exprimiert wurde. Während die Expressionsrate der rekombinanten PPO3 so hoch ist, dass die Detektion des löslichen Proteins in einer SDS-PAGE erfolgen kann, ist die Strep-Tag-Version des rekombinanten Proteins so nicht nachweisbar (Abb. C.15).

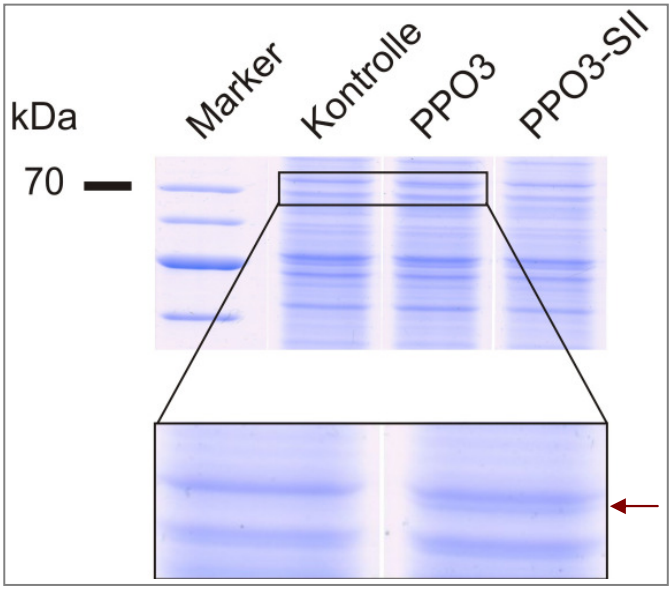

Abb. C.15: Nachweis von PPO3 und PPO3-SII im löslichen Zellextrakt von S2-Zellen via SDS-PAGE. Nach einer 48 h Expression wurden nach Zellaufschluss jeweils 15 µg Protein für die Analyse eingesetzt. Als Kontrolle dienten untransfizierte S2-Zellen.

Erst ein nach Zellaufschluss durchgeführter Western Blot zeigte, dass auch PPO3-SII prinzipiell exprimiert wurde, doch akkumuliert der Großteil des rekombinanten Proteins in Form von *inclusion bodies* im unlöslichen Zellpellet (Abb. C.16, A). Nach einer Variation der Expressionsdauer von 24-96 h zeigte sich nach Ammoniumsulfatfällung des löslichen Zellüberstandes, dass auch die modifizierte Version PPO3-SII in geringen Mengen in löslicher Form vorliegt. Dabei wird das Maximum an löslichem, rekombinantem Protein bei einer Expressionsdauer von 48 h erhalten (Abb. C.16, B).

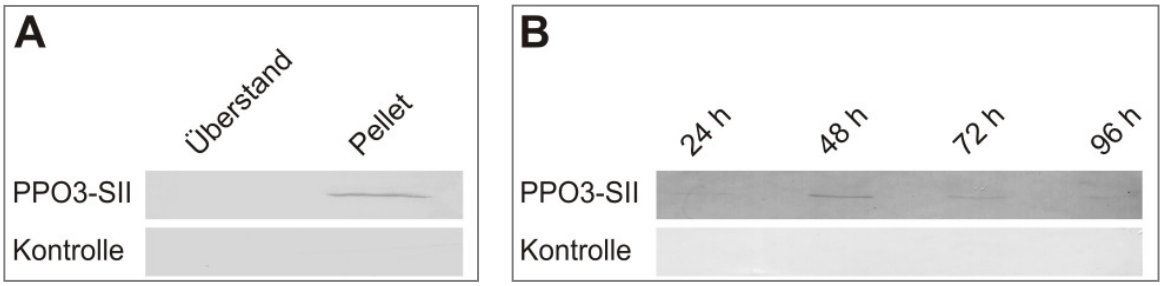

Abb. C.16: Nachweis der rekombinanten Expression von löslicher PPO3-SII in S2-Zellen via Western Blot. A) Nachweis der rekombinanten Expression unter Verwendung des löslichen Überstandes sowie des unlöslichen Pellets nach Zellaufschluss. B) Abhängigkeit der PPO3-SII-Löslichkeit von der Expressionsdauer. Die rekombinante PPO3-SII wurde jeweils mit 30% Ammoniumsulfat aus dem löslichen Zellüberstand gefällt und für die Analyse eingesetzt.

Die Detektion möglicher Phenoloxidase-Aktivitäten im S2-Zelllysat wurde mit vier verschiedenen Methoden versucht, die jeweils sowohl auf Basis des Dopachrom- als auch des MBTH-Tests durchgeführt wurden (B.10.). Zudem wurden verschiedene Parameter im Expressionsprotokoll variiert, um die optimalen Bedingungen für die Expression biologisch funktionsfähiger PPO3 ermitteln zu können. So wurden die rekombinanten

Expressionen von PPO3 und PPO3-SII für 24, 48, 72 und 96 h durchgeführt. Jeder Expressionsansatz wurde letztendlich in drei Puffern aufgeschlossen, wobei neben einem 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 ein PBS-Puffer, pH 7,5 sowie ein 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 verwendet wurde. Alle Ansätze wurden unmittelbar nach Zellaufschluss für die unterschiedlichen Aktivitätsnachweise eingesetzt. Die Aktivierung der PPO3 wurde dabei jeweils mit unterschiedlichen Mengen an SDS sowie mit Trypsin versucht. Als entsprechende Negativkontrolle wurde das Lysat untransfizierter S2-Zellen verwendet. Mögliche inhibierende Einflüsse der Versuchsbedingungen auf die enzymatische Aktivität wurden durch die Verwendung der als Positivkontrolle mitgeführten, kommerziell erhältlichen Champignon-Tyrosinase ausgeschlossen.
Zur schnellen Überprüfung aller Proben auf Enzymaktivität wurde der Tropfen-Test (B.10.1.) herangezogen, bei dem bereits 20 ng der Kontrolle Champignon-Tyrosinase ein positives Signal im Assay liefern (C.17, A). Parallel dazu wurden die proteinhaltigen Proben unter Aktivitätserhalt in einer 10%igen PAGE aufgetrennt und abschließend in der Substratlösung inkubiert (C.17, B).

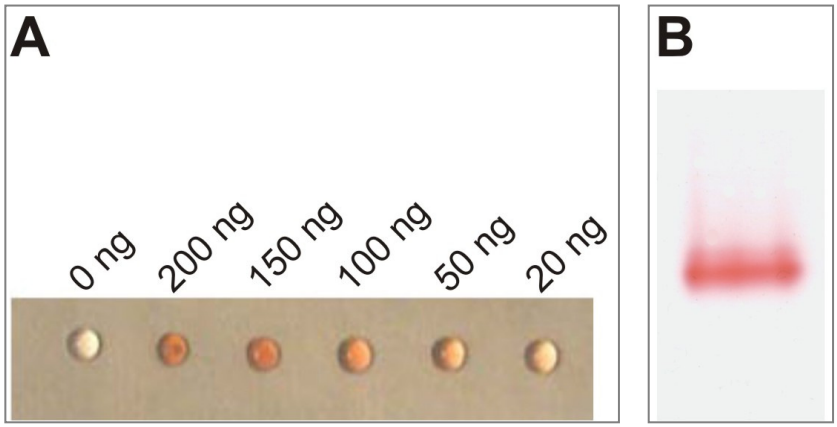

Abb. C.17: Aktivitätsnachweis der als Positivkontrolle verwendeten Champignon-Tyrosinase. Für beide Tests wurde der MBTH-Nachweis herangezogen (vgl. B.10.). A) Tropfen-Test mit 0-200 ng des Enzyms. Abb. verändert nach Hörnemann (2005). B) Nachweis von Aktivität in einer 10%igen Nativen PAGE nach Inkubation in der Substratlösung. Verwendet wurden 200 ng der Positivkontrolle.

Unter Verwendung von bis zu 70 µg der jeweiligen S2-Zelllysate konnte aber mit keinem dieser beiden Assays eine eindeutige Aktivität der rekombinanten Phenoloxidase detektiert werden (Daten nicht gezeigt).
Eine schwache Aktivität wurde aber nach einer rekombinanten Expression für 48 h lichtmikroskopisch *in vivo* in den jeweiligen S2-Zellen nachgewiesen, wohingegen die untransfizierten Zellen keine durch die Aktivität verursachte Färbung zeigten (Abb. C.18, A-C). Die enzymatische Substratumsetzung durch die PPO3 und PPO3-SII konnte zusätz-

lich via Absorptionsänderung bei 475 nm verfolgt werden, sobald die löslichen Zellüberstände direkt nach Zellaufschluss in einem 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 vermessen wurden (C.18, D-F).

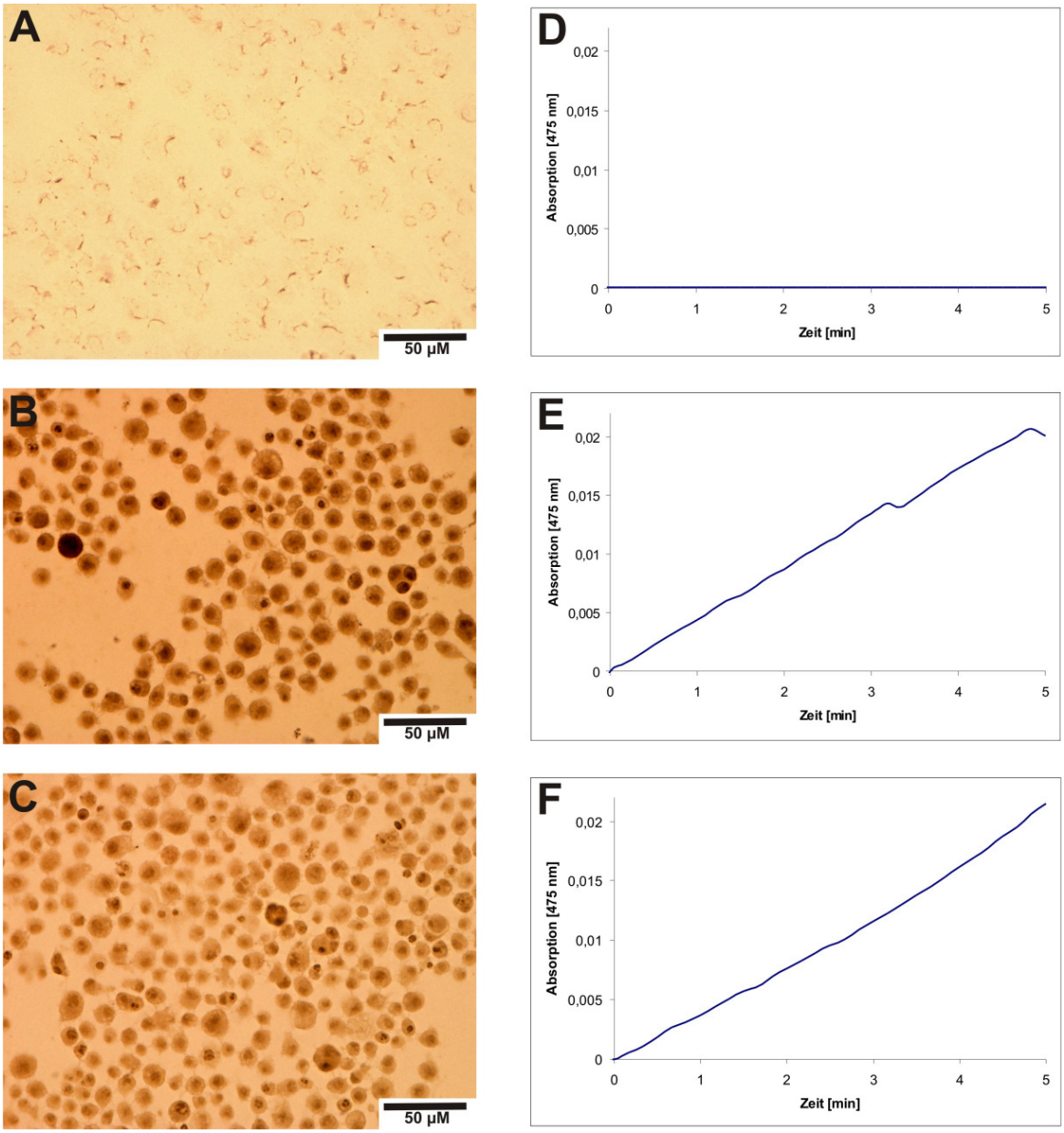

Abb. C.18: Aktivitätsnachweis der rekombinanten Phenoloxidase nach einer 48 h-Expression in S2-Zellen. A-C) Nachweis der Aktivität *in vivo* in S2-Zellen nach Aktivierung mit 1 mg/ml Trypsin. D-F) Messung der Substratumsetzung nach Aktivierung mit 1 mg/ml Trypsin. Alle Proben wurden auf dieselbe Proteinkonzentration eingestellt und gegen die Überstände der untransfizierten Zellen vermessen. A + D) Untransfizierte S2-Zellen als Negativkontrolle, B + E) Rekombinante PPO3, C + F) Rekombinante PPO3-SII.

In allen Fällen konnte die enzymatische Aktivität der rekombinanten Phenoloxidase nur bei einer Aktivierung mit Trypsin hergestellt werden, wohingegen SDS als Aktivator keine Wirkung zeigte. Auch der Expressionszeitrahmen spielte eine große Rolle bei dem Nach-

weis des funktionellen Enzyms. Nur bei einer rekombinanten Expression von bis zu 48 h konnte eine Phenoloxidase-Aktivität im Zelllysat detektiert werden. Bereits eine leichte Erhöhung der Inkubationsdauer um nur wenige Stunden führte dazu, dass keine funktionelle rekombinante PPO3 bzw. PPO3-SII mehr nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Spezifität der in den Assays erhaltenen Signale wurde durch den Einsatz eines typischen Inhibitors von Phenoloxidasen bestätigt. Verwendet wurde hierfür der kompetitive Inhibitor Phenylthioharnstoff, der in Konzentrationen von 70 nM bis 5 µM eingesetzt wurde. Vergleicht man die Wirkung, so zeigt sich, dass im Falle der Positivkontrolle 1 µM für die vollständige Hemmung von 30 nM Champignon-Tyrosinase notwendig sind (Abb. C.19, A). Dagegen reichen bereits 70 nM Phenylthioharnstoff aus, um die Enzymaktivität der rekombinanten Phenoloxidasen PPO3 und PPO3-SII im S2-Zelllysat vollständig zu inhibieren (Abb. C.19, B + C).

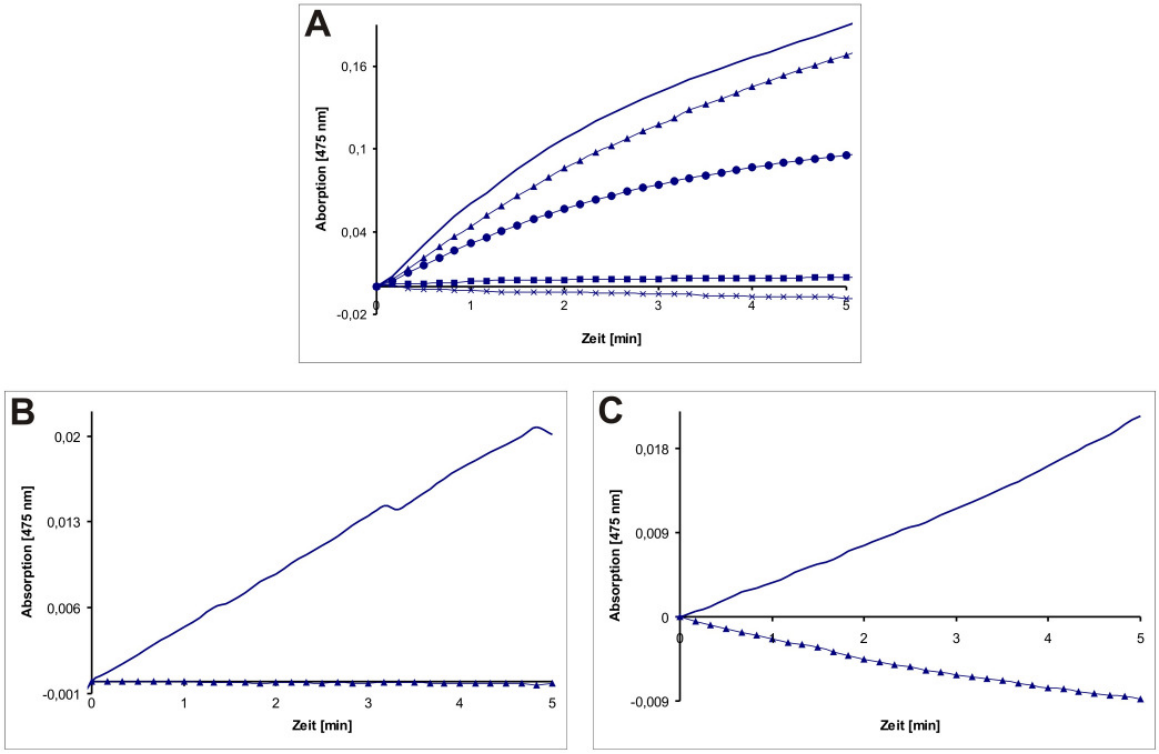

Abb. C.19: Inhibition von Trypsin-aktivierter, rekombinanter PPO3(-SII) durch Phenylthioharnstoff. A) 30 nM Champignon-Tyrosinase als Positivkontrolle. B) S2-Zelllysat mit rekombinanter PPO3. C) S2-Zelllysat mit rekombinanter PPO3-SII. Die Proben wurden jeweils mit 1 mg/ml Trypsin sowie dem Inhibitor in der angegebenen Konzentration für 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Substrates gestartet. Zugabe von 70 nM (Δ), 140 nM (o), 1 µM (□) und 5 µM (x) Phenylthioharnstoff.

3.2. Rekombinante Expression in bakteriellen Systemen

In einem parallelen Ansatz wurde versucht, basierend auf einem heterologen, bakteriellen Expressionssystem eine Methode für die rekombinante Herstellung der Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden zu etablieren.

3.2.1. Rekombinante Expression der Prophenoloxidase 3

Zusätzlich zu den Expressionsversuchen in Insektenzellen (C.3.1.) erfolgte eine bakterielle Überexpression der PPO3 im T7-Expressionssystem unter Verwendung geeigneter pET-Vektoren. Für eine gewünschte native Expression wurde die PPO3-Sequenz in pET3a bzw. in pET24a ligiert. In einem zweiten Ansatz wurde die Sequenz in den Vektor pET32b ligiert, der eine N-terminale Fusion mit dem hydrophilen Protein Thioredoxin erlaubt. Dabei wurde das Fusionsprotein so konstruiert, dass das Thioredoxin bei Bedarf proteolytisch abgespalten werden kann. Im Folgenden werden die entsprechenden rekombinanten Proteine als PPO3 bzw. im Fall des Thioredoxin-Fusionsproteins als Thrx-PPO3 bezeichnet. Wird ein Versuch mit beiden Proteinen durchgeführt, wird der Einfachheit halber auf die Bezeichnung (Thrx-)PPO3 zurückgegriffen.

3.2.1.1. Auswahl geeigneter Bakterienzellen

Die ersten Testexpressionen wurden sowohl in BL21(DE3)pLysS als auch in dem abgeleiteten Stamm Rosetta(DE3)pLysS durchgeführt. Dabei wurden nach erfolgter Transformation je Stamm durchschnittlich fünf Klone für die Expressionsversuche eingesetzt, um den mit der besten Überexpressionseffizienz ermitteln zu können. Die Kulturansätze wurden während der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} ~ 0,5) mit 0,4 mM IPTG induziert und die Expressionen üN bei 26 °C durchgeführt. Während allerdings in BL21(DE3)pLysS oftmals keine Expression von dem rekombinanten Protein mit dem Strep-Tag II beobachtet werden konnte, führten alle in Rosetta(DE3)pLysS durchgeführten Testexpressionen grundsätzlich zum Erhalt von (Thrx-)PPO3. Auch zeigte sich, dass der Stamm Rosetta(DE3)pLysS in allen Fällen eine höhere Expressionsrate aufwies als die verwendeten BL21-Zellen. Als Konsequenz wurde für alle nachfolgenden Expressionen auf den transformierten Rosetta-Stamm zurückgegriffen, wohingegen die BL21-Zellen nur Verwendung fanden, wenn geringere Expressionsraten erwünscht waren.

3.2.1.2. Erhalt von löslicher rekombinanter (Thrx-)PPO3

Bereits die genauere Analyse der ersten Testexpressionen ließ erkennen, dass die rekombinante (Thrx-)PPO3 zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten (*inclusion bodies*) neigte. Da weder Spuren von löslichem rekombinanten Protein noch eine Phenoloxidase-Aktivität im bakteriellen Zelllysat detektiert werden konnten, wurde eine Aufreinigung und Rückfaltung der (Thrx-)PPO3 aus den *inclusion bodies* angestrebt. Allerdings wurden die geplanten Rückfaltungsexperimente durch die schlechte Aufreinigung der *inclusion bodies* behindert. Auch wenn die Solubilisierung der Proteinaggregate mittels chaotroper Denaturierungsmittel (Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid) bzw. mit Detergenzien (SDS, N-Laurylsarcosin) in Verbindung mit alkalischen Puffern versucht wurde, gelang es erst in 8 M Harnstoff in Kombination mit ca. 8 mM DTT bzw. β-Mercaptoethanol und einer anschließenden Inkubation bei 50 °C, die *inclusion bodies* halbwegs aufzulösen. Da das rekombinante Protein aber während der verschiedenen Renaturierungsversuche stets komplett ausfiel, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde der Fokus darauf gelegt, durch die Variation einiger Expressionsparameter lösliche, rekombinante (Thrx-)PPO3 zu erhalten. Die Verbesserung der Proteinlöslichkeit wurde dabei durch eine Änderung von Expressionsdauer, -temperatur, Induktorkonzentration und Kulturvolumen versucht. Für die Auswertung aller Ansätze wurden die Bakterien aufgeschlossen, der lösliche Zellüberstand wurde durch Zentrifugation von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt und beides mittels SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass lösliche (Thrx-)PPO3 nur bei einer Expression von 3 h bei der für *E. coli* optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C erhalten wird (Abb. C.20).

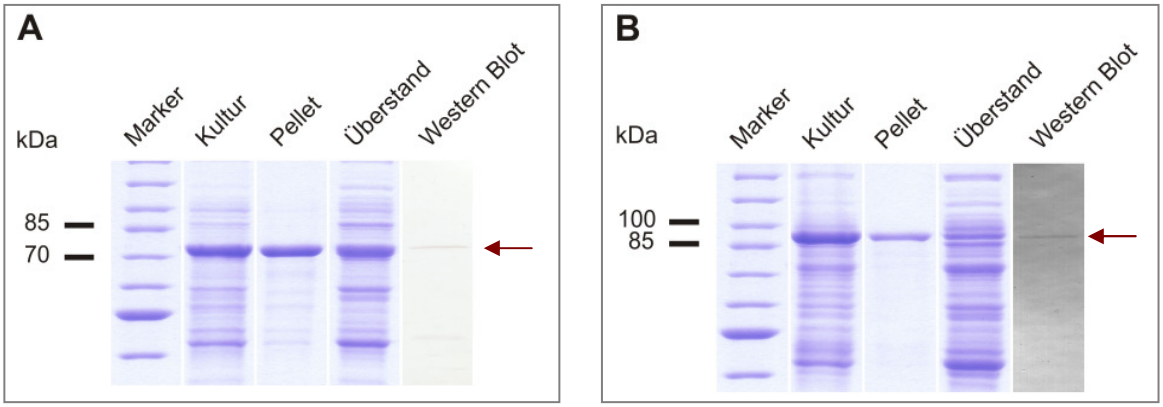

Abb. C.20: Rekombinante Expression von PPO3 (79 kDa) und Thrx-PPO3 (90 kDa) bei 37 °C für 3 h in einem 100 ml Kulturvolumen. Jeweils von links nach rechts dargestellt: 10%ige SDS-PAGE mit Marker, Bakterienkultur, Pellet nach Zellaufschluss, Überstand nach Zellaufschluss. Jeweils ganz rechts in den Abbildungen: Western Blot-Nachweis des jeweiligen rekombinanten Proteins unter Verwendung des löslichen Überstandes. A) Rekombinante PPO3. Man beachte, dass die 79 kDa rekombinante PPO3 im Überstand in der SDS-PAGE auf derselben Höhe läuft wie ein bakterielles Protein. Den tatsächlichen Anteil an löslicher PPO3 gibt somit die Western Blot-Analyse wieder. B) Rekombinante Thrx-PPO3.

Im Gegensatz zum Fusionsprotein Thrx-PPO3 ist die Bildung löslicher PPO3 nicht nur abhängig von der Temperatur, sondern auch vom Kulturvolumen. Nur in Expressionskulturen von 50-100 ml ist PPO3 im löslichen Zellüberstand nachweisbar (Tab. C.3, rot markiert).

Tabelle C.3: Optimierung der Expressionsbedingungen

	Expressionsbedingungen				Erfolg	
Protein	**Temperatur**	**Zeit**	**Induktor**	**Volumen**	**Expression**	**Löslichkeit**
PPO3	18 °C	24 h	0,4 mM	100 ml	+	-
	26 °C	18 h			+++	-
	30 °C	6 h			+	-
	37 °C	3 h	0,4 mM	50 ml	++	+
				100 ml	++	+
				500 ml	+++	-
				800 ml	+++	-
Thrx-PPO3	18 °C	24 h	0,4 mM	100 ml	+	-
	26 °C	18 h			+++	-
	30 °C	5 h			+	-
	37 °C	3 h	0,4 mM	50 ml	++	+
				100 ml	++	+
				500 ml	+++	+
				800 ml	+++	+
			0,1 mM	100 ml	++	+

Nichtsdestotrotz konnte auch in den Fällen, in denen definitiv lösliches Protein exprimiert wurde, keine Phenoloxidase-Aktivität im Zellüberstand nachgewiesen werden. Die Zugabe von 10-100 µm $CuSO_4$ zum Kulturmedium vor Induktion der Expression hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Bildung katalytisch aktiver (Thrx-)PPO3.

3.2.1.3. Aufreinigung der löslichen rekombinanten (Thrx-)PPO3

Nach rekombinanter Expression von PPO3 sowie des entsprechenden Thioredoxin-Fusionsproteins gestaltete sich die Entwicklung eines geeigneten Aufreinigungsprotokolls für beide Proteine als schwierig. Die Verwendung einer klassischen Prozedur, bestehend aus Ammoniumsulfatpräzipitation gefolgt von diversen chromatographischen Schritten, scheiterte bereits zu Beginn, da sich die rekombinante (Thrx-)PPO3 nach erfolgter Fällung mit 20-30% Ammoniumsulfat nicht mehr in Lösung bringen ließ. Sowohl bei der Entsalzung mit Hilfe der Amicon Ultra-15 Zentrifugenfilter, als auch bei der schonenden Version via Dialyse fiel diese stets vollständig aus. Auch eine Variation der verwendeten Puffer sowie der pH-Werte, in die das gefällte PPO3-Protein aufgenommen wurde, führte zu keinem Erfolg. Eine geplante Aufreinigung nur unter Verwendung von Chromatographien, wie z.B. Anionenaustauscher-, Größenausschluss- und hydrophober Interaktionschromatographie, wurde ebenfalls durch eine schlechte Löslichkeit des rekombinanten Proteins behindert. Bereits der nach der ersten durchgeführten Chromatographie notwendige Schritt des Poolens und Einengens der gewünschten Fraktionen mit Zentrifugenfiltern hatte zur Folge, dass die (Thrx-)PPO3 während der Zentrifugationsschritte aggregierte. Aus diesen Gründen wurde auf die Aufreinigung in einem Ein-Schritt-Protokoll, basierend auf einer Affinitätschromatographie, zurückgegriffen. Die rekombinante Expression von PPO3 und Thrx-PPO3 mit einem C-terminalen Strep-Tag II ermöglichte die schnelle und simple Aufreinigung beider Proteine unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Strep-Tag/Strep-Tactin-Systems (B.8.4.). Dabei zeigte sich, dass die Fusion der PPO3 an das hydrophile Thioredoxin die Menge an löslichem, rekombinantem Protein erhöht. Während maximal 1 mg PPO3 pro Liter Expressionskultur aufgereinigt werden konnte, betrug die Ausbeute an Thrx-PPO3 bis zu 2,5 mg pro Liter Ausgangskultur. Interessanterweise zeigte sich nur für das Fusionsprotein ein optimaler Reinheitsgrad, wohingegen die Aufreinigung von PPO3 nur partiell möglich war (Abb. C.21 A + B).

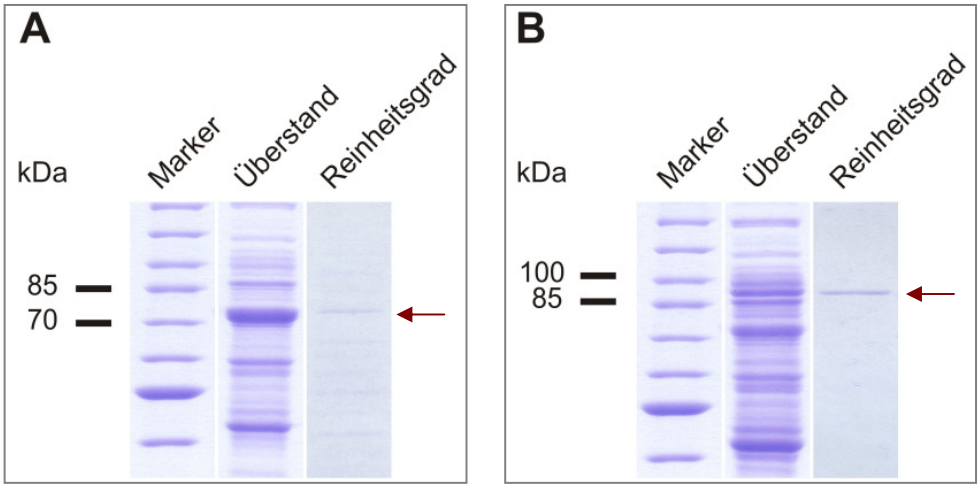

Abb. C.21: Aufreinigung über den Strep-Tag II. Jeweils von links nach rechts dargestellt: 10%ige SDS-PAGE mit Marker, Überstand nach Zellaufschluss und das Protein nach Aufreinigung. A) PPO3 (79 kDa). B) Thrx-PPO3 (90 kDa).

3.2.1.4. Rekonstitution von rekombinanter (Thrx-)PPO3: in vitro-Kupfereinbau

Zur Gewinnung katalytisch aktiver Phenoloxidase mussten die für die Funktion wichtigen Kupferionen *in vitro* in das lösliche Apoprotein eingebaut werden. Unter der Berücksichtigung, dass die Kinetik des Kupfereinbaus vom pH-Wert abhängig sein könnte, wurden trishaltige Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet. Hierfür wurden die Bakterienzellen jeweils in dem Puffer mit dem gewünschten pH-Wert aufgeschlossen und diese Zellüberstände in den weiteren Versuchen eingesetzt. Eine zuvor durchgeführte Überprüfung der pH-abhängigen Löslichkeit bestätigte, dass bei dem verwendeten Spektrum von pH 5,5-9,0 jeweils mindestens Spuren der löslichen Thrx-PPO3 in den Zellüberständen zu finden sind (Abb. C.22).

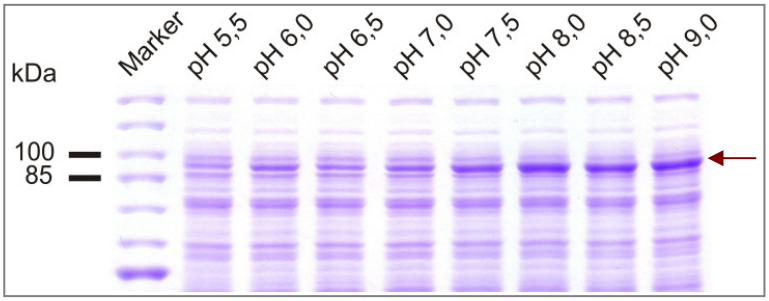

Abb. C.22: Analyse der pH-abhängigen Löslichkeit der Thrx-PPO3 (90 kDa) mittels SDS-PAGE. Von links nach rechts: Marker und Zellüberstände nach Aufschluss der Bakterien in einem Tris/HCl-Puffer.

Unter Verwendung dieser unaufgereinigten, bakteriellen Überstände mit rekombinanter PPO3 bzw. Thrx-PPO3, sowie der Überstände des untransformierten Bakterienstammes als Negativkontrolle, wurden die Kupfereinbauversuche vorgenommen. Dabei wurden neben dem pH-Wert weitere Parameter wie die Inkubationstemperatur und die einge-

setzte Kupferkonzentration sowie das Kupferangebot variiert. Zusätzlich zu der Verwendung von $CuSO_4$ als Cu^{2+}-Donor wurden die Versuche parallel mit einem Angebot an Cu^{+}-Ionen aus einem Cu(I)-GSH-Komplex durchgeführt (B.9.3.1.). Letztere wurden durch Komplexierung mit Glutathion (GSH, reduzierte Form) hergestellt, wobei das GSH im 5-fachen bzw. 10-fachen Überschuss eingesetzt wurde (Tabelle C.4).

Tabelle C.4: Rekonstitutionsversuche von PPO3 sowie Thrx-PPO3 mit Kupfer

		pH-Werte (50 mM Tris/HCl) 5,5 / 6,0 / 6,5 / 7,0 / 7,5 / 8,0 / 8,5 / 9,0		
Temperatur [°C]	4	10 µm 100 µm 500 µm		$CuSO_4$
	RT	10 µm 100 µm 500 µm		
	40	10 µm 100 µm 500 µm		
	4	10 µm : 50 µm 100 µm : 500 µm 500 µm : 2,5 mM	**1:5**	$CuSO_4$:Glutathion
		10 µm : 50 µm 100 µm : 500 µm 500 µm : 2,5 mM	**1:10**	
	RT	10 µm : 50 µm 100 µm : 500 µm 500 µm : 2,5 mM	**1:5**	
		10 µm : 50 µm 100 µm : 500 µm 500 µm : 2,5 mM	**1:10**	
	40	10 µm : 50 µm 100 µm : 500 µm 500 µm : 2,5 mM	**1:5**	
		10 µm : 50 µm 100 µm : 500 µm 500 µm : 2,5 mM	**1:10**	

Alle Ansätze wurden parallel mit der kommerziell erhältlichen Champignon-Tyrosinase als Positivkontrolle angesetzt, um einen möglichen inhibierenden Effekt der Pufferbestandteile bzw. der Versuchsbedingungen auf die Enzymaktivität ausschließen zu können. Regelmäßig durchgeführte Phenoloxidase-Aktivitätstests (B.10.) sollten eine Aussage über den erfolgreichen Einbau von Kupfer in das rekombinante Apoprotein bringen. Die Auswertung der Tests mit dem MBTH-Nachweis wurde allerdings durch unspezifische Farbreaktionen erschwert. Es zeigte sich im Vergleich mit der Negativkontrolle, dass Cu^{2+}-Ionen ab 100 µm $CuSO_4$ in Verbindung mit dem Färbereagenz MBTH und dem Phenoloxidase-Substrat Dopamin auch in Abwesenheit eines aktiven Enzyms zu einem bei 505 nm deutlich detektierbaren Produkt führten. Auch eine Oxidation der Cu(I)-GSH-Komplexe zu Cu(II)-GSSG, welche vor allem nach zu langer Inkubation bzw.

besonders bei basischen pH-Werten auftrat, führte zu unspezifischen Detektionsprodukten. Aus diesem Grund wurden alle Ansätze zusätzlich mit dem Dopachrom-Assay auf eine mögliche Aktivität überprüft. Nichtsdestotrotz konnte in keinem einzigen Fall eine katalytische Aktivität der rekombinanten (Thrx-)PPO3 nachgewiesen werden.
In einem nachfolgenden Versuch wurde statt des Tris/HCl-Puffers ein 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 als Rekonstitutionspuffer eingesetzt. Die Versuche wurden in Bezug auf das Kupferangebot und die Kupferkonzentrationen sowie die Inkubationstemperatur wie zuvor beschrieben wiederholt, eine katalytische Aktivität der PPO3 konnte allerdings auch hier nicht nachgewiesen werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde berücksichtigt, dass der optimale pH für den *in vitro*-Kupfereinbau in das Apoenzym vom dem für den Aktivitätstest idealen pH abweichen kann (Wigfield und Goltz, 1993). Eine Möglichkeit, solche Bedingungen optimal miteinander zu verknüpfen, ist das Umpuffern der Proteinlösung mit der Methode der Dialyse nach erfolgter Rekonstitution (Nakamura et al., 2000). So wurde zur Rekonstitution der PPO3 auf trishaltige Puffer unterschiedlicher pH-Werte zurückgegriffen, wohingegen die Aktivitätsanalysen in einem Phosphatpuffer, pH 7,0 durchgeführt wurden. Diese Versuche fanden sowohl mit dem unaufgereinigten, rekombinanten Protein im bakteriellen Zelllysat als auch mit der aufgereinigten PPO3 statt, wobei wie zuvor verschiedene Parameter wie die Kupferquelle, -konzentration sowie die Inkubationstemperatur variiert wurden. Trotz all dieser Modifikationen zeigte die rekombinante PPO3 aber in keinem Fall eine katalytische Aktivität.
Neben den bislang erwähnten Kupferquellen wird in einigen Studien für die Rekonstitution von Kupferproteinen die Verbindung $CuCl_4^{3-}$ verwendet, die durch das Zusammenwirken von $Cu(II)Cl_2$ und dem reduzierenden Vitamin C (L-Ascorbinsäure) entsteht (B.9.3.3.; Jensen et al., 1999a; b). Erste Versuche mit dieser Verbindung, bei der die bakteriellen Überstände 1:1 bzw. durchschnittlich 1 mg der aufgereinigten (Thrx-)PPO3 1:10 in diesem Tris-$CuCl_4^{3-}$-Puffer verdünnt wurden, führten zu keiner Rekonstitution der Enzymaktivität. In diesen letzten Experimenten wurde allerdings die Induktion der Aktivität bislang nur mit unterschiedlichen Konzentrationen an SDS versucht.
Auffällig in allen bislang durchgeführten Versuchsansätzen war, dass ab einer Inkubationsdauer von mehr als 12-24 h in den Proben mit (Thrx-)PPO3 eine verstärkte Aggregation und somit ein Ausfallen der Proteine beobachtet werden konnte. Eine Verbesserung der Proteinlöslichkeit wurde durch die Zugabe des Sulfobetains PPS zum Tris-$CuCl_4^{3-}$-Puffer erreicht. Diese Modifikation führte aber trotzdem zu keiner erfolgreichen Rekonstitution der rekombinanten Apoproteine PPO3 bzw. Thrx-PPO3 mit Kupfer. Weitere Experimente in Verbindung mit zusätzlichen Modifikationen im Ablauf wie der Variation der Kupfer- und Proteinkonzentration oder auch die Variation der Aktivierungsparameter konnten aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

3.2.2. Rekombinante Expression von Hexamerinen

Neben den rekombinanten Expressionsversuchen der PPO3 wurde das bakterielle T7-System auch auf einen kupferlosen Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie angewandt. Hierfür wurde ein Hexamerin von *D. melanogaster* ausgewählt. Dieses extrazellulär in der Hämolymphe vorliegende LSP2 (Larval Serum Protein 2) bildet ein Monohexamer aus einer einzigen, etwa 75 kDa großen Untereinheit, wobei diese Untereinheiten unter nativen Bedingungen durch ein N-terminales Signalpeptid in die Hämolymphe sezerniert werden (Akam et al., 1978; Mousseron-Grall et al., 1997). Ein LSP2-Plasmid-Klon mit der vollständigen kodierenden Sequenz samt Signalpeptid wurde vom „*Drosophila Genomics Resource Center*“ (USA) bezogen und für die Klonierungsarbeiten eingesetzt.

3.2.2.1. Rekombinante Expression von LSP2 im bakteriellen pET-System

Die rekombinante Expression von LSP2 erfolgte unter Verwendung von pET-Vektoren und dem Stamm BL21(DE3)pLysS. Bei der Erstellung der entsprechenden Expressionskonstrukte wurde die LSP2-Sequenz so modifiziert, dass die für das Signalpeptid codierenden 63 bp entfernt wurden. Auf diesem Weg wurde nicht nur eine erfolgreiche Expression von LSP2 in diesen Bakterien erreicht, auch zeigte sich nach Präparation der Zellen, dass sich unter den optimierten Bedingungen bei einer Expressionstemperatur von 26 °C ein Teil der LSP2-Proteine im löslichen Zellextrakt befand (B.5.1.3.; Hefenbrock, 2008). Der lösliche Anteil an LSP2 konnte problemlos in einem Zwei-Schritt-Protokoll, bestehend aus Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustauschchromatographie, aus dem bakteriellen Überstand aufgereinigt werden, wobei die Ausbeute an reinem LSP2 bei durchschnittlich 5-6 mg Protein pro Liter Expressionskultur lag (Abb. C.23).

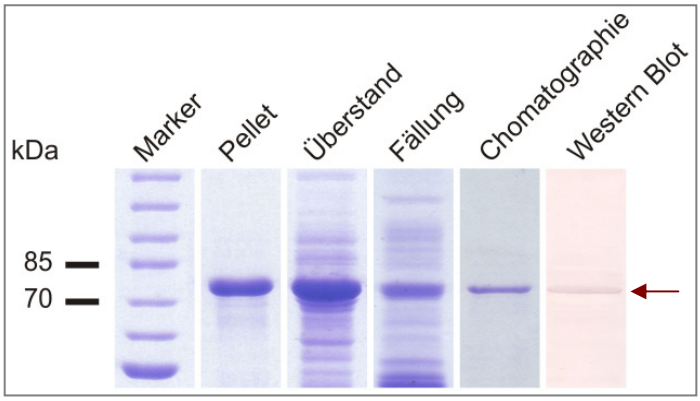

Abb. C.23: Rekombinante Expression und Aufreinigung des LSP2 (75 kDa). Von links nach rechts dargestellt: 10%ige SDS-PAGE mit Marker, Pellet und Überstand nach Aufschluss der Bakterien, 30%iges Ammoniumsulfatpellet, Probe nach Anionenaustauschchromatographie. Ganz rechts: Western Blot-Nachweis des reinen LSP2 mit Anti-LSP2-Antikörpern.

3.2.2.2. Rekonstitution der LSP2-Quartärstruktur

Für die Assoziation der aufgereinigten, rekombinanten LSP2-Monomere zum Hexamer wurde das Dialyseverfahren eingesetzt, wobei jeweils 5 mg des aufgereinigten Proteins für 60 h bei 4 °C gegen einen physiologischen Puffer dialysiert wurden (B.9.2.). Die Analyse der erhaltenen Quartärstruktur erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Als Kontrolle wurden die nativen LSP2-Hexamere der *Drosophila*-Hämolymphe herangezogen. Ein Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen verdeutlichte den Erfolg der Hexamer-Rekonstitution: Das rekombinante LSP2 zeigte nach Dialyse die für dieses Hexamerin charakteristischen quaderförmigen, etwa 20 x 20 nm großen, hexameren Strukturen, die auch in der Hämolymphe eindeutig identifizierbar sind (Abb. C.24).

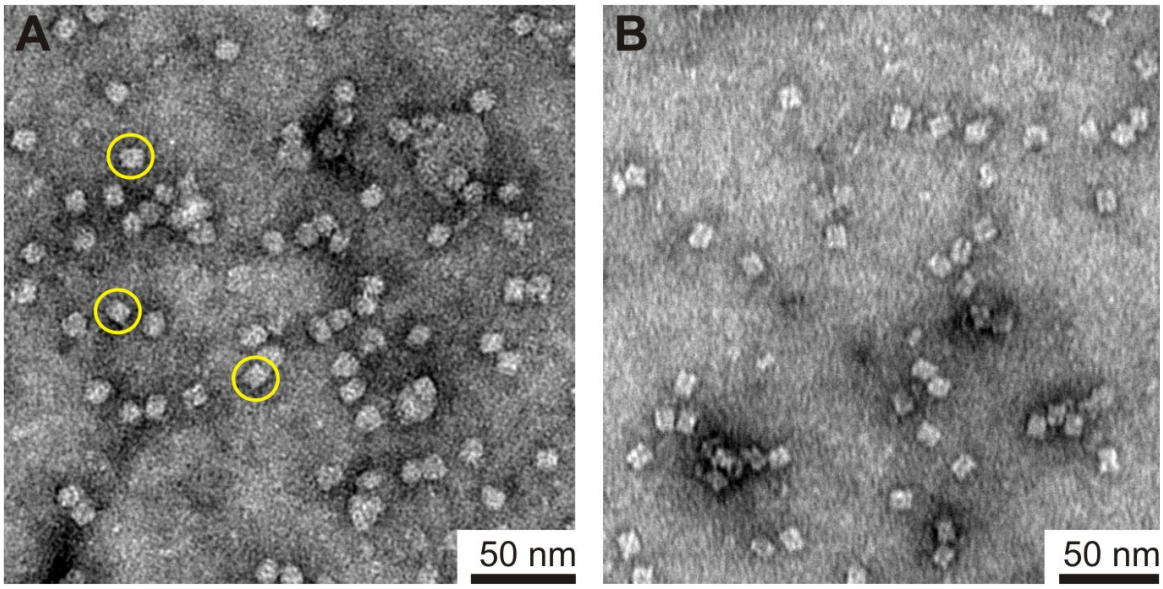

Abb. C.24: Nachweis der LSP2-Hexamere. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen bei einer Negativkontrastierung der Proben. A) Hämolymphe von *D. melanogaster*-Larven des dritten Entwicklungsstadiums. Die LSP2-Hexamere sind gelb umkreist. B) Rekombinante LSP2-Hexamere nach einer 60 h-Dialyse.

Unter Verwendung der rekombinanten LSP2-Monomere wurde die Abhängigkeit der Hexamerbildung von der Dialysedauer untersucht. Die Auswertung der unterschiedlich lange dialysierten Proben erfolgte mit der Methode der Größenfraktionierung. Eine zuvor durchgeführte Eichung der Größenfraktionierungssäule ergab, dass die Differenzierung der LSP2-Hexamere von den monomeren Untereinheiten durch eine einfache Analyse des Chromatogrammprofils möglich ist: Während die nativen, ca. 450 kDa Hexamere der Hämolymphe bereits nach ca. 2,4 h die Säule passiert haben (Abb. C.25, A), eluieren die rekombinanten LSP2-Monomere von 75 kDa erst nach ca. 3,9 h (Abb. C.25, B).

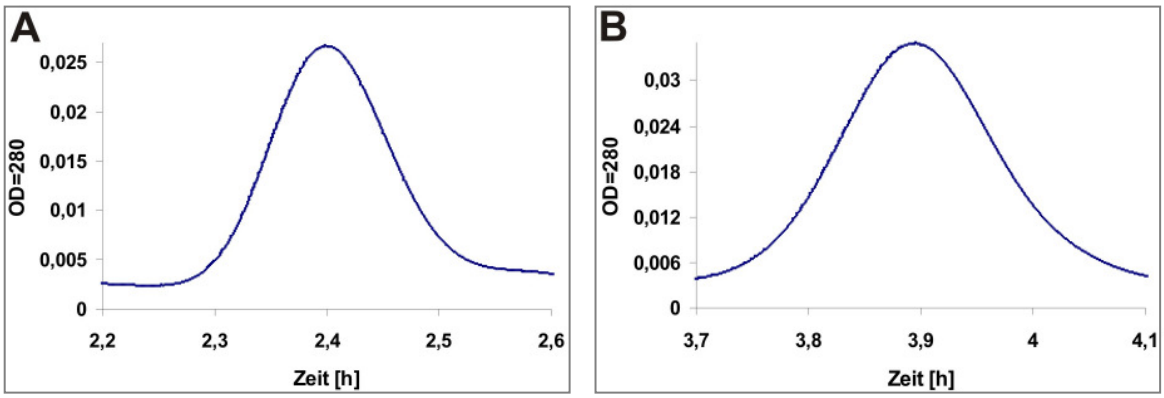

Abb. C.25: Eichung der Größenfraktionierungssäule: Elutionsprofil von LSP2-Hexameren und Monomeren. Pro Chromatographielauf wurden jeweils 5 mg der Proteinproben eingesetzt. A) Hämolymphe von *D. melanogaster*-Larven des dritten Entwicklungsstadiums. B) Aufgereinigte, rekombinante LSP2-Monomere vor Dialyse.

Auch die im Rahmen der Eichung durchgeführte Auftrennung des zum Hexamer assoziierten rekombinanten LSP2 resultiert in einem Elutionspeak nach ca. 2,4 h. Dass es sich hierbei tatsächlich um die Hexamere handelt, bestätigt eine elektronenmikroskopische Analyse dieses Elutionspeaks. Nach dem Poolen und Einengen der entsprechenden Fraktionen bis zu einer Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml zeigten die angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen eindeutig die quaderförmigen LSP2-Hexamere von 20 x 20 nm Größe (Abb. C.26).

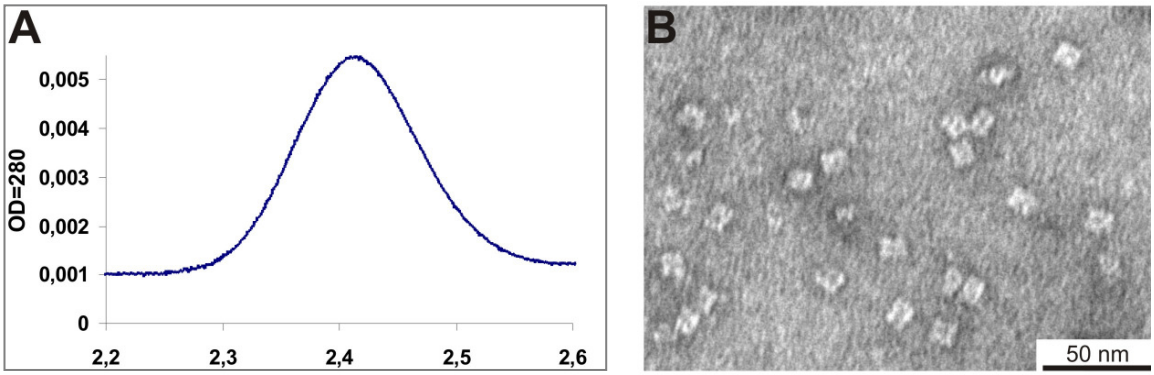

Abb. C.26: Nachweis rekombinanter LSP2-Hexamere im Elutionspeak nach 2,4 h. A) Dargestellt ist der nach 2,4 h in einer Gelfiltrationschromatographie beobachtete Elutionspeak einer für 60 h dialysierten Probe. B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen des nach 2,4 h beobachteten Elutionspeaks.

Die Abb. C.27 fasst die einzelnen Chromatogrammprofile zusammen, die nach der zeitabhängigen Dialyse von rekombinanten LSP2-Monomeren erhalten wurden. Dabei wird deutlich, dass eine Dialyse von mindestens 60 h für eine erfolgreiche Assoziation der Monomere zum Hexamer nötig ist. Die Größenauftrennung einer 24-48 h lang dialysierten Probe resultiert nur in einem einzigen deutlichen Elutionspeak nach ca. 3,9 h,

welcher dem monomeren LSP2 entspricht. Dagegen werden nur bei einer Dialysezeit von 60-144 h hexamere Strukturen erhalten, die - wie laut Eichung erwartet - nach ca. 2,4 h von der Säule eluieren (Abb. C.27, mit rotem Pfeil markiert). Eine Verlängerung der Dialysezeit von 60 h auf bis zu 144 h hat aber keine Erhöhung der Hexamerbildung zur Folge. Stattdessen eluieren ab einer Dialyse von 60 h Dauer auch zunehmend Proteine mit höherer sowie niedrigerer molekularer Masse als erwartet von der Säule. Der nach ca. 4,3 h erhaltene Elutionspeak bei einer Dialysezeit von 60-160 h weist vermutlich auf eine Denaturierung bzw. Degradierung der LSP2-Monomere hin. Dagegen sprechen die Elutionspeaks der Proteine, die innerhalb von 0,5-2 h die Säule passieren, für eine Aggregatbildung des LSP2. So liegt nach 160 h Dialyse der Großteil der LSP2-Proteine hochmolekular in aggregierter Form vor (Abb. C.27).

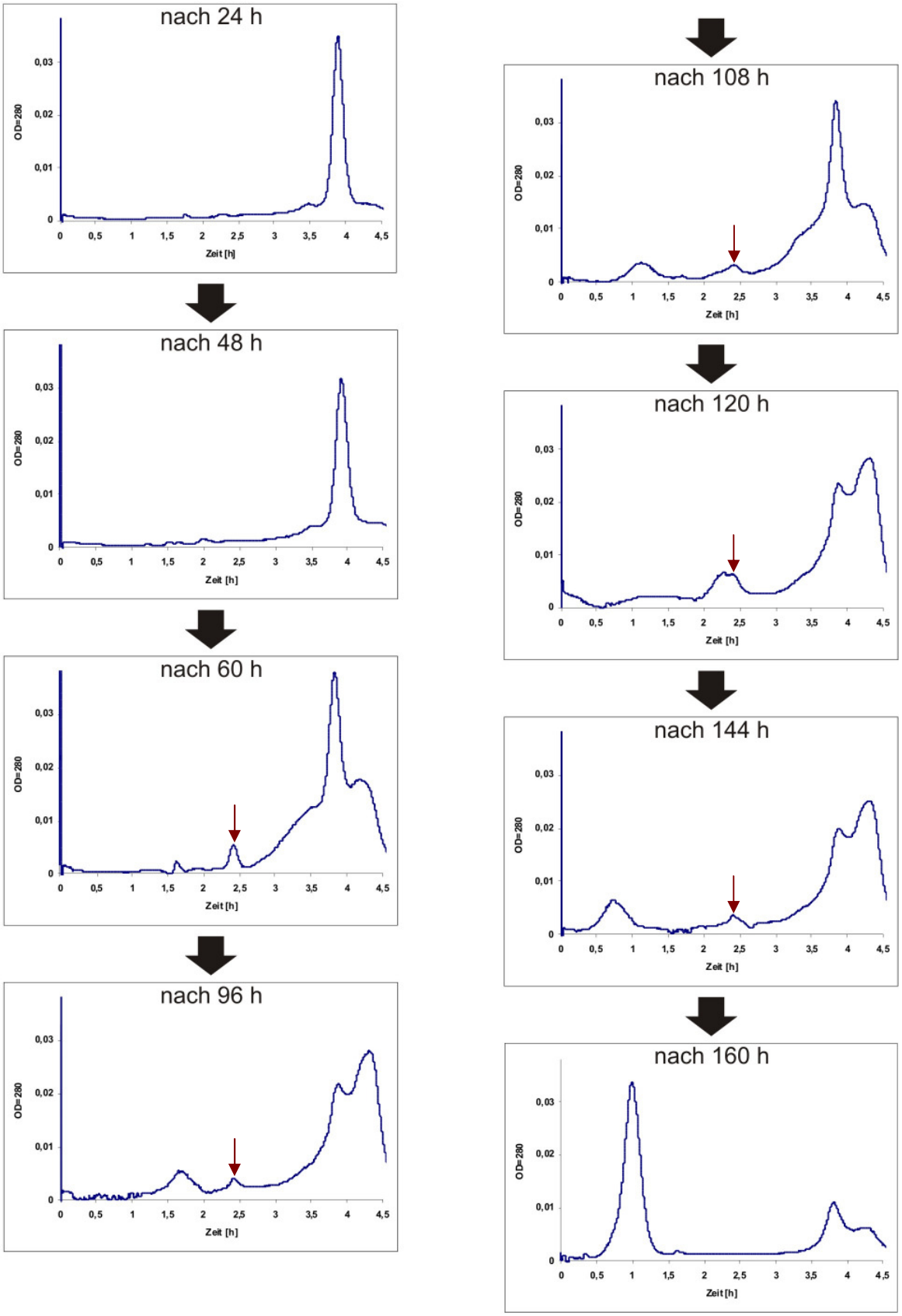

Abb. C.27: Abhängigkeit der LSP2-Hexamerbildung von der Dialysedauer. Auswertung mittels Gelfiltrationschromatographie nach Dialyse von 5 mg rekombinantem LSP2 für die angegebene Dauer. Der dem LSP2-Hexamer entsprechende Peak ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

D. Diskussion

1. Das Hämoglobin von *Carcinus maenas*

In der Regel wird jeweils eines der drei respiratorischen Proteine Hämocyanin, Hämoglobin und Hämerythrin pro Organismus exprimiert (Vinogradov, 1985; Mangum, 1992; Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995; Hardison, 1996; 1998). Bekannte Ausnahmen bilden lediglich die Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata* (Lieb et al., 2006) sowie der Amphipode *Cyamus scammoni*, in denen eine Koexistenz von Hämoglobin und Hämocyanin in der Hämolymphe vorliegt (Terwilliger, 1991; Terwilliger und Ryan, 2006; Terwilliger, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Strandkrabbe *Carcinus maenas* ein dritter Organismus identifiziert, der sowohl Hämocyanin als auch Hämoglobin exprimiert. Diese Koexistenz weicht allerdings von den bekannten Fällen ab, da es sich um die Kombination eines extrazellulären Hämocyanins und eines intrazellulären Hämoglobins handelt. Zudem wurde mit dem Hämoglobin von *C. maenas* (CmaHb) erstmals ein intrazelluläres Globin der Crustacea nachgewiesen. Um Rückschlüsse in Hinblick auf dessen Funktion und Entstehung ziehen zu können, wurde CmaHb näher charakterisiert.

1.1. Hämoglobin: Funktion in Entgiftung oder Signaltransduktion?

Verschiedene Analysen zeigten, dass es sich bei CmaHb um ein kiemenspezifisches Globin handelt. So wurde CmaHb sowohl mit der Methode der RT-PCR als auch mittels Western Blot (Abb. C.3) eindeutig in den Kiemen nachgewiesen. Immunhistochemische Untersuchungen (Abb. C.6) ließen ebenso wie Zellfraktionierungsstudien (Abb. C.4) eine Membranassoziation des CmaHb in diesem Gewebe erkennen. Erste Untersuchungen am rekombinanten Protein wiesen auf eine hohe Autooxidation hin.
Bislang ist jedoch unklar, welche Aufgabe dieses Globin in den respiratorischen Organen von *C. maenas* erfüllt, zumal ein extrazelluläres Hämocyanin eine adäquate Versorgung dieses Organismus mit Sauerstoff gewährleistet (Markl, 1979; 1986). Der Gasaustausch erfolgt dabei in den Lamellen der Kiemen, wohingegen die im Kiemenseptum gelegenen afferenten und efferenten Gefäße die Hämolymphe führen. Das CmaHb wurde sowohl in den Lamellen, als auch im Septum nachgewiesen (Abb. C.6). Auffällig ist vor allem die Lokalisation in den Zellbereichen, die dem Wasser in der Kiemenhöhle zugewandt sind. Hieraus resultiert eine Nähe des CmaHb zu den Hauptzellen, die die respiratorische

Funktion in dem Kiemen erfüllen (Goodman und Carvey, 1990). Auch wenn die für die Sauerstoffbindung notwendigen Aminosäuren in CmaHb vorhanden sind (Abb. C.1), spricht dessen schnelle Autooxidation eher gegen eine respiratorische Funktion. Eine Funktion als Sauerstoffsensor, wie sie bislang für einige Globine der Archaea und Bakterien nachgewiesen werden konnte (Hou et al., 2001; Freitas et al., 2003; Thijs et al., 2007), ist bei einer solch hohen Autooxidationsrate ebenfalls auszuschließen.

Rückschlüsse auf mögliche Funktionen lassen sich ziehen, wenn man sich verstärkt auf die Membranlokalisation des CmaHb beruft. Seit einigen Jahren sind diverse bakterielle Globine für ihre Interaktionen mit Membranlipiden bekannt (Ramandeep et al., 2001; Liu et al., 2004; Rinaldi et al, 2006; Di Giulio und Bonamore, 2008). Diese Proteine lagern sich an die Zellmembran der Bakterien an oder sogar in diese ein (Ramandeep et al., 2001; Bonamore, 2003). Zudem sind sie in der Lage, Lipide in ihrem aktiven Zentrum zu binden (Ollesch et al., 1999; Rinaldi et al., 2006). Zahlreiche Hypothesen, die die Membranlokalisation dieser Globine erklären sollen, umfassen neben der Ausübung respiratorischer Aufgaben vor allem Funktionen zum Schutz der zellulären Oxidasen und/oder der Bakterienmembran vor ROS/RNS (Di Giulio und Bonamore, 2008). Besonders der letzte Punkt ist interessant, da CmaHb durch seine Lokalisation zwischen dem Wasser in der Atemhöhle und den respiratorisch tätigen Kiemenzellen eine solche Schutzfunktion gegenüber der Kiemenmembran besitzen könnte. Hierfür ist die beobachtete Autoxidation des rekombinanten CmaHb sogar essentiell, da die Ausübung der Pseudoperoxidaseaktivität auf der Bildung von Met-Globin beruht (Cashon und Alayash, 1995; Alayash, 1999; Alayash et al., 1999).

Im Gegensatz zu diesen bakteriellen Globinen (Ramandeep et al., 2001; Park et al., 2002) besitzt das CmaHb laut computergestützter Voraussagen ein N-terminales Sequenzmotiv für eine N-Myristoylierung. Ermöglicht wird dadurch eine spezifische Fettsäureaddition, die auf der kovalenten Bindung eines Myristinrestes an ein N-terminales Glycin des Zielproteins beruht (Resh, 1999). Dieser Prozess wird in den meisten Fällen co-, selten posttranslational durch das Enzym N-Myristoyltransferase katalysiert (Towler et al., 1987; Zha et al., 2000), wobei Myristoyl-CoA als Fettsäuredonator fungiert (Farazi et al., 2001). N-Myristoylierungen vermitteln eine reversible Interaktion mit Zellmembranen und/oder anderen Proteinen (Peitzsch et al, 1993; Murray et al., 1997). Solche myristoylierten Proteine spielen in unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden eine Rolle (Carr et al., 1982; Resh, 1994; Zhu et al., 1995; De Jonge et al., 2000; Ishitani et al., 2000; Zha et al., 2000; Farazi et al., 2001). Diese Art der Modifikation weist somit möglicherweise auf eine Funktion des CmaHb in einem noch unbekannten Signaltransduktionsprozess hin. Da *C. maenas* aufgrund seiner hohen Umwelttoleranz physikochemischen Schwankungen in seiner Umgebung unterworfen ist (Walther, 2008), ist die

Existenz solcher Signaltransduktions- bzw. Regulationsprozesse in den Kiemen sehr wahrscheinlich, da diese Organe über das die Atemhöhle durchströmende Wasser in Berührung mit der Außenumgebung kommen.

1.2. Implikation für die Evolution der Arthropoden-Globine

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass die Globine der Crustacea paraphyletisch sind. Die Globine der Insecta[3)] bilden mit denen der Branchiopoda (Crustacea) eine monophyletische Gruppe, welche die Schwestergruppe der Globine der Malacostraca (Crustacea) darstellt. Letztere werden bisher lediglich durch das in dieser Arbeit untersuchte CmaHb repräsentiert. Die Globine der Crustacea und Insecta stehen wiederum mit den Globinen der Chelicerata in einem Schwestergruppenverhältnis. Die Globine der Branchiopoda sind offensichtlich näher mit den Globinen der Insecta verwandt als mit denen der Malacostraca (Abb. D.1).

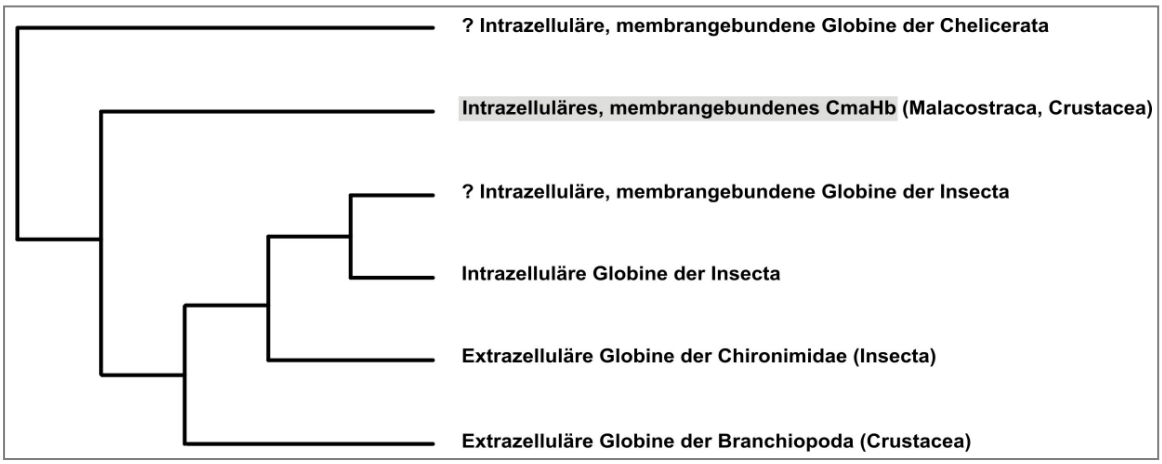

Abb. D.1: Schematische Darstellung der Evolution von Arthropoden-Globinen: Intrazelluläre, membrangebundene Globine als ursprüngliche Variante. Vgl. auch Stammbaum Abb. C.10. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte CmaHb ist grau hinterlegt. Fälle, in denen eine Membranbindung nur computergestützt vorausgesagt wurde, sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

[3)] Begriffsdefinition Insecta vgl. Seite 5

Innerhalb der Arthropoden-Globine stellt CmaHb das erste bekannte intrazelluläre Globin dar, welches eindeutig eine Membranassoziation aufweist (Abb. C.4, Abb. C.6). Computergestützen Analysen weisen darauf hin, dass in diesem Fall die Interaktion mit der Membran über eine N-Myristoylierung vermittelt wird (Abb. D.2).

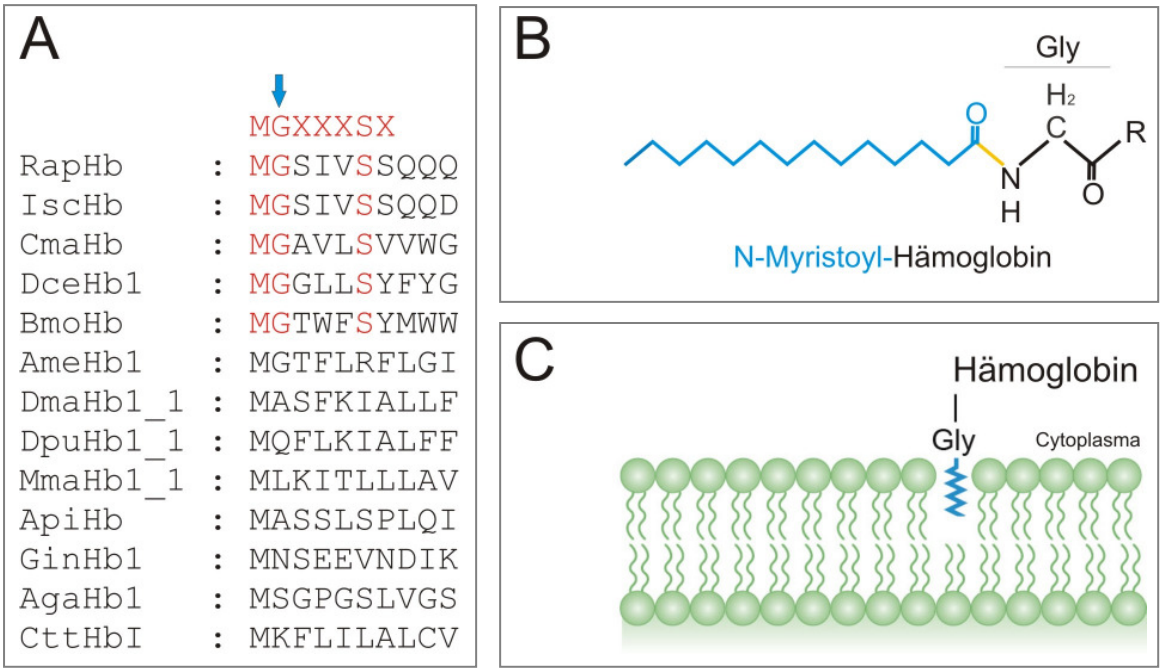

Abb. D.2: Membranbindung von intrazellulären Globinen über eine N-Myristoylierung. A) Computergestützte Analyse der N-Termini verschiedener Arthropoden-Globine. Potentielle Signalsequenzen für N-Myristoylierungen sind in den jeweiligen Globinsequenzen rot markiert. Die Konsensussequenz für die N-Myristoylierung ist ganz oben rot dargestellt, das für die Fettsäureaddition benötigte Glycin ist mit einem blauen Pfeil markiert. RapHb: *Rhipicephalus appendiculatus* Hämoglobin, IscHb: *Ixodes scapularis* Hämoglobin, CmaHb: *Carcinus maenas* Hämoglobin, DceHb1: *Dascillus cervinus* Hämoglobin, BmoHb: *Bombyx mori* Hämoglobin, AmeHb1: *Apis mellifera* Hämoglobin, DmaHb1_1: *Daphnia magna* Hämoglobin Domäne 1, DpuHb1: *Daphnia pulex* Hämoglobin Domäne 1, MmaHb1_1: *Moina macrocopa* Hämoglobin Domäne 1, ApiHb: *Acyrthosiphon pisum* Hämoglobin, GinHb1: *Gasterophilus intestinalis* Hämoglobin, AgaHb1: *Anopheles gambiae* Hämoglobin, CttHbI: *Chironomous thummi thummi* Hämoglobin B) Myristoyliertes Hämoglobin. Nach Abspaltung des Methionins wird die Fettsäure kovalent an das Glycin des Hämoglobins gebunden. Diese Amidbindung ist gelb markiert. C) Schema zur Membranassoziation myristoylierter Globine.

Die Globine der Cheliceraten, die von denen der zwei Zecken *Ixodes scapularis* und *Rhipicephalus appendiculatus* repräsentiert werden, besitzen ebenfalls potentielle N-terminale Sequenzmotive für eine N-Myristoylierung (Abb. D.2). Da die entsprechenden Sequenzen aus EST-Daten abgeleitet wurden, sind derzeit noch keine genauen Aussagen über die Lokalisation und Funktion dieser Proteine möglich. In beiden Fällen konnte aber mit dem Programm PSORT II definitiv die Präsenz eines hydrophoben Signalpeptids für die Sekretion in den Extrazellulärraum ausgeschlossen werden. Die mit dem Programm Myristoylator berechnete Wahrscheinlichkeit einer N-Myristoylierung von

98-99% deutet stark auf eine Membranbindung hin. Eine intrazelluläre, membrangebundene Lokalisation stellt offensichtlich die ursprüngliche Form der Arthropoden-Globine dar (Abb. D.1).

In den Insecta ist lediglich bei den Globinen des Seidenspinners *Bombyx mori* (Lepidoptera) und des Moorweichkäfers *Dascillus cervinus* (Coleoptera) die Konsensussequenz für eine N-Myristoylierung vorhanden (Abb. D.2). Im Gegensatz dazu besitzen die restlichen der hier untersuchten intrazellulären Insekten-Globine kein Sequenzmotiv für eine Myristoylierung und liegen somit frei im Cytoplasma vor. Sie sind vermutlich aus der ursprünglich membrangebundenen Variante hervorgegangen. Solche intrazellulären Hämoglobine wurden in mehreren Vertretern der eumetabolen Insektenordnungen, wie beispielsweise der Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera und Lepidoptera, nachgewiesen (Burmester und Hankeln, 1999; Hankeln et al., 2002; 2006; Burmester et al., 2006; Burmester und Hankeln, 2007). Die Hämoglobine von *Anopheles*, das Hämoglobin der Honigbiene *Apis mellifera* und Globin1 von *D. melanogaster* sind dabei mit dem jeweiligen Tracheensystem (Tracheen, Tracheolen und Terminalzellen) assoziiert (Hankeln et al., 2002; 2006; Burmester et al., 2006; 2007). Die genaue Funktion all dieser intrazellulären Globine der Insecta ist noch weitgehend ungeklärt. Das Globin1 von *D melanogaster* ist vermutlich an der Detoxifizierung von ROS beteiligt (Gleixner et al., 2008). Die intrazellulären Hämoglobine der Rückenschwimmer (Hemiptera) (Bergstrom, 1977; Wells et al., 1981; Matthews und Seymour, 2006; 2008) und der Larven der Pferdemagenbremse *Gasterophilus intestinalis* (Keilin und Wang, 1946; Dewilde et al., 1998; Pesce et al., 2005) dienen dagegen der Sauerstoffspeicherung.

Extrazelluläre Hämoglobine haben sich offensichtlich zwei Mal unabhängig voneinander in den Chironimidae (Insecta) und Branchiopoda (Crustacea) aus einem intrazellulären Vorläufer entwickelt (Abb. D.1). Diese Globine erfüllen respiratorische Funktionen, d.h. sie üben eine Rolle im Transport bzw. der Speicherung von Sauerstoff aus. Das extrazelluläre Hämoglobin der Larven der Zuckmücken (Chironimidae) gewährleistet bei der hypoxischen Lebensweise dieser Organismen die ausreichende Sauerstoffversorgung (Walshe, 1951; Bergstrom et al., 1976; Osmulski und Leyko, 1986; Saffarini et al., 1991; Zebe 1991; Weber und Vinogradov, 2001).

Innerhalb der Crustacea weisen neben den Branchiopoda auch Vertreter der Copepoda, Ostracoda und Cirripedia extrazelluläre Hämoglobine in ihrer Hämolymphe auf (Fox, 1957; Mangum, 1983; Terwilliger, 2001; Weber und Vinogradov, 2001). Die entsprechenden Hämoglobinsequenzen sind allerdings noch nicht bekannt, so dass derzeit keine Aussagen über deren phylogenetische Einordnung möglich sind. Es ist aber zu vermuten, dass diese extrazellulären Proteine wie die Hämoglobine der Branchiopoda aus einem intrazellulären Vorläufer hervorgegangen sind. In den Malacostraca, in denen

üblicherweise Hämocyanin die respiratorischen Aufgaben übernimmt (Mangum, 1983; Markl, 1986; Markl und Decker, 1992; Burmester, 2002), ist die Existenz eines extrazellulären Hämoglobins in dem Amphipoden *Cyamus scammoni* bekannt. Zudem liegt in diesem Fall eine Koexistenz von extrazellulärem Hämoglobin und Hämocyanin in der Hämolymphe vor (Terwilliger, 1991; Terwilliger und Ryan, 2006; Terwilliger, 2008). Da nach bisherigem Kenntnisstand *C. scammoni* keine Phenoloxidase besitzt, wird für das Hämocyanin eine Funktion als Pseudophenoloxidase vorgeschlagen (Terwilliger und Ryan, 2006; Terwilliger, 2008), wohingegen für das Hämoglobin eine Funktion als Sauerstofftransportprotein angenommen wird (Terwilliger, 1991; 2008). Die Sequenz dieses Globins ist ebenfalls nicht bekannt. Da es sich aber um ein extrazelluläres Protein handelt, ist zu vermuten, dass sich dieses - nach einem Funktionswandel des Hämocyanins von einem respiratorischen Protein zu einer Pseudophenoloxidase - aus einem intrazellulären Globin entwickelt hat.

2. Das Hämocyanin von *Speleonectes tulumensis*

Innerhalb der Malacostraca übernimmt Hämocyanin die Funktion des Sauerstofftransporters in der Hämolymphe. Dagegen konnte dieses Protein bislang in keinem einzigen Vertreter der „Entomostraca“[4)] eindeutig nachgewiesen werden (Mangum, 1985; Markl und Decker, 1992; Burmester, 2002). BLAST-Analysen bestätigen dies, da weder innnerhalb der bekannten genomischen Sequenzen, noch in den EST-Datenbanken entsprechende Hämocyaninsequenzen für die Vertreter der „Entomostraca“ identifiziert werden konnten. Im Fall der hier untersuchten Remipedia, einer 1979 entdeckten Klasse der Crustacea mit bislang etwa 20 beschriebenen Taxa (Yager, 1981; Koenemann et al., 2007b), wird allerdings seit einigen Jahren über ein Vorkommen von hämocyaninähnlichen Partikeln spekuliert (Yager, 1991; van der Ham und Felgenhauer, 2007). So wurden beispielsweise mit Hilfe von EM-Aufnahmen Kristalle in den Hämatocyten dieser Krebse nachgewiesen, die in Form und Struktur dem 8 x 6 Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* ähneln (Yager, 1991).
Im Rahmen der eigenen Untersuchungen an *Speleonectes tulumensis* konnten erstmals die Hämocyaninsequenzen eines Vertreters der Remipedia ermittelt werden. Mit dem Nachweis des entsprechenden Proteins via Western Blot wurde zudem eindeutig belegt, dass dieses Protein auch außerhalb der Malacostraca exprimiert wird.

2.1. Hämocyanin: Funktion als Sauerstofftransportprotein

Die Remipedia sind an eine sauerstoffarme Umgebung in Höhlengewässern adaptiert (Pohlman et al., 1997; Koenemann et al., 2006), so dass die Existenz eines respiratorischen Proteins zur Verbesserung der Sauerstoffverteilung im Kreislaufsystem dieser Tiere von Vorteil ist. Die Identifizierung von Hämocyanin in *S. tulumensis* lässt folglich vermuten, dass dieses Protein die respiratorischen Funktionen im Organismus erfüllt. Eine Analyse der Hämocyaninsequenzen bestätigte, dass die für die Sauerstoffbindung essentiellen Aminosäuren, wie die zur Koordination der Kupferionen zuständigen sechs Histidine sowie die an der Stabilisierung der Sauerstoffbindung beteiligten drei Phenylalanine, konserviert sind. Die Sequenzdaten weisen zudem auf ein extrazelluläres Protein hin. So besitzen alle drei Aminosäuresequenzen der Hämocyaninuntereinheiten von *S. tulumensis* ein N-terminales Signalpeptid für die Sekretion in die Hämolymphe, wie es auch für die respiratorischen Hämocyanine der Malacostraca charakteristisch ist (Mangum, 1985; Markl und Decker, 1992; van Holde und Miller, 1995). Das Beispiel

S. tulumensis bringt die Vermutung nahe, dass die Remipedia funktionelles Hämocyanin in ihrer Hämolymphe aufweisen, welches die ausreichende Sauerstoffversorgung des Organismus unter den hypoxischen Lebensbedingungen gewährleistet.

2.2. Schwestergruppenverhältnis der Remipedia und Insecta?

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten phylogenetischen Analysen schließen eindeutig eine Zuordnung der drei StuHc-Untereinheiten in die Gruppe der Crustaceen-Hämocyanine aus. Stattdessen gruppieren diese mit den Hämocyaninen der Insekten (Abb. C.13). Auffällig ist dabei, dass der untersuchte Organismus *S. tulumensis* beide Untereinheitstypen besitzt, die für die Insektenhämocyanine charakteristisch sind (Hagner-Holler et al., 2004; Pick et al., 2008; 2009). StuHc1 und 3 bilden ein Monophylum mit der Hämocyaninuntereinheit 1 der Insekten, StuHc2 dagegen gruppiert mit der entsprechenden Untereinheit 2. Zudem weist StuHc2 eine einzigartige Insertion in seiner Sequenz auf, wie sie auch in den orthologen Sequenzen der Hämocyaninuntereinheit 2 von Insekten zu finden ist (Abb. C.11; Aminosäuren 460-470).

Hämocyanine eignen sich aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Evolutionsrate sehr gut als Marker für die evolutive Entwicklung der Arthropoden (Burmester, 2001; Kusche und Burmester, 2001; Kusche et al., 2002; Kusche et al., 2003a). Die erhaltenen Resultate weisen somit auf ein Schwestergruppenverhältnis der Remipedia und Insecta sowie folglich auf eine Paraphylie der Crustacea hin.

Aufgrund von morphologischen Merkmalen wurde lange Zeit angenommen, dass die Insecta und Myriapoda das Monophylum „Tracheata“ oder auch „Atelocerata“ bilden (Kästner und Gruner, 1993; Hennig, 1994; Westheide und Rieger, 1996; Brusca und Brusca, 2003). Diese These wird mittlerweile abgelehnt (Friedrich und Tautz, 1995; Giribet und Ribera, 2000; Kusche und Burmester, 2001; Kusche et al., 2002) und stattdessen eine Gruppierung der Insecta und Crustacea postuliert, die unlängst zu den zwei Evolutionsmodellen der „Tetraconata“ (Richter, 2002) und „Pancrustacea“ (Zravý und Štys, 1997) geführt hat. Auch wenn molekulare Analysen auf eine Paraphylie der Crustacea hindeuten, ist noch immer unklar, welches Taxon der Crustacea die Schwestergruppe der Insecta bildet (Garcia-Machado et al., 1999; Wilson et al., 2000; Hwang et al., 2001, Roeding et al., 2007; Dunn et al., 2008). Die phylogenetische Einordnung der Remipedia ist ebenfalls nicht geklärt und Gegenstand kontroverser Diskussionen, wobei verschiedene Positionen innerhalb der Crustacea vorgeschlagen wurden (Schram, 1986; Regier und Shultz, 2001; Regier et al., 2005; Hassanin 2006; Lim und Hwang, 2006; Carapelli et al., 2007). So weisen beispielsweise phylogenetische Analysen der 18S

rRNA und der mitochondrialen Gene auf eine nähere Verwandtschaft der Remipedia und Maxillopoda hin (Ito, 1989; Spears und Abele, 1997; Lim und Hwang, 2006), wohingegen ein Vergleich der Genanordnung im mitochondrialen Genom dies wiederum eindeutig ausschließt (Lavrov et al., 2004). Aufgrund der homonomen Segmentierung des Körpers wird aber auch eine basale Stellung der Remipedia innerhalb der Crustacea oder sogar der Mandibulata vorgeschlagen (Schram, 1986; Willis, 1997; Giribet et al., 2001). Eine mögliche Gruppierung der Remipedia und Insecta, wie die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Hämocyaninsequenzen sie vermuten lässt, kann durch weitere Studien bestätigt werden. So weisen phylogenetische Analysen, die unter Verwendung der Sequenzen des Elongationsfaktors 2 durchgeführt wurden, auf ein Schwestergruppenverhältnis der Remipedia und Insecta hin (Regier und Shultz, 2001). Auch morphologische Untersuchungen stützen eine nähere Verwandtschaft. Aufgrund der Ähnlichkeit der hochkomplexen Gehirnstrukturen der Remipedia zu denen der Malacostraca und Insecta wird vermutet, dass diese drei Gruppen ein Monophylum bilden (Fanenbruck et al., 2004; Fanenbruck und Harzsch, 2005). Die Entdeckung der lecithotrophen Remipedia-Larven und die Analyse ihrer frühen Larvalentwicklung unterstützen ebenfalls eine Verwandtschaft zu den Malacostraca (Koenemann et al., 2007a, Koenemann et al., 2009). Jedoch ist die Durchführung weiterer molekularer und morphologischer Analysen notwendig, um die Stellung der Remipedia sowie ihre Verwandtschaft zu den Insekten zu bestätigen. Zumindest weisen aber viele Daten darauf hin, dass dieser Klasse der Krebse eine Schlüsselrolle dabei zukommt, die Evolution der Pancrustacea sowie die Entwicklung der Insecta zu verstehen.

[4)] Begriffsdefinition „Entomostraca“ vgl. Seite 15

3. Etablierung von rekombinanten Expressionssystemen

Ein weiteres, wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung von geeigneten Expressionssystemen, mit denen erstmals die Herstellung rekombinanter Proteine der Arthropoden-Hämocyanin-Superfamilie ermöglicht werden sollte. Der Fokus lag dabei auf der rekombinanten Expression von Phenoloxidasen und Hexamerinen.

3.1. Ansätze zum Erhalt rekombinanter Metalloproteine

Bei der rekombinanten Expression von biologisch funktionsfähigen Phenoloxidasen und Hämocyaninen müssen die für die Funktion benötigten Kupferionen in das korrekt gefaltete Apoprotein integriert werden. In der Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele für eine erfolgreiche Herstellung von rekombinanten Metalloproteinen finden. Unabhängig von dem verwendeten Expressionssystem können dabei drei mögliche Vorgehensweisen abgeleitet werden (Abb. D.3).

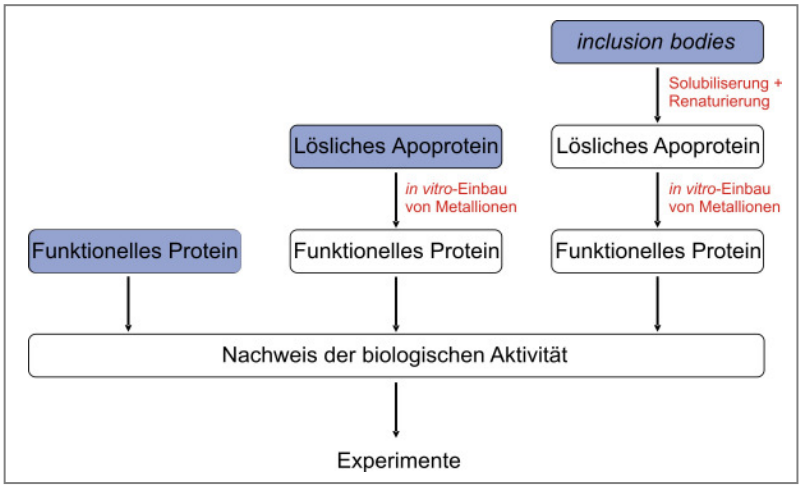

Abb. D.3: Drei Vorgehensweisen zum Erhalt biologisch aktiver Metalloproteine. Blau markiert ist jeweils das Produkt, welches nach rekombinanter Expression erhalten wird. Die jeweils zu etablierenden Schritte sind rot dargestellt.

Im bestmöglichen Fall gelingt es, bereits im ausgewählten System funktionelles rekombinantes Protein herzustellen. Die auf diese Weise exprimierten Proteine, wie z.B. Globine (Gambacurta et al., 1993; Dewilde et al., 2001; Fuchs et al., 2004), Pilz-Tyrosinasen (Westerholm-Parvinen et al., 2007), Cu/Zn-Superoxid-Dismutasen (Pan et al., 1999), Metallo-β-Lactamasen (Crawford et al., 2004) oder Metalloproteasen (Köhler et al., 2000; Rösmann et al., 2002; Becker et al., 2003; Kruse et al., 2004), können sofort für weiter-

gehende funktionelle Studien eingesetzt werden. Wenn allerdings nur die Synthese der löslichen Apoform gelingt, muss das Protein nachträglich durch einen *in vitro*-Einbau des Metallions rekonstituiert werden. Diese Vorgehensweise führte z.B. im Fall einer Pilz-Tyrosinase aus *Aspergillus oryzae* zum Erfolg (Nakamura et al., 2000). Im ungünstigsten Fall werden allerdings Aggregatbildungen des gesamten rekombinanten Proteins in Form von so genannten *inclusion bodies* beobachtet. Gelingt es, solche Aggregate unter geeigneten Bedingungen zu solubilisieren und *in vitro* zu renaturieren (Rudolph und Lilie, 1996), können sehr hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein gewonnen werden. Globine und Metalloproteasen konnten bereits erfolgreich in Anwesenheit der jeweiligen Ionen *in vitro* renaturiert werden (Fronticelli et al., 1991; Marie-Claire et al., 1998; Reyda et al., 1999; He et al, 2002). Entsprechende Vorgehensweisen bei der *in vitro*-Renaturierung des rekombinant exprimierten Mollusken-Hämocyanins KLH (Dürr, 2008) sowie zweier pflanzlicher Tyrosinasen (Hörnemann, 2005) zeigten dagegen, dass diese Methodik im Fall der Typ3-Kupferproteine nicht unbedingt zum Erfolg führt.

3.2. Rekombinante Expression funktioneller Typ3-Kupferproteine

Bei der Etablierung eines rekombinanten Expressionssystem für die Typ3-Kupferproteine der Arthropoden-Hämocyanin-Superfamilie wurde nach einem System gesucht, dass die Produktion der funktionellen Proteine erlaubt. Als Indikator für eine erfolgreiche Herstellung von biologisch aktiven Enzymen dient in der Regel der Nachweis der katalytischen Aktivität (Spritz et al., 1997; Nakamura et al., 2000; Kohashi et al., 2004). Solch ein Aktivitätsnachweis lässt sich im Fall der Phenoloxidasen mit Hilfe einfacher enzymatischer Tests bereits im Zelllysat erbringen (Decker und Rimke, 1998; Decker et al., 2001). Aus diesem Grund lag der Fokus auf der rekombinanten Expression einer ausgewählten Phenoloxidase. Im Laufe der Arbeiten wurde die Prophenoloxidase 3 (PPO3) aus der Fruchtfliege *D. melanogaster* in Bakterien und in Insektenzellen exprimiert. Katalytisch aktive PPO3 konnte allerdings nur nach einer Expression in der *Drosophila*-Insektenzelllinie S2 erhalten werden.

3.2.1. Bedeutung von Chaperonen für die Expression von Kupferproteinen

Bakterielle Expressionsstämme wie z.B. *E. coli* BL21(DE3)pLysS haben sich in Verbindung mit dem T7-Expressionssystem (Studier und Moffat, 1986; Rosenberg und Studier, 1987; Studier, 1991) vielfach bei der rekombinanten Expression von Häm-Eisen-haltigen Metalloproteinen wie Hämoglobin oder auch Neuroglobin bewährt (Dewilde et al., 2001;

Fuchs et al., 2004, de Sanctis et al., 2005; 2006). Im Laufe der durchgeführten Arbeiten konnte dieses T7-System ebenfalls auf die rekombinante Expression von PPO3 optimiert werden, eine enzymatische Aktivität zeigte das Protein allerdings nicht. Auch eine Expression unter Kupferzugabe in das Bakterienmedium zeigte keinen positiven Einfluss (C.3.2.).

Das Scheitern solcher heterologer Wirtssysteme bei der Expression funktioneller PPO3 ist vermutlich in einem fehlenden *in vivo*-Kupfereinbau begründet. Die Ursache hierfür ist in der Kupferhomöostase von Pro- und Eukaryoten zu suchen. Freie Kupferionen im Cytoplasma katalysieren die Entstehung von hochreaktiven Hydroxylradikalen (Samuni et al., 1981; Halliwell und Gutteridge, 1990; Kehrer, 1993; Yu, 1994), die toxisch für die Zelle sind (Freedman et al., 1989; Floyd, 1990; Aruoma et al., 1991). Freies Kupfer liegt jedoch nur in einer Größenordnung von weniger als einem Kupferatom pro Zelle vor (Lippard, 1999; Rae et al., 1999). Die Aufrechterhaltung dieses niedrigen Levels ist auf eine strikte Kontrolle der gesamten Kupferhomöostase zurückzuführen (Hamer et al., 1985; Freedman, 1989; Cooksey, 1993; 1994; Vulpe und Packman, 1995; Chen et al., 1996; Kelly und Palmiter, 1996; Southon et al., 2004). Die Versorgung der zelleigenen Kupferproteine mit den zur biologischen Funktion benötigten Ionen wird durch spezielle Chaperone gewährleistet (Valentine und Gralla, 1997; Harrison et al., 1999; O'Halloran und Culotta, 2000; Huffman und O'Halloran, 2001; Field et al., 2002). Dabei erfolgt der Kupfertransfer zu den Proteinen der unterschiedlichen Zellkompartimente durch jeweils eigene Kupferchaperone (Glerum et al., 1996; Amaravadi et al., 1997; Culotta, 1997; Lin et al., 1997; Valentine und Gralla, 1997; Lamb et al., 1999; 2001; Banci et al. 2003; Southon et al., 2004). Auch im Hinblick auf die Typ3-Kupferproteine kann mittlerweile die Existenz von spezifischen Chaperonen bestätigt werden. In Bakterien wurden Operons identifiziert, in denen die jeweilige Tyrosinase mit einem zusätzlichen ORF organisiert ist (Katz et al., 1983; Bernan et al., 1985; Kawamato, 1993; Lopez-Serrano et al., 2002; 2004). Letzteres codiert für das entsprechende Chaperon, das für den Kupfereinbau und die damit einhergehende Aktivierung des Enzyms notwendig ist (Lee et al., 1988; Chen et al., 1992; 1993; Lopez-Serrano et al., 2007). Die Entstehung der aktiven Tyrosinase von Säugern ist ebenfalls von solchen Chaperonen abhängig. Nach erfolgter Faltung und Reifung im Endoplasmatischen Retikulum (Wang und Hebert, 2006) findet der Kupfereinbau in das Apoenzym im *trans*-Golgi-Netzwerk statt, wobei die P-Typ ATPase ATP7A (Vulpe und Packman, 1995) nachweislich an der Kupferbeladung der Tyrosinasen beteiligt und für den Erhalt funktionellen Proteins essentiell ist (Petris et al., 2000).

Die Anwesenheit solcher Kupferchaperone scheint *in vivo* für die Expression funktioneller Kupferproteine unumgänglich zu sein. Ihre Bedeutung muss bei einer rekombinanten Expression funktioneller PPO3 berücksichtigt werden. So kann biologisch funktionsfähige

PPO3 vermutlich nur in Bakterien rekombinant exprimiert werden, wenn eine Koexpression mit dem entsprechenden Metallochaperon erfolgt. Solche Koexpressionen führten bereits im Falle einiger bakterieller Kupferproteine zum Erfolg (Kohashi et al., 2004; Ito und Inouye, 2005). Allerdings sind die potentiellen Chaperone vieler Typ3-Kupferproteine inklusive die der entsprechenden Vertreter der Arthropoden-Hämocyanin-Superfamilie noch nicht bekannt, auch wenn hierbei die Bedeutung von Metallothioneinen mehrfach diskutiert wurde (Beltramini und Lerch, 1982; Berger et al., 1997; Brouwer et al., 2002). Das erschwert die rekombinante Expression dieser Kupferproteine in einem heterologen Wirtssystem wie *E. coli* beträchtlich und führt dazu, dass die Expression ohne das spezifische Chaperon bestenfalls das Protein in seiner jeweiligen Apoform liefert (Nakamura et al., 2000; Lopez-Serrano et al., 2007).

3.2.2. Rekombinante Expression funktioneller PPO3 in Insektenzellen

Gerade in Situationen, in denen ein Helferprotein noch nicht bekannt ist, bietet sich die Verwendung von homologen Wirtssystemen zur rekombinanten Expression von biologisch aktiven Proteinen an. Indem so die bereits natürlicherweise in den jeweiligen Zellen vorhandenen spezifischen Metallochaperone genutzt wurden, führte die rekombinante Expression verschiedener Tyrosinasen aus Bakterien und Pilzen zu funktionsfähigem Enzym (Kawamoto et al., 1993; Fujita et al., 1995; Spritz et al., 1997; Bubacco et al., 2000; Nakamura et al., 2000). Diese Vorgehensweise zur Gewinnung katalytisch aktiver Kupferenzyme wurde auch auf das Protein PPO3 angewandt. Bei der rekombinanten Expression von Typ3-Kupferproteinen der Arthropoden bieten sich vor allem Insektenzellen als geeigneter Wirt an. So exprimieren Insekten nicht nur natürlicherweise Phenoloxidasen, in einigen Fällen wurde auch der Besitz von Hämocyanin nachgewiesen (Hagner-Holler et al., 2004; Burmester und Hankeln, 2007). Somit ist anzunehmen, dass alle die für die Synthese dieser Kupferproteine notwendigen Strukturen in diesen Zellen vorhanden sind. Zur Expression der PPO3 wurden mit dem Baculovirus-System und dem „*Drosophila Expression System*“ zwei unterschiedliche Systeme herangezogen.

3.2.2.1. Das Baculovirus-System

Bei der Sichtung der möglichen rekombinanten Insektenzellsysteme, die zwar hohe Proteinausbeuten versprechen, aber trotzdem kontrollierbar sind, fiel die Wahl auf das Baculovirus-System (Miller, 1988; Luckow et al., 1993; Ciccarone et al., 1997; Possee, 1997). Diese auf einer virusvermittelten Expression in Insektenzellen basierende Methodik führte schon bei der Expression unterschiedlicher Proteine zum Erfolg (Chan et al.,

1994; Pyle et al., 1995; Krupenko et al., 1995; Köhler et al., 2000). Die Verwendung von Signalpeptiden zur Sekretion in das umliegende Medium lieferte dabei in vielen Fällen aufgrund einer verbesserten Proteinfaltung und -löslichkeit die funktionellen Proteine (Krupenko et al., 1995; Zhou et al., 2000; Katagiri und Ingham, 2002), wie beispielsweise die katalytisch aktive Zink-Protease Meprin (Köhler et al., 2000; Becker et al., 2003; Kruse et al., 2004). Dieser Vorgehensweise entsprechend wurde versucht, das Kupferprotein PPO3 mit dem Meprin-Signalpeptid zu exprimieren. Hierbei wurden als Wirt neben den für die Generierung und Amplifikation von Viren notwendigen Sf9-Zellen auch die High Five-Zellen eingesetzt. Letztere zeichnen sich im Vergleich zu den Sf9 durch besonders hohe Expressionsraten aus (Davis et al., 1993a; 1993b; Mohandas et al., 1994; Krupenko et al., 1995; Dürr, 2008). Die massive Überproduktion eines rekombinanten Proteins führt allerdings zu einer starken Beeinträchtigung der zelleigenen Proteinsynthese. So ist auch die Konzentration verschiedener ER-Chaperone in Baculovirus-infizierten Zellen nicht nur weitaus geringer als im Wildtyp, sondern nimmt auch ab Tag 3 nach Infektion weiter ab (Yun et al., 2005). Daher wurden die Proteinexpressionen im Baculovirus-System für maximal 72 h durchgeführt, um ein Ungleichgewicht bei der Expression der rekombinanten PPO3 und der zelleigenen, eventuell zur Faltung des Proteins benötigten ER-Chaperone zu vermeiden (B.5.2.1.6.). Idealerweise resultiert diese Zeitspanne in vielen Fällen in dem Maximum an rekombinantem Protein, wohingegen eine Erhöhung der Expressionsdauer wiederum zu einer Abnahme der Ausbeute führt (Yamada et al., 1990; Pyle et al., 1995; Dürr, 2008). Wie im Falle der PPO3 die Auswertung der Proteinexpression zeigte, wurde das rekombinante Enzym durch das künstlich angefügte Signalpeptid tatsächlich in das umliegende Medium sezerniert (Abb. C.14). Dabei zeigte aber weder die in Sf9-Zellen exprimierte PPO3, noch das Protein aus den High Five-Zellen eine katalytische Aktivität. Auch bei einer Expression unter Zugabe von 5 µM, 10 µM oder 100 µM $CuSO_4$ wurde wie zuvor eine Sekretion der rekombinanten PPO3 ins Medium beobachtet, katalytisch aktiv war das Protein jedoch nicht (C.3.1.1.).

Natürlich kann spekuliert werden, dass in Insektenzellen die für den *in vivo*-Kupfereinbau benötigten Metallochaperone in den Zellkompartimenten, die ein sekretorisches Protein durchläuft, fehlen. Hierfür spricht, dass die Phenoloxidasen der Insekten keine Signalpeptide besitzen, sondern natürlicherweise im Cytoplasma der Hämocyten an freien Ribosomen synthetisiert werden (Kawabata, 1995; Söderhall und Cerenius, 1998). Aber auch das künstlich an die PPO3 angefügte Signalpeptid könnte einen unbeabsichtigten Einfluss auf die Aktivität haben. Vergleiche verschiedener, im Baculovirus-System eingesetzter Signalpeptide zeigten, dass diese nicht nur einen Einfluss auf die Sekretionsrate eines Proteins haben können (Mroczkowski et al., 1994), sondern auch in manchen

Fällen den eigentlichen Faltungsprozess des Proteins im sekretorischen Weg beeinflussen und zudem zu unterschiedlich glykosylierten Formen führen. Das Resultat sind Proteine, die sich in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden (Park et al., 1999).
Im Fall der hier exprimierten PPO3 zeigten die Analysen zwei Formen des rekombinanten Enzyms, die ein unterschiedliches Laufverhalten in SDS-Gelen bzw. eine unterschiedliche molekulare Masse aufwiesen (Abb. C.14). Dieses Phänomen wird bei einer rekombinanten Expression im Baculovirus-System häufig beobachtet und ist auf heterogene Glykosylierungen sowie auf einen proteolytischen Abbau der rekombinanten Proteine zurückzuführen (Ramabhadran et al., 1993; Sugiyama et al., 1993; Heitz et al., 1997; Dürr, 2008). Letzterer ist durch die Aktivität zellulärer und/oder viraler Proteasen bedingt, die nach einer Virusinfektion verstärkt exprimiert und durch die nach wenigen Tagen auftretende Zelllyse in das umliegende Medium freigesetzt werden (Gotoh, 2001a; 2001b; Hom et al., 2002).
Die genaue Ursache für die beobachtete Inaktivität der PPO3 ist somit nicht eindeutig zu benennen und kann sogar auf eine Kombination mehrerer dieser aufgeführten Punkte zurückzuführen sein. Zudem ist zu berücksichtigen, dass eine fehlende oder ungenügende Aktivierung der rekombinanten PPO3 ebenfalls nicht als Ursache ausgeschlossen werden kann. Eine Variation der Aktivierungsparameter in den Analysen wurde durch die vergleichsweise geringen Proteinausbeuten limitiert. Diese liegen bei rekombinanten Proteinen, die den sekretorischen Weg durchlaufen müssen, in der Regel weit unter denen einer intrazellulären rekombinanten Expression (Shuler et al., 1995; Yun et al., 2005; Dürr, 2008).

3.2.2.2. Das „Drosophila Expression System“

Die bisherigen Arbeiten zeigten die Grenzen des Baculovirus-Systems bei der Synthese der PPO3 auf und sind richtungsweisend für eine erfolgreiche rekombinante Expression biologisch aktiver PPO3 in Insektenzellen. Viele der aufgeführten Limitierungen lassen sich bereits auf einfache Weise umgehen, wenn eine cytoplasmatische Expression in stabil transfizierten Insektenzellen durchgeführt wird. Die Wahl fiel hierbei auf das „*Drosophila Expression System*“ (Johanson et al., 1989; Angelichio et al., 1991), welches auf einer rekombinanten Proteinexpression in stabil transfizierten *Drosophila*-Zellen der Linie Schneider S2 basiert (Schneider, 1972). Die Verwendung einer Insektenzelllinie aus dem ursprünglichen Wirt der hier zu exprimierenden PPO3 erscheint schlüssig, da auf diesem Weg bereits verschiedene *Drosophila*-Proteine erfolgreich exprimiert werden konnten (Fehon et al., 1990; Krantz und Zipursky, 1990; Wang et al., 1993; Millar et al., 1994; 1995). Im Fall der PPO3 wurde auf eine induzierbare Expression zurückgegriffen,

die einerseits durch die Verwendung des starken *Drosophila* Metallothionein-Promotors hohe Ausbeuten an rekombinantem Protein verspricht (Maroni et al., 1986; Bunch et al., 1988), andererseits aber durch den Induktor $CuSO_4$ sowie durch die Expressionsdauer kontrollierbar bleibt (Millar et al., 1994; Tota et al., 1995; Wang et al., 1993). Tatsächlich konnte erstmalig nach einer Expressionsdauer von maximal 48 h in Anwesenheit von 0,5 mM $CuSO_4$ nicht nur lösliche, sondern auch funktionelle rekombinante PPO3 gewonnen werden (C.3.1.2.). Die katalytische Aktivität der PPO3 wurde letztendlich im Rahmen zweier unabhängiger Assays im Zelllysat nachgewiesen (Abb. C.18), wobei aber nicht jeder eingesetzte Aktivator eine Wirkung zeigte.

Bereits seit Längerem ist bekannt, dass *in vitro* diverse Detergenzien, Salze, Fettsäuren und Alkohole zu einer Aktivierung von Prophenoloxidasen führen (Sugumaran und Nellaiappan, 1991; Asada et al., 1993; Hall et al., 1995; Nellaiappan und Sugumaran, 1996; Asada, 1998; Asada und Sezaki, 1999; Espin und Wichers, 1999a; Asano und Takebuchi, 2009). Weit verbreitet ist dabei die Verwendung von SDS, welches abhängig von der Phenoloxidase in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgreich eingesetzt wird (Moore und Flurkey, 1990; van Gelder et al., 1997; Espin und Wichers, 1999b; Jaenicke, 2002). Im Fall der rekombinanten PPO3 wurde die Konzentration an SDS von 0,01-0,3% variiert, führte aber in keinem Fall zu einem katalytisch aktiven Enzym. Als alternative Möglichkeit einer *in vitro*-Aktivierung der zymogenen PPO3 wurde auf eine limitierte Proteolyse durch Inkubation mit Serinproteasen zurückgegriffen. Eine solche protease-vermittelte Aktivierung ist im Fall der Arthropoden-Phenoloxidasen nicht nur *in vivo* physiologisch relevant (Söderhall und Cerenius, 1998; Sugumaran, 2002; Cerenius und Söderhall, 2004). Sie wird auch bei vielen *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt, wobei neben der, aus dem jeweiligen Organismus aufgereinigten, spezifischen Protease (Fujimoto et al., 1993; Chosa et al., 1997; Asada und Sezaki, 1999; Asada et al., 2003) auch Trypsin verwendet wird (Hall et al., 1995; Espin et al., 1999; Nagai und Kawabata, 2000; Jaenicke, 2002). Letzteres führte auch bei der hier exprimierten PPO3 nach einer 5minütigen Inkubation zu einer Aktivierung (Abb. C.18).

Enzymkinetische Untersuchungen bestätigten die Spezifität der erhaltenen Signale. Hierbei wird in der Regel die Wirkung von typischen Phenoloxidase-Inhibitoren wie Azid, L-Mimosin, oder auch Phenylthioharnstoff auf die Substratumsetzung analysiert (Bubacco et al., 2000; Jaenicke, 2002). In dieser Arbeit wurde nur Phenylthioharnstoff eingesetzt, welches in den durchgeführten Messungen eine Inhibitionswirkung auf die zuvor mit Trypsin aktivierte PPO3 zeigte (Abb. C.19). Diese abschließenden Experimente zeigen die Eignung des „*Drosophila Expression Systems*“ bei der rekombinanten Expression biologisch funktionsfähiger PPO3.

3.3. Rekombinante Expression in bakteriellen Systemen

Im Gegensatz zu einer rekombinanten Expression in Insektenzellen bieten bakterielle Expressionssysteme den entscheidenden Vorteil, dass sich das gewünschte Protein in der Regel einfach, schnell und kostengünstig in großen Mengen exprimieren lässt. Daher wurde versucht, basierend auf dem bakteriellen T7/pET-System (B.5.1.) ein Expressionssystem für die Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden zu etablieren.

3.3.1. Expression von Typ3-Kupferproteinen: Prophenoloxidase 3

Wie zuvor dargestellt (D.3.2.1.), scheitert eine rekombinante Expression von biologisch aktiver PPO3 in dem heterologen Wirt *E. coli* vermutlich an dem Fehlen des für den Kupfereinbau verantwortlichen Chaperons. Nichtsdestotrotz zeigten Nakamura et al. (2000) am Beispiel einer Pilz-Tyrosinase aus *Aspergillus oryzae*, dass sich die Vorteile von prokaryotischen Wirtssystemen prinzipiell auch bei der Expression von Typ3-Kupferproteinen nutzen lassen. Gelingt es wie in diesem Fall, das lösliche Apoprotein in Bakterien zu exprimieren, so kann dieses *in vitro* unter Kupferzugabe zu funktionellem Enzym rekonstituiert werden (D.3.1., Abb. D.3). Entsprechend dieser Vorgehensweise wurde versucht, eine solche Methodik auch für die PPO3 aus *D. melanogaster* zu entwickeln.

3.3.1.1. Rekombinante Expression der löslichen PPO3-Apoform

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals, am Beispiel der PPO3 eine Arthropoden-Phenoloxidase als lösliches Apoprotein in *E. coli* rekombinant zu exprimieren. Hierbei führte erst die Verwendung des Bakterienstammes Rosetta(DE3)pLysS zum gewünschten Erfolg. Die zu Beginn eingesetzten Zellen des Stammes BL21(DE3)pLysS, deren Derivate sich bei der Synthese diverser Kupferproteine als vielversprechend erwiesen haben (Hibino et al., 1994; Kong et al., 2000; Nakamura et al., 2000; Sullivan et al., 2004), lieferten dagegen nicht nur geringere Proteinausbeuten, sondern scheiterten auch an der Synthese der mit einem Affinitätstag ausgestatteten PPO3 (C.3.2.1.1.).
Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die unterschiedliche Codon-Usage von Pro- und Eukaryoten eine bedeutende Rolle bei einer heterologen Proteinexpression in *E. coli* spielen kann (Zahn, 1996; Baneyx, 1999). So haben bei der Expression der PPO3 in *E. coli* nicht nur die Codons der eigentlichen Proteinsequenz die Synthese in den BL21-Zellen behindert, auch die Codons des künstlich an die PPO3 angefügten Strep-Tag II wurden vermutlich nicht ganz optimal gewählt. Der Stamm Rosetta(DE3)pLysS, der sechs zusätzliche tRNA-Gene für einige von *E. coli* selten verwendete Codons besitzt

(Novy et al., 2001), konnte die Abweichungen im Hinblick auf die Codon-Usage ausgleichen und so die Expression der PPO3 verbessern.
Zum Erhalt der größtmöglichen Menge löslicher PPO3 wurden einige Parameter optimiert. Eine Variable, die dabei für jedes Protein individuell abgestimmt werden muss, ist die optimale Expressionstemperatur. Diverse Proteine konnten über eine Expression bei 37 °C in löslicher Form erhalten werden (Arcuri et al., 2008; Kang et al., 2008; Samra und Athar, 2008; Cao et al., 2009). Die rekombinante PPO3 dagegen lag unter diesen Bedingungen nur in geringen Anteilen löslich vor, wohingegen der Großteil des Proteins in Form von *inclusion bodies* zu finden war (Abb. C.20). Eine Absenkung der für *E. coli* optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C auf Werte zwischen 18-30 °C kann aber in vielen Fällen die Bildung löslichen Proteins gegenüber einer Aggregation zu *inclusion bodies* begünstigen (Jensen et al., 1999a; Kong et al., 2000; Nakamura et al., 2000; Yoon et al., 2002; Yang et al., 2003, Vera et al., 2007). Hier wurde allerdings der gegenteilige Fall beobachtet: statt einer Verbesserung der Ausbeute an löslicher PPO3 führte eine Erniedrigung der Expressionstemperatur nur dazu, dass das gesamte Protein in *inclusion bodies* lokalisiert war (C.3.2.1.2. und Tabelle C.3).
Erst durch eine Fusion mit Thioredoxin konnte die Ausbeute an löslicher PPO3 unter der als optimal ermittelten Expressionstemperatur von 37 °C mehr als verdoppelt werden (C.3.2.1.3.). Fusionen mit einem solchen hydrophilen Protein haben sich bereits in vielen Fällen als sehr günstig für die Herstellung von ansonsten zur Aggregation neigender Proteine in löslicher Form erwiesen (LaVallie et al., 1993; Pan et al., 1999; Abdulaev et al., 2000; Yoon et al., 2002; Yang et al, 2003; Niiranen et al., 2007). So wurde z.B. die Expression einer löslich vorliegenden Apotyrosinase aus dem Pilz *Aspergillus oryzae* in *E. coli* durch eine Fusion mit Thioredoxin erreicht (Nakamura et al., 2000).

3.3.1.2. Ermittlung der optimalen Parameter für die in vitro-Rekonstitution

Das nächste Ziel zur Gewinnung biologisch aktiver PPO3 stellte die *in vitro*-Rekonstitution des exprimierten, löslichen Apoenzyms mit Kupfer dar. Die für dieses Protein optimalen Parameter für die Rekonstitution konnten allerdings noch nicht ermittelt werden. Erschwert wurde das Ganze dadurch, dass die Möglichkeiten eines solchen Kupfereinbaus *in vitro* sehr vielfältig sind, wobei die effektivste Methode nicht vorhersagbar ist. Variablen sind z.B. die verwendeten Rekonstitutionspuffer, pH-Werte, das Kupferangebot in Bezug auf die Oxidationsstufe und die eingesetzte Kupferkonzentration, die Inkubationstemperatur und -dauer, aber auch die Atmosphäre, mit der gearbeitet wird (Wigfield und Goltz, 1990a; 1990b; Brouwer und Brouwer-Hoexum, 1992; da Costa Ferreira et al., 1993; Wigfield und Goltz, 1993; Musci et al., 1996; Nakamura et al., 2000). Die mit der

rekombinanten PPO3 durchgeführten Versuche fanden nur unter aeroben Bedingungen statt, welche schon in verschiedenen Studien zu einer erfolgreichen Rekonstitution von Kupferproteinen führte (Kertesz et al., 1972; Wigfield und Goltz, 1990a; 1990b; Wigfield und Goltz 1993; Nakamura et al., 2000; He et al., 2002).

Als ein mögliches kritisches Element bei einer erfolgreichen Rekonstitution *in vitro* gilt vor allem die Oxidationsstufe des angebotenen Kupfers. Hier gibt es zum einen den Ansatz, für die Rekonstitution der Apoproteine das einwertige Cu^+ zu verwenden (Ciriolo et al., 1990, Brouwer und Brouwer-Hoexum, 1992, Mehra und Mulchandani, 1995; Musci et al., 1996), zum anderen können in der Literatur auch Anwendungen mit der höheren Oxidationsstufe Cu^{2+} gefunden werden (Kertesz et al., 1972; Nakamura et al., 2000, He et al., 2002). Die Tatsache, dass das Kupfer in Metallothioneinen oder Hämocyaninen als Cu^+ vorliegt, führt dazu, dass vor allem die Verwendung von Cu^+ für die Rekonstitution der jeweiligen Apoproteine empfohlen wird (Konings et al., 1969; Nielson et al., 1985; Brouwer und Brouwer-Hoexum, 1992).

In den Experimenten zur Rekonstitution der PPO3 wurde mit beiden Oxidationsstufen gearbeitet. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass nur Cu^{2+} in Form von $CuSO_4$ gut löslich und einfach zu handhaben ist. Dagegen sind Cu^+-Ionen im wässrigen Milieu instabil und müssen in Form eines Komplexes angeboten werden. Da Glutathion *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Bindung und Mobilisierung von Kupfer spielt, wird es oftmals *in vitro* zur Herstellung der einwertigen Kupferionen eingesetzt (Freedman et al., 1989; Ballatori, 1994; Wang und Ballatori, 1998). Die Stabilität dieses Komplexes ist dabei abhängig von dem Verhältnis GSH:Kupfer (Ciriolo et al., 1990; Hörnemann, 2005). Bei der Rekonstitution der PPO3-Apoform führte aber keines der beiden Kupferangebote zum Erfolg. Auch die Berücksichtigung der Tatsache, dass die Kinetik des Kupfereinbaus abhängig vom pH-Wert sein könnte (Wigfield und Goltz, 1990a), änderte nichts an diesem Resultat.

Analysen am Beispiel der kupferbindenden P-Typ ATPase ATP7A zeigten, dass die Verwendung von Cu^{2+} in Form von $CuCl_2$, Cu^+-Thioharnstoff oder Cu^+-GSH nur zu einer Rekonstitution des Proteins von 3-16% führte (Jensen et al., 1999b). Im Gegensatz dazu konnte diese ATPase mit der aus L-Ascorbinsäure und $Cu(II)Cl_2$ entstehenden Verbindung $CuCl_4^{3-}$ zu 100% rekonstituiert werden (Jensen et al., 1999a; 1990b). Aus diesem Grund wurde diese $CuCl_4^{3-}$-Verbindung auch für die Rekonstitution der rekombinanten PPO3 herangezogen, obwohl der positive Einfluss von L-Ascorbinsäure auf die Beladung von Kupferproteinen fraglich ist. Zwar spielt es *in vivo* eine Rolle bei dem Kupfertransport sowie der -regulation, doch behindern bereits physiologische Mengen an L-Ascorbinsäure die Beladung von Cu-Zn-Superoxiddismutasen mit Kupfer (Harris und Perceival, 1991). Ob und wie gut sich diese Kupferquelle für die Rekonstitution der PPO3 eignet,

kann allerdings noch nicht abschließend beurteilt werden. Zwar wurden bereits die ersten Experimente durchgeführt, an deren Abschluss keine Enzymaktivität der PPO3 festgestellt werden konnte. Doch spricht dies nicht prinzipiell gegen die $CuCl_4^{3-}$-Verbindung. Die fehlende katalytische Aktivität könnte in diesem Fall in einer mangelnden Aktivierung des Enzyms begründet sein. Modifikationen im Ablauf wie die Variation der Aktivierungsparameter in den durchgeführten Enzymtests sind noch durchzuführende Maßnahmen, zumal in diesen Versuchen bislang nur SDS zur Induktion der Aktivität eingesetzt wurde. Wie aber letztendlich die parallel an dem in Insektenzellen exprimierten PPO3 durchgeführten Messungen zeigten, scheinen die hier verwendeten Konzentrationen an SDS keine Aktivierung des rekombinanten Enzyms zur Folge zu haben. Aus diesem Grund sollten in den Folgestudien die Analysen der Rekonstitutionsexperimente ausschließlich nach einer proteolytischen Aktivierung der PPO3 mit Trypsin erfolgen, da bislang nur dieser Aktivator zu einer enzymvermittelten Substratumsetzung geführt hat (D.3.2.2.2. und Abb. C.18).

3.3.2. Expression eines kupferlosen Vertreters: Hexamerin LSP2

Im Rahmen eines weiteren Projektes wurde versucht, einen ausgewählten kupferlosen Vertreter der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden in *E. coli* rekombinant zu exprimieren. Die Wahl fiel hierbei auf das Hexamerin LSP2 von *D. melanogaster*, das als Quartärstruktur ein Hexamer aus einer einzigen Untereinheit ausbildet (Mousseron-Grall et al., 1997). Da diese 20 x 20 nm großen hexameren Strukturen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut zu sehen sind, kann mit dieser Methode die korrekte Faltung des rekombinanten LSP2 einfach und schnell über den Nachweis der Quartärstruktur erkannt werden. Im Laufe der Arbeiten gelang tatsächlich die Etablierung einer Methodik, die erstmals die rekombinante Herstellung eines Hexamerins erlaubte (C.3.3.2.).
Das LSP2 besitzt natürlicherweise ein N-terminales Signalpeptid, über das die Sekretion des Proteins in die Hämolymphe erfolgt (von Heijne, 1990; Mousseron-Grall et al., 1997). Für eine beabsichtigte Expression in *E. coli* werden solche Sequenzen in der Regel so modifiziert, dass das rekombinante Protein nach seiner Synthese im bakteriellen Cytoplasma in diesem Kompartiment verbleibt (Kadonaga et al., 1984; Vizioli et al, 2001; Boisguerin, 2006; Dürr, 2008). Auch die Arbeiten an dem Protein LSP2 zeigten, dass die Entfernung des Signalpeptids Voraussetzung für eine erfolgreiche rekombinante Expression in *E. coli* ist. Solche natürlicherweise sezernierten Proteine können allerdings nur im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas korrekt gefaltet werden, wenn wie bei dem Hexamerin LSP2 die Ausbildung von Disulfidbrücken für ihre Faltung und Funktion nicht essentiell ist.

Eine Analyse der LSP2-Proteinfaltung erfolgte erst nach Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem löslichen Zellextrakt. Die hierfür notwendigen Versuche zur Ausbildung der LSP2-Quartärstruktur wurden mit der Methode der Dialyse durchgeführt, bei der der Prozess der Rekonstitution alleine durch die Diffusion der Pufferbestandteile vollzogen wird (Rudolph und Lilie, 1996; Hefenbrock, 2008). Tatsächlich zeigten die ersten elektronenmikroskopischen Analysen den Erfolg der Hexamer-Rekonstitution. Die für dieses Protein charakteristischen quaderförmigen, etwa 20 x 20 nm großen Hexamere konnten eindeutig in den mikroskopischen Aufnahmen identifiziert werden (Abb. C.24).
Warum allerdings nicht die gesamten rekombinanten Monomere die native LSP2-Quartärstruktur ausbilden, ist noch unklar. Wie die Größenfraktionierungsstudien der zeitabhängigen Dialysen zeigten, denaturiert oder degradiert der Großteil der rekombinanten Monomere während der Dialyse (Abb. C.27). Sicherlich sind hier noch Optimierungen in der Methodik der Rekonstitution nötig, zu denen die Zugabe von Proteasehemmern gehört. Doch lässt sich anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen eindeutig der Schluss ziehen, dass mit dem bestehenden prokaryotischen System die rekombinante Expression des korrekt gefalteten Hexamerins LSP2 im Cytoplasma von *E. coli* möglich ist. Dieses Resultat lässt hoffen, dass auch verwandte Proteine wie z.B. die hier exprimierte Apoform der Arthropoden-Phenoloxidase PPO3 im bakteriellen Cytoplasma korrekt gefaltet vorliegen.

3.3.3. Wahl des Testsystems: Phenoloxidasen *vs.* Hämocyanine

Die Arbeiten mit dem hier verwendeten bakteriellen Expressionssystem zeigten, dass sich das Hexamerin LSP2 in großen Mengen in *E. coli* exprimieren lässt. Nach Aufreinigung konnten bis zu 6 mg LSP2 aus einem Liter Expressionskultur erhalten werden (C.3.2.1.). Im Gegensatz dazu führte die Expression der PPO3 in *E. coli* dazu, dass der Großteil dieses rekombinanten Proteins in *inclusion bodies* lokalisiert ist. Die Ausbeute an löslicher PPO3 betrug nach Aufreinigung maximal 1 mg pro Liter Expressionskultur (C.3.2.1.3.). Es ist bekannt, dass die Abwesenheit von Cofaktoren, spezifischen Chaperonen oder anderer wechselwirkender Proteine im ausgewählten Expressionssystem zu einer Aggregation des rekombinanten Proteins in Form von *inclusion bodies* führen kann (Lottspeich und Zorbas, 1998; Fink, 1999; Mogk et al., 2002). Dennoch konnte aus *E. coli* nach Optimierung der Expressionsbedingungen anteilig lösliches rekombinantes Apo-PPO3 gewonnen werden. Alle nachfolgenden Versuche zur Aufreinigung und Rekonstitution dieses Apoproteins wurden aber ebenfalls erschwert, da die PPO3 stark zu der Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten neigte (C. 3.2.1.4.).
Natürlich kann vermutet werden, dass das Fehlen der Kupferionen die Ursache für die

beobachtete Aggregation ist. So könnte dies zu einer unvollständigen Proteinfaltung führen, die die Löslichkeit der rekombinanten PPO3-Apoform herabsetzt. Hierfür spricht, dass auch die Apoformen verschiedener rekombinanter Typ3-Kupferproteine, wie z.B. des Mollusken-Hämocyanins KLH (Dürr, 2008) oder auch pflanzlicher Tyrosinasen (Hörnemann, 2005), eine Tendenz zur Proteinaggregation aufweisen.

Diverse Studien berichten aber von einer generellen Instabilität und Unlöslichkeit der Phenoloxidasen, welche z.B. durch Einfrier-Auftau-Prozesse verstärkt werden, sowie einem Aktivitätsverlust bei der Aufreinigung (Hall et al., 1995; Sugumaran, 2002). Daher sind die Phenoloxidasen von Arthropoden schon seit langer Zeit als "*sticky enzymes*" bekannt (Söderhall, 1982), was auf einen hohen Anteil von ungeladenen und hydrophoben Aminosäuren zurückzuführen ist. Ein Vergleich der aus Sequenzen berechneten Netto-Ladung bei pH 8,0 zeigt, dass Hämocyanine deutlich negativer geladen sind als Phenoloxidasen (Jaenicke, 2002; Decker und Jaenicke, 2004). Die daraus resultierenden unterschiedlichen Eigenschaften der zwei Proteinklassen sind als Anpassung an ihre Funktion zu verstehen. Eine stark negativ geladene Oberfläche ist von Vorteil, da sie z.B. die Löslichkeit der Hämocyanine erhöht, zudem aber eine unkontrollierte Aggregation bei den herrschenden hohen Hämocyaninkonzentrationen in der Hämolymphe vorbeugt. Dagegen werden die Phenoloxidasen der Arthropoden erst im Rahmen einer Immunantwort in die Hämolymphe freigesetzt. Ihre hydrophobe Oberfläche setzt die Löslichkeit herab und verbessert somit die Wechselwirkung mit der Oberfläche von Pathogenen. Es ist anzunehmen, dass die im Rahmen der Expressions- und Rekonstitutionsversuche beobachteten Schwierigkeiten zum Teil auf eben diese natürliche Hydrophobizität von Phenoloxidasen zurückzuführen sind.

Aus diesem Grund wurde versucht, im Rahmen zweier Diplomarbeiten das bestehende prokaryotische Expressionssystem auf ein ausgewähltes Arthropoden-Hämocyanin anzuwenden (Hefenbrock, 2008; Didier, 2009). Die Wahl fiel auf das Hämocyanin des Krebses *Palinurus elephas*, welches ein Hexamer aus vier verschiedenen Untereinheitstypen darstellt, die sich in <5% der Aminosäuren unterscheiden (Kusche et al., 2003b). Computergestütze Voraussagen, die anhand der Aminosäuresequenzen mit dem Programm ProtParam getroffen wurden, weisen auf unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften von PPO3 und der *Palinurus elephas* Hämocyaninuntereinheit 4 (Hc4) hin. Als eine weitere Referenz wurden zudem die jeweiligen Werte des erfolgreich exprimierten Hexamerins LSP2 betrachtet (Tabelle D.1).

Tabelle D.1: Vergleich von PPO3, Hc4 und LSP2

	PPO3[1)]	Hc4[2), 3)]	LSP2[3)]
ΣAS	683	657	681
MW [kDa]	79,3	75,9	81,4
pI	6,1	5,1	5,8
Negativ geladene AS (Asp + Glu)	98	112	93
Positiv geladene AS (Arg + Lys)	86	60	60
Netto-Ladung	-12	-52	-33
GRAVY	-0,482	-0,623	-0,564

[1)] Expression von PPO3 ohne Fusionsprotein Thioredoxin
[2)] vgl. Diplomarbeiten Hefenbrpck, 2008 und Didier, 2009,
[3)] Expression von LSP2 und Hc4 ohne das N-terminale Signalpeptid

Bereits die Betrachtung der Netto-Ladung unter Berücksichtigung der vier Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Arginin und Lysin zeigt, dass das Hc4 im Vergleich zur PPO3 stärker negativ geladen ist. Dies wird auch durch die Hydropathiewerte GRAVY („Grand average of hydropathicity“) bestätigt, zu deren Berechnung die Summe der Hydropathiewerte aller 20 proteinogenen Aminosäuren durch die Gesamtanzahl ΣAS dividiert wird (Kyte und Doolittle, 1982). Die Untereinheit Hc4 sollte sich somit theoretisch ähnlich gut in Bakterien exprimieren lassen wie das LSP2, welches eine Netto-Negativladung von -33 und einen GRAVY von -0,564 aufweist.

Tatsächlich wurden diese Annahmen in der Praxis bestätigt. So konnte das für das Enzym PPO3 optimierte bakterielle Expressionssystem nicht nur auf Hc4 angewandt werden, sondern führte sogar zu einer nahezu zehnfach höheren Ausbeute an löslichem Apoprotein. Dabei lag die optimale Temperatur für die rekombinante Expression der Apoformen von Hc4 und PPO3 beide Male bei 37 °C (Hefenbrock, 2008; Didier 2009), wohingegen das Maximum an rekombinantem LSP2 bei einer Temperatur von 26 °C exprimiert wird. Eine Erhöhung der Expressionstemperatur um nur 3-4 °C führte bereits zu einer kompletten Lokalisation des LSP2 in *inclusion bodies* (Hefenbrock, 2008).

Die Vorteile der Arbeiten mit Hc4 bei der Etabalierung rekombinanter, bakterieller Systeme zur Expression der Arthropoden-Typ3-Kupferproteine sind also deutlich. Durch die höheren Proteinausbeuten sind nicht nur gezieltere *in vitro*-Rekonstitutionen des Apoproteins mit Kupfer möglich. Diese Versuche werden zudem nicht mehr durch ein für die PPO3 typisches Aggregieren und Ausfallen der rekombinanten Proteine behindert. Dies führte sogar dazu, dass bei der Verwendung des Rekonstitutionsprotokolls basierend auf dem Tris-$CuCl_4^{3-}$-Puffer erste Hinweise auf einen erfolgreichen Kupfereinbau in rekombinante Apohämocyanine verzeichnet werden konnten. Die Aufnahme von Absorptionsspektren erlaubte dabei aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima der verschiedenen Kupferoxidationszustände im Hämocyanin (Oxy, Met, Semi-Met, Desoxy) eine erste Identifizierung der gebildeten Form (Andrew et al., 1993). Es konnte jedoch nur in einem Rekonstitutionsansatz Oxyhämocyanin nachgewiesen werden, während

sich in allen anderen vermutlich die Met-Form gebildet hatte (Didier, 2009). Weiterführende Experimente in Form von Sauerstoffbindungsmessungen sind notwendig, um die Eignung dieser Methode zum Erhalt funktioneller, rekombinanter Hämocyanine eindeutig zu belegen. Doch implizieren die mit Hc4 erhaltenen Ergebnisse zumindest, dass auch dieses bakterielle Expressionssystem eine Möglichkeit bietet, durch die nachfolgende *in vitro*-Rekonstitution biologisch funktionsfähige Typ3-Kupferproteine der Hämocyanin-Superfamilie zu erhalten.

E. Zusammenfassung

Hämoglobine und Hämocyanine erfüllen in vielen Arthropoden eine Funktion im Transport und in der Speicherung von Sauerstoff. Hämoglobine gehören zu der Klasse der Häm-Proteine, die sich alle durch den Besitz eines metallhaltigen Porphyrinkomplexes auszeichnen. Die reversible Bindung von Sauerstoff wird durch das zentral im Häm vorliegende, zweiwertige Eisenion ermöglicht. Im Gegensatz dazu binden Arthropoden-Hämocyanine mit Hilfe zweier Kupferionen Sauerstoff. Sie bilden stets Hexamere bzw. Multihexamere aus sechs ähnlichen oder identischen Untereinheiten, wobei jede dieser ca. 75 kDa Untereinheiten ein Kupferzentrum besitzt. Die Hämocyanine der Arthropoden werden mit vier hämocyanin-ähnlichen Proteinklassen bestehend aus Enzymen (Phenoloxidasen), Speicherproteinen (Pseudohämocyanine und Hexamerine) sowie bestimmten Rezeptoren (Hexamerinrezeptoren) zu der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Identifizierung und Charakterisierung dieser zwei respiratorischen Proteine in ausgewählten Krebstieren.

Mit dem kiemenspezifischen Hämoglobin (CmaHb) der Strandkrabbe *Carcinus maenas* (Decapoda, Malacostraca) wurde erstmals ein intrazelluläres Globin in den Crustacea nachgewiesen. CmaHb weist eine Membranlokalisation auf, die bislang nur im Falle einiger bakterieller Globine beschrieben wurde. CmaHb ist dabei das erste bekannte Globin, bei dem die Interaktion mit der Membran über eine N-Myristoylierung vermittelt wird. Sequenzanalysen wiesen darauf hin, dass neben CmaHb auch Globinsequenzen der Chelicerata sowie zumindest zwei Globine der Insecta ein N-terminales Motiv für eine N-Myristoylierung besitzen. Phylogenetische Analysen lassen vermuten, dass eine intrazelluläre, membrangebundene Lokalisation die ursprüngliche Form der Arthropoden-Globine darstellt. Aus diesen sind offensichtlich die intrazellulären, frei im Cytoplasma vorliegenden Globine der Insecta sowie die extrazellulären Globine der Insecta und Branchiopoda (Crustacea) hervorgegangen. Folgende Studien sollten sich auf die Charakterisierung möglicher Funktionen von myristoylierten Globinen konzentrieren. Hypothesen zur Funktion des CmaHb umfassen den Schutz der Kiemenmembran vor ROS oder eine Rolle in einem noch unbekannten Signaltransduktionsprozess. Eine respiratorische Funktion ist dagegen aufgrund einer hohen Autoxidationsrate des CmaHb unwahrscheinlich.

Ferner wurde am Versuchstier *Speleonectes tulumensis* (Remipedia) zum ersten Mal eindeutig die Expression eines respiratorischen, extrazellulären Hämocyanins außerhalb der Malacostraca belegt. Die drei Hämocyaninuntereinheiten gruppieren in allen phylogenetischen Analysen mit den Hämocyaninen der Insekten. Auffällig ist dabei, dass dieser

Krebs beide Untereinheitstypen besitzt, die in Insekten vorkommen. Die erhaltenen Resultate weisen somit auf ein mögliches Schwestergruppenverhältnis der Remipedia und Insecta sowie folglich auf eine Paraphylie der Crustacea hin. Jedoch sind weitere Analysen notwendig, um die Stellung der Remipedia sowie ihre Verwandtschaft zu den Hexapoda zu untersuchen.

Im Rahmen eines dritten Projektes wurden erstmalig rekombinante Expressionssysteme für ausgewählte Mitglieder der Hämocyanin-Superfamilie der Arthropoden etabliert. Am Beispiel der Prophenoloxidase 3 (PPO3) aus *D. melanogaster* gelang es, einen kupferhaltigen Vertreter in biologisch aktiver Form in Insektenzellen zu exprimieren. Parallel durchgeführte Arbeiten mit heterologen, bakteriellen Expressionsystemen zeigten, dass sich auch diese prinzipiell für die rekombinante Expression der Proteine dieser Superfamilie eignen. So gelang am Beispiel des Hexamerins LSP2 von *D. melanogaster* die Expression eines löslichen, kupferlosen Vertreters in *E. coli*. Nach Aufreinigung der rekombinanten LSP2-Untereinheiten konnte die Quartärstruktur des Proteins erfolgreich rekonstituiert werden. Bei der rekombinanten Expression der Kupferproteine in *E. coli* wurden ebenfalls gravierende Fortschritte erzielt, da erstmals die rekombinante Herstellung einer Phenoloxidase und eines Hämocyanins als lösliches Apoprotein in Bakterien gelang. Mit der in dieser Arbeit erreichten rekombinanten Expression einer funktionellen Phenoloxidase und eines Hexamerins stehen somit bereits zwei Vertreter der Arthropoden-Hämocyanin-Superfamilie in ausreichender Menge zur Verfügung, die für bioanalytische Studien sowie für Struktur-Funktionsanalysen eingesetzt werden können.

F. Literaturverzeichnis

Abdulaev, N.G., Ngo, T., Chen, R., Lu, Z., und Ridge, K.D. (2000). Functionally discrete mimics of light-activated rhodopsin identified through expression of soluble cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 275, 39354-39363

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

Alayash, A.I. (1999). Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants? *Nature Biotechnol.* 17, 545-549

Alayash, A.I., Brockner Ryan, B.A., Eich, R.F., Olson, J.S., und Cashon, R.E. (1999). Reactions of sperm whale myoglobin with hydrogen peroxide. Effects of distal pocket mutations on the formation and stability of the ferryl intermediate. *J. Biol. Chem.* 274, 2029-2037

Altschul, S.F., Madden, T.F., Schäffer, A.A., Zhang, J., Miller,W., und Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST und PSI-BLAST: a new generation of protein databse search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402

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

Andersson, K., Sun, S.-C., Boman, H.G., und Steiner, H. (1989). Purification of the phenoloxidase from *Hyalophora cecropia* and four proteins involved in its activation. *Insect Biochem.* 19, 629-637

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* haemocyanin. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 15, 2297-2303

Angelichio, M.L., Beck, J.A., Johansen, H., und Ivey-Hoyle, M. (1991). Comparison of several promotors and polyadenylation signals for use in heterologous gene expression in cultured *Drosophila* cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 5037-5043

Arcuri, H.A., Apponi, L.H., Valentini, S.R., Durigon, E.L., de Azevedo Jr., W.F.,Fossey, M.A., Rahal, P., und de Souza, F.P. (2008). Expression and purification of human syncytial virus recombinant fusion protein. *Protein Expr. Purif.* 62, 146-152

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E., und Dizaroglu, M. (1991). Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 273, 601-604

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

Asada, N., Fukumitsu, T., Fujimoto, K., und Masuda, K.-I. (1993). Activation of prophenoloxidase with 2-Propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 515-520

Asada, N., und Sezaki, H. (1999). Properties of phenoloxidases generated from prophenoloxidase with 2-propanol and the natural activator in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 37, 149-158

Asada, N., Yokoyama, G., Kawamoto, N., Norioka, N., und Hatta, T. (2003). Prophenol oxidase A_3 in *Drosophila melanogaster*: activation and the PCR-based cDNA sequence. *Biochem. Genet.* 41, 151-163

Asano, T., und Takebuchi, K. (2009). Identification of the gene encoding pro-phenoloxidase A_3 in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 18, 223-232

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

Aso, Y., Kramer, K.J., Hopkins, T.L., und Lookhart, G.L. (1985). Characterization of haemolymph protyrosinase and a cuticular activator from *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem.* 15, 9-17

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

Aspán, A., und Söderhall, K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and ist activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem.* 21, 363-373

Azam, A., und Daniel, E. (1992). Structure of extracellular hemoglobin from the brine shrimp Artemia salina. *Comp. Biochem. Physiol. B* 101, 185-188

Ballatori, N. (1994). Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv. Pharmacol.* 27, 271-298

Banci, L., Bertini, I., Cramaro, F., Del Conte, R., und Viezzoli, M.S. (2003). Solution of Apo Cu,Zn superoxide dismutase: role of metal ions in protein folding. *Biochemistry* 42, 9543-9553

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

Becker, C., Kruse, M.N., Slotty, K.A., Köhler, D., Harris, J.R., Rösmann, S., Sterchi, E.E., und Stöcker, W. (2003). Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *J. Biol. Chem.* 384, 825-831

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

Beltramini, M., und Lerch, K. (1982). Copper transfer between *Neurospora* copper metallothionein and type 3 copper apoproteins. *FEBS Lett.* 142, 219-222

Beltramini, M., und Lerch, K. (1983). The reconstitution reaction of *Neurospora* apotyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 313-319

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., und Stryer, L. (2003). Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Berger, B., Dallinger, R., Gehrig, P., und Hunziker, P.E. (1997). Primary structure of a copper-binding metallothionein from mantle tissue of the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. *Biochem J.* 328, 219-224

Bergstrom, G. (1977). Partial characterization of haemoglobin of the bug, *Buenoa confusa*. *Insect Biochem.* 7, 313-316

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

Bernan, V., Filpula, D., Herber, W., Bibb, M., und Katz, E. (1985). The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. *Gene* 37, 101-110

Boisguérin, V. (2006). Recombinant expression of molluscan hemocyanin (KLH) substructures in a prokaryotic system: *E. coli*. Dissertation. Universität Mainz

Bologna, G., Yvon, C., Duvaud, S., und Veuthey, A.-L. (2004). N-terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics* 4, 1626-1632

Bolognesi, M., Bordo, D., Rizzi, M., Tarricone, C., und Ascenzi, P. (1997). Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68, 29-68

Bonamore, A., Farina, A., Gattoni, M., Schininá, M.E., bellelli, A., und Boffi, A. (2003). Interaction with membrane lipids and heme ligand binding properties of *Escherichia coli* flavohemoglobin. *Biochemistry* 42, 5792-5801

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

Braun, R.P., und Wyatt, G.R. (1996). Sequence of the hexameric juvenile hormonebinding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. *J. Biol. Chem.* 271, 31756-31762

Bridges, C. (2001). Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. *J. Exp. Biol.* 204, 1021-1032

Brusca, R.C., und Brusca, G.J. (2003). Invertebrates. Sinauer Associates, Sunderland Mass.

Brouwer, M., und Brouwer-Hoexum, T. (1992). Glutathione-mediated transfer of copper(I) into american lobster apohemocyanin. *Biochemistry* 31, 4096-4102

Brouwer, M.; Syring, R.; und Hoexum Brouwer, 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

Bubacco, L., Vijgenboom, E., Gobin, C., Tepper, A.W.J.W., Salgado, J., und Canters, G.W. (2000). Kinetic and paramagnetic NMR investigations of the inhibitor of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *J. Mol. Catal. B-Enzym* 8, 27-35

Bunch, T.A., Grinblat, Y., und Goldstein, L.S. (1988). Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1043-1061

Burks, C.S., und Fuchs, M.S. (1995). Partial purification of plasma phenoloxidase of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 110, 641-647

Burmester, T. (1999a). Identification, molecular cloning and phylogenetic analysis of a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*. *J. Biol. Chem.* 274, 13217-13222

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

Burmester, T. (2000). Hämocyanine und Globine - Proteinfamilien im evolutiven Wandel. Habilitationsschrift

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., Antoniewski, C., und Lepesant, J.-A. (1999). Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* 262, 49-55

Burmester, T. und Hankeln, T. (1999). A globin gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1809-1811

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

Burmester, T., Klawitter, S. and Hankeln, T. (2007). Characterization of two globin genes from the Malaria mosquito *Anopheles gambiae*: Divergent origin of nematoceran hemoglobins *Insect Mol. Biol.* 16, 133-142

Burmester, T., Kölling, C., Schroer, B., und Scheller, K. (1998a). Complete sequence, expression, and evolution of the hexamerin LSP-2 of *Calliphora vicina. Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 11-22

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

Burmester, T. und Scheller, K. (1995a). Ecdysterone-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*: involvement and developmental regulation of arylphorin binding proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 799-806

Burmester, T., und Scheller, K. (1995b). Complete cDNA-sequence of the receptor responsible for arylphorin uptake by the larval fat body of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 981-989

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. (1999). Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. *Naturwissenschaften* 84, 468-474

Burmester, T., Storf, J., Hasenjäger, A., Klawitter, S., und Hankeln, T. (2006). The hemoglobin genes of *Drosophila*. *FEBS J.* 273, 468-480

Cao, S., Zhang, Y., Liu, F., Wang, Q., Zhang, Q., Liu, Q., Li, C., Liang, M., und Li, D. (2009). Secretory expression and purification of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit and ist applications on intranasal vaccination of hantavirus. *Mol. Biotechnol.* 41, 91-98

Carapelli, A., Lio, P., Nardi, F., van der Wath, E., und Frati, F. (2007). Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC Evol. Biol.* 7, Suppl 2, S8

Carothers, A.M., Urlaub, G., Mucha, J., Grunberger, D., und Chasin, L.A. (1989). Point mutation analysis of total RNA, pcr amplification of cDNA, and Taq-sequencing by a novel method. *Biotechniques* 7, 494-499

Carr, S.A., Biemann, K., Shoji, S., Parmelee, D.C., und Titani, K. (1982). N-Tetradecanoyl is the NH_2-terminal blocking group of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6128-6131

Cashon, R.E., und Alayash, A.I. (1995). Reaction of human haemoglobin HbA_0 and two cross-linked derivatives with hydrogen peroxide: differential behaviour of the ferryl intermediate. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 461-469

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

Chan, W.K., Chu, R., Jain, S., Reddy, J.K., und Bradfield, C.A. (1994). Baculovirus expression of the Ah receptor and Ah receptor nuclear translocater. Evidence for additional dioxin responsive element-binding species and factors required for signalling. *J. Biol. Chem.* 269, 26464-26471

Chase, M.R., Raina, K., Bruno, J., und Sugumaran, M. (2000). Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 953-967

Chase, M.R., und Sugumaran, M. (2001). Genomic and cDNA sequence of prophenoloxidases from *Drosophila melanogaster*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 484, 349-362

Chen, L.Y., Chen, M.Y., Leu, W.M., Tsai, T.Y., und Lee, Y.H. (1993). Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase trans-activator MelC1. MelC1 is likely a chaperone for apotyrosinase. *J. Biol. Chem.* 268, 18710-18716

Chen, L.Y., Leu, W.M., Wang, K.T., und Lee, Y.H. (1992). Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MelC1. *J. Biol. Chem.* 267, 20100-20107

Chen, P., Munoz, A., Nettesheim, D., Shaw, F.S., und Petering, D.H. (1996). Stoichiometry and cluster specificity of copper binding to metallothionein: homogeneous metal clusters. *Biochem. J.* 317, 395-402

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., und Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299

Chomczynski, P., und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlororform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159

Chosa, N., Fukumitsu, T., Fujimoto, K., und Ohnishi, E. (1997). Activation of prophenoloxidase A_1 by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 61-68

Ciccarone, V.C., Polayes, D., und Luckow, V.A. (1997). Generation of recombinant baculovirus DNA in *E. coli* using baculovirus shuttle vector. Humana Press. Inc.

Ciriolo, M.R., Desideri, A., Paci, M., und Rotilio, G. (1990). Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I)-glutathione complex. *J. Biol. Chem.* 265, 11030-11034

Claus, H., und Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 3-14

Cooksey, D.A., (1993). Copper uptake and resistence in bacteria. *Mol. Microbiol.* 7, 1-5

Cooksey, D.A., (1994). Molecular mechanism of copper resistence and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 381-386

Crawford, P.A., Sharma, N., Chandrasekar, S., Sigdel, T., Walsh, T.R., Spencer, J., und Crowder, M.W. (2004). Over-expression, purification, and characterization of metallo-beta-lactamase ImiS from *Aeromonas veronii* bv. Sobria. *Protein Expr. Purif.* 36, 272-279

Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E., und Hendrickson, W.A. (1998). Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.* 278, 855-870

Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., und Gitlin, J.D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272, 23469-23472

da Costa Ferreira, A.M., Ciriolo, M.R., Marcocci, L., und Rotilio, G. (1993). Copper(I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. *Biochem. J.* 292, 673-676

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

Davis, T.R., Schuler, M.L., Grandos, R.R., und Wood, H.A. (1993a). Comparison of oligosaccharide processing among various insect cell lines expressing a secreted glycoprotein. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. A* 29, 842-846

Davis, T.R., Wickham, T.J., McKenna, K.A., Granados, R.R., Shuler, M.L., und Wood, H.A. (1993b). Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. A* 29, 388-390

Decker, H. (2005). Copper proteins with dinuclear active sites. *Encyclopedia of inorganic chemistry* 2nd Edition, 1159-1173

Decker, H., und Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins.

Decker, H., Markl, J., Loewe, R., und Linzen, B. (1979). Hemocyanins in spiders. VIII. Oxygen affinity of the individual subunits isolated from *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe Seylors Z. Physiol. Chem.* 360, 1505-1507

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

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., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, F., und Tuczek, F. (2007). Similar activation process and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* 398, 183-191

Decker, H., und Sterner, R. (1990). Nested allostery of arthropodan hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*). The role of protons. *J. Mol. Biol.* 211, 281-293

Decker, H., und Terwilliger, N. (2000). Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.* 203, 1777-1782

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

de Jonge, H.R., Hogema, B., und Tilly, B.C. (2000). Protein N-Myristoylation: critical role in apoptosis and salt tolerance. *Sci. STKE* 63, 1-4

Depledge, M. N., und Bjerregaard, P. (1989). Haemolymph protein composition and copper levels in the decapod crustaceans. *Helgoländer Meeresunters*. 43, 207-223

de Sanctis, D., Ascenzi, P., Bocedi, A., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., und Bolognesi, M. (2006). Cyanide binding and heme cavity conformational transitions in *Drosophila melanogaster* hexacoordinate hemoglobin. *Biochemistry* 45, 10054-10061

de Sanctis, D., Dewilde, S., Vonrhein, C., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., Ponassi, M., Nardini, M., und Bolognesi, M. (2005). Bishistidyl heme hexa-coordination, a key structural property in *Drosophila melanogaster* haemoglobin. *J. Biol. Chem.* 280, 27222-27229

Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., und Bachere, E. (2001). *J. Biol. Chem.* 276, 47070-47077

Deutscher, M.P. (1990). Guide to protein purification. *Meth. Enzymol.* 182, 1-894

Dewilde, S., Blaxter, M., Van Hauwaert, M.L., Van Houte, K., Pesce, A., Griffon, N., Kiger, L., Marden, M.C., Vermeire, S., Vanfleteren, J., Esmans, E., und Moens, L. (1998). Structural, functional, and genetic characterization of *Gastrophilus* hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 273, 32467-32474

Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzal, V., Aerts, T., Marden, M.C., Caubergs, R., und Moens, L. (2001). Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J. Biol. Chem.* 276, 38949-38955

Dickerson, A.E., und Geis, I. (1983). Hemoglobin: structure, function, evolution and pathology. Benjamin/Cummings Publ. Co., Redwood City, California

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

di Giulio, A., und Bonamore, A. (2008). Globin interactions with lipids and membranes. *Meth. Enzymol.* 436, 239-253

Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M., Edgecombe, G.D., Sorensen, M.V., Haddock, S.H.D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R.M., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., und Giribet, G. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745-749

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

Dürr, R. (2008). Rekombinantes Hämocyanin und Hämoglobin aus Schnecken: *Keyhole limpet*-Hämocyanin (KLH) und *Biomphalaria glabrata*-Hämoglobin (BgHb). Dissertation. Universität Mainz.

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

Ellerton, H., Ellerton, N., und Robinson, H. (1983). Hemocyanin - a current perspective. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 41, 143-248

Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., und Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2, 953-971

Erker, W., Beister, U., und Decker, H. (2005). Cooperative transition in the conformation of 24-mer Tarantula hemocyanin upon oxygen binding. *J. Biol. Chem.* 280, 12391-12396

Espin, J.C., van Leeuwen, J., und Wichers, H. J. (1999). Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3509-3517

Espin, J. C., und Wichers, H.J. (1999a). Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3503-3508

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

Fanenbruck, M., und Harzsch, S (2005). A brain atlas of *Godzilliognomus frondosus* Yager, 1989 (Remipedia, Godzilliidae) and comparison with the brain of *Speleonectes tulumensis* Yager, 1987 (Remipedia, Speleonectidae): implications for arthropod relationships. *Arthropod Struc. Dev.* 34, 343-378

Fanenbruck, M., Harzsch, S., und Waegele, J.W. (2004). The brain of the Remipedia (Crustacea) and an alternative hypothesis on their phylogenetic relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3868-3873

Farazi, T.A, Waksman, G, Gordon, J.I. (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem.* 276, 39501-39504

Fedorcsak, I., und Ehrenberg, L. (1966). Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* **20**, 107-112

Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A.T., und Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci *Notch* and *Delta*, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523-534

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791

Felsenstein, J. (2004). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6b. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Field, L.S., Luk, E., und Culotta, V.C. (2002). Copper chaperones: personal escorts for metal ions. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34, 373-379

Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Phys. Rev.* 79, 425-449

Floyd, R.A. (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4, 2587-2597

Fox, H. M. (1957). Haemoglobins in crustacea. *Nature Lond.* 179, 148-149

Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., und Preisach, J. (1989). The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605

Freitas, T.A.K., Hou, S., und Alam, M. (2003). The diversity of globin-coupled sensors. *FEBS Lett.* 552, 99-104

Friedrich, M., und Tautz, D. (1995). Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature* 376, 165-167

Fronticelli, C., O'Donnell, J.K., und Brinigar, W.S. (1991). Recombinant human hemoglobin: expression and refolding of β-globin from *Escherichia coli*. *J. Prot. Chem.* 10, 1991

Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., Schmidt, M., Hamdane, D., Marden, M.C., Hankeln, T., und 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., Masuda, K.-I., Asada, N., und Ohnishi, E. (1993). Purification and characterization of prophenoloxidases from pupae of *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem.* 113, 285-291

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, 7796-7773

Fujita, Y., Uraga, Y., und Ichishima, E. (1995). Molecular cloning of a nucleotide sequence of the protyrosinase gene, *melO*, from *Aspergillus oryzae* and expression of the gene in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1261, 151-154

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

Garcia-Machado, E., Pempera, M., Dennebouy, N., Oliva-Suarez, M., Mounolou, J.C., und Monnerot, M. (1999). Mitochondrial genes collectively suggest the paraphyly of Crustacea with respect to Insecta. *J. Mol. Evol.* 49, 142-149

Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved versions of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. EVol.* 14, 689-695

Gaykema, W.P.J., Hol, W.G.J., Vereijken, J.M., Soeter, N.M., Bak, H.J., und Beintema, J.J. (1984). 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. *Nature* 309, 23-29

Gerdemann, C.; Eicken, C., und Krebs, B. (2002). The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.* 35, 183-191

Gillespie, J.P., Kanost, M.R., und Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 611-643

Giribet, G., Edgecombe, G.D., und Wheeler, W.C. (2001). Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* 413, 157-161

Giribet, G., und Ribera, C. (2000). A review of arthropod phylogeny: New data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics* 16, 204–231

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

Gleixner, E., Abriss, D., Adryan, B., Kraemer, M., Gerlach, F., Schuh, R., Burmester, T., und Hankeln, T. (2008). Oxygen-induced changes in hemoglobin expression in *Drosophila*. *FEBS J.* 275, 5108-5116

Goodman, S.H., und Carvey, M.J. (1990). Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.* 260, 495-505

Gotoh, T., Miyazaki, Y., Kikuchi, K.-I., Bentley, und W.E. (2001). Investigation of sequential behaviour of carboxyl protease and cysteine protease activities in virus-infected Sf9 insect cell culture by inhibition assay. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 742-749

Gotoh, T., Miyazaki, Y., Sato, W., Kikuchi, K.-I., und Bentley, W.E. (2001). Proteolytic activity and recombinant protein production in virus-infected Sf9 insect cell cultures supplemented with carboxyl and cysteine protease inhibitors. *J. Biosci. Bio.* 92, 248-255

Gupta, R., Jung, E., und Brunak, S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)

Hagermann, L. (1983). Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. *Mar. Biol.* 77, 11-19

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

Hall, M., Scott, T., Sugumaran, M., Söderhall, K., und Law, J.H. (1995). Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, sibstrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7764-7768

Halliwell, H.B., und Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzymol.* 186, 1-85

Hamer, D.H., Thiele, D.J., und Leumontt, J.E. (1985). Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228, 685-690

Hankeln, T., Jaenicke, V., Kigerm L., Dewilde, S., Ungerechts, G., Schmidt, M., Urban, J., Marden, M.C., Moens, L., und Burmester, T. (2002). Characterization of *Drosophila* hemoglobin: evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects. *J. Biol. Chem.* 277, 29012-29017

Hankeln, T., Klawitter, S., Krämer, M., und Burmester, T. (2006). Molecular characterization of hemoglobin from the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 52, 701-710

Hara, T., Miyoshi, T., und Tsukamoto, T. (1993). Comparative studies on larval and pupal phenoloxidase of the housefly, *Musca domestica* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 287-292

Hardison, R.C. (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protest, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5675-5679

Hardison, R.C. (1998). Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.* 201, 1099-1117

Harris, E.D., und Perceival, S.S. (1991). A role for ascorbic acid in copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1193-1197

Harrison, M.D., Jones, C.E., und Dameron, C.T. (1999). Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4, 145-153

Hassanin, A. (2006). Phylogeny of Arthropoda inferred from mitochondrial sequences: strategies for limiting the misleading effects of multiple changes in pattern and rates of substitution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 100-116

Haunerland, N.H. (1996). Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 755-765

Hayashi, A., Suzuki, T., und Shin, M. (1973). An enzymatic reduction system for metmyoglobin and methemoglobin, and its application to functional studies of oxygen carriers. *Biochem. Biophys. Acta* 310, 309-316

Hazes, B.; Magnus, K.A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K.H., und Hol, W.G. (1993). Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci.* 2, 597-619

He, H.-J., Yuan, Q.-S., Yang, G.-Z., und Wu, X.-F. (2002). High-level expression of human extracellular superoxide dismutase in *Escherichia coli* and insect cells. *Protein Expr. Purif.* 24, 13-17

Hefenbrock, C. (2008). Rekombinante Expression von Arthropoden-Hämocyaninen. Diplomarbeit. Universität Hamburg

Heitz, F.N., Nay, C., und Guenet, C. (1997). Expression of functional muscarinic M2 receptors in different insect cell lines. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 17, 305-31

Hengsakul, M., und Cass, A.E.G. (1997). Alkaline phosphatise-Strep Tag fusion protein binding to streptavidin: resonant mirror studies. *J. Mol. Biol.* 266, 621-632

Hennig, W. (1994). Taschenbuch der speziellen Zoologie: Wirbellose Teil II. Gliedertiere.UTB, Gustav Fischer Verlag, Jena

Herberts, C., und de Frescheville, J. (1981). Occurrence of hemocyanin in the rizocephalan crsutacea *Sacculina carcini*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 70, 657-659

Herlinger, E., Jameson, R., und Linert, W. (1995). Spontanous autooxidation of dopamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2, 259-263

Heyneman, R.A. (1965). Final purification of a latent phenolase with mono- and diphenoloxidase activity from *Tenebrio molitor*. *Biochem. Biophs. Res. Commun.* 21, 162-169

Hibino, T., Hyun Lee, B., und Takabe, T. (1994). Role of transit peptide sequence of plastocyanin for ist expression, processing, and copper-binding activity in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 116, 826-832

Holm, L., und Sander, C. (1993). Structural alignments of globins, phycocyanins and colicin A. *FEBS Lett.* 315, 301-306

Hom, L.G., Ohkawa, T., Trudeau, D., und Volkman, L.E. (2002). *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus ProV-CATH is activated during infected cell death. *Virology* 296, 212-218

Hörnemann, J. (2005). Untersuchungen zur rekombinanten Expression und Faltung pflanzlicher Tyrosinasen. Dissertation. Universität Mainz.

Horton, P., und Nakai, K. (1996). A probabilistic classification system for predicting the cellular localization sites of proteins. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 4, 109-115

Horton, P., und Nakai, K. (1996). Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 5, 147-152

Hou, S., Freitas, T., Larsen, R.W., Piatibratov, M., Sivozhelezov, V., Yamamoto, A., Meleshkevitch, E.A., Zimmer, M., Ordal, G.W., und Alam, M. (2001). Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in archaea and bacteria. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 98, 9353-9358

Hourdez, S., Lamontagne, J., Peterson, P., Weber, R.E., und Fisher, C.E. (2000). Hemoglobin from a deep-sea hyrothermal-vent copepod. *Biol. Bull.* 199, 95-99

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

Huffman, D.L., und O'Halloran, V.O. (2001). Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 677-701

Hwang, U.W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C.J., und Kim, W. (2001). Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* 413, 154-157

Ichishima, E., Maeba, H., Amikura, T., und Sakata, H. (1984). Multiple forms of protyrosinase from *Aspergillus oryzae* and their mode of activation at pH 3.0. *Biochim. Biophys. Acta* 786, 25-31

Ilan, E., und Daniel, E. (1979). Structural diversity of arthropod extracellular haemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 63, 303-308

Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W., und Zhu, J.K. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant cell* 12, 1667-1678

Ito, T. (1989). Origin of the basis in copepod limbs, with reference to remipedian and cephalocarid limbs. *J. Crust. Biol.* 9, 85-103

Ito, M., und Inouye, K. (2005). Catalytic properties of an organic solvent-resistent tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21 and its high-level production in *E. coli*. *J. Biochem*. 138, 355-362

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

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

Jaenicke, E., und Decker H. (2004). Functional changes in the family of Type 3 copper proteins during evolution. *Chembiochem.* 5,163-169

Jaenicke, E., Föll, R., und Decker, H. (1999). Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone. *J. Biol. Chem.* 274, 34267-34271

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

Jensen, P.Y., Bonander, N., Horn, N., Tümer, Z., und Farver, O. (1999b). Expression, purification and copper-binding studies of the first metal-binding domain of Menkes protein. *Eur. J. Biochem.* 264, 890-896

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

Johansen, H., van der Straten, A., Sweet, R., Otto, E., Maroni, G., und Rosenberg, M. (1989). Regulated Expression at High Copy Number Allows Production of a Growth Inhibitory Oncogene Product in *Drosophila* Schneider Cells. *Genes Dev.* 3, 882-889

Kadonaga, J.T., Gautier, A.E., Straus, D.R., Charles, A.D:, Edge, M.D., und Knowles, J.R. (1984). The role of the β-lactamase signal sequence in the secretion of proteins by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259, 2149-2154

Kästner, A., und Gruner, H.-E. (1993). Lehrbuch der speziellen Zoologie, Band 1, Teil 4, Arthropoda. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York

Kaim, W., und Rall, J. (1996). Kupfer - ein „modernes“ Bioelement. *Angew. Chem.* 108, 47-64

Kang, C.S., Son, S.-Y., und Bang, I.S. (2008). Biologically active and C-amidated hinnavinII-38-asn produced from a trx fusion construct in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* 46, 656-661

Katagiri, Y., und Ingham, K.C. (2002). Enhanced production of green fluorescent fusion proteins in a baculovirus expression system by addition of secretion signal. *Biotechniques* 33, 24-26

Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., und Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 33, 511-518

Katz, E., Thompson, C.J., und Hopwood, D.A. (1983). Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2703-2714

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. Sci. Acad. USA* 92, 7774-7778

Kawamato, S., Nakamura, M., und Yashima, S. (1993). Cloning, sequence and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces lavendulae* MA406 A-1. *J. Ferm. Bioeng.* 76, 345-355

Kehrer, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 21-48

Keilin, D., und Wang, Y.L. (1946). Haemoglobin of *Gasterophilus* larvae. Purification and properties. *Biochem. J.* 40, 855-866

Kelly, E.J., Palmiter, R.D. (1996). A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat. Genet.* 13, 219-222

Kendrews, J.C. (1963). Myoglobin and the structure of proteins: crystallographic analysis and data-processing techniques reveal the molecular architecture. *Science* 139, 1259-1266

Kertesz, D., Rotilio, G., Brunori, M., Zito, R., und Antonini, E. (1972). Kinetics of reconstitution of polyphenoloxidase from apoenzyme and copper. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1208-1215

Khyse-Anderson, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209

Klabunde, T., Eicken, C., Saccbettini, J.C., und Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* 5, 1084-1090

Kohashi, P.Y., Kumagai, T., Matoba, Y., Yamamoto, A., Maruyama, M., und Sugiyama, M. (2004). An efficient method for the overexpression and purification of active tyrosinase from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Protein Expr. Purif.* 34, 202-207

Köhler, D., Kruse, M., Stöcker, W., und Sterchi, E.E. (2000). Heterologously overexpressed, affinity-purified human meprin alpha is functionally active and cleaves components of the basement membrane in vitro. *FEBS Lett.* 465, 2-7

Koenemann, S., Olesen, J., Alwes, F., Iliffe, T.M., Hoenemann, M., Ungerer, P., Wolff, C. und Scholtz, G. (2009). The post-embryonic development of Remipedia (Crustacea) - additional results and new insights. *Dev. Genes Evol.*, in press

Koenemann, S., Schram, F.R., Bloechl, A., Iliffe, T.M., Hoenemann, M., und Held, C. (2007a). Post-embryonic development of remipede crustaceans. *Evol. Dev.* 9, 117-121

Koenemann, S., Schram, F.R., Hönemann, M., und Iliffe, T.M. (2007b). Phylogenetic analysis of Remipedia (Crustacea). *Org. Divers. Evol.* 7, 33-51

Koenemann, S., Schram, F.R., und Iliffe, T.M. (2006). Trunk segmentation in Remipedia. *Crustaceana* 79, 607-631

Kong, K.H., Park, S.Y., Hong, M.P., und Cho, S.H. (2000). Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 125, 563-569

Konings, W.M., Van Driel, R., und Gruber, M. (1969). Structure and properties of hemocyanins. V. Binding of oxygen and copper in *Helix pomatia* hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 194, 55-66

Kopáček, P., Weise, C., und Götz, P. (1995). The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 25, 1081-1091

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

Kozak, M. (1990). An Analysis of Vertebrate mRNA Sequence: Intimations of Translational Control. *J. Cell Biol.* 115, 887-903

Kozak, M. (1991). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8301-8305

Krantz, D.E., und Zipursky, S.L. (1990). *Drosophila* chaoptin, a member of the leucine-rich repeat family, is a photoreceptor cell-specific adhesion molecule. *EMBO J.*, 1969-1977

Krupenko, S.A., Horstman, D.A., Wagner, C., und Cook, R.J. (1995). Baculovirus expression and purification of rat 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *Protein Expr. Purif.* 6, 457-464

Kruse, M.-N., Becker, C., Lottaz, D., Köhler, D., Yiallouros, I., Krell, H.-W., Sterchi, E.E., und Stöcker, W. (2004). Human meprin a and b homo-oligomers: Cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease Inhibitors. *Biochem. J.* 378, 383-389

Kurtz, D.M. (1999). Oxygen-carrying proteins: three solutions to a common problem. *Essays Biochem.* 34, 85-100

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

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 characterization and evolution of the hemocyanin from the european spiny lobster, *Palinurus elephas*. *J. Comp. Physiol. B* 173, 319-325

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

Kyte, J., und Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132

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

Lai-Fook, J. (1966). The repair of wounds in the integument of insects. *J. Insect Physiol.* 12, 195-226

Lamb, A.L., Torres, A.S., O'Halloran, T.V., und Rosenzweig, A.C. (2001). Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat. Struct. Biol.* 8, 751-755

Lamb, A.L., Wernimont, A.K., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V., und Rosenzweig, A.C. (1999). Crystal structure of the copper chaperone ffor superoxide dismutase. *Nat. Struct. Biol.* 6, 724-729

Lamkemeyer, T.; Zeis, B., Decker, H., Jaenicke, E., Waschbüsch, D., Gebauer, W., Markl, J., Meissner, U., Rousselot, M., Zal, F., Nicholson, G.J., und Paul, R.J. (2006). Molecular mass of macromolecules and subunits and the quaternary structure of hemoglobin from the microcrustacean *Daphnia magna*. *FEBS J.* 273, 3393-3410

LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., und McCoy, J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology* 11, 187-193

Lavrov, D.V., Brown, W.M., und Boore, J.L. (2004). Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan)crustacean relationships. *Proc. Biol. Sci.* 271, 537-544

Lee S.Y., Lee B.L., Söderhäll K. (2003). Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 278, 7927-7933

Lee, Y.H., Chen. B.F., Wu, S.Y., Leu, W.M., Lin, J.J., Chen, C.W., und Lo, S.C. (1988). A trans-acting gene is required for the phenotypic expression of a tyrosinase gene in *Streptomyces*. *Gene* 65, 71-81

Lerch, K. (1983). *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell Biochem.* 52, 125-138

Lieb, B., Altenheim, B., Markl, J., Vincent, A., van Olden, E., van Holde, K.E., und Miller, K.I. (2001). Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4546-4551

Lieb, B., Dimitrova, K., Kang, H.S., Braun, S., Gebauer, W., Martin, A., Hanelt, B., Saenz, S.A., Adema, C.M., und Markl, J. (2006). Red blood with blue-blood ancestry: intriguing structure of a snail hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12011-12016

Lim, J.T., und Hwang, U.W. (2006). The complete mitochondrial genome of *Pollicipes mitella* (Crustacea, Maxillopoda, Cirripedia): non-monophylies of Maxillopoda and Crustacea. *Mol. Cells* 22, 314-322

Lin, S.J., Pufahl, R.A., Dancis, A., O'Halloran, T.V., und Culotta, V.V. (1997). A role for the Saccharomyces cerevisae ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* 272, 9215-9220

Ling, J., Nestor, L.P., Czernuszewicz, R.S., Spiro, T.G., Fraczkiewicz, R., Sharma, K.D., Loehr, T.M., und Sanders-Loehr, J. (1994). Common oxygen binding site in hemocyanins from arthropods and molluscs. Evidence from raman spectroscopy and normal coordinate analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7682-7691

Linzen, B., Soeter, N.M., Riggs, A.F., Schneider, H.J., Schartau, W., Moore, M.D., Behrens, P.Q., Yokota, E., Nakashima, H., Takagi, T., Nemoto, T., vereijken, J.M., Bak, H.J., Beintema, J.J., Volbeda, A., Gaykema, W.P.J., und Hol, W.G.J. (1985). The structure of arthropod hemocyanins. *Science* 229, 519-529

Lippard, S.J. (1999). Free copper ions in the cell? *Science* 284, 784-749

Liu, C., He, Y., und Chang, Z. (2004). Truncated hemoglobin O of *Mycobacterium tuberculosis*: the oligomeric state change and its interaction with membrane components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 1163-1172

Loewe, R. (1978). Hemocyanins in spiders. V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. *J. Comp. Physiol.* 128, 161-168

Lopez-Serrano, D., Sanchez-Amat, A., und Solano, F. (2002). Cloning and molecular characterization of a SDS-activated Tyrosinase from *Marinomonas mediterranea*. *Pigment Cell Res.* 15, 104-111

Lopez-Serrano, D., Solano, F., und Sanchez-Amat, A. (2004). Identification o fan operon involved in tyrosinase cativity 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*. *Microbiology* 153, 2241-2249

Lottspeich F., und Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Lu, A., Seshagiri, S., und Miller, L.K. (1996). Signal sequence and promotor effects on the efficacy of toxin-expressing baculoviruses as biopesticides. *Biol. Control* 7, 320-332

Luckow, V.A., Lee, C.S., Barry, G.F., und Olins, P.O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67, 4566-4579

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. Physiol.* 25, 137-157

Magnus, K.A., Hazes, B., Ton-That, 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 the blood. *Biol. Crust.* 5, 373-429

Mangum, C.P. (1985). Oxygen transport in invertebrates. *Am. J. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 248, 505-514

Mangum, C.P. (1992). Physiological function of hemerythrin. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 13, 173-192

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

Manning, A.M., Trotman, C.N.A., und Tate, W.P. (1990). Evolution of a polymeric globin in the brine shrimp *Artemia*. *Nature* 348, 653-656

Marie-Claire, C., Roques, B.P., und Beaumont, A. (1998). Intramolecular processing of prothermolysin. *J. Biol. Chem.* 278, 5697-5701

Markl, J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull.* 171, 90-115

Markl, J. (1996). Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine. *Chemie in unserer Zeit* 30, 6-18

Markl, J., und Decker, H. (1992). Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 13, 325-376

Markl, J., Hofer, A., Bauer, G., Markl, A., Kempter, B., Brenzinger, M., und Linzen, B. (1979). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins: II. Crustacea. *J. Comp. Physiol. B* 133, 167-175

Markl, J., und Kempter, B. (1981). Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. In: Structure, active site, and function of invertebrate oxygen binding proteins, J. Lamy and J. Lamy, eds. Marcel Dekker, New York, 125-137

Markl, J., Stumpp, S., Bosch, F.X., und Voit, R. (1990). Hemocyanin biosynthesis in a tarantula, studied by the in situ hybridization and immunocytochemistry. In: *Invertebrate dioxygen carriers.* Edited by: Preaux, G., und Lontie, R., University Press Louvain, Belgium, 497-502

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. *Linzen B. (ed). Invertebrate oxygen carriers. Springer, Berlin Heidelberg New York, 281-292*

Maroni, G., Otto, E., und Lastowski-Perry, D. (1986). Molecular and cytogenetic characterization of a metallothionein gene of *Drosophila*. *Genetics* 112, 493-504

Martin, A.G., Depoix, F., Stohr, M., Meissner, U., Hagner-Holler, S., Hammouti, K., Burmester, T., Heyd, J., Wriggers, W., und Markl, J. (2007). *Limulus polyphemus* hemocyanin: sequence analysis, molecular modelling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers. *J. Mol. Biol.* 366, 1332-1350

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

Mason, H.S. (1948). The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 172, 83-99

Matthews, P.G.D., und Seymour, R.S. (2006). Diving insects boost their buoyancy bubbles. *Nature* 441, 171

Matthews, P.G.D., und Seymour, R.S. (2008). Haemoglobin as a buoyancy regulator and oxygen supply in the backswimmer (Notonectidae, *Anisops*). *J. Exp. Biol.* 211, 3790-3799

Mehra, R.K., und Mulchandani, P. (1995). Glutathione-mediated transfer of Cu(I) into phytochelatins. *Biochem. J.* 307, 697-705

Menze, M.A., Hellmann, N., Decker, H., und Grieshaber, M.K. (2005). Allosteric models for multimeric proteins: oxygen-linked effector binding in hemocyanin. *Biochemistry* 44, 10328-10338

Milani, M., Pesce, A., Nardini, M., Ouellet, H., Ouellet, Y., Dewilde, S., Bocedi, A., Ascenzi, P., Guertin, M., Moens, L., Friedman, J.M., Wittenberg, J.B., und Bolognesi, M. (2005). Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. *J. Inorg. Biochem.* 99, 97-109

Millar, N.S., Baylis, H.A., Reaper, C., Bunting, R., Mason, W.T., und Satelle, D.B. (1995). Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line. *J. Exp. Biol.* 198, 1843-1850

Millar, N.S., Buckingham, S.D., und Satelle, D.B. (1994). Stable expression of a functional homo-oligomeric *Drosophila* GABA receptor in a *Drosophila* cell line. *Proc. R. Soc. Lond. B* 258, 307-314

Miller, L.K. (1988). Baculoviruses as gene expression vectors. *Ann. Rev. Microbiol.* 42, 177-199

Moens, L., und Kondo, M. (1977). Characterization of the extracellular hemoglobins of *Artemia salina*. *Biochem. J.* 165, 111-119

Mogk, A., Mayer, M.P., und Deuerling, E. (2002). Mechanism of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *Chembiochem.* 3, 807-814

Mohandas, A.R., Dekaban, G.A., und Dales, S. (1994). Vaccinia virion surface polypeptide Ag35 expressed from a baculovirus vector is targeted to analogous poxvirus and insect virus components. *Virology* 200, 207-219

Monder, C., Williams Jr., J.N., und Waisman, H.A. (1957a). Studies on the non-enzymic conversion of dopa to melanin. I. Studies on autooxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 72, 255-270

Monder, C., Williams Jr., J.N., und Waisman, H.A. (1957b). The non-enzymic conversion of dopa to melanin. II. 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 sulphate activation of a plant polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* 265, 4982-4988

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

Mroczkowski, B.S., Huvar, A., Lernhardt, W., Misono, K., Nielson, K., und Scott, B. (1994). Secretion of thermostable DNA polymerase using a novel baculovirus vector. *J. Biol. Chem.* 269, 13522-13528

Müller, 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

Müller, G., Ruppert, S., Schmid, E., und Schütz, G. (1988). Functinal analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J.* 7, 2723-2730

Murray, D., Ben-Tal, Nir, Honig, B., und McLaughlin, S. (1997). Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* 5, 985-989

Musci, G., Di Marco, S., Bellenchi, G.C., und Calabrese, L. (1996). Reconstitution of ceruplasmin by the Cu(I)-glutathione complex. Evidence for a role of Mg^{2+} and ATP. *J. Biol. Chem.* 271, 1972-1978

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

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

Nakamura, M., Nakajima, T., Ohba, Y., Yamauchi, S., Lee, B.R., und Ichishima, E. (2000). Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 350, 537-545

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

Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr., und Deerfield, D.W. II. (1997). GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW NEWS* 4, 14

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, & von Heijne G (1997). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural Syst.* 8, 581-599

Nielson, K.B., Atkin, C.L., und Winge, D.R. (1985). Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.* 260, 5342-5350

Niiranen, L., Espelid, S., Karlsen, C.R., Mustonen, M., Paulsen, S.M., Heikinheimo, P., und Willassen, N.P. (2007). Comparative expression study to increase the solubility of cold adapted Vibrio proteins in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.* 52, 210-218

Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., und Mierendorf, R. (2001). Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations* 12, 1-3

O'Halloran, T.V., und Culotta, V.C. (2000). Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275, 25057-25060

Olianas, A., Sanna, M.T., Messana, I., Castagnola, M., Masia, D., Manconi, B., Cau, A., Giardina, B., und Pellegrini, M. (2006). The hemocyanin of the shamefaced crab *Calappa granulata*: structural-functional characterization. *J. Biochem.* 139, 957-966

Ollesch, G., Kaunzinger, A., Juchelka, D., Schubert-Zsilavec, M., und Ermler, U. (1999). Phospholipid bound to the flavohemoprotein from *Alcaligenes eutrophus*. *Eur. J. Biochem.* 262, 396-405

Osmulski, P.A., und Leyko, W. (1986). Structure, function and physiological role of *Chironomus* hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol. B* 85, 701-722

Pan, S.-Mei, Hwang, G.-B., und Liu, H.-C. (1999). Over-expression and characterization of copper/zinc-superoxide dismutase from rice in *Escherichia coli*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40, 275-281

Park, K.-Y., Kim, K.-J., Howard, A.J., Stark, B.C., und Webster, D.A. (2002). *Vitreoscilla* hemoglobin binds to subunit I of cytochrome *bo* ubiquinol oxidases. *J. Biol. Chem.* 277, 33334-33337

Park, J.Y., Lee, J., Cho, B.Y., und Chae, C.-B. (1999). Different bioactivities of human thyrotropin receptors with different signal peptides. *Mol. Cell. Endocrinol.* 147, 133-142

Pau, R.N., und Eagles, P.A.M. (1975). The isolation of an o-diphenol oxidase from third-instar larvae of the bowfly *Calliphora erythrocephala*. *Biochem J.* 149, 707-712

Paul, R., Bergner, B., Pfeffer-Seidl, A., Decker, H., Efinger, R., and Storz, H. (1994). Gas transport in the haemolymph of arachnids - oxygen transport and the physiological role of haemocyanin. *J. Exp. Biol.* 188, 25-46

Peitzsch, R.M., und McLaughlin, S. (1993). Binding to acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32, 10436-10443

Perutz, M.F. (1979). Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 327-386

Pesce, A., Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., und Burmester, T. (2002). Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep.* 3, 1146-1151

Pesce, A., Nardini, M., Dewilde, S., Hoogewijs, D., Ascenzi, P., Moens, L., und Bolognesi, M. (2005). Modulation of oxygen binding to insect hemoglobins: the structure of hemoglobin from the botfly *Gasterophilus intestinalis*. *Protein Sci.* 14, 3057-3063

Petris, M.J., Strausak, D., und Mercer, J.F. (2000). The menkes copper transporter is required fort he activation of tyrosinase. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2845-2851

Pick, C., Hagner-Holler, S., und Burmester, T. (2008). Molecular characterization of hemocyanin and hexamerin from the firebrat *Thermobia domestica* (Zygentoma). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 977-983

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

Pifferi, P., und Baldassari, L. (1973). A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorns Hydrazon. *Anal. Biochem.* 52, 325-335

Pless, D., Aguilar, M., Falcon, A., Lozano-Alvarez, E., und Heimer de la Cotera, E. (2003). Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean. *Arch. Biochem.Biophys.* 409, 402-410

Pohlmann, J. W., Iliffe, T.M., und Cifuentes, L.A. (1997). A stable isotope study of organic cycling and the ecology of an anchialine cave ecosystem. *Marine Ecology Progress Series* 155, 17-27

Pomerantz, S., und Warner, M. (1967). 3,4-Dihydroxyl-L-phenylalanin as the tyrosinase cofactor. *J. Biol. Chem.* 242, 5308-5314

Possee, R.D. (1997). Baculoviruses as expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 569-572

Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., und Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238, 336-341

Pyle, L.E., Bartona, P., Fujiwara, Y., Mitchell, A., und Fidge, N. (1995). Secretion of biologically active human proapoliprotein A-I in a baculovirus-insect cell system: protection from degradation by protease inhibitors. *J. Lipid. Res.* 36, 2355-2361

Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufhal, R.A., Culotta, V.C., und O'Halloran, T.V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805-808

Ramabhadran, T.V., Gandy, S.E., Ghiso, J., Czernik, A.J., Ferris, D., Bhasin, R., Goldgaber, D., Frangione, B., und Greengard, P. (1993). Proteolytic processing of human amyloid β protein precursor in insect cells. *J. Biol. Chem.* 268, 2009-2012

Ramandeep, Kwang, W.H., R., Raje, M., Kim, K.-J., Stark, B.C., Dikshit, K.L., und Webster, D.A. (2001). *Vitroscilla* haemoglobin. Intracellular localization and binding to membranes. *J. Biol. Chem.* 276, 24781-24789

Regier, J.C., und Shultz, J.W. (2001). Elongation factor-2: a useful gene for arthropod phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20, 136-148

Regier, J.C., Shultz, J.W., und Kambic, R.E. (2005). Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic. *Proc. Biol. Sci.* 272, 395-401

Resh, M.D. (1994). Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76, 411-413

Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insight into membrane targeting of myristoylated palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1-16

Reyda, S., Jacob, E., Zwilling, R., und Stöcker, W. (1999). cDNA cloning, bacterial expression, *in vitro* renaturation and affinity purification of the zinc endopeptidase astacin. *Biochem. J.* 344, 851-857

Richter, S. (2002). The Tetraconata concept: hexapod-crustacean relationships and the phylogeny of Crustacea. *Org. Divers. Evol.* 2, 217-237

Rinaldi, A.C., Bonamore, A., Macone, A., Boffi, A., Bozzi, A., und Di Giulio, A. (2006). Interaction of *Vitreoscilla* hemoglobin with membrane lipids. *Biochemistry* 45, 4069-4076

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

Rodriguez-Lopez, J.N., Escribano, J., und Garcia-Canovas, F. (1993). A continuous spectrophotometric method for the determination of Monophenolase activity of tyrosinase using 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal. Biochem.* 216, 205-212

Roeding, F., Hagner-Holler, S., Ruhberg, H., Ebersberger, I., von Haeseler, A., Kube, M., Reinhardt, R., und Burmester, T. (2007). EST sequencing of Onychophora and phylogenomic analysis of Metazoa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 45, 942-951

Rösmann, S., Hahn, D., Lottaz, D. Kruse, M.-N., Stöcker, W., und Sterchi, E.E. (2002). Activation of human meprin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J. Biol. Chem.* 277, 40650-40658

Ronda, L., Faggiano, S., Bettati, S., Hellmann, N., Decker, H., Weidenbach, T., und Mozzarelli, A. (2007). Hemocyanin from *E. californicum* encapsulated in silica gels: oxygen binding and conformational states. *Gene* 398, 202-207

Rosenberg, A.H., und Studier, F.W. (1987). T7 RNA polymerase can direct expression of influenza virus cap-binding protein (PB2) in *Escherichia coli*. *Gene* 59, 191-200

Rudolph, R., und Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*10, 49-65

Saffarini, D.A., Trewitt, P.M., Luhm, R.A., und Bergstrom, G. (1991). Differential regulation of insect globin and actin mRNAs during larval development in *Chironomus thummi*. *Gene* 101, 215-222

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., und Ehrlich, 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: A Laboratory Manual. Second Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Samuni, A., Chevion, M., und Czapski, G. (1981). Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.* 256, 12632-12635

Sanger, F., Nicklen, S., und Coulsen, A.R. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 74, 5463-5467

Samra, Z.Q., und Athar, M.A. (2008). Cloning, sequence, expression and characterization of human beta-mannosidase. *Acta Biochim. Pol.* 55, 479-490

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

Schmidt, T.G.M., und Skerra, A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the „Strep-tag“ and immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr. A*, 676, 337-345

Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27, 363-365

Schram, F.R. (1986). Crustacea. Oxford University Press, Oxford, New York

Shuler, M.L., Wood, H.A., Granados, R.R., und Hammer, D.A. (1995). Baculovirus expression systems and biopesticides. Wiley-Liss, New York

Skerra, A., und Schmidt, T.G.M. (2000). Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Meth. Enzymol. A* 326, 271-304

Southon, A., Burke, R., Norgate, M., Batterham, P., und Camakaris, J. (2004). Copper homoeostasis in *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Biochem. J.* 383, 303-309

Söderhäll, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods? A review. *Dev. Comp. Immunol.* 6, 601-611

Söderhäll, K., Aspán, A., und Duvic, B. (1990). The proPO-System and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.* 141, 896-907

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

Spears, T., und L. G. Abele (1997). Crustacean phylogeny inferred from 18S rDNA. Arthropod Relationships, Chapman and Hall, London, 169-187

Spritz, R.A., Ho., L., Furumua, M., und Hearing Jr., V.J. (1997). Mutational analysis of copper binding by human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* 102, 207-212

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioonformatics* 22, 2688-2690

Stöcker, W., Raeder, U., Bijilholt, M.M.C., Wichertjes, T., van Bruggen, E.F.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* 158, 271-289

Studier, F.W., und Moffat, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130

Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219, 37-44

Sugiyama, K., Ahorn, H., Maurer-Fogy, I., und Voss, T. (1993). Expression of human interferon-α2 in Sf9 cells. Characterization of O-linked glycosylation and protein heterogeneities. *Eur. J. Biochem.* 217, 921-927

Sugumaran, M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 15, 2-9

Sugumaran, M., und Nellaiappan, K. (1991). Lysolecithin – a potent biophysical of prophenoloxidase from the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1371-1376

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. *Plant Physiol.* 136, 3234-3244

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

Telfer, W.H., und Massey, H.C. (1987). A storage protein from *Hyalophora* that binds riboflavin and resembles the apoprotein of hemocyanin. In: *Molecular Entomology* (Law, J. H., ed.) UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Series, Alan R. Liss Inc., New York, 305-314

Terwilliger, N. B. (1991). Arthropod (*Cyamus scammoni*, amphipoda) haemoglobin structure and function. In: *Structure and function of invertebrate oxygen carriers*, edited by Vingradov, S.N. und Kapp, O.H., New York, Springer Verlag, 59-63

Terwilliger, N. B. (1992). Molecular structure of the extracellular heme proteins. In: *Advances in comparative and enviromental physiology* 13. *Blood and oxygen carriers*, edited by Mangum, C.P., Heidelberg, Springer Verlag, 193-229

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

Terwilliger, N.B. (2001). Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J. Exp. Biol.* 201, 1085-1098

Terwilliger, N. B. (2008). Whale rider: the co-occurrence of haemoglobin and haemocyanin in *Cyamus scammoni*. Protein Reviews: Dioxygen binding and sensing proteins. Springer-Verlag Italy, 203-209

Terwilliger, N.B., Dangott, L.J. und Ryan, M.C. (1999). Cryptocyanin, a crustacean molting protein, and evolutionary links to arthropod hemocyanin and insect hexamerins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2013-2018

Terwilliger, N. B., und Ryan, M. (2001). Ontogeny of crustacean respiratory proteins. *Am. Zool.* 41, 1057-1067

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

Thijs, L., Vinck, E., Bolli, A., Trandafir, F., Wan, X., Hoogewijs, D., Coletta, M., Fago, A., Weber, R.E., Van Doorslaer, S., Ascenzi, P., Alam, M., Moens, L., und Dewilde, S. (2007). Characterization of a globin-coupled oxygen sensor with a gene-regulating function. *J. Biol. Chem.* 282, 37325-37340

Tota, M.R., Xu, L., Sirotina, A., Strader, C.D., und Graziano, M.P. (1995). Interaction of [fluorescein-Trp25]glucagon with human glucagon receptor expressed in *Drosophila* Schneider 2 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 26466-26472

Towler, D.A., Adams, S.P., Eubanks, S.R., Towery, D.S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L., Gordon, J.I. (1987). Purification and characterization of yeast myristoyl CoA: protein N-myristoyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2708-2712

Truchot, J. (1992). Respiratory function of arthropod hemocyanin. *Adv. Comp. Physiol.* 13, 377-410

Tsai, T.Y., und Lee, Y.H. (1998). Roles of copper ligands in the activation and secretion of *Streptomyces tyrosinase*. *J. Biol. Chem.* 273, 19243-19250

Tsukamoto, T., Ishiguro, M., und Funatsu, M. (1986). Isolation of latent phenoloxidase from prepupae of the housefly, *Musca domestica*. *Insect Biochem.* 16, 573-581

Uglow, R.F. (1969a). Haemolymph protein concentrations in portunid crabs. I. Studies on adult *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 1083-1090

Uglow, R.F. (1969b). Haemolymph protein concentrations in portunid crabs. II. The effect of imposed feeding on *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 31, 959-967

Valentine, J.S., und Gralla, E.B. (1997). Delivering copper inside yeast and human cells. *Science* 278, 817-818

van der Ham, J.L., und Felgenhauer, B.E. (2007). The functional morphology of the putative injecting apparatus of *Speleonectes tanumekes* (Remipedia). *J. Crust. Biol.* 27, 1-9

van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., und Wichers, H.J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 47, 1309-1323

van Holde, K.E., und Miller, K.I. (1995). Hemocyanins. *Adv. Protein Chem.* 47, 1-81

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

Vera, A., Gonzales-Montalban, N., Aris, A., und Villaverde, A. (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 1101-1106

Vinogradov, S.N. (1985). The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocruorins and chlorocruorins). *Comp. Biochem. Physiol.* 82B, 1-15

Vizioli, J., Catteruccia, F., della Torre, A., Reckmann, I., und Müller, H.-M. (2001). Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *Eur. J. Biochem.* 268, 4027-4035

Voit, R., Feldmaier-Fuchs, G., Schweikardt, T., Decker, H., and Burmester, T. (2000). Complete sequence of the 24mer 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 heamocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å 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

von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J. Membrane Biol.* 115, 195-201

Voss, S., und Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity fort he Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-982

Vulpe, C.D., und Packman, S. (1995). Cellular copper transport. *Annu. Rev. Nutr.* 15, 293-322

Walshe, B.M. (1951). The function of haemoglobin in relation to filter feeding in leaf-meaning chironomid larvae. *J. Exp. Biol.* 28, 57-61

Walther, M. (2008). Krebstiere (Crustacea) - Biologie, Vorkommen, Haltung und Erkrankungen, sowie ihre Bedeutung als Zootierobjekte und Lebensmittelressourcen. Dissertation. Universität Gießen

Wang, W., und Ballatori, N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50, 335-355

Wang, N., und Hebert, D.N. (2006). Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Res.* 19, 3-18

Wang, W.-C., Zinn, K., und Bjorkman, P.J. (1993). Expression and structural studies of fasciclin I, an insect cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 268, 1448-1455

Weber, R.E., und Vinogradov, S.N. (2001). Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Phys. Rev.* 81, 569-628

Wells, R.M.G., Hudson, M.J., und Brittain, T. (1981). Function of the hemoglobin and the gas bubble in the backswimmer *Anisops assimilis*. 8hemiptera: Notonectidae). *J. Comp. Physiol. B* 142, 515-522

Westerholm-Parvinen, A., Selinheimo, E., Boer, H., Kalkkinen, N., Mattinen, M., und Saloheimo, M. (2007). Expression of the *Trichoderma reesei* tyrosinase 2 in *Pichia pastoris*: Isotopic labeling and physicochemical characterization. *Protein Expr. Purif.* 55, 147-158

Westheide, W., und Rieger, R. (1996). Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

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. (1990a). The pH dependence of the reconstitution reaction of apotyrosinase: the question of Cu(I) versus Cu(II). *Biochem. Cell Biol.* 68, 648-650

Wigfield, D.C., und Goltz, D.M. (1990b). 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

Willis, M. (1997). A phylogeny of recent and fossil Crustacea derived from morphological characters. Pp. 189–209 *in* R. A. Fortey, and R. H. Thomas, eds. Arthropod Relationships. Chapman & Hall, London

Willott, E., Wang, X.-Y., und Wells, M.A. (1989). cDNA and gene sequence of *Manduca sexta* arylphorin, an aromatic amino acid-rich larval serum protein: homology to arthropod hemocyanins. *J. Biol. Chem.* 264, 19052-19059

Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E., und Benzie, J. (2000). The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? *Mol. Biol. Evol.* 17, 863-874

Winder, A.J., und Harris, H. (1991). New assays for the tyrosinase hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 198, 317-326

Wolfe, J., Akam, M.E., und Roberts, D.B. (1977). Biochemical and immunological studies on larval serum protein 1, the major haemolymph protein of *Drosophila melanogaster* third-instar larvae. *Eur. J. Biochem.* 79, 47-53

Yamada, K., Nakajima, Y., und Natori, S. (1990). Production of recombinant sarcotoxin IA in *Bombyx mori* cells. *Biochem J.* 272, 633-636

Yasuhara, Y., Koizumi, Y., Katagiri, C., und Ashida, M. (1995). Reexamination of properties of prophenoloxidase isolated from larval hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 14-23

Yager, J. (1981). Remipedia, a new class of Crustacea from a marine cave in the Bahamas. *J. Crust. Biol.* 1, 328-333

Yager, J. (1991). The Remipedia (Crustacea): Recent investigations of their biology and phylogeny. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 84, 261-269

Yang, W.L., Peng, L.S., Zhong, X.F., Wei, J.W., Jiang, X.Y., Ye, L.T., Zou, L., Tu, H.B., Wu, W.Y., und Xu, A.L. (2003). Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A_2 from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. *Toxicon* 41, 713-721

Yoon, S.O., Hirata, R.D.C., da Silva, A.C.R., Nguyen, N.Y., und Hirata, M.H. (2002). Cloning and expression of soluble recombinant protein comprising the extracellular domain of the human type I interferon receptor 2c subunit (IFNAR-2c) in *E. coli*. *Biotech. Lett.* 24, 1443-1448

Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Phys. Rev.* 74, 139-161

Yun, E.Y., Goo, T.W., Kim, S.W., Choi, K.H., Hwang, J.S., Kang, S.W., und Kwon, O.Y. (2005). Changes in cellular secretory processing during baculovirus infection. *Biotechnol. Lett.* 27, 1041-1045

Zahn, K. (1996). Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J. Bacteriol.* 178, 2926-2933

Zatta, P. (1984). Zinc transport in the haemolymph of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. UK* 64, 801-807

Zebe, E. (1991). In vivo-studies on the function of haemoglobin in the larvae of *Chironomus thummi* (Insecta, Diptera). *Comp. Biochem. Physiol. A* 99, 525-529

Zeis, B., Nies, A., Bridges, C., und Grieshaber, M. (1992). Allosteric modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Specific and additative effects on haemocyanin oxygen-affinity. *J. Exp. Biol.* 168, 93-110

Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wie, M.C., Korsmeyer, S.J. (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290, 1761-1765

Zhou, D., Malissard, M., Berger, E.,G., und Hennet, T. (2000). Secretion and purification of recombinant beta1-4 galactosyltransferase from insect cells using pFmel-protA, a novel transposition-based baculovirus transfer vector. *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 3-7

Zhu, D., Cardenas, M.E., und Heitman, J. (1995). Myristoylation of calcineurin B is not required for function of interaction with immunophilin-immunosuppressant complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisae*. *J. Biol. Chem.* 270, 24831-24838

Zrzavý, J., und Štys, P. (1997). The basic body plan of arthropods: insights from evolutionary morphology and developmental biology. *J. Evol. Biol.* 10, 353-367

G. Anhang

1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEC	3-amino-9-Ethylcarbazol
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
C	Vernetzungsgrad
cDNA	Komplementäre DNA
CIP	Calf intestine alkaline phosphatase
CmaHb	*Carcinus maenas* Hämoglobin
CMC	kritische micellare Konzentration
CuA, CuB	Kupferzentren der Typ3-Kupferproteine
d	Desoxy
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest. H_2O	destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosintriphosphat
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamin-N-N-N'-N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	*expressed sequence tag*
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GITC	Guanidinisothiocyanat
GRAVY	Grand average of hydropathicity
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
Hc	Hämocyanin
HCl	Salzsäure
His-Tag	Hexahistidin-Tag (Affinitätstag)
HRP	Meerrettich Peroxidase
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactpyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
L	Liter
LB	Luria Broth

LSP2	Larval serum protein 2
M	Molar, mol/Liter
MBTH	3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon
MCS	Multiple cloning site, Polylinker
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäue-Natriumsalz
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaN_3	Natriumazid
NBT	Nitro-Blau Tetrazoliumchlorid
NLS	N-Lauroylsarcosin
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte (Absorption)
ORF	Open reading frame
P	Pellet nach Zellaufschluss
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PelHc4	Palinurus elephas Hämocyaninuntereinheit 4
pI	Isoelektrischer Punkt
PO	Phenoloxidase
PPO3	Prophenoloxidase 3
PPO3-SII	Prophenoloxidase 3 mit C-terminalem Strep-Tag II
PCR	Polymerase chain reaction
pET	engl.: plasmid for expression by T7 RNA-Polymerase
RACE	engl.: rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SN	Überstand
SOD	Superoxiddismutase
spez.	spezifisch
Strep-Tag II	Streptavidin-Tag (Affinitätstag)
StuHc	*Speleonectes tulumensis* Hämocyanin
T	Totralacrylamidkonzentration
Taq	*Thermophilus aquaticus*
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Thrx	Thioredoxin
Thrx-PPO3	Fusionsprotein aus Thioredoxin und Prophenoloxidase 3
Thrx-PPO3-S II	Fusionsproteins aus Thioredoxin, Prophenoloxidase 3 und Strep-Tag II
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
U	Hämocyaninuntereinheit
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
Ü	Überstand nach Zellaufschluss
üN	über Nacht
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactopyranosid

2. Codes

Tabelle G.1: Einbuchstaben-Code der Nukleotide

Symbol	Bedeutung
G	Guanin
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
R	Guanin oder Adenin
Y	Thymin oder Cytosin
M	Adenin oder Cytosin
K	Guanin oder Thymin
S	Guanin oder Cytosin
W	Adenin oder Thymin
H	Adenin, Cytosin oder Thymin
B	Guanin, Thymin oder Cytosin
V	Guanin, Cytosin oder Adenin
D	Guanin, Adenin oder Thymin
N	Guanin, Adenin, Thymin oder Cytosin

Tabelle G.2: Ein- und Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren

A	**Ala**	**Alanin**	**M**	**Met**	**Methionin**
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

3. Vektoren

Tabelle G.3: Verwendete Vektoren

Vektor	Eigenschaft	Firma
pGemT-Easy	Vektor für TA-Klonierung, Amp^R	Promega
TOPO TA	Vektor für TA-Klonierung, Amp^R	Invitrogen
pET3a	Expressionsvektor (pET-System), Amp^R	Novagen
pET24a	Expressionsvektor (pET-System), Kan^R	Novagen
pET32b	Expressionsvektor (pET-System), Amp^R	Novagen
pFASTBac1	Expressionsvektor (Baculovirus-System), Amp^R, Gen^R	Invitrogen
pCOHygro	Selektionsvektor (DES-System), $Hygr^R$, Amp^R	Invitrogen
pMT/V5-HisB	Expressionsvektor (DES-System), Amp^R	Invitrogen

4. Primer

Die Schmelztemperaturen (Tm) aller verwendeten Primer wurden mit dem Programm „OligoAnalyzer“ (http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) bestimmt. Als

Annealing-Temperatur in den einzelnen PCR-Experimenten wurde in der Regel die ermittelte Tm +/- 5 °C verwendet. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind rot markiert.

Tabelle G.4: Degenerierte Primer zur Ermittlung von Remipedia-Hc-Teilsequenzen

Bezeichnung	5'-3' Orientierung	Sonstiges
MDF	ATGGAYTTYCCNTTYTGGTGGA	Tm = 53-60 °C
MEH	GTNGCGGTYTCRAARTGYTCCAT	Tm = 54-64 °C

Tabelle G.5: Spezifische Primer: Verifizierung der bekannten Remipedia-Hc1-Teilsequenz

Bezeichnung	5'-3' Orientierung	Sonstiges
RemiHc_ESTsFwd1a	CACGCTGGGAGAGTTGGATGA	Tm = 59 °C
RemiHc_ESTsFwd1b	AGATCCCTCATTCTTCAGGCTGC	Tm = 59 °C
RemiHc_ESTsFwd2a	TGGATGATGGTCGAAATGGACAAGT	Tm = 58 °C
RemiHc_ESTsFwd2b	GCGCAAATCCACTGAATCTTCTGTTAC	Tm = 58 °C
RemiHc_ESTsRev1a	AGCGATGGTTTAGCCTGTCTGTT	Tm = 59 °C
RemiHc_ESTsRev1b	TGGACCTCTAGTGGTCGCTCTT	Tm = 60 °C

Tabelle G.6: RACE-Primer zur Vervollständigung der Remipedia-Hc-Sequenzen 1-3

Bezeichnung	5'-3' Orientierung	Sonstiges
RemiHc_5RACERev1	CATCTGTTGTGTATGGTGGGAGACTATC	Tm = 58 °C (Hc1)
RemiHc_5RACERev2	TGTGCAGCCTGAAGAATGAGGGATCT	Tm = 62 °C (Hc1)
RemiHc1_5RACErev1	TAGATCTCATACTGGGGTGGGAGCAAGA	Tm = 62 °C
RemiHc1_5RACErev2	TGGCCCAGCAGGCTATCTTGTAGAAGGT	Tm = 65 °C
RemiHc2_5RACErev1	TGTTGTCAGGTCTCATGGGGAACTGGAA	Tm = 63 °C
RemiHc2_5RACErev2	CCTGGATGTCATCTGATGGTGATTGTAG	Tm = 59 °C
RemiHc2_3RACE1	CAAATGGTACAGAAGTGTCCCTGAATGA	Tm = 59 °C
RemiHc2_3RACE2	GGTGAAATAGTAGAGGCTTCTGAACACA	Tm = 58 °C
RemiHc3_5RACErev1	TCCACCTCCAGCTTGGGGAAAGTC	Tm = 63 °C
RemiHc3_5RACErev2	ATGTCGTCGGGCCTGACGGGGAACTCAT	Tm = 68 °C
RemiHc3_3RACE1	CACGGGGATCAACACTTTGGGTGAGAT	Tm = 62 °C
RemiHc3_3RACE2	GCGTCAACCCGGGCTTCTACAAGAGCAT	Tm = 66 °C

Tabelle G.7: Primer zur Amplifikation der *Carcinus maenas* Hb-Sequenz via *nested*-PCR

Bezeichnung	5'-3' Orientierung	Sonstiges
CmaHb_F1	GCTACTCTCAAGACCCACAC	Tm = 55 °C
CmaHb_R1	GTAGTAGGACTGAAGGACTG	Tm = 51 °C
CmaHb_NdeI (nested)	TACTCACATATGGGAGCCGTGCTGAGTGTG	Tm = 62 °C
CmaHb_Bam (nested)	TACTCTGGATCCTCATGCATCATAAGAAGT	Tm = 45 °C

Tabelle G.8: Primer zur Ermittlung der *Carcinus maenas* Hb-Introns/Exons

Bezeichnung	5'-3' Orientierung	Sonstiges
CmaHb_Fwd1Intr	TCACTCTTCGTCACCGCA	Tm = 56 °C
CmaHb_Fwd2Intr	TCAGTGCTGGTGGAGTTACT	Tm = 58 °C
CmaHb_F3_Intron	TGGTTAAGTCCAGGCACGCAG	Tm = 63 °C
CmaHb_F4_Intron	GTTCCAGGAAGAGCCAGTACTA	Tm = 62 °C
CmaHb_F5_Intron	CTCAAGAACACAGGAGCCAATC	Tm = 62 °C
CmaHb_Rev1Intr	TGCCAGTCGCTTGCTGTTCT	Tm = 60 °C
CmaHb_Rev2Intr	AGTCCAAGCTTCCTCTGCCAC	Tm = 63 °C
CmaHb_R3_Intron	GTGAGGAACAAATTTATTCCGTGC	Tm = 62 °C
CmaHb_R4_Intron	AGCTCAAAGTCTCCCTTGGGTA	Tm = 62 °C
CmaHb_R5_Intron	GATGACTTTCATAGCCTGAGTCC	Tm = 63 °C

Tabelle G.9: Vektorprimer

Bezeichnung	5'-3' Orientierung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG
M13Fwd (~20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13Fwd (~40)	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
MTFwd	CATCTCAGTGCAACTAAAGG
BGHRev	TTAGAAGGCACAGTCGAGG
pET03	GCAGCAGCCAACTCAGCTTC
pET05	ACCACAACGGTTTCCCTCTAG
pET05_pET32b	GGAATAACAATTCCCCTCTAG
pFASTBac1_03	ATCCTCTAGTACTTCTCGAC
pFASTBac1_05	TATTCCGGATTATTCATACC

Tabelle G.10: Genspezifische Sequenzierprimer

Bezeichnung	5'-3' Orientierung	Sonstiges
SeqPPO3_F	AGGGCTACGTTTTGGATACG	DmePPO3
SeqPPO3_F1	TTCAACAACCTGGACGAACC	DmePPO3
SeqPPO3_F2	AAGTTCGTGGTTACCATGCC	DmePPO3
SeqPPO3_F3	TCAGTTGCTCCATGAGACTG	DmePPO3
SeqPPO3_R	CGTACTGTTGGGCGTCAGAT	DmePPO3
Seq1Fwd_DmeLSP2	CCATCATGTCAAGCAGATGG	DmeLSP2
Seq2Fwd_DmeLSP2	AGCTGTACCGCTTCATTGTG	DmeLSP2
Seq3Fwd_DmeLSP2	GTTAACCACATCAAGCGCGC	DmeLSP2

DmeLSP2: „Larval serum protein 2“ aus *Drosophila melanogaster*
DmePPO3: „Prophenoloxidase 3“ aus *Drosophila melanogaster*

Tabelle G.11: Klonierungsprimer für die Erstellung von Expressionskonstrukten

Bezeichnung	Primer	5'-3' Orientierung	Modifikationen	Sonstiges
CmaHb_NdeI	Fwd	TACTCACAT**ATG**GGAGCCGTGCTGAGTGTG	NdeI	
CmaHboSP_NdeI	Fwd	TACTCACAT**ATG**GTCACATTTCCTGAAGAGGGA	NdeI	HbΔN1-21
CmaHbVerk_NdeI	Fwd	TACTCACAT**ATG**GGCCTCACTCTTCGTCAC	NdeI	HbΔN1-40
CmaHb_Bam	Rev	TACTCTGGATCC**TCA**TGCATCATAAGAAGT	BamHI	
PPO3_NdeI	Fwd	TACTCACAT**ATG**GCCGACAAGAAGAATCTG	NdeI	
FwdDmePPO3_BamHI_pET32b	Fwd	TACTCAGGATCCGGCCGACAAGAAGAATCTGCT	BamHI	ohne Startcodon
Fwd-Primer-NotI	Fwd	TACTCAGCGGCCGC**ATG**GCTTGGATTAGATCCA CTTGCATTCTCTTTTTTACCTTGCTTTTTGCCCAC ATAGCAGCTGTACCGATTGCCGACAAGAAGAATC TGCT	NotI Signalpeptid des Meprin α Propeptid Meprin	Propeptid Meprin zur korrekten Abspaltung des Signalpeptids
DmePPO3_Fwd_SpeI	Fwd	TACTCAACTAGTGAG**ATG**GCCGACAAGAAGAATCT	SpeI Ergänzung Kozak-Sequenz	Kozak-Sequenz: GAGATGG
PPO3_Bam	Rev	TACTCTGGATCC**TCA**GGAGCGAGCTGGTAC	BamHI	
RevDmePPO3_XhoI_pET32b	Rev	TACTCTCTCGAG**TCA**GGAGCGAGCTGGTACCTC GCGAA	XhoI	
R-Primer-XhoI	Rev	TACTCTCTCGAG**TCA**CTTTTCGAACTGCGGGTGG CTCCAGGAGCGAGCTGGTACCTCGCGAA	XhoI Strep-Tag II	
DmeLSP2_NdeI_Fwd	Fwd	TACTCACAT**ATG**AAGTCGTTCACGGTGATTGC	NdeI	
DmeLSP2oSP_NdeI_Fwd	Fwd	TACTCACAT**ATG**AAGCACCTGGACTCCAAGGT	NdeI	kein Signalpeptid
DmeLSP2_StrepII_XhoI_Rev	Rev	TACTCTCTCGAG**CTA**CTTTTCGAACTGCGGGTGG CTCCAGACCACATTGGTGTGCT	XhoI Strep-Tag II	
DmeLSP2_XhoI_Rev	Rev	TACTCTCTCGAG**CTA**GACCACATTGGTGTGCT	XhoI	

Start- und **Stopp-Codons** im Primer sind unterstrichen dargestellt.
CmaHb: Hämoglobin aus *Carcinus maenas*
DmePPO3: Prophenoloxidase 3 aus *Drosophila melanogaster*
DmeLSP2: Hexamerin „larval serum protein 2" aus *Drosophila melanogaster*

5. Expressionskonstrukte

Folgende Expressionskonstrukte wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellt:

Tabelle G.12: *Carcinus maenas* Hämoglobin

Konstrukt	Modifikationen	Klonierungsprimer
CmaHb/pET3a	-----	CmaHb_NdeI CmaHb_Bam
CmaHbΔN1-21/pET3a	N-terminal verkürzt um 21 AS	CmaHboSP_NdeI CmaHb_Bam
CmaHbΔN1-40/pET3a	N-terminal verkürzt um 40 AS	CmaHbVerk_NdeI CmaHb_Bam

Tabelle G.13: *Drosophila melanogaster* Hexamerin LSP2

Konstrukt	Modifikationen	Klonierungsprimer
DmeLSP2/pET24a	-----	DmeLSP2_NdeI_Fwd DmeLSP2_XhoI_Rev
DmeLSP2-Strep II/pET24a	+ C-terminaler Strep-tag II	DmeLSP2_NdeI_Fwd DmeLSP2_StrepII_XhoI_Rev
DmeLSP2oSP/pET24a	- Signalpepid	DmeLSP2oSP_NdeI_Fwd DmeLSP2_XhoI_Rev
DmeLSP2oSP- Strep II/pET24a	- Signalpepid + C-terminaler Strep-tag II	DmeLSP2oSP_NdeI_Fwd DmeLSP2_StrepII_XhoI_Rev

Tabelle G.14: *Drosophila melanogaster* Prophenoloxidase 3

Konstrukt	Modifikationen	Klonierungsprimer
DmePPO3/pET3a	-----	PPO3_NdeI PPO3_Bam
DmePPO3-Strep II/pET24a	+ C-terminaler Strep-tag II	PPO3_NdeI R-Primer-XhoI
Thrx-DmePPO3/pET32b	-----	FwdDmePPO3_Bam_pET32b RevDmePPO3_XhoI_pET32b
Thrx-DmePPO3-Strep II/ pET 32b	+ C-terminaler Strep-tag II	FwdDmePPO3_Bam_pET32b R-Primer-XhoI
DmePPO3-Strep II/ pFASTBac1	+ Signalpeptid + C-terminaler Strep-tag II	Fwd-Primer-NotI R-Primer-XhoI
DmePPO3/pMT-V5-HisB	-----	DmePPO3_Fwd_SpeI RevDmePPO3_XhoI_pET32b
DmePPO3-Strep II/pMT-V5- His B	+ C-terminaler Strep-tag II	DmePPO3_Fwd_SpeI R-Primer-XhoI

6. Transformierte bakterielle Expressionsstämme

Nach Transformation von Expressionsstämmen mit den entsprechenden Konstrukten wurden bakterielle Dauerkulturen angelegt. Tabelle G.5.1 fasst alle Dauerkulturen und die für die Anzucht verwendeten Antibiotika zusammen.

Tabelle G.15: Dauerkulturen für die Expression von *Carcinus maenas* Hämoglobin

Konstrukt	Expressionsstamm	Antibiotikaresistenzen
CmaHb/pET3a	BL21(DE3)pLysS	Ampicillin, Chloramphenicol
CmaHbΔN1-21/pET3a	BL21(DE3)pLysS	Ampicillin, Chloramphenicol
CmaHbΔN1-40/pET3a	BL21(DE3)pLysS	Ampicillin, Chloramphenicol

Tabelle G.16: *Drosophila melanogaster* Hexamerin LSP2

Konstrukt	Expressionsstamm	Antibiotikaresistenzen
DmeLSP2/pET24a	BL21(DE3)pLysS	Kanamycin, Chloramphenicol
DmeLSP2-Strep II/pET24a	BL21(DE3)pLysS	Kanamycin, Chloramphenicol
DmeLSP2oSP/pET24a	BL21(DE3)pLysS	Kanamycin, Chloramphenicol
DmeLSP2oSP-Strep II/pET24a	BL21(DE3)pLysS	Kanamycin, Chloramphenicol

Tabelle G.17: *Drosophila melanogaster* Prophenoloxidase 3

Konstrukt	Expressionsstamm	Antibiotikaresistenzen
DmePPO3/pET3a	BL21(DE3)pLysS	Ampicillin, Chloramphenicol
DmePPO3-Strep II/pET24a	BL21(DE3)pLysS Rosetta(DE3)pLysS	Kanamycin, Chloramphenicol Kanamycin, Chloramphenicol
Thrx-DmePPO3/pET32b	BL21(DE3)pLysS	Ampicillin, Chloramphenicol
Thrx-DmePPO3-Strep II/ pET32b	BL21(DE3)pLysS	Ampicillin, Chloramphenicol

7. Stabil transfizierte Zell-Linien

Eine stabile Transfektion von Insektenzellen erfolgte im DES-System (Invitrogen) unter Einsatz der *Drosophila*-Zelllinie S2.

Tabelle G.18: Dauerkulturen transfizierter S2-Zellen

Konstrukt	Zell-Linie	Antibiotikaresistenz
DmePPO3/pMT-V5-HisB	S2	Hygromycin
DmePPO3-Strep II/pMT-V5-His B	S2	Hygromycin

8. Sequenzen

8.1. *Carcinus maenas* Hämoglobin

8.1.1. Nukleotid- und Aminosäuresequenz

Nukleotid- und Aminosäuresequenz des kiemenspezifischen Hämoglobins aus der Strandkrabbe *C. maenas*. Das Startcodon ATG ist rot markiert, das Stoppcodon durch drei Sterne dargestellt. Das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen. Die für die Sauerstoffbindung wichtigen Aminosäuren Phenylalanin (CD1) und die zwei Histidine (E7, F8) sind gelb schattiert. Die Nukleotide, die die beiden Introns B12.2 und E.11.0 flankieren, sind grün (am Intronbeginn) und hellblau (am Intronende) schattiert.

```
                                                                g
cggcacacgcatcctgtcggcctctctctccctctctctgcttggacctcgcgctactct
caagacccacacagacacacacacatagacaaggagaaattgagtcgactaggcatt**atg**
                                                          M
ggagccgtgctgagtgtggtttggggatggttaagtccaggcacgcaggtgggtgccgtc
G  A  V  L  S  V  V  W  G  W  L  S  P  G  T  Q  V  G  A  V
acatttcctgaagagggaagtctgggccccgaagcagacgttccggataaaaccacaggc
T  F  P  E  E  G  S  L  G  P  E  A  D  V  P  D  K  T  T  G
Ctcactcttcgtcaccgcaccgccatctaccgcacttgggatcttgtgagaccgaatccg
L  T  L  R  H  R  T  A  I  Y  R  T  W  D  L  V  R  P  N  P
Aaactgcacggaataaatttgttcctcacaatgttccaggaagagccagtactacagacc
K  L  H  G  I  N  L  F  L  T  M  F  Q  E  E  P  V  L  Q  T
Agattcaaaggcttcgctggcaagtctattgaggaactcaagaacagcaagcgactggca
R  F  K  G  F  A  G  K  S  I  E  E  L  K  N  S  K  R  L  A
gcacatggcactactgtggtcatggctatcacggcaatggtggacaacttggaggacgtg
A  H  G  T  T  V  V  M  A  I  T  A  M  V  D  N  L  E  D  V
tcagtgctggtggagttactcaagaacacaggagccaatcacagggaccgaggtgtaccc
S  V  L  V  E  L  L  K  N  T  G  A  N  H  R  D  R  G  V  P
aagggagactttgagctgctggcgccagtcctggttaggttcctgaaggataacttgggg
K  G  D  F  E  L  L  A  P  V  L  V  R  F  L  K  D  N  L  G
tcagcttggagccccgtggcagaggaagcttggactcaggctatgaaagtcatcaatgca
S  A  W  S  P  V  A  E  E  A  W  T  Q  A  M  K  V  I  N  A
gttatcttcacttcttatgatgca**tga**tgctcctcccttcccttctcctctccctccctc
V  I  F  T  S  Y  D  A  ***
cgctctttgtactctccctccccgtccttctccgtctcctcccacaacacactcaatgcc
cagtccttcagtcctactacaatacaagctcatcacacttcactcactttaatatagtac
tgtagtaatgtatctttttttcccaagatacttactttattacaaccacacctaagctgc
aaaatacattaagaagtgtttgtcatgtctacacactcactcacacacacacacacacac
acacacacatccataaataaattaacatataataaagaaatattattatacatttc
```

8.1.2. Phylogenie

8.1.2.1. Verwendete Sequenzen

Abkürzung	**Zugangsnummer**	**Artname**
AgaHb1	AM182453	*Anopheles gambiae*
AgaHb2	AM182454	*Anopheles gambiae*
AmeHb1	AM158085	*Apis mellifera*
ApiHb	EST	*Acyrthosiphon pisum*
AsaHbC1 1	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbC1 2	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbC1 3	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbC1 4	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbC1 5	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbC1 6	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbC1 7	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbC1 8	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbC1 9	AF104216	*Artemia salina*
AsaHbT1 1	AF104217	*Artemia salina*
AsaHbT1 2	AF104217	*Artemia salina*
AsaHbT1 3	AF104217	*Artemia salina*
AsaHbT1 4	AF104217	*Artemia salina*
AsaHbT1 5	AF104217	*Artemia salina*
AsaHbT1 6	AF104217	*Artemia salina*
AsaHbT1 7	AF104217	*Artemia salina*
AsaHbT1 8	AF104217	*Artemia salina*
AsaHbT1 9	AF104217	*Artemia salina*
BmoHb	AB440198	*Bombyx mori*
CmaHb	EST	*Carcinus maenas*
CtpHbV	X56271	*Chironomus thummi piger*
CtpHbW	X56271	*Chironomus thummi piger*
CtpHbY	X56271	*Chironomus thummi piger*
CttHbI	P02221	*Chironomus thummi thummi*
CttHbIIb	AF001292	*Chironomus thummi thummi*
CttHbIII	EST	*Chironomus thummi thummi*
CttHbVI	EST	*Chironomus thummi thummi*
CttHbVII6	A30477	*Chironomus thummi thummi*
CttHbVIII	P02227	*Chironomus thummi thummi*
CttHbIX	P02223	*Chironomus thummi thummi*
CttHbE	P11582	*Chironomus thummi thummi*
CttHbX	P02228	*Chironomus thummi thummi*
CttHbZ	P29245	*Chironomus thummi thummi*
DceHb1	EST	*Dascillus cervinus*
DmaHb1 1	U67067	*Daphnia magna*
DmaHb1 2	U67067	*Daphnia magna*
DmeHb1	NM_169678	*Drosophila melanogaster*
DpsHb1	AM086023	*Drosophila pseudoobscura*
DpuHb1 1	AF074722	*Daphnia pulex*
DpuHb1 2	AF074722	*Daphnia pulex*
DviHb1	AM086022	*Drosophila virilis*
GinHb1	AF063938	*Gasterophilus intestinalis*
IscHb	EST	*Ixodes scapularis*
MmaHb1 1	AB055113	*Moina macrocopa*
MmaHb1 2	AB055114	*Moina macrocopa*
RapHb	EST	*Rhipicephalus appendiculatus*

8.1.2.2. Alignment

Die phylogenetische Analyse erfolgte auf Grundlage des folgenden Alignments.

```
                        *        20         *        40         *        60         *
RapHb     : LTPREKGLVRDTWALVRKDIKA-NAIAIFLTLFQRHPEYQKLE--SGFAEVPPE-ALPTNPRLGAHAMSVAYAITSL :  73
IscHb     : LTPREKGLVRDTWALVRKDVKA-NAIAIFLTLFQRHPEYQKLE--SGFADVPPE-ALSTNPRLGAHAMSVAYAITSL :  73
CmaHb     : LTLRHRTAIYRTWDLVRPNPKL-HGINLFLTMFQEEPVLQTRE--KGFAGKSIE-ELKNSKRLAAHGTTVVMAITAM :  73
DmaHb1_2  : LTPHQIQDVQRSWENIRNGRNA-LVSSIFVKLFKETPRIQKFE--AKFANVAVD-SLAGNAEYEKQVALVADRLDTM :  73
DmaHb1_1  : LSAHERSLIRKTWEQARKDG-D-VAPQILFRFVKAHPEYQKME--SKFANVPQA-ELLTNGNFLAQAYTILAGLNVV :  72
DpuHb1_2  : LTPHQIHDVQRSWENIRANRNS-LVSAIFVKLFKETPRVQKHE--AKFANVAVD-SLPGNADYEKQVALVADRLDTI :  73
DpuHb1_1  : LSSHDRSIIRKTWDQAKKDGDV-PPKILFRFIVAN-PEYQKME--KSFATVPQN-ELLGNGNFLAQAYTILAGLNVV :  72
MmaHb1_2  : LSGHIIKDVQRSWENVRGNRNT-IVAGIFQKLFAGTPRLQKAE--SKFAKVAAA-DLSANADFNKQVALVADRLDVI :  73
MmaHb1_1  : LSASDRAIIRKTWEQARKDG-D-VAPQILFRFVKAHPEYQKLE--RSFASVPQD-ELLGNGNFLAQAYTILAGLNVV :  72
AsaHbT1_9 : FSAYDIQAVQRTWALAKPDLMG-KGAMVFKQLFTDHG-YQPLE--SNLAQYEIT-GLEGSPELNTHARNVMAQLDTL :  72
AsaHbT1_8 : ITDAEKALVQESWDLLKPDLLG-LGRKIFTKVFTKHPDYQILETRTGFGDTPLT-KLDDNPAFGTHIIKVMRAFDHV :  75
AsaHbT1_7 : LSAREVAVVKQTWNLVKPDLMG-VGMRIFKSLFEAFPAYQAVE--PKFSDVPLD-KLEDTPAVGKHAISVTTKLDEL :  73
AsaHbT1_6 : LTALEKQSIQDIWSNLRSTGLQDLAVKIFTRLFSAHPEYKLLE--TGRFGNVDN--INENAPFKAHLHRVLSAFDIV :  73
AsaHbT1_5 : LYGKEIVALRQAFAAVTPRNVE-IGKRVFAKLFAAHPEYKNLE--KKFEQYSVE-ELPSTDAFHYHISLVMNRFSSI :  73
AsaHbT1_4 : LTGRQKEMIKASWSKARTDLRS-LGQELFMRMFKAHPEYQTLEVNKGFADVPLV-SLREDERFISHMANVLGGFDTL :  75
AsaHbT1_3 : LSGLEKNAILSTWGKVRGNLQE-VGKATFGKLFTAHPEYQQME--RFSQGMPLA-SLVESPKFAAHTQRVVSALDQT :  73
AsaHbT1_2 : LSCVDVANIQESWSKVSGDLKT-TGSVVFQRMINGHPEYQQLE--RQFRDVDLD-KLGESNSFVAHVFRVVAAFDGI :  73
AsaHbT1_1 : ILCSDKATIKRTWATVT-DLPS-FGRNVFLSVFAAKPEYKNLE--VEFRNIPAS-ELASSERLLYHGGRVLSSIDEA :  72
AsaHbC1_9 : FSAADIEAIQKTWALAKPDLMG-KGASVFRQLFTDHG-YQPLE--SNLVEYEVT-GLEGSPELNTHARNVMAQLDTL :  72
AsaHbC1_8 : ITDAEKVLVQRSWELLKPDLLG-LGRKIFGVIFTKHPEYQILETRVGFGDTPLT-QLDNNPAFGEHIIKVMRAFDYV :  75
AsaHbC1_7 : LSVREVEVVKQTWNLVKPDLMG-VGMRIFKSLFEKFPAYQAVE--PKFSDVPLD-KLEDIPAVGKHAISVTTKLDEL :  73
AsaHbC1_6 : LTALEKQSIQDIWTSLRPTGLEELAVKMFTRLFADHPEYKLLE--T-GRLGNVD-NINENAPFRAHLHRVLSAFDIV :  73
AsaHbC1_5 : LYGKEVVALRQAFAAISPRNVE-IGKRVFAKLFTSHPEYKNLE--KKFEQYSVE-ELPSTDAFDYHISLVMNRFSAV :  73
AsaHbC1_4 : LTGRQKEAIKASWSVARTDLRF-LGQELFMRMFNLNPEYQSLEVNKGFADVPLV-SLREDERFISHMANVLRGFDTL :  75
AsaHbC1_3 : LSGLEKNAILNTWGKVRGNLQE-VGKATFGKLFAAHPEYQQME--RFFQGVQLA-ELVDSPKFAAHTQRVVSALDQT :  73
AsaHbC1_2 : LSCVDVANVQESWATVSANLKN-TGSILFQRLINDHPEYQQLE--RQFRDVELA-KLGESNGFVAHVFRVVAAFDGI :  73
AsaHbC1_1 : ILCSDKATIKRTWSIVNDLPS--FGRNVFLSVFAAKPEYKNLE--VEFRNIPAS-ELANSERLLYHGGRVLASIDEV :  72
ApiHb     : LSPLQISQLKDSWSVLAQDPSQ-LASALVIRLFKENPEYQSLE--KRLKNLSID-ELASNPQFMSHASKVGAALAST :  73
DmeHb1    : MNSDEVQLIKKTWEIPVATPTD-SGAAILTQFFNRFPSNLEKE--P-FRDVPLE-ELSGNARFRAHAGRIIRVFDES :  72
DviHb1    : MNSDELEMIKKTWEIPVATPTD-SGAAILTAFFNRFPSSLQKE--P-FHNVPLE-ELPSNARFRAHAGRIIRVFDES :  72
DpsHb1    : MNSDEVQVIKKTWEIPVATPTD-SGAAILQEFFTRFPSNLEKE--S-FRDVPLE-DLSGNSRFRAHAGRIIRVFDDS :  72
DceHb1    : LTPREKSLVVNSWAIVRKDMIG-NGTELFILFFTKFPKYLTYE--P-FRDVPFD-QLRENKKVHAHAVNVMYALSSI :  72
GinHb1    : MNSEEVNDIKRTWEVVAAKMTE-AGVEMLKRYFKKYPHNLNHE--PWFKEIPFD-DLPENARFKTHGTRILRQVDEG :  73
AmeHb1    : LTERQKKLVQNTWAVVRKDEVA-SGIAVMTAFFKKYPEYQRYE--TAFMDTPLN-ELPANKRFQAHCAGVITALNNV :  73
BmoHb     : LTRREIHAVQKSWAPVNANSFA-TGSELLRRLFNTYPDTKEYE--KMVRKLPEE-EYSQNPQFKAHVINLMTSLNLA :  73
AqaHb1    : LTKSQKVALIAAWSIVKKDLVT-HGRNIFVMFFEEYPQYLDYE--D-FGGGSAG-ELGENRSLHAHALNVMNFIGTL :  72
AqaHb2    : LTASEKITLFSAWGLIRKDLDV-HGRNVLLLLFHKHPRYIAYE--D-FTDDPNAQSLVDNKSLYDQAIHVFKAVGAL :  73
CttHbI    : PSGDQIAAAKASWNTVKNNQ-----VDILYAVFKANPDIQTAE--SQFAGKDLD-SIKGTPDFSKHAGRVVGLFSEV :  69
CttHbIIb  : LSADEASLVRGSWAQVKHSE-----VDILYYIFKANPDIMAKE--PQFAGKDLE-TLKGTGQFATHAGRIVGFVSEI :  69
CttHbIII  : LSADQISTVQASFDKVKGDP-----VGILYAVFKADPSIMAKE--TQFAGKDLE-SIKGTAPFETHANRIVGFFSKI :  69
CttHbVI   : LTTEQADLVKKTWSTVKFNE-----VDILYAVFKAYPDIMAKE--PQFAGKDLD-SIKDSAAFATHATRIVSFLSEV :  69
CttHbVII6 : LTADEASLVQSSWKAVSHNE-----VEILAAVFAAYPDIQNKE--SQFAGKDLA-SIKDTGAFATHATRIVSFLSEV :  69
CttHbVIII : MSADQLALFKSSWNTVKHNE-----VDILYAVFKANPDIQAKE--PQFAGKDLD-SIKDSADFAVHSGRIVGFFSEV :  69
CttHbIX   : VSSDQANAIRASWAGVKHNE-----VDILAAVFSDHPDIQARE--PQFAGKDLA-SIKDTGAFATHAGRIVGFISEI :  69
CttHbX    : LDAHEVEQVQATWKAVSHDE-----VEILYTVFKAHPDIMAKE--PKFAGKDLE-AIKDTADFAVHASRIIGFFGEY :  69
CttHbE    : LSGDQIGLVQSTYGKVKGDS-----VGILYAVFKADPTIQAAE--PQFVGKDLD-AIKGGAEFSTHAGRIVGFLGGV :  69
CttHbZ    : LTSDEAALVKSSWAQVKHNE-----VDILYTVFKAYPDIQARE--PQFAGKDLD-SIKTSGQFATHATRIVSFFSEL :  69
CttHbV    : LTSDEANLVKSSWNQVKHNE-----VDILAAVFKAYPDIQAKE--PQFAGKDLD-SIKTSGQFATHATRIVSFLSEL :  69
CttHbW    : --CDKAPFIKASWNQVKHNE-----VDILYTVFKAYPEIQDRE--PQFAGKDLE-AIKETAEFAVHSTRIVSFMSEI :  67
CttHbY    : -PCDDFKIMQEAWNTMKNEE-----VEILYTVFKAYPDIQAKE--PQFVGKDLE-TIKGTAEFAVHATRIVSFMTEV :  68

                80         *       100         *       120         *       140         *
RapHb     : VDSLDDA---ECLVELVRKIAISETR-RPVTVTNFEHTMVVIVDTLKEKLGGKMTPAAVATW??????????????? : 131
IscHb     : VDSLDDA---ECLVELVRKVAVSETR-RPVSVTHFENLTVVIVDTLKERLGGKMSPAAVAAWEKTLRLVVTVTADVY : 146
CmaHb     : VDNLEDV---SVLVELLKNTGANERD-RGVPKGDFELLAPVLVRFLKDNLGSAWSPVAEEAWTQAMKVINAVIFTSY : 146
DmaHb1_2  : ISAMDDK---LQLLGNINYMRYTETE-RGIPRGPWEDFGRLLLDSLAAN---GVSSDDLDSWKGVLAVFVNGVSPRK : 143
DmaHb1_1  : VQSLSSQ---ELMANQLNALGGAEKP-RGATPVMFEQFGGILEEVLAEELGSSFTAEARQAWKNGLTALISGISKNL : 145
DpuHb1_2  : ISAMDDK---LQLLGNINYMRYTEQPPRAIPRQTFEDFARLLIDGLTA---SGVSGDDMDSWKGVLTIFVNGVSPKQ : 144
DpuHb1_1  : IQSLSSQ---ELLANQINALGGAEQP-RGATPIMFEQFGAITEEVLAEELGIAFNAEARQAWKNGMRALVAGISKNL : 145
MmaHb1_2  : ISAMDDK---LQLLGNINYMRYSEEP-RGISRQTFEDFAELLIESLASS---GVAADDLSSWKGALAVFVNGVTPKK : 143
MmaHb1_1  : IQSLGSR---ELLANQLNALGGAEFS-RGATPVMFDEFGAIAMDVLAEELGSAFNAEAKAAWTTAVRGLNAGIVKTL : 145
AsaHbT1_9 : VGSLQNS---IELGQSLAQLGKDEVP-RKVNRVHFKDFAEHFIPLMKADLGDEFTPLAESAWKKAFDVMIATIEQGQ : 145
AsaHbT1_8 : IQILGKP---KTLMAYLRSVGADEIA-RNVERRHFQAFSNALIPVMQHELKAQLRPDAVAAWRKGLDRIIGIIDQGL : 148
AsaHbT1_7 : IQTLDEP---ANLALLARQLGEDEIV-LRVNKPMFKSFGKVLVRLLENDLGQRFSSFASRSWHKAYDVIVEYIEEGL : 146
AsaHbT1_6 : ISTLDDS---EHLIRQLKDLGLFETR-LGMTRSHFDNFATAFLSVAQDIAPNQLTVLGRESLNKGFKLMHGVIEEGL : 146
AsaHbT1_5 : GKVIDDN---VSFVYLLKKLGREEIK-RGLSRKQFDQFVELYIAEISSE----LSDTGRNGLEKVLTFATGVIEQGL : 142
AsaHbT1_4 : LQNLDES---SYFIYSLRNLGDAEIQ-RKAGTQHFRSFEAILIPYLQES--QGLDAASVEAWKKFFDVSIGVIAQGL : 146
AsaHbT1_3 : LLALNRP---SDFVYMIKELGLDEIN-RGTDRSHFENYQVVFIEYLKETLGDSLDEFTVKSFNHVFEVIISFLNEGL : 146
AsaHbT1_2 : IHELDNN---QFIVSTLKKLGEQEIA-RGTDISHFQNFRVTLLEYLKEN---GMNGAQKASWNKAFDAFEKYISMGL : 143
AsaHbT1_1 : IAGIDTP---DRAVKTLLALGEREIS-RGTVRRHFEAFSYAFIDELKQR---GVESADLAAWRRGWDNIVNVLEAGL : 142
AsaHbC1_9 : VGSLQNS---IELGKSLNQLGKDEVP-RKVNKVHFDDFAEHFVPLMKANLGDEFTPLAESAWKKAFNVMVATIEQGQ : 145
AsaHbC1_8 : IRNLGKP---KTLLAYLKNVGADEIA-RNVERRHFQAFSEALIPVMQRELKAQLKPEAVAAWRKGLDRIIGVIDQGL : 148
AsaHbC1_7 : IQTLDEP---ANLALLARQLGEDEIV-LGVNKPMFKSFGEVLVRLLENDLGQRFSNFASKSWHRAYDVIVEYIEEGL : 146
AsaHbC1_6 : ITSLDNN---ALLIRQLKDLGLFETR-LGMTRAHFDNFATAFFSVAEDIVPNLLTALGRESLGKGFKLMVAVIEEGL : 146
AsaHbC1_5 : GKVIDDN---VSFVYLLKKLGREEIK-RGLSRKQFDQFVELYIAEISPE----LSETGRSGLEKVLTFATGVIEQGL : 142
AsaHbC1_4 : LQNLDDT---SYFVYALRNLGDAEIQ-RKAGTEHFRSFEAILIPYLQES--QGLDAAGVEAWKIFFDVSIGVIAQGL : 146
AsaHbC1_3 : LLALNRP---SDFVYMIKELGLDEIN-RGTDRSHFENYQVVFVEYLKETLGDSVDEFTVKSFNHVFEVIINFLNEGL : 146
AsaHbC1_2 : IKELDNN---PFIVSTLKRLGEQEIA-RGTDISHFQNFRTTLLVYLNEN---GMNQAQEASWNKAFDAIEKYISIGL : 143
AsaHbC1_1 : ISEIDSP---DSAAKKLVALGERIT-RGTVRRHFEAFSYAFIDELKQR---GVASADLAAWRKGWDSIVDILEAGL : 142
ApiHb     : IDHLDKP---EELEKLLTNLGIKKK-YGLSAKHFQVIGDVLIAMITEAIG-DSEPELLDLWKSSLTSVLSIIIAAC : 145
DmeHb1    : IQVLGQDGDLEKLDEIWTKIAVSIP-RTVSKESYNQLKGVILDVLTAA--CSLDESQAATWAKLVDHVYGIIFKAI : 146
DviHb1    : IRVLGQDGDQEKLDEIWTKVAVNIP-RRISRESYNQLKEVILEVLTAA--CSLNESQVETWTKLIDHVYNIIFKAI : 146
DpsHb1    : IRVLGEEGDVEKLEEIWTKIAVSIP-RTISKESYNQLKGVILEVLTAA--CSLDESQAATWAKLVDHIYGIIFKAI : 146
DceHb1    : VDNLSNV---EVLVNLLSKTGEAGR-RKIPEQSFGDLKVTVLELLRVGLGSKITDEGIDAWNKTLEVAIKVIHDGM : 145
GinHb1    : VKALSVDFGDKKFDDVWKKLAQTHE-KKVERRSYNELKDIIIEVVCSCV--KLNEKQVHAYHKFFDRAYDIAFAEM : 147
AmeHb1    : IDF-LHDP--GLMEASLIGLVERKK-RGQTKEEFQNLKEVMLEVLRQALGKQYTPEVAEAWNKTLDMMFGKIYQVF : 146
BmoHb     : VNN-LNQP--EIVAAMMTKLGESRR-RQIKEKNFHELKEVIVKLFIDVL--RLDDATLSAWGKTVEFWYKHIFVTL : 144
AgaHb1    : IDYGLNDP--ALLKCSLAKLVRNRK-RNVTKEDVAAVGGVIMRYSLKALEQHKTKTLEEAFGAFLGTVAAAFE--- : 143
AgaHb2    : IEYGFKDP--VLFDATLRKITRRKD-RPVYTEDILTIGEVLLNYLEQALGRQMSDSLPDAFWKLFQTIAGRFPATP : 147
CttHbI    : MDLLGNDANTPTILAKAKDFGKSKS-RA-SPAQLDNFRKSLVVYLKGATK--WDSAVESSWAPVLDFVFSTLKNEL : 142
CttHbIIb  : VALMGNSANMPAMETLIKDMAANKA-RGIPKAQFNEFRASLVSYLQSKVS--WNDSLGAAWTQGLDNVFNMMFSYL : 143
CttHbIII  : IGEL------PNIEADVNTFVASKP-RGVTHDQLNNFRAGFVSYMKAHTD--F-AGAEAAWGATLDTFFGMIFSKM : 136
CttHbVI   : ISLAGSDANIPAIQNLAKELATSKP-RGVSKDQFTEFRTALFTYLKAHIN--FDGPTETAWTLALDTTYAMLFSAM : 143
CttHbVII6 : IALSGNTSNAAAVNSLVSKLGDDKA-RGVSAAQFGEFRTALVAYLQANVS--WGDNVAAAWNKALDNTFAIVVPRL : 143
CttHbVIII : IGLIGNPENRPALKTLIDGLASSKA-RGIEKAQFEEFRASLVDYLSHHLD--WNDTMKSTWDLALNNMFFYILHAL : 143
CttHbIX   : VALVGNESNAPAMATLINELSTSHN-RGITKGQFNEFRSSLVSYLSSHAS--WNDATADAWTHGLDNIFGMIFAHL : 143
CttHbX    : VTLLGSSGNQAAIRTLLHDLGVFKT-RGITKAQFGEFRETMTAYLKGHNK--WNADISHSWDDAFDKAFSVIFEVL : 143
CttHbE    : IDDL------PNIGKHVDALVATKP-RGVTHAQFNNFRAAFIAYLKGHVD--YTAAVEAAWGATFDAFFGAVFAKM : 137
CttHbZ    : IALSGSESNLSAIYGLISKMGTDKN-RGITQTQFNEFRTALVSYISSNVS--WGDNVAAAWTHALDNVYTAVFQIV : 143
CttHbV    : IALSGNEANLSAVYGLVKKLGVDKN-RGITQGQFNEFKTALISYLSSHVS--WGDNVAAAWEHALENTYTVAFEVI : 143
CttHbW    : VSLVGNPAVQSSIDLLLVKMANDKA-RGVTKELFEKFNIAFMGYLKSHTT--WDEKTENAWKVVGDEHHAIVYSIL : 141
CttHbY    : ISLLGNPDNLPAIMSLLSKLGKDKG-RGITVKQFDEFHEAFHNFLHTHSV--WNDNVDAAWHCNEKEIRKVINANL : 142
```

8.2. *Speleonectes tulumensis* Hämocyanin

8.2.1. Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Nukleotid- und Aminosäuresequenz der drei Hämocyaninuntereinheiten StuHc1, StuHc2 und StuHc3 aus *Speleonectes tulumensis*. Jeweils gekennzeichnet: das Startcodon ATG ist in rot markiert, das Stoppcodon durch drei Sterne dargestellt. Das für die Sekretion notwendige N-terminale Signalpeptid ist blau, das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen. Die für die Kupferbindung sechs wichtigen Histidine sind gelb schattiert.

8.2.1.1. Hämocyaninuntereinheit 1 (StuHc1, FM863709)

```
   ggacactgacatggactgaaggagtagaaagtcgtccttggcgtagaactgaccaaa
atgaagagcttcatctttctgttggtagttggcgttgcctgggcaggcactctgtctgac
M  K  S  F  I  F  L  L  V  V  G  V  A  W  A  G  T  L  S  D
cagatggtgggtgattctcctgtcttcattccaggagatgccgactttctgcaaaagcag
Q  M  V  G  D  S  P  V  F  I  P  G  D  A  D  F  L  Q  K  Q
agtaagatcctgaagctgttcaataagatccacgaacacaaccgctacaatgatcaggtc
S  K  I  L  K  L  F  N  K  I  H  E  H  N  R  Y  N  D  Q  V
gatattgcaacgtccttcaacccctttggatcatctcggtgacttcaagcaccgtgactgt
D  I  A  T  S  F  N  P  L  D  H  L  G  D  F  K  H  R  D  C
gtcctcaagctggtgaagaagtacaaggcacacaggctgctgccccgtggacacgtcttc
V  L  K  L  V  K  K  Y  K  A  H  R  L  L  P  R  G  H  V  F
aatctgttcagaccccgcgacagggaggagatggtcatgttcttcgaggctctcttctat
N  L  F  R  P  R  D  R  E  E  M  V  M  F  F  E  A  L  F  Y
gccaagacctgggacaccttctacaagatagcctgctgggccagggacaaaataaacgag
A  K  T  W  D  T  F  Y  K  I  A  C  W  A  R  D  K  I  N  E
aaccagttcttgtacgccatgtacgtcgcagtccaccaccgccacgactgcaagggcgtc
N  Q  F  L  Y  A  M  Y  V  A  V  H  H  R  H  D  C  K  G  V
ttgctcccaccccagtatgagatctacccacagctgttcgtcaacaatgacgtcatccaa
L  L  P  P  Q  Y  E  I  Y  P  Q  L  F  V  N  N  D  V  I  Q
gaagcatacagcgcaaagatgaagcaggtacccgcaaccatcaagatgcattggactggc
E  A  Y  S  A  K  M  K  Q  V  P  A  T  I  K  M  H  W  T  G
accatccgcaaccccgagcagcatgtggcctacttcggcgaggatttgggcttgaactcc
T  I  R  N  P  E  Q  H  V  A  Y  F  G  E  D  L  G  L  N  S
catcacagccactggcacatggatttccccttctggtggaagaaggcatacggaaccgag
H  H  S  H  W  H  M  D  F  P  F  W  W  K  K  A  Y  G  T  E
aaggacaggaaaggagaactcttcttctactcccaccacgagctgaccaccagatatgac
K  D  R  K  G  E  L  F  F  Y  S  H  H  E  L  T  T  R  Y  D
ctccagagactgtccaacaacctgcccattgttggccctctcgcctgggataagccaatc
L  Q  R  L  S  N  N  L  P  I  V  G  P  L  A  W  D  K  P  I
cacaatggtttctatccacaagcagcttacaggaacggtcacgagttccccgctcgtcca
H  N  G  F  Y  P  Q  A  A  Y  R  N  G  H  E  F  P  A  R  P
gacgacgtgaagttcactgacctcgacaaagatggtttccatatcaaggtatcccagatg
D  D  V  K  F  T  D  L  D  K  D  G  F  H  I  K  V  S  Q  M
aaggaatacgagagaagaatcagagacgccattgccatgaaagccgtttatgggaaagac
K  E  Y  E  R  R  I  R  D  A  I  A  M  K  A  V  Y  G  K  D
ggtcacgcaatcagcctcaacaacactcatggcatcaacaccctcgcagagatcattgag
G  H  A  I  S  L  N  N  T  H  G  I  N  T  L  A  E  I  I  E
gcttctgccttcagcgtgaacccagacttctatggatctatacacaacatggcccatatc
A  S  A  F  S  V  N  P  D  F  Y  G  S  I  H  N  M  A  H  I
atgctgggagagttggatgaccctcagggcaaatacggaactccacccggagtgatggaa
M  L  G  E  L  D  D  P  Q  G  K  Y  G  T  P  P  G  V  M  E
catttcgagactgccacaagagatccctcattcttcaggctgcacaagtacatcgactcc
H  F  E  T  A  T  R  D  P  S  F  F  R  L  H  K  Y  I  D  S
ttcttcaaggagcacaaggatagtctcccaccatacacaacagatgagctggacttccac
F  F  K  E  H  K  D  S  L  P  P  Y  T  T  D  E  L  D  F  H
```

```
ggtgtcgaaatcgtcgatgtcgaggttgacaaactgatgacgttctttgatgacttcgaa
G  V  E  I  V  D  V  E  V  D  K  L  M  T  F  F  D  D  F  E
attgacctgacaatggccctggatgacactcccgaactcgctgacgttccaataaaggct
I  D  L  T  M  A  L  D  D  T  P  E  L  A  D  V  P  I  K  A
atttcccaccgcctgaaccatgctcctttcacttacttactcaagatgaagagcgatgcc
I  S  H  R  L  N  H  A  P  F  T  Y  L  L  K  M  K  S  D  A
tcccacgttgcgactgttcgtatcttcttgggacccaaatacaactcctatggtgaagaa
S  H  V  A  T  V  R  I  F  L  G  P  K  Y  N  S  Y  G  E  E
ctctcactggacacaaagaggtggatgatggtcgaaatggacaagtttgttgtccacttg
L  S  L  D  T  K  R  W  M  M  V  E  M  D  K  F  V  V  H  L
cattctggaaacagcgaaattctgcgcaaatccactgaatcttctgttacgatccccgac
H  S  G  N  S  E  I  L  R  K  S  T  E  S  S  V  T  I  P  D
cccaagggatacaaaggtatggtggaggcagtaaagagtgccattgcaggcgacagcgaa
P  K  G  Y  K  G  M  V  E  A  V  K  S  A  I  A  G  D  S  E
tttaaagtcaacaaggaacaccgccactgtggaattccggacaggcttctgcttcctaaa
F  K  V  N  K  E  H  R  H  C  G  I  P  D  R  L  L  L  P  K
ggaagcaaggaaggaacacctttcaccctcttcgtcatggtgaccgacttcgatgatgat
G  S  K  E  G  T  P  F  T  L  F  V  M  V  T  D  F  D  D  D
aacgccaacaccgatgttgagtcgactcatgattatggcggctccatcagctactgcggc
N  A  N  T  D  V  E  S  T  H  D  Y  G  G  S  I  S  Y  C  G
actctgactgaaggtcagaagtaccctgacaaaaagcccatgggcttcccatttgatcgc
T  L  T  E  G  Q  K  Y  P  D  K  K  P  M  G  F  P  F  D  R
cacattgaggatgtccatgacttcaagaccaagaacatgatcgtcaaggacgtcgttgtc
H  I  E  D  V  H  D  F  K  T  K  N  M  I  V  K  D  V  V  V
actcataagagcgaccactagaggtccagtaaggccctcgtccgcataacagacaggcta
T  H  K  S  D  H  ***
aaccatcgctgcaagaacatcaaatgtttaaggttttaaaactcaacttgtatatatata
tatatatatatctttttttgtgcacttcaaaatgactttgtttctccattcggatgtctt
ttactaaagcctaaagtcaacctatcatttcatgtgaaaatgcatgcctgtctgtattag
aaacttttggtatctgaactcttttgagaatttaaattttgaacatggtgatatgtatca
aataattaaatgataaataaattct
```

8.2.1.2. Hämocyaninuntereinheit 2 (StuHc2, FM863710)

```
        ggacacctgacatggactgaaggagtagaaaacccatctggtcacggtcaca
atgaggtcacttgcggtcttactcctgctcttggtagcggcctccgctgcagatgaggtg
M  R  S  L  A  V  L  L  L  L  L  V  A  A  S  A  A  D  E  V
ttcctgaagaggcagcgcgacattctgctgctcctgttgagattgcatcagcctaacgcc
F  L  K  R  Q  R  D  I  L  L  L  L  L  R  L  H  Q  P  N  A
atcccggagcagaagtccacctcggagagctacgacccgctcatgcacctgtcccacttc
I  P  E  Q  K  S  T  S  E  S  Y  D  P  L  M  H  L  S  H  F
aagaaacccgaacttgtccaggaactggtagatgagattacccatggcaccacgctgcca
K  K  P  E  L  V  Q  E  L  V  D  E  I  T  H  G  T  T  L  P
agaggcgaaatcttcaacctttcaacacggagcataggaccagtatgatccacgtgttc
R  G  E  I  F  N  L  F  N  T  E  H  R  T  S  M  I  H  V  F
gaggttcttttcttcgccaaggacttcgacactttcttcaagactgccgtatatgcacgt
E  V  L  F  F  A  K  D  F  D  T  F  F  K  T  A  V  Y  A  R
gaccgggtcaatgagttcttgttctattatgccttcagcgtggcagctgttcgaagaagt
D  R  V  N  E  F  L  F  Y  Y  A  F  S  V  A  A  V  R  R  S
gactgcgaggggctccagttaccacccccctatgagatcttccctcacttctttgtcaca
D  C  E  G  L  Q  L  P  P  P  Y  E  I  F  P  H  F  F  V  T
agtgacgtaatcaggtcagcctacaaggcgaagatgatgcatactccaacgatcattgat
S  D  V  I  R  S  A  Y  K  A  K  M  M  H  T  P  T  I  I  D
atgcactggactggctccatccacaaccccgagcagcgtgtcgcctactacggtgaagat
M  H  W  T  G  S  I  H  N  P  E  Q  R  V  A  Y  Y  G  E  D
gtgggtctgaactcacatcatagccactggcataaggacttccccttctggtggaaacca
V  G  L  N  S  H  H  S  H  W  H  K  D  F  P  F  W  W  K  P
gagtatggcattgagctggaccgcaaaggagagcttttcttctacaatcaccatcagatg
E  Y  G  I  E  L  D  R  K  G  E  L  F  F  Y  N  H  H  Q  M
acatccaggtttgacctggagagactgtctaatgacctgactatttccaagcctcttgct
```

```
T  S  R  F  D  L  E  R  L  S  N  D  L  T  I  S  K  P  L  A
tggtacaggccagtagtcgagggtttcagtccagatgccatctacaaacatgggttccag
W  Y  R  P  V  V  E  G  F  S  P  D  A  I  Y  K  H  G  F  Q
ttccccatgagacctgacaacaccaagttccatgacctttctacagtaactgtcaatcat
F  P  M  R  P  D  N  T  K  F  H  D  L  S  T  V  T  V  N  H
atgagggcttatgagtcaagaatccatgagagtatagactttggacatgtttattctaca
M  R  A  Y  E  S  R  I  H  E  S  I  D  F  G  H  V  Y  S  T
aatggtacagaagtgtccctgaatgatgagcatggaatcaacattttaggtgaaatagta
N  G  T  E  V  S  L  N  D  E  H  G  I  N  I  L  G  E  I  V
gaggcttctgaacacagcataaatccagactattatggcagcctacataacttagcccat
E  A  S  E  H  S  I  N  P  D  Y  Y  G  S  L  H  N  L  A  H
gttatgcttggcaggataaccgatcctgaaggcaaatttgatgctcctccaggtgtgatg
V  M  L  G  R  I  T  D  P  E  G  K  F  D  A  P  P  G  V  M
gaacattttgagactgccacacgagatccatctttcttcaggctccacaaatacatagac
E  H  F  E  T  A  T  R  D  P  S  F  F  R  L  H  K  Y  I  D
aacattttcaagtctcacaaggaccatctaaccccatacacacataaggagttggagttc
N  I  F  K  S  H  K  D  H  L  T  P  Y  T  H  K  E  L  E  F
ccaggtgtcacagttactgctgctaaggttgtggggttgagccatgctagcactcccaat
P  G  V  T  V  T  A  A  K  V  V  G  L  S  H  A  S  T  P  N
atgcttatcacccatttcaataacttctacatcgacttgcacaatgcacttgacacaaca
M  L  I  T  H  F  N  N  F  Y  I  D  L  H  N  A  L  D  T  T
accacactgggagatgttgacattaaggctcgcataggcagaatggctcatgagcctttc
T  T  L  G  D  V  D  I  K  A  R  I  G  R  M  A  H  E  P  F
aagtacaccatcaatgtgaactctgagagacctgtcactgccacagtccgaatcttcttg
K  Y  T  I  N  V  N  S  E  R  P  V  T  A  T  V  R  I  F  L
gctcctgcctacaactggtatggtgaggaaatccatcttgatgagggaagatggttggca
A  P  A  Y  N  W  Y  G  E  E  I  H  L  D  E  G  R  W  L  A
gttgaattggataagtttgctgtgaagttgcatgagggtgagaatgtcataacacgtttg
V  E  L  D  K  F  A  V  K  L  H  E  G  E  N  V  I  T  R  L
tcaaaggactccaccatcactatcccagacatgaagtcccacaaggatatgatccgtgag
S  K  D  S  T  I  T  I  P  D  M  K  S  H  K  D  M  I  R  E
gtggagagtgctctggcaggtgaacttgaataccatattgacgaacatcatcgtcattgt
V  E  S  A  L  A  G  E  L  E  Y  H  I  D  E  H  H  R  H  C
gggttctctcaaggtctgctgatccctaagggtagtgaggctggaacacacttcaaagta
G  F  S  Q  G  L  L  I  P  K  G  S  E  A  G  T  H  F  K  V
ttcattatgctgactgactgggacaaggatcatgccaatgcagatgctcacccagaagat
F  I  M  L  T  D  W  D  K  D  H  A  N  A  D  A  H  P  E  D
gattatggtggttccattggatattgtggtgctctctgggccaaatatcctgacaagaag
D  Y  G  G  S  I  G  Y  C  G  A  L  W  A  K  Y  P  D  K  K
cccatgggtttcccctttgatcgtcacatacaggatgaagaagatttcttcacagaaaac
P  M  G  F  P  F  D  R  H  I  Q  D  E  E  D  F  F  T  E  N
atgaaacttattgatgttgtcattaagaatattaaataagaagagtggaagactatatcc
M  K  L  I  D  V  V  I  K  N  I  K  ***
attctgcctcagcatcagacaaattacactgattcttttccagttcatctatgaaaaatt
taaaattatttcctgataacaagatactaaaatataatttaacctttatgaagttagctc
agtttgacataatgccatattaaaaccaaaagaaaagtatgaaaccttgattccatatgt
tataaatttttacttgagtgtacaatcagtaagagaattttaacctcaagttgtcccata
ctttttctgtaatatcatgtgtactcatttttgctgttctcaaattacagttaggaaga
tgtagtgaatatcacagtgaggaatgtacaaagctcttggatgataactggtttcaaatt
ctgtaatgatgatgtaaaaacatagcaataaatgaaaagatgggatataaattaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

8.2.1.3. Hämocyaninuntereinheit 3 (StuHc3, FM863711)

```
                                                          g
gacactgacatggactgaaggagtagaaagcctccgtgtctcgtctcactgacgcacagc
atgaagttcctcctcgttttgctggtcgcagggttcgctgcagccatccaccgtgaagtc
M  K  F  L  L  V  L  L  V  A  G  F  A  A  A  I  H  R  E  V
atcgacgctgacaagggctttctgaagcgccagaaggatgtcctcaccttgctgaaccat
I  D  A  D  K  G  F  L  K  R  Q  K  D  V  L  T  L  L  N  H
```

```
gtcttcagccacttccaggacgccgcccaccaggaggacgggaggacgtacgagccgctc
V  F  S  H  F  Q  D  A  A  H  Q  E  D  G  R  T  Y  E  P  L
aaccacctcacatcctaccaggacccgactccggtgaagaagctggtgaggatgtacaag
N  H  L  T  S  Y  Q  D  P  T  P  V  K  K  L  V  R  M  Y  K
atgggcgactgcctgaagcagagcgagatcttctgcctcttcaccgaccaccaccgtcac
M  G  D  C  L  K  Q  S  E  I  F  C  L  F  T  D  H  H  R  H
gagatgatcttgctcttcgaggccctctactacgccaaggactggggcaccttcatgaag
E  M  I  L  L  F  E  A  L  Y  Y  A  K  D  W  G  T  F  M  K
atggcacgttgggcccgcgtccacctcaacggcgccctcttcgtctacagtgtgaaggtg
M  A  R  W  A  R  V  H  L  N  G  A  L  F  V  Y  S  V  K  V
gcgttgctgcaccgacaggacacgtacggaatacgcctcaccccggcgtacgagctgaac
A  L  L  H  R  Q  D  T  Y  G  I  R  L  T  P  A  Y  E  L  N
ccgcacatgttcgtcaccaacgacgccatcaccaaggcctacagtgccaagatgaggaac
P  H  M  F  V  T  N  D  A  I  T  K  A  Y  S  A  K  M  R  N
aaagacgcggtggtgcgcgtggagttcacgggtaccatccacaaccccgagcagcacgtg
K  D  A  V  V  R  V  E  F  T  G  T  I  H  N  P  E  Q  H  V
gcctactacggtgaggacatcggcatgaactcgcaccacagccactggcatatggacttc
A  Y  Y  G  E  D  I  G  M  N  S  H  H  S  H  W  H  M  D  F
cccttctggtggaagaaggattacccgacgcagatggaccgcaagggcgagctcttctgg
P  F  W  W  K  K  D  Y  P  T  Q  M  D  R  K  G  E  L  F  W
tacgcgcaccaccagctcaccacccgcttcgacttggagcgcctctccaacaacctggac
Y  A  H  H  Q  L  T  T  R  F  D  L  E  R  L  S  N  N  L  D
gtcgtgaagccgctcgcctgggacaagcccatcgagcatggcttctcgcccgagaccgtg
V  V  K  P  L  A  W  D  K  P  I  E  H  G  F  S  P  E  T  V
tacaggacgggagatgagttccccgtcaggcccgacgacatgatgttccacgacatccat
Y  R  T  G  D  E  F  P  V  R  P  D  D  M  M  F  H  D  I  H
ggcatcgtcagcgtcaccgacatgaaggccatggagtataggatcctgcacaccatcgac
G  I  V  S  V  T  D  M  K  A  M  E  Y  R  I  L  H  T  I  D
gccaacttgtacgttgcggagaacgggactttccccaagctggaggtggacacggggatc
A  N  L  Y  V  A  E  N  G  T  F  P  K  L  E  V  D  T  G  I
aacactttgggtgagatcatcgaagcgtctgagcacagcgtcaacccgggcttctacaag
N  T  L  G  E  I  I  E  A  S  E  H  S  V  N  P  G  F  Y  K
agcatccacactctctctcacgtcatgctcggcaagatcaccgaccccgaacacaagtat
S  I  H  T  L  S  H  V  M  L  G  K  I  T  D  P  E  H  K  Y
ggcatgcctccaggtgtgatggagcacttcgagacgtccaccagggaccccgccttcttc
G  M  P  P  G  V  M  E  H  F  E  T  S  T  R  D  P  A  F  F
cgcctgcacaagtacatcgacaacctcttcagaacatacaaggagcacctgccaccctac
R  L  H  K  Y  I  D  N  L  F  R  T  Y  K  E  H  L  P  P  Y
accaaggaagggctggctgtcgacgggttgaaggtcaatgacgtcgaggtcactgaactg
T  K  E  G  L  A  V  D  G  L  K  V  N  D  V  E  V  T  E  L
aagaccttttcgaggacttcgagttcgacctgacgcaggggatggagctaacgggcacc
K  T  F  F  E  D  F  E  F  D  L  T  Q  G  M  E  L  T  G  T
ggcgacgacgcccacatcaaggcggtgatggcgcgcatcaaccacaagccgttccactac
G  D  D  A  H  I  K  A  V  M  A  R  I  N  H  K  P  F  H  Y
accatcaaggtgaacagcgacgtcaagcgcacggggatggtgcgcatcttcctggcgccc
T  I  K  V  N  S  D  V  K  R  T  G  M  V  R  I  F  L  A  P
aaatacgactggtacggcgaggagatcgacataacacacaacgcctggcagactgtcggg
K  Y  D  W  Y  G  E  E  I  D  I  T  H  N  A  W  Q  T  V  G
ctcgacaagttcctggtgccactggacccaggcgagaacgtgatcgtgaggaagtcagac
L  D  K  F  L  V  P  L  D  P  G  E  N  V  I  V  R  K  S  D
gagtcgactgtcaccatcccggacccgcctagctacgcccagttggtgaaggaggtggag
E  S  T  V  T  I  P  D  P  P  S  Y  A  Q  L  V  K  E  V  E
gacgccctcagtggcacttccgttctcaaagtacacaagttccaccgtcactgcggcatc
D  A  L  S  G  T  S  V  L  K  V  H  K  F  H  R  H  C  G  I
cccgaccgaatgctgcttcccaagggtaaagtcggcggcatggagttcatgctgctggtc
P  D  R  M  L  L  P  K  G  K  V  G  G  M  E  F  M  L  L  V
gtcgtgaccgacggcggcgccgacaagggggtcaccatccacgacgatcacatatacggc
V  V  T  D  G  G  A  D  K  G  V  T  I  H  D  D  H  I  Y  G
ggctccacctcgctgtgtggcatcaggggcgagaagtatcccgacaagagggcgctcggc
G  S  T  S  L  C  G  I  R  G  E  K  Y  P  D  K  R  A  L  G
ttcccgttcgaccgctacatccacagtgtggaggacttcgtcactcccaacatgttctgt
F  P  F  D  R  Y  I  H  S  V  E  D  F  V  T  P  N  M  F  C
```

```
aaagatgttgtcatcacccacgtcccgcacgcctagagccgtcgcctgcggccctcccag
K  D  V  V  I  T  H  V  P  H  A  ***
tcacgtgaccgccaactgggaggcgtgggaccttgtcttatgccttcagcgcgccgtcgc
ccggagtggacgcagaagctgtgaggcacgccctaccaacaactcgtactccagacgtca
tactcgacgtcacggacctggaggtcacctcaggtcaggcagacgtaacaggaagacctg
cttcatgtgttgaggcctgcgaggctgagccaaggaacgtagtcggacgcggtcctcact
cacctggacatgacagtctgtgtcttggagctagcgacatctggacattcacggacatgg
taccactgtgaaggcatgacacaagcacataacatggattcattcattcctgcattaaag
atgttggcttccaaatgtcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

8.2.2. Phylogenie

8.2.2.1. Verwendete Sequenzen

Folgende Sequenzen wurden bei den phylogenetischen Analysen der drei Hämocyanin-untereinheiten herangezogen. Bei der Benennung der Proteine ist die jeweilige Untereinheit mit „U“ abgekürzt.

Abkürzung	**Zugangsnummer**	**Protein**	**Artname**
EpiHc	CAD12808	Hämocyanin	*Epiperipatus* sp.
ScoHcC	Q8T115	Hämocyanin U C	*Scutigera coleoptrata*
ScoHcD	Q8T116	Hämocyanin U D	*Scutigera coleoptrata*
ScoHcB	Q8IFJ8	Hämocyanin U B	*Scutigera coleoptrata*
ScoHcA	Q95P08	Hämocyanin U A	*Scutigera coleoptrata*
SpiHc1	CAC33894	Hämocyanin U 1	*Spirostreptus* sp.
AuaHc6	P80476	Hämocyanin U 6	*Androctonus australis*
CsaHc1	CAC44749	Hämocyanin U 1	*Cupiennius salei*
EcaHcA	P14750	Hämocyanin U A	*Eurypelma californicum*
EcaHcB	Q9NFH9	Hämocyanin U B	*Eurypelma californicum*
EcaHcC	Q9NFL6	Hämocyanin U C	*Eurypelma californicum*
EcaHcD	P02241	Hämocyanin U D	*Eurypelma californicum*
EcaHcE	P02242	Hämocyanin U E	*Eurypelma californicum*
EcaHcF	Q9NFL5	Hämocyanin U F	*Eurypelma californicum*
EcaHcG	Q9NFL4	Hämocyanin U G	*Eurypelma californicum*
LpoHcI	1LL1_A	Hämocyanin U I	*Limulus polyphemus*
LpoHcII	CAJ91097	Hämocyanin U II	*Limulus polyphemus*
LpoHcIV	CAJ91099	Hämocyanin U IV	*Limulus polyphemus*
LpoHcVI	CAJ91100	Hämocyanin U VI	*Limulus polyphemus*
NinHcA	CAD68052	Hämocyanin U A	*Nephilia inaurata*
NinHcB	CAD68053	Hämocyanin U B	*Nephilia inaurata*
NinHcD	CAD68054	Hämocyanin U D	*Nephilia inaurata*
NinHcE	CAD68055	Hämocyanin U E	*Nephilia inaurata*
NinHcF	CAD68056	Hämocyanin U F	*Nephilia inaurata*
NinHcG	CAD68057	Hämocyanin U G	*Nephilia inaurata*
TtrHcA	AAZ40335	Hämocyanin U A	*Tachypleus tridentatus*
HamHcA	AJ272095	Hämocyanin U A	*Homarus americanus*
PinHcB	P10787	Hämocyanin U b	*Panulirus interruptus*
PinHcA	P04254	Hämocyanin U a	*Panulirus interruptus*
PinHcC	S21221	Hämocyanin C	*Panulirus interruptus*
PvaHc1	AJ250830	Hämocyanin U 1	*Penaeus vannamei*
PvaHc	X82502	Hämocyanin	*Penaeus vannamei*
PelHc1	AJ344361	Hämocyanin U 1	*Palinurus elephas*
PelHc2	CAC69244	Hämocyanin U 2	*Palinurus elephas*
PelHc3	CAC69245	Hämocyanin U 3	*Palinurus elephas*

PelHc4	CAD56697	Hämocyanin U 4	*Palinurus elephas*
EpuHc1	EST	Hämocyanin U 1	*Eurydice pulchra*
CcsHc	ABB59715	Hämocyanin	*Cyamus scammoni*
GpuHc1	CAI78901	Hämocyanin U 1	*Gammarus roeseli*
GroHc1	CAI78901	Hämocyanin U 1	*Gammarus roeseli*
PleHc	AF522504	Hämocyanin	*Pacifastacus leniusculus*
PleHc2	AAO47336	Hämocyanin U 2	*Pacifastacus leniusculus*
CmaHc1	AAW57889	Hämocyanin U 1	*Cancer magister*
CmaHc2	AAW57890	Hämocyanin U 2	*Cancer magister*
CmaHc3	AAW57891	Hämocyanin U 3	*Cancer magister*
CmaHc4	AAW57892	Hämocyanin U 4	*Cancer magister*
CmaHc5	AAW57893	Hämocyanin U 5	*Cancer magister*
CmaHc6	U48881	Hämocyanin U 6	*Cancer magister*
CsaHc	AF249297	Hämocyanin	*Callinectus sapidus*
CmaCC1	AF091261	Cryptocyanin 1	*Cancer magister*
CmaCC2	ABB59714	Cryptocyanin 2	*Cancer magister*
HamPHc1	AJ132141	Pseudohämocyanin 1	*Homarus americanus*
HamPHc2	Q6KF81	Pseudohämocyanin 2	*Homarus americanus*
StuHc1	FM863709	Hämocyanin U 1	*Speleonectes tulumensis*
StuHc2	FM863710	Hämocyanin U 2	*Speleonectes tulumensis*
StuHc3	FM863711	Hämocyanin U 3	*Speleonectes tulumensis*
SamHc1	AF038569	Hämocyanin U 1	*Schistocerca americana*
PgrHc1	DQ118369	Hämocyanin U 1	*Perla grandis*
PgrHc2	DQ118370	Hämocyanin U 2	*Perla grandis*
PmaHc1	AJ555403	Hämocyanin U 1	*Perla marginata*
PmaHc2	AJ555404	Hämocyanin U 2	*Perla marginata*
TdoHc1	FM165288	Hämocyanin U 1	*Thermobia domestica*
TdoHc2	FM165289	Hämocyanin U 2	*Thermobia domestica*
ScuHc1	FM242638	Hämocyanin U 1	*Sinella curviseta*
CacHc1	FM242641	Hämocyanin U 1	*Chelidurella acanthopygia*
CmoHc1	FM242640	Hämocyanin U 1	*Carausius morosus*
LmiHc1	FM242651	Hämocyanin U 1	*Locusta migratoria*
HmeHc1	FM242642	Hämocyanin U 1	*Hierodula membranacea*
HmeHc2	FM242643	Hämocyanin U 2	*Hierodula membranacea*
BduHc1	FM242646	Hämocyanin U 1	*Blaptica dubia*
BduHc2	FM242647	Hämocyanin U 2	*Blaptica dubia*
CseHc1	FM242644	Hämocyanin U 1	*Cryptotermes secundus*
CseHc2	FM242645	Hämocyanin U 2	*Cryptotermes secundus*
PamHc1	FM242648	Hämocyanin U 1	*Periplaneta americana*
PamHc2	FM242649	Hämocyanin U 2	*Periplaneta americana*
MgeHc1	FM242639	Hämocyanin U 1	*Machilis germanica*
TdoHex1	FM165290	Hexamerin 1	*Thermobia domestica*
PmaHx1	AM690365	Hexamerin 1	*Perla marginata*
LmiHex1	EST	Hexamerin 1	*Locusta migratoria*
LmiHex2	EST	Hexamerin 2	*Locusta migratoria*
RmiHx1	AY923852	Hexamerin 1	*Romalea microptera*
BdiHex	U31328	Hexamerin	*Blaberus discoidalis*
PamHex12	L40818	Hexamerin (Allergen C12)	*Periplaneta americana*
RflHex1	AY572858	Hexamerin 1	*Reticulitermes flavipes*
RflHex2	AY572859	Hexamerin 2	*Reticulitermes flavipes*
AgeHex2	AY293287	Arylphorin-Hexamerin 2	*Apriona germari*
TmoHex2	AF395329	Hexamerin 2	*Tenebrio molitor*
LdeDP1	X76080	Diapauseprotein 1	*Leptinotarsa decemlineata*
CfeHex2	AJ251271	Hexamerin 2	*Camponotus festinatus*
BheHex	I25974	Hexamerin	*Bracon hebetor*
MseAryla	M28396	Arylphorin alpha	*Manduca sexta*
MseArylb	M28397	Arylphorin beta	*Manduca sexta*
AgaHex2	XM321800	Hexamerin 2	*Anopheles gambiae*

8.2.2.2. Alignment

Die phylogenetischen Analysen erfolgten auf Basis des folgenden Alignments.

```
           ****************************************
EpiHc      M-------------------------------------PSTSQQKEVLDFFNIPETRRVSRAKQ-KDKPSVIF---KPLPAGIG---------------   43
LpoHcI     M-------------------------------------TVKEKQSRLLPLFKHLT----SLTRD-QLPVG-LR---DDRLKDVG---------------   38
TtrHcA     -------------------------------------TIKEKQASILALFEHLT----SVPKQ-HIPEK-ER---DNRLHDVG---------------   37
EcaHcE     M-------------------------------------PDKQKQLRVISLFEHMT----SIN-T-PLPRD-QI---DARLHHLG---------------   37
NinHcE     M-------------------------------------SVKEKQQRVCSLFTHLT----SISRT-AVPLA-DR---DPRLHGIG---------------   38
EcaHcG     M-------------------------------------ASIPEKQALILPLFEKLT----SLTKE-TPPRA-QW---DPRLAGVG---------------   39
NinHcG     M-------------------------------------SIKEKQDQILPLFEKLT----TLTRQ-QIPPE-QR---DPRLIGVG---------------   38
CsaHc1     M-------------------------------------AIKDKVEKLLPLFEKLT----SLTKQ-QLAPD-QR---DPRLASVG---------------   38
AauHc6     -------------------------------------TVADKQARLMPLFKHLT----ALTRE-KLPLD-QR---DERLKGVG---------------   37
LpoHcIV    M-------------------------------------TLKEKQDRILVLFEHLT----SLTKH-QLPED-QR---DPRLHDLG---------------   38
EcaHcF     M-------------------------------------TVQDKQRQILPLFEHLT----SLTRG-GLDRT-ES---DVRLRRVG---------------   38
NinHcF     M-------------------------------------PAQDKQRRILPLFEHLA----SLTRA-VLPPE-ER---DPRLKRLG---------------   38
EcaHcD     M-------------------------------------TIADHQARILPLFKKLT----SLSPD-PLPEA-ER---DPRLKGVG---------------   38
NinHcD     M-------------------------------------SVKDKQAQILPLFKNLT----ALAPE-TLPEA-ER---DPRLKGVG---------------   38
LpoHcII    M-------------------------------------TLHDKQIRVCHLFEQLS----SATVI-GNGDKHKH---SDRLKNVG---------------   39
EcaHcA     M------------------------------------TILHDKQVQALKLFEKLS---VAATGE-PVPAD-QI---DERLRNIT---------------   40
NinHcA     M------------------------------------SLLHEKQVRVLKLFERLS---VAASGE-KIPAD-QI---DARLSTVG---------------   40
LpoHcVI    M-----------------------------------VLGALEKQLRVLPLFEYAS----IPTKE-KFALKAHR---DPKLQGLG---------------   41
EcaHcB     M-------------------------------------PSTAEKQRRILPFFQFTS----LSTKD-KFGILVQR---DPRLAGLG---------------   40
NinHcB     M-------------------------------------SSASEKQKRVLPLFQYVS----FSTKD-KFGMRVQR---DPRLSGLG---------------   40
EcaHcC     M------------------------------------PSDANEMQARLLQLFEHST----LSTKA-KFGLRVIR---DPKLAGIG---------------   41
ScoHcA     M-------WS-LALATLFVLGTVIRADQC----PPVPADTKDKLEKILELIGHVNRPLTPETPE---PAG-YD---ETKLKGLG---------------   65
ScoHcB     M---VA--KWCVLAMCLLVAVG----ADKC----PRA-TDQEAKQKRMLEVLQHVNKPYVAETKDPKIPAG--S---EDVFKHLG---------------   66
ScoHcC     M---GAWKVWTFFAIALVVAVKAYDEEAKC----MSHDEDSQVKERQILHIVDSINKPISPDFRA---PRGVID---EHKLRGLG---------------   72
ScoHcD     M---DT--RVLRLTLALVALSGVLADSESCS---SAIVNDYKLKQKEIQHLVDTINKPVYPDFKD---TRGIID---ESKLKGLG---------------   71
SpiHc1     M-------KLFILAVVLLATTAI---AEKCP---KP--VNVEAKQKMVDTLISYINKPANPVP-----PKPPID---PKKLIGIG---------------   62
GpuHc1     M---KLLLLCL-AATSAFAWPSYV----------NDAAPSLAVRQQAVNHLLYRVTEPL--RFDDLKAAAASFN---PVADKSIYTDGGVA--AQHLVDE   79
GroHc1     M---KLLLLCL-AATSRFAWPSFV----------NDAAPSLAVRQQAVNHLLYRVTEPL--RFDDLKAAAASFN---PVADKSIYTDGGAA--AQHLVDE   79
CcsHc      M---RTLAFCL-LVASAAAWPHFFQN--------DHPTDSLTQRQHDINQILTRITEDL---TGDAKALAESFD---PIADTSIYKDDGKA--AKKLVQE   80
EpuHc1     I--------VLLLVSTAAAWPNWA----------NDAPVSSAKKQQDILRLLYKVTEHIRERFTDLKDASKNFD---PLADLTHYTDGGAS--VKTLMGE   77
PleHc2     MVLVKLLVLCS-LVAAAAAWPSF---GQDGFQSDAP-DATLAKRQQVVNHLLDYIYDHL--HYTDLKGIAGTFS---PEADTSIYTDDGAA--AHVLMEE   88
HamHcA     T----------LVAAAAAWPSFSYQN-------DASGDSTAKRQQDVNHLLDRIYDHL--HYSDLKQISETFS---PEADTSMYTDGGTA--AHHLMEE   75
PinHcB     ------------------------------------DALGTGNANKQQDINHLLDKIYEPT--KYPDLKDIAENFN---PLGDTSIYNDHGAA--AEALMKE   59
PinHcA     ------------------------------------DALGTGNAQKQQDINHLLDKIYEPT--KYPDLKEIAENFN---PLGDTSIYNDHGAA--VETLMKE   59
PelHc1     ----KVLVLCA-LVATAAAWPSFSGELTNGFQS-DVHSSDNAHKQQDVNHLLDKIYEPI--KDEELHNIAQTFD---PVADTSIYGDVGAA--AKTLMQE   87
PelHc4     M---KVLVLCA-LVATAAAWPSFSGELPNGFQS-DVHSSDNAHKQQDVNHLLDKIYEPI--KDEELHNIAQTFD---PVADTSIYVDDGAA--AKTLMQE   88
PelHc3     ----KVLVLCA-LVATAAAWPSFSGELTNGFQS-DVHSSDNAHKQQDVNHLLDKIYEPI--KDEKLHNTAQTFD---PVADTSIYGDDGAA--AKTLMQE   87
PelHc2     ----KVLVLCA-LVATAAAWPSFSGELTNGFQS-DVHSSDNAHKQQDVNHLLDKIYEPI--KDEELHNIAQTFD---PVADTSIYVDDGAA--AKTLMQE   87
CmaHc6     M---KLLVLFA-LVAAAAAWPNFGIMAD------SAGGAFDAQKQHDVNSALWKVYEDI--QDPHLIQLSQNFD---PLS--GHYDDDGVA--AKRLMKE   81
CmaHc4     M---KLLVLFA-LVAAAVAWPSFGMMAD------S-AGAPDAHKQHDVNSVLWKVYEDI--RDPHLKELSQSFD---PLS--GHYDDDGVA--AKRLMKE   80
CmaHc5     M---RLLVLCT-LVAAAAAWPNFGMMAD------SPGGASDVQKQHDVNSALWKVYEDI--RDSNLIQLSQSFD---PLS--GHYDDDGVA--AKRLMKE   81
CsaHc      M---KLLLLCA-LVAGASAWPNFGMMAD------SPGGASNAQKQHDVNSILWKVYEEI--RDPHLKELSQSFD---PLS--GHYDDDGVA--AKRLMKE   81
CmaHc3     M---RLLVLCALGLLCLLPGGS----------CDHHVSLAHKQHDVNSALWKVYEDI--RDTHLKELSQSFD---PLS--GQYDDNGVA--AKRLMKE   76
PvaHc1     L---------LALVAAAAAWPNFGFQS-------DAGGESDAQKQHDVNFLLHKIYGNI--RYSDLKAKADSFD---PAGRFGSYSDGGEA--VQKLVRE   77
PvaHc      M---RVLVVLGLVAAAA-----------------FQVASADVQQQKDVLYLLNKIYGDI--QDGDLLATANSFD---PVGNLGSYSDGGAA--VQKLVQD   73
PinHcC     A-----------------------------DCQAGDSADKLLAQKQHDVNYLVYKLYGDI--RDDHLKELGETFN---PQGDLLLYHDNGAS--VNTLMAD   65
PleHc      M---QWTVLVAALLVAT-----------------VSADTDVAHQQQAINRLLYKVTSHIKSSFTDLKEAAETWN---PRDHTDKSSDGGAA--IKHLMDE   75
CmaHc1     M---KWAVVAAVLLVAA-----------------VAEGADLAHRQQAVNRLLYKIYSPIPSAFAKLKEHATTFN---PRDHISHCNDGGNS--VNHLMDE   75
CmaHc2     M---KWAVVAAVLLVAA-----------------VAEGADLAHRQQAVNRLLYKIYSPIPSAFAKLKEHATTFN---PRDHISHCNDGGNS--VNHLMDE   75
HamPHc1    ----------SLVVAAAAASPYSGSHDFSGFQRDEPDGVPTAQKQHDINFLLHKLYEPL--HEANLKALEDSFD---PLTHTANMPDAGVA--VNKLMQE   83
HamPHc2    V-------LLCSLVAATAAWPYFG-----GFQRDEPDGVPTAQKQHDINFLLHKLYEPL--HEANLKALEDSFD---PLAHTANMPDGGVA--VNKLMQE   81
CmaCC1     D-----------------------------------EPDGVSKYQKQHDVYYAFYKIFEPL--RESNLVEKAATFN---PVGDVSMYKDGGVA--VQNLMYE   60
CmaCC2     M---KVLVVFALVALSAAAAQAN-----------EPDGIPTYQKQHDVNNALYKIFEPL--REDNLRDKALTFN---PVGDVSIYRDGGVA--VRQLMYE   79
PmaHc2     M---KFALVLIGLCALAAA---------------DTVDDTFYKHQTQVLHLVEHIYEPISSHYEDLTTIKKTYD---PLQHLDNFKD-GDH--VKHFVHD   76
PgrHc2     M---KLALVLIGLCALAAA---------------DAVDDTFYKHQTQVLHLVEHIYEPISSHYEDLIYIKKTYD---PLQHLDLFKD-GEQ--VKHFVHD   76
CseHc2     M---RPATVLLIVLGACALASAE-----------QKADAIFLKRQLQVLNLLRHLNQPLID--PELLVFKNSFS---PLNNLNKFKD-PTA--VKNFLKL   78
PamHc2     M---KLVWALAIALGACALVVAD-----------QKADMTFLTRQLQVLKLLRHLNQPLSD--PELTAIKNSFS---PLNHLNKFKE-PET--VKLLVGL   78
BduHc2     M---KLLGILVSCACVVAAAVAVQ----------QKADGVFLNRQISVLKLLQHLNQPLVD--SDLTAYKESFS---PLNNLNRYRD-AEV--VKQYVGL   79
HmeHc2     ----------------------------------MADATFLKRQLHVLKLLRHISEPITD--PELHAKKQSGD---PANHLNKFND-PKA--VRHFVNL   57
TdoHc2     ----------------------------------MADETFLKRQMLILKLLRHISEPLED--PELVQIKDSYS---PLNSLSVYKD-PQL--VQKVVRK   57
SamHc1     M---RLMWLAVLVVAVALGGAQAGIGD-------VPADKPFLMKQREVLRLFNKVHEPNRY--KEQVELGNAYE---PLNSLPRYRN-PAP--VKQLVRL   82
BduHc1     M---KTLL-FLLLGVALYHQACARQAQINRG---VPVDREFLTRQNEILHLLNKVHEPNRF--KDQSELGRSYD---PTAHFDKYKN-ASP--VKSLVKL   85
PamHc1     M---KWQL-VTFLGVALCYLASAKLSE-------VPADKEFLVRQREVLRLLNKVHEPNRF--KEQAELGRSYD---PTAHFSKYKN-AVP--VKRMVKE   81
CseHc1     M---KCILTVALLGVAVCHLAQAKVMR--GE---APADKIFLSKQREVLKLLNKVHEPNRF--KDQADLGRSYD---PTQHLSKYKN-ALP--VKTLVKQ   84
HmeHc1     M---------------------GLVKYTGS---ASADKDFLVKQRQILRLCNKVHEPNRF--KEQAELGKNYE---PLKHLDKYKH-PRS--VKTLVKY   67
CmoHc1     M---QWVI-AAVLLAGLGQLVAAKYTR--GE---VPADKDFLLKQREVLKLLNKPHEPNRY--KDQADSGSKYE---PSNNLNRYKN-PVP--VKTLVKR   83
CacHc1     M---KLIPACLVVAVCIAYCCGVS----------VPADSGLVVRQYEILKLLNKVHEPNRI--KEQIEIGNSFD---LSTALTGFKN-PNA--AKALLKG   79
TdoHc1     M---RAVL-LLLLVGFTAHLVVGRVTR--GA---VPADKEFLLKQKEILQLLNKVHEPNRF--KEQVNLGNSYD---PLANLGNYKK-AAA--VHQLVKL   83
PmaHc1     M---KWLL-TLGLVMVLASLAQAKLTR--GS---VPADQDFLTRQRDVIRLCMKVHEHNHY--QEQVDLVKDYD---PSVA-GKFKD-VTP--IKRLMKY   82
PgrHc1     M---KWLL-TLGLLVVLASLAQAKLTR--GS---VPADHEFLVRQRDIIRLCMKVHQHNHY--EEQVDLVKDYD---PSVA-GKFKD-VTP--IKKLMKY   82
ScuHc1     M--ARFALTLIACTLVVAVAA-------------TPADQEFLTKQKEIVKLLNKVHELNFY--QDQATIGKDWD---PLAHLDSYKN-VRV--VKELVKE   77
MgeHc1     M---KTVFCLLLALAASLAVPTKKD----------VPADHEFLVKQREILKLLFRAHEPNIS--EDQVDIAAKFD---IEANLDKFKE-VDS--VKELYEL   80
TdoHex1    M---AQTLVLISTLLVAFVAATNIHHYNRRYDDRVAADNYHLNKQDVIIKLLHRVHQPNQY--RDLADIGNNYN---IEQNVDKYQN-EEA--VRKFVEQ   89
PmaHex1    M---KSAFVLLALAAFAAASVL----PGDTTDHKRVADKEFLVKQKNLLQLFVRPHQYNLY--KEQAEIGKGYS---LESHLADYTN-AKA--VKQFLHV   85
BdiHex     M---KTALVLI-LATATLAVAYPSSTQDYR----VVADKTFLTRQRDFLRLLVRIEQPNYY--ADQYEVGNAYD---IEANINNYKY-PHV--VKNFLSA   84
RflHex2    M---RTAVLLVFLATAALAAANPSPSQESR----IIADKQFLQRQNDFLRLLVRIEQPNYY--EDQVTLGNSYD---IEVNIKNYKH-PQV--VKQFLSA   85
PamHex12   M---KTALVFAAVVA-FVAARFPDHKDYK-----QLADKQFLAKQRDVLRLFRHVHQHNIL--NDQVEVGNTYD---IEANIGNYST-PDV--VKQFMAY   83
RflHex1    M---NTALLFATVVAVLVCGAFSDHHVGK-----KVADKPFLMKQKNILGLVHRIHQDNLF--KEQVDVGNTYD---IEAHISNYKN-TKV--VKEFISY   84
LmiHex1    M---RTATVVVLSLLAALAAATAVPP--------SEADKELLEKQNKIIRLFYQVQQPTII--PEEQEIAKSYK---PIENIDNYQY-KDK--VEVFWKY   81
LmiHex2    M---RTATVVVLSLLAALAAAAVVPH--------SEAGKELLEKQDKLLRLFYHVHQPTLV--KEEQEIAKTYK---PIEHVDNYQY-KDK--VELFWKY   81
RmiHx1     M---RTATVVVLSLLAAFAAAAVVPH--------SEADKELLEKQRKLVKLFYHVQQPTFF--KSEQEIAKTYK---PIEHVDNYQY-KEK--VELFWKY   81
TmoHex2    M---RLILVALLAGLCAVSAVSV-------------HSTNYAQKQKDVWRLFKYINQPSYY--KDHVEIAHNYH---LSKNVAAYSK-PEV--VEQFYKY   76
AgeHex     M---KFSLILLVGLCALASSAVLHQHK--------VKVDQEYVQKQKQILHLFDHINQPSHH--REHVEIAKSFF---FGDHVDSYNK-PEV--VKKFIQY   82
LdeDP1     M---KISLVFLVGFCTAVLSNPV-------------ADTNYLKREQQILKLLYHVNQPSTY--PEHVEIGKSCMFCEKGSLYDKYEK-REV--VDNWVQF   79
AgaHex2    ------------------------------------KYAEKDWLHKQEDLLLLFRHLYEKDWN--PQLVAYAKNFH---FKESAELFQHEPTVQWAKKLWSY   61
MseAryla   M---KTVVILAGLVALALSSAVPPPKYQHHYKT-SPVDAIFVEKQKKVFSLFKNVNQLDYE--AEYYKIGKDYD---VEANIDNYSN-KKV--VEDFLLL   88
MseArylb   M---KTVIILAGLVALALGSEVPVKHSFKV----KDVDAAFVERQKKVLDLFQDVDQVNPN--DEYYKIGKEYN---IEANIDNYSN-KKA--VEEFLQL   85
CfeHex2    M---LKELLLLALVALCTTKGLHITG--------KTADLDFLHKQKKLYELLFFVKQNT-LTDMEFHKIGRDYN---IESNIDSYND-KLI--VQDFLHL   82
BheHex     M---LKKVFLLASLAIIVIKADTDFYYTD-----VIADQDFLLKQKKVFQLLYHVSQPD-ISNPELFQEGLAYD---IGANIDSYSN-KDA--VNHFLEL   85
StuHc2     M---RSLAVLLLLLVAA-----------------SAADEVFLKRQRDILLLLRLHQPNAI--PEQKSISESYD---PLMHLSHFKK-PEL--VQELVDE   72
StuHc3     M---KFLLVLLVAGFAAAIHREV-----------IDADKGFLKRQKDVLTLLNHVFSHFQD--AAHQEDGRTYE---PLNHLTSYQD-PTP--VKKLVRM   78
StuHc1     M---KSFIFLL--VVGVAWAGTLSDQMVGDSPVFIPGDADFLQKQSKILKLFNKIHEHNRY--NDQVDIATSFN---PLDHLGDFKH-RDC--VLKLVKK   87
EpiHc      -----KLKKGNLFSPFIKRHREESTKVIEFLLDSKDYKGFLENAASLRPVVNEILFVYCFSVALYQSPHTTNLLAPPIWQTMPYDFF-DQRVENQIN-GI  136
LpoHcI     -----HLPRGTLFSLFHAKHLEEATHLYEILYGAKDFDDLMHLLEQARNTVNEGMFVYAATVAVLHRDDCRGVTVPPIEEVFPDRFIPVETIRHADKEA-  132
TtrHcA     -----HLSRGKLFSLFHREHLEEATHLYEILHAAKNFDDFLLLCKQARDFVNEKMFAYAVSVALLHRDDCRGLIIPPVEEVFPDRFIPVETIREAQKEV-  131
EcaHcE     -----RLPQGELFSCFHEEDLEEATELYKILYTAKDFDEVINLAKQSRTFVNEGLFVYAVSVALLHRDDCKGIVVPAIQEIFPDRFVPTETINLAVKEA-  131
NinHcE     -----KLAQGELFSCFHEKGLAEATKLYETLYAAKDFEDFINLAKQARSFANEGLFVYAASVAILHRDDCRGVTVPPIQEIFPDRFVPSETISLALKEV-  132
EcaHcG     -----VLPRGTLFSCFHEKHLLEATKLFKVLYSAESFNDFLQLAREARDVVNEGLFAYAFSVAVIHRDDCKGVTLPPIQEVFPDRFVPSETINLAMKEA-  133
NinHcG     -----VLPRGTLFSCFHERHLKEATKLFEVLYKAADFADFINLAKQARDVVNEGLFVYALSVAVVHRDDCRGVTLPPIQEVFPDRFIPAETINLASKEA-  132
CsaHc1     -----ILPRGTLFSCFHEKHLNEATELFKILYRANDFDDFLKLATQARDVANEGLYVYALSVAVAHRDDCKGITLPPIQEVFPDRFIPSETINLAMKEA-  132
AauHc6     -----ILPRGTLFSCFHARHLAEATELYVALYGAKDFNDFIHLCEQARQIVNEGMFVYAVSVAVLHREDCKGITVPPIQEVFPDRFVPAETINRANKEA-  131
LpoHcIV    -----HLHRGELFSCFHKEHLEEATHLYETLYKAKNFDDFIHLCEEARQIVNEGMFVYAASVAVLHRDDCKGLAVPPIQEIFPDRFIPAETITQAMKDD-  132
EcaHcF     -----RLPRGTLFSCFHSEHLKEATELYQILYKADSFADFIHLAQQARDIVNEGLFVYSVSVAILHRDDCRGVTVPPIQEIFPDRFVPAETVNQAVKAD-  132
NinHcF     -----RLPRGTLFSCFHTEHLIEAEELFETLYAAKDFEDFMRLAEQARDIVNEGMFVYSTSVALLHRDDCRGVTVPPIQEIFPDRFIPSETINQAIKAD-  132
```

```
EcaHcD    -----FLPRGTLFSCFHEEHLAEAETLAEALVEAKNFDDFIALATNARAVVNEGLYAFAMSVAILSRDDCNGVVLPPIQEVFPDRFVPAETINRALKVD-  132
NinHcD    -----FLPRGRLFSCFHEDHLGEAQALYEVLYEAKDFGDFINLAKQAREIVNEGLFAFALSVTVLHRDDCRGVILPPIQEVFPDKFIPAETINRALKAD-  132
LpoHcII   -----KLQPGAIFSCFHPDHLEEARHLYEVFWEAGDFNDFIEIAKEARTFVNEGLFAFAAEVAVLHRDDCKGLYVPPVQEIFPDKFIPSAAINEAFKKA-  133
EcaHcA    -----TLGPNEFFSCFYPDHLEQAKRVYEVFCHAANFDDFVSLAKQARSFMNSTLFAFSAEVALLHREDCRGVIVPPVQEVFADRFIPADSLIKAFTLA-  134
NinHcA    -----ELPNSAFFSCFLPAHLEEAKRLIEIFYSAKDFDDFVLLAEQARTFVNSTLFAFAAEVAILHRADSRGIIVPPIQEIFADRFVPADTLIRAFSVA-  134
LpoHcVI   -----VLGRGQLFSLFHAEHLAAATKLYEVLIGAKTFEEFLDLCHQVRDFVNEGLYVYAVSVAILHRPDCKGVSLPPIQEIFPDKFVTVQTLYDAFKEF-  135
EcaHcB    -----VLGRGVLFSCFHEEHLKEATQLYEVLIECESFEEFLDLCHQAREYVNEGLYVYAVSVAILHRQDCRGVSLPPVQEVFPDKFVPSETLFKAFKEV-  134
NinHcB    -----VLGRGVLFSCFHEDHLKEATQLYEVLITAPTFEEFLDLCHQCRDYVNEGLFAYAVSVAILHRKDCRGVNLPPVQEIFPDKFVPVETLYEAYKET-  134
EcaHcC    -----ILGRGKIFSCFHEDHLEEASRLAEVLVGAETFDEFIDLCHQCRDFVNEALFVYSLSVAILHRPDCHGISLPPIQEIFPDKFVPVETIYKAFKEA-  135
ScoHcA    -----ILPQHEIFSLFDERTWPEATKAAEFLMEATDFEHFIQRADVLRHRINEDMFMYALNVAVLHRKDTRGVQVPRIHKIYPDKFLKQDILEVEREKV-  159
ScoHcB    -----ILEKHEVFSLFDERQWDEATTAAVYMLTAPSFDEFIDRAEIVRHRINEDMFYYAFSVAAVHRDDTRGINLPRIHEIYPDKFLKHKVIVEVKNSI-  160
ScoHcC    -----TLKKREIFSLFDERNWDEASKVVRLLLDAKDFDDFIDVAEVIRLRVNEELFLYAFSVAVMHRGDTQGLQVPRIHDIFPDKFLKEDVIHRLLELS-  166
ScoHcD    -----TLPRREVFSLFDERNWAEAAKVVELLLEPKTFREFIHLADIIHHRVNEDLFLYALSVAIAHRPDCQGVQVPRVLDIYPDKFLRKEVIHKIKEVS-  165
SpiHc1    -----ILPKDQVFSLFDERTWDEVSEVLKRFMAAPTFEDFIKVAETLYPHVNEDLFLFGLSVAIVHRPDANGVHVPRVHEVYPDKFLTNDVLINIRKQI-  156
GpuHc1    IADHRVLEKHHWFSLFNTRQREEALLLFDVLIHSKTWETALNNAAYFREKMNEGEFVYALYAAVIHSKLGAGIVLPPLYEVTPHLFTNSEVIQKAYTAQ-  178
GroHc1    LADHRLLEKHHWFSLFNTRQREEALMLFDVFMHCKTWEAALNNAAYFREQMNEGEFVYALYAAVIHSELGAGIVLPPLYEVTPHSFTNSEVIQKAYTAQ-  178
CcsHc     IKDERVLERHHWFSLFNTRQREEALMLFDVFMNCKTWKAAMGNAAYFRHSMNEGEFVYAFYAAVIHSALGKGIVLPPLYEVTPHMFTNSEVISKAYTAQ-  179
EpuHc1    IDDHRVLEQHHWFSLFNNRHREEALMLFDALMHCNDWHTAVSAAAYFREKLNEGVFVYGLYTAVIHADLGQGLVLPPLYEVTPHLFTNSEVINKAYSAK-  176
PleHc2    LRDGRLLEQHHWFSLFNTRQREEAIMLFEVLIHCKSWCFVKNAAYFREHMNEGEFVYALYVAVIHTDLGHGIVLPPLYEVTPHLFTNSEVINKAYSAK-  187
HamHcA    LNDHRFLEQHHWFSLFNPRQREEALMLFDVLMHCKSWECFVDNAAFFRERMNEGEFAYALYTAVIHSELGQGIVLPPLYEITPHMFTNSEIIHKAYTAK-  174
PinHcB    LNDHRLLEQRHWFSLFNTRQREEALMLFAVLNQCKEWYCFRSNAAYFRERMNEGEFVYALYVSVIHSKLGDGIVLPPLYEITPHMFTNSEVIDKAYSAK-  158
PinHcA    LNDHRLLEQRHWYSLFNTRQRKEALMLFAVLNQCKEWYCFRSNAAYFRERMNEGEFVYALYVSVIHSKLGDGIVLPPLYEITPHMFTNSEVIDKAYSAK-  158
PelHc1    LNDHRLLEQHHWFSLFNTRQREEALMLFTVLNQCKDWNCFLNNAAFFRERMNEGEFVYALYVSVIHSKLGDGIVLPPLYEVTPHMFTNSEVIDKAYSAK-  186
PelHc4    LNDHRLLEQHHWFSLFNTRQREEALMLFTVLNQCKDWNCFLNNAAFFRERMNEGEFVYALYVSVIHSKLGDGIVLPPLYEVTPHMFTNSEVISKAYTAQ-  187
PelHc3    LNDHRLLEQHHWFSLFNTRQREEALMLFTVLNQCKDWNCFLNNAAFFRERMNEGEFVYALYVSVIHSKLGDGIVLPPLYEVTPHMFTNNEVIDKAYSAK-  186
PelHc2    LNDHRLLEQHHWFSLFNTRQREEALMLFTVLNQCKNWNCFRNNAAFFRERMNEGEFVYALYVSVIHSKLGDGVVLPPLYEVTPHMFTNNEVIDKAYSAK-  186
CmaHc6    LNENRLLKQNHWFSLFNTRQREEALMLYDVLEHSTDWSTFAGNAAFFRVSMNEGEFVYALYAAVIHSELTQHVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIQEAYKAK-  180
CmaHc4    LNENRLLEQNHWFSLFNTRQREALMLYDVLEHSTDWSTFAGNAAFFRVHMNEGEFVYALYAAVIHSELTQHVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIQEAYKAK-  179
CmaHc5    LNENRLLEQHHWFSLFNTRQREEALMLYDVLEHSTDWSTFAGNAAFFRVRMNEGEFVYALYAAVIHSELTQHVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIQEAYKAK-  180
CsaHc     LNDHRLLEQKHWFSLFNTRQREEALMLYDVLEHSTDWETFAGNAAYFRVRMNEGEFVYAIYAAVIHSPLTEHVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIQAAYKAK-  180
CmaHc3    LNENRLLEQHHWFSLFNTRQREEALMLYDILEHSTDWDTFAGNAAFFRVRMNEGEFVYALYAAVIHSELTQHVVLPPIYEVTPHLFTNSEVIQEAYKAK-  175
PvaHc1    VKDGKLLQQRHWFSLFNPRQRHEALMLFDVSIHCKDWNTFVSNAAYFRQKMNEGEFVYALYVAVIHSPLTEHVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIESAYRAK-  176
PvaHc     LNDGKLLEQKHWFSLFNTRHRNEALMLFDVLIHCKDWASFVGNAAYFRQKMNEGEFVYALYVAVIHSSLAEQVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIEEAYRAK-  172
PinHcC    FKDGRLLQKKHWFSLFNTRQREEALMMHRVLMNCKNWHAFVSNAAYFRTNMNEGEYLYALYVSLIHSGLGEGVVLPPLYEVTPHMFTNSEVIHEAYKAQ-  164
PleHc     LDDHRLLEQHHWFSLFNDRQREEALLLVDVLLHSTDLEAFKNNAAYFREHTNEGEFVYALYVAVTHSDLTPHVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIDQAYAAK-  174
CmaHc1    IEAHRVLEQKHWFSLFNERQREEALMMVDVLLNCMDFETFQGNAAYFREHMNEGEFVYAIYVAVTHSELMQGVVLPPMYEVTPHMFTNSEVIDKAYAAK-  174
CmaHc2    IEANRVLEQKHWFSLFNERQREEALMMVDVLLNCMDFETFQGNAAYFREHMNEGEFVYAIYVAVTHSELMQGVVLPPMYEVTPHMFTNSEVIDKAYTAK-  174
HamPHc1   VKTQHLEERHHWFSVFNATQREEALLLVKVLLQCQDWPTAIGNAVYFRKMMNEETYVYALYTAIKHSPLTKHVVLPPLYEIMPHFFTSSEVIQQAYRAK-  182
HamPHc2   VKTQHLEERHHWFSVFNATQREEALLLVKVLLQCQDWPTAIGNAVYFRKMMNEETYVYALYTAIKHSPLTKHVVLPPLYEIMPHFFTSSEVIQQAYRAK-  180
CmaCC1    LTHQRLLEKKHWAVATNKRHLEEAIMLFEVFMQCKDWNCVASNAAYFRERVNEEEFIYAAYHAIKHSPLTQHVVLPAIYEVKPRHFTKTQIAEEAYEAKE  160
CmaCC2    LTHDRLLEKKHWAVATNKRHLEEAIMLFEVFMQCKDWNCAASNAAYFRERVNEEEFIYAAYHAVKHSPLTQHVVLPAIYEVKPHHFTKSQVINEAYEAKE  179
PmaHc2    VTHGKYLAHDEIFNIFHPHHRRQMVYLFEILYGAKDFDSFFNMAVWARDHMSPRMFLYAFSVAVLHRTDCKGITLPPAYEITPDMFLTTDVMRKAYQAK-  175
PgrHc2    VTHGKFLAHDEIFNIFHPQHRRQMIYLFEILYGAKDFDTFFNMAVWARDHMSPRMFLYAFSVAVLHRADCKGITLPPAYEITPDMFLTTDVMRKAYQAK-  175
CseHc2    VTEGKLLERDAIFSLFDARQRAQMVTLFEVLYGATDYDTFLKAAAWARDRTNPRQFLYAFSVALLHREDCRGVILPPAYEITPHMFLTTDVVRKAYQAK-  177
PamHc2    ITKGKVLQRDTVFSLFHPRHRYEMVTLFETLYGATDYDTFFRTAVYARDRLNPRQFLYAFSVALLHRQDCRGICLPPAYEITPHMFLTTDVVRKAYKAK-  177
BduHc2    VESGKLLHRDGIFGLFNPEHRQQMIVLFETLYGASDWDTFFKTAVWARDRTNPRQFLYAFSVALLHREDCRGIKLPPQYEITPHVFLTTDVVRKAYQAK-  178
HmeHc2    VRKGSLLSRDTVFSLFNPKHREQMVALFEVLYSAVDYDTFFNTAVWARDRMNPRQFLYSFSVALLHRPDCRGLTLPPAYEITPHMFLTTDVVREAYKAK-  156
TdoHc2    LENGQMLNRDNIFVLFDPVHRRQMIDVFEILYFANDYDTFFKTAVWLRDRMNPRQFLYAFSVALLHRKDCRGFTLPPAYEITPHMFLTTDVVRQAYQAK-  156
SamHc1    YRAGSLLPRGAIFTLFDDTHREQMILLFESLLYANDWETFLRTAAWARDRVNEGQFVYALCVAVLHREDTRGVVLPPPYEIYPHLFVNSEVIHAAYKAK-  181
BduHc1    YTSGQLLPRGHIFTLFNDKHREQMITVFESLFYAQDWDTFYRTACWARDRVNEGQFVYALSVAVLHREDTRGIVLPPAYEIYPHLFVNSEVIHAAYRAK-  184
PamHc1    YMAGHMLPRGAIFTLFNNKHREEMITVFESFFFAEDWDTFYRTACWARDRVNEGQFIYALSLAVLHREDTRGIVLPPAYEIYPHLFVNSEVIHAAYKAK-  180
CseHc1    YTSGRLLPRGRIFTLFNDRQREQMITIFESLFYAEDWDTFYRTACYVRDRVNEGQFVYALSVAVLHREDTRGMVLPPAYEVYPHLFVNSDVIHAAYRAK-  183
HmeHc1    YNSGLTLPRGAIFTLFNDKHREQMITVFESLFFAQDWDTFLRTACWCRDRVNEGQFVYALSVAVLHREDTRGIVLPPPYEIYPHLFVNSEVIHAAYKAK-  166
CmoHc1    YNSHSLLPRGQIFTLFDDKHREEMVLLFESMFYALDWDTFYKTACWARDRINEGQFIYALSVAVIHRDDAKGIVLPPSYEIYPHLYVNSEVIHAAYKAK-  182
CacHc1    YKAGSLLPRGSIFTLFNEKHRSEMILLFETFFYANDWDLLFKTACWARDRINEGQFVYALSVAVLHRSDTHGIVLPPPYEIYPHLFVNSEVIHAAYKAK-  178
TdoHc1    YNNGALLPRGEIFTLFRERDLEEMIYLFEALFYANDWNTFLSTACWARDRINEGQFVYALSVAVLHREDTKGVVLPPAYEIYPHLFVNSEVIHQAYKAK-  182
PmaHc1    YNAKTLLPRGDIFSLFHKEHREEMILLFESFLFAQDWDTFFKTAVWARDRINEGQFVYALSVAVLHREDCKGIILPPAYEIYPHMFVNSEVINSAYKAK-  181
PgrHc1    YNAKTLLPRGDIFSLFHKEHREEMILLFESFLFAQDWDTFFKTAVWARDRINEGQFVYALSVAVLHRDDCKGIILPPAYEIYPHLFVTSEVIDSAYKAK-  181
ScuHc1    LKNGKLIKRGEIFNLFNEEHRREMILLFETLFFAKDWDTFHKTACWARDKINEGQFVYALSVATLHRADTRGIRLPPAYETYPHLFVTSQVIHEAYAAK-  176
MgeHc1    YVKKQLLHRGEIFNTFEDKHLEQAILLIETLLSANSWDTLYRTACWARDKVNEGQFVYALSVTVMHSDFLRGIILPPPYEIYPHLFVNSEVIHEAYSAK-  179
TdoHex1   YKKG-MLPRGRIFSIFDKKQQDEMINLFEVFYYAKDFDTFLKTACFARDRVNEGQFVHAFLTAILHREDTKDVVLPPIYEVMPHFFLDTKVIKKAYEAK-  187
PmaHex1   YKQG-MLPKGEIFSVFYQEYLEQAIHLFDVFYFAKDWDTFYKTACWARDRVNEGQFIYALSVAALQREDCKDFVLPPVYEVYPHLFLQNEVIQKAYEVR-  183
BdiHex    YKRG-MLPRGVPYSPYYTTQSYETKLLFDLFYYANDYDTFYKTVCWARDRINEGQFLYAFSTAVFQREDLSDYILPPPYEIYPYLFVDSEVIQKAYETR-  182
RflHex2   YKKG-FLPRGVPYSPYYTTQSYETKLLFDLFYYANDYDTFYKTAVWARDRINAGQFLYAFSVATFLREDLNDIVLPPPYEVYPYLFVDSDVIQKAYETK-  183
PamHex12  FKKG-MLSRGEPFSVNYEKHREQAIMLYDLLYFANDYDTFYKTACWARDRVNEGMFMYSFSIAVFHRDDMQGVMLPPPYEVYPYLFVDHDVIHMAQKYW-  181
RflHex1   YKKG-MLQRWEPFSVYYKTHLEQAISLFELFYFANDFDTFYKTACWARDRVNPLMFWYSFTAAVLHRDDTTDVMMPPPYEVYPYFFVDSDIIQKAYKYW-  182
LmiHex1   YTEYGFVPRDEVFSIYYKKHFSQAKGLFELFYYAKDFDTFYKTAVWAREYLNPGLFVYSFTVAVLHREDTKFVTLPAPYEVYPQLFVNAEVIQKAYDAR-  180
LmiHex2   YVDVGFLPKGEVFSVYYQKHFYQARALFELFFFAKDFETFYKTAVWAREHLNEALFVYSYTVAVLHREDTKDVTLPAPYEVYPQLFVNAEVIQQAYDAY-  180
RmiHx1    YVDVGFLPRGEVFSVFYEKHYYQARALFELFYFAKDYDTFYKTAVWARQHLNEGMFVYSFTVAVLHREDTKDVTLPPPYEIYPQFFVNAEVIQKAYDAR-  180
TmoHex2   WQYGKLLPRGEIFSVFHGEHLKQAVALFKLFYYANDYETFYTTAVWARNHINEGMFMYSLSVALIHRPDTYYFSLPPIYEIYPHYFYSTEVIKKAQYYKQ  176
AgeHex    WKYG-MLPKGEIFSVMYKEHLEQAIALFEMFYHAKDYQTFYKTAVWARQHVNEGMFLYSFSVAVVHRPDTYGIILPPIYEVYPHYFYNSEVIHKAQVYKQ  181
LdeDP1    WRFG-LLPRGEVFSVFYEEHLRQAIALFKLFYYAKTYDEFHRVATWARQNVNEGMFVYAFSVAIIHRPDCRRLMLPPIYEIKPHYFFNKEVINKAYYYKQ  178
AgaHex2   YEHG-LLPKGEVFSVYDELHREQAIALFRVLYHAKDWETFYKVAAWARYYVNEGMFVYALTVATHRADMAGFVLPAPYEISPYHFINTEVIQKAQQYK-  159
MseAryla  YRTG-FMPKGFEFSIFYERMREEAIALFELFYYAKDFETFYKTASFARVHVNEGMFLYAYYIAVIQRMDTNGLVLPAPYEVYPQYFTNMEVLFKVDRIK-  186
MseArylb  YRTG-FLPKYYEFSPFYDRLRDEAIGVFHLFYYAKDFDTFYKSAAWARVYLNEGQFLYAYYIAVIQRKDTQGFVVPAPYEVYPQFFANLNTMLKVYRTK-  183
CfeHex2   HKSG-MLSRNAIYSPYYEEHREEVKIVTKLFFSAKDFQTFYKTASWARLNLNDGVFTSAFTTAVFYRPDCKHMRLPAPYEIYPNLFFDNNVIQRARDIKM  181
BheHex    YKFG-FLPRGAIYSLYYPKLLDETKALFKLFYYAKDFDTFYKTALWARNRLNEGEFICAFYEAVIRRPDTEYLQLPPPYELYPYAFFNSEVIEAAKNAKL  184
StuHc2    ITHGTTLPRGEIFNLFNTEHRTSMIHVFEVLFFAKDFDTFFKTAVYARDRVNEFLFYYAFSVAAVRRSDCEGLQLPPPYEIFPHFFVTSDVIRSAYKAK-  171
StuHc3    YKMGDCLKQSEIFCLFTDHHRHEMILLFEALYYAKDWGTFMKMARWARVHLNGALFVYSVKVALLHRQDTYGIRLTPAYELNPHMFVTNDAITKAYSAK-  177
StuHc1    YKAHRLLPRGHVFNLFRPRDREEMVMFFEALFYAKTWDTFYKIACWARDKINENQFLYAMYVAVHHRHDCKGVLLPPQYEIYPQLFVNNDVIQEAYSAK-  186


EpiHc     IES---TK-------GAPDKQPIQVILEPTGN--NR--DPEFKLSYFREDIAINSHHWHWHVIYPV----GSNPSDKK--INRKGELFYYMHEQMLARYD  216
LpoHcI    AAH-P-DK-------------DIVVEFEETGN--IL--DPEYRLAYFREDVSINRHHWHWHVIYPATW--RPEFMHKE--LDRKGELFYYMHQQMCARYD  209
TtrHcA    ELH-P-GK-------------DI-VEVENTGN--IL--DPEYRLCYFREDLGVNAHHWHWHVYPATW--RSEVMGKT--KNRKGELFFYMHQQMCARYD  207
EcaHcE    ANH-P-DQ-------------DISVHVVETGN--IL--DEEYKLAYFREDVGTNAHHWHWHVYPATW--DPAFMGRM--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  208
NinHcE    TNH-P-DK-------------DIEVEIESTGN--IL--DPEYKMSYFREDVGTNAHHWHWHVYPATW--RPEVMGKL--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  209
EcaHcG    KND-P-NS-------------DIVVDVQETGN--IL--DPEYKLAYFREDIGANAHHWYWHVVYPANW--DAVFTGKT--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  210
NinHcG    RNN-P-TE-------------DVVVEIEDTGN--IL--EPEYKLAYFREDIGINAHHWYWHVVYPANW--SVELTGKV--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  209
CsaHc1    KNK-T-YD-------------DVVVEIEDTGN--IR--DPEYKLAYFREDVAVNAHHWYWHVVYPANW--DESLTGKV--KDRKGELFYYMHQQMSARYD  209
AauHc6    SNH-PDQQ-------------SIVVEAEETGN--IL--DPEYKLSYFREDIGINAHHWHWHVYPATW--NPTVMGKE--KDRKGELFFYMHQQMCARYD  209
LpoHcIV   HHR-KEHE-------------DLVVDIEETGN--IL--NPEQRLAYFREDIEVNAHHWHWHLVFPATW--RPEVMGKV--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  210
EcaHcF    LKRQSSDE-------------DVLVEIQETGN--IL--DPEHKLAYFREDIGANAHHWHWHVYPPTW--DASVMSKV--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  211
NinHcF    LRR-ADDS-------------PVIVDVIQTGN--IL--DPEYKLAYFREDIGANAHHWHWHVYPATW--RPEIMGKV--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  210
EcaHcD    KVS-DPNK-------------DTVVPIQKTGN--IR--DPEYNVAYFREDIGINSHHWHWHLVYPAFY--DADIFGKI--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  210
NinHcD    KKS--TDE-------------SKVIEIQKTGN--II--DPEYNLAYFREDIGINAHHWHWHLVYPATY--RPDFFGKV--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  209
LpoHcII   HVRPEFDES------------PILVDVQDTGN--IL--DPEYRLAYFREDVGINAHHWHWHLVYPSTW--NPKYFGKK--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  213
EcaHcA    TTTQPGDES------------DIIVDVKDTGN--IL--DPEYKLAYFREDIGVNAHHWHWHVVYPSTY--DPAFFGKV--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  214
NinHcA    TTKPAGDES------------DVIIDVQETGN--IL--DPEYKLAYFREDIGVNAHHWHWHVVYPSVY--DSKFFGKK--KDRTGELFYYMHQQMCARYD  214
LpoHcVI   WQNPHKEE-------------DVIVDMQTTGN--IL--DPEYNLAYFREDIGINAHHWHWHLVYPATW--RPEVIGKV--KDRKGELFYYMHQQMCARYD  214
EcaHcB    RLHPDDE--------------EIIVDIEKTGN--VK--DPEYNLAYFREDIGVNAHHWHWHLVYPATW--RPEVVHRI--KDRKGELFFYMHQQMCARYD  212
NinHcB    KLHKEDE--------------DVIINIQKTGN--IM--DPEYNLAYFREDIGINAHHWHWHLVYPATW--RPEVIGRI--KDRKGELFFYMHQQMCARYD  212
EcaHcC    TRHADKTD-------------DIIVDMEATGT--IM--DPEYNLAYFREDIGINAHHWHWHVVYPSAW--DSVKMHMR--KDRKGELFFYMHQQMCARYD  214
ScoHcA    NHGEEK---------------PVVDATELHQN--QL--DPNYRLSYFLEDIGMNSHHYHWHVVHPAVW--LPKHGPRK---DRKGELFYYMHHQMVARYD  235
ScoHcB    NSGQED---------------PLIDATHEFTD--LR--DPNSKLHYFLEDVGLNSHHYHWHVIHPAVWQESLEELTHQ-HKDRKGELFYFMHHQMVNRYD  240
ScoHcC    NRGEHYDRI------------PIIDATQISHN--YL--DPNSELEYFLEDLGLNSHHHHWHVIHPAIW--VSELGNEK---DRKGEFFYWMHHQMLARYE  245
ScoHcD    NEGAYLDKV------------PVIDATEVSDN--HL--DPNQELLYFLEDLGMNSHHHHWHVIHPAIW--LPKHGGVK---DRKGELFFYMHKQMVARYD  244
SpiHc1    IKGHKN---------------PVVKDTHYYHN--DF--DPFRRVDYFTEDLGMNSHHYHWHVLHPSIW---TQDIGEK---SKLGELFYWMHRQMVARFD  231
GpuHc1    M-----------------TQTPGTFKQDFTGS--KK--NPEQRVAYFGEDIGMNVHHVTWHLDFPFWW--EDSY-GYH--LDRKGELFFWAHHQLTVRFD  252
GroHc1    M-----------------TQTPGNFKMDFTGS--KK--NPEQHVAYFGEDIGMNVHHVTWHLDFPFWW--EDSY-GYH--LDRKGELFFWAHHQLTVRFD  252
CcsHc     M-----------------TQTPGKFSMEFTGS--QK--NPEQRVAYFSEDIGLNVHHVTWHMDFPFWW--DDSY-GYS--LDRKGELFFWVHHQLTARFD  253
EpuHc1    M-----------------TQTPGKFRMSFTGT--KK--NPEQRVAYFGEDIGLNVHHVTWHMDYPFWW--KDSY-GYH--LDRKGELFFWVHHQLTVRFD  250
PleHc2    M-----------------TQTPGKFNMDFTGT--KK--NKEQRVAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWW--KDSY-GYH--LDRKGELFFWVHHQLTARFD  261
HamHcA    M-----------------TQTPGRFEMKFTGT--KK--NKEQRVAYFGEDIGLNIHHVTWHMDFPFWW--KDSY-GYH--LDRKGELFFWAHHQLTVRFD  248
PinHcB    M-----------------TQKPGTFNVSFTGT--KK--NREQRVAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPTWW--QDSY-GYH--LDRKGELFFWVHHQLTARFD  232
PinHcA    M-----------------TQKQGTFNVSFTGT--KK--NREQRVAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWW--EDSY-GYH--LDRKGELFFWVHHQLTARFD  232
```

```
PelHc1    M-----------------THKEGTFNMSFTGT--KK--NKEQRVAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWW--DDSY-GYH--LDRKGELFFWVHHQLTARFD  260
PelHc4    M-----------------THKEGTFNMSFTGT--KK--NKEQRVAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWW--DDSY-GYH--LDRKGELFFWVHHQLTARFD  261
PelHc3    M-----------------THKEGTFNMSFTGT--KK--NKEQRVAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWW--DDSY-GYH--LDRKGELFFWVHHQLTARFD  260
PelHc2    M-----------------THEGNTFDMSFTGT--KK--NREQRVAYFGEDIGMNIHHVTWHMDFPFWW--QDSY-GYH--LDRKGELFFWVHHQLTARFD  260
CmaHc6    M-----------------TQTAAKIESHFTGS--KS--NPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHLEFPFWW--DDAHENHH--IERKGESFFWVHHQLTVRFD  255
CmaHc4    M-----------------TQTAAKIESHFTGS--KS--NPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHLEFPFWW--DDAHENHH--IERKGESFFWVHHQLTVRFD  254
CmaHc5    M-----------------TQTAAKIESHFTGS--KS--NPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHLEFPFWW--DDAHENHH--IERKGESFFWVHHQLTVRFD  255
CsaHc     M-----------------TQTASKIKSHFTGS--KS--NPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHLEFPFWW--DDSHENHH--INRKGESFFWVHHQLTVRFD  255
CmaHc3    M-----------------TQTRAKIESHFTGS--KS--NPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHLEFPFWW--DDAHENHH--IERKGENFFWVHHQLTVRFD  250
PvaHc1    Q-----------------TQKPGKFESSFTGT--KK--NPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHMEFPFWW--DDKY-SHH--LDRKGGNFFWVHHQLTVRFD  250
PvaHc     Q-----------------KQTPGKFKSSFTGT--KK--NPEQRVAYFGEDIGLNTHHVTWHMEFPFWW--NDAY-GHH--LDRKGENFFWIHHQLTVRFD  246
PinHcC    M-----------------TNTPSKFESHFTGS--KK--NPEQHVAYFGEDVGMNTHHVLWHMEFPFWW--EDSS-GRH--LDRKGESFFWVHHQLTVRYD  238
PleHc     M-----------------TQTPGNFKMEFTGS--KK--NREQRGAYFGEDVGLNSHHVHWHMDFPFWW--N----GAK--IDRKGELFFWAHHQLTARYD  245
CmaHc1    M-----------------TQTAGEFYMSFTGS--KK--NPEQRVAYFGEDIGMNSHHVHWHMDYPFWW--H----GQE--IDRKGELFFWAHHQLTARFD  245
CmaHc2    M-----------------TQTAGEFYMSFTGS--KK--NPEQRVAYFGEDIGMNSHHVHWHMDYPFWW--H----GQE--IDRKGELFFWAHHQLTARFD  245
HamPHc1   M-----------------IGQPGKFNMNFTGT--QN--NPEHKIAYFGEDIGLSTHYINWHIEYPFWW--NETF-GYQ--IERRGENYFWVHHQLVNRFE  256
HamPHc2   L-----------------IEKPGRFNMNFTGT--QN--NPEHKIAYFGEDIGLSTHYINWHIEYPFWW--NETF-GYQ--IERRGENYFWVHHQLVNRFE  254
CmaCC1    M-----------------KLRNVFFQNNFTGT--PN--DIEHRVAYFREDIGVGTHHLMIHLENPFWW--KDTY-GYH--IDRKGENFFYAYHQLLNRYE  234
CmaCC2    M-----------------KLRNIYFQNNFTGT--PN--DIEHRVAYFREDIGVGTHHLMINLENPCWW--KDTY-GYH--IDRKGENFFYAYHQLLNRYE  253
PmaHc2    M-----------------TATKTVIPMKFTGS--IK--NPEQRVAYFGEDIGVNSHHSHWHMDFPFWW--KR-SYDVT--KDRRGELFFYMHHQMVNRFD  249
PgrHc2    M-----------------TAQKTVIPMKFTGS--IK--NPEQRVAYFGEDIGINSHHSHWHMDFPFWW--KR-SYDIT--KDRRGELFFYMHHQMVNRFD  249
CseHc2    M-----------------MRTPTVIPMKFTGS--VN--NPEQRVAYFGEDIGMNSHHSHWHMDFPFWW--KQ-EYTVD--KDRKGELFFYMHHQMVARFD  251
PamHc2    M-----------------TRTPTVIPMKFTGS--VN--NPEQRVAYFGEDIGMNSHHSHWHMDFPFWW--KQ-EYAGY--KDRKGELFYYMHHQMVARFD  251
BduHc2    M-----------------TRTPTVIPMKFTGS--AN--NPEQRVAYFGEDIGLNSHHAHWHMDFPFWW--KP-EYDGD--KDRKGELFFYMHHQAVARFD  252
HmeHc2    M-----------------TRQPVLIPMKFTGS--VN--NPEQRVAYFGEDIGMNSHHAHWHMDFPFWW--KP-HYQHNHSKDRKGELFFYMHHQMVARFD  232
TdoHc2    M-----------------TRTPKVIPMQFTGS--VR--NQEQRVAYFGEDIGMNSHHSHWHMDFPFWW--KP-EYGVE--KDRKGELFYYMHHQLIARFD  230
SamHc1    M-----------------RQEPAVVHMNFTGT--IR--NPEQRVAYLGEDLGMNSHHSQWHMDFPFWW--KEDEYGIR--KERKGELFYYMHHQLIARFD  256
BduHc1    M-----------------RQEPAVVRMNFTGT--VR--NPEQRVAYLGEDVGMNSHHSHWHMDFPFWW--KEQEYGSH--KDRKGELFYWMHHQLISRFD  259
PamHc1    M-----------------RQEPAVVRMNFTGT--IR--NPEQRVAYLGEDVGMNSHHSHWHMDFPFWW--KQEEYGVH--KDRKGELFYYMHHQLIARFD  255
CseHc1    M-----------------RQEPAVVRMNFTGT--VR--NPEQRVAYLGEDVGINSHHSHWHMDFPFWW--KQDEYGVK--KDRQGELFYYMHHQLIARLD  258
HmeHc1    M-----------------RQEPAIVRMNFTGT--IR--NPEQRVAYLGEDVGMNAHHSHWHMDFPFWW--KQQEYGVE--KDRKGELFYWMHHQLIARFD  241
CmoHc1    M-----------------RQEPAVVRMNFTGT--IR--NPEQRVAYLGEDLGMNSHHAHWHMDFPFWW--KPEEYGID--KDRKGELFYYMHHQLIARFD  257
CacHc1    M-----------------RQEPAIVRMNFTGT--IK--NPEQRVAYLGEDIGMNAHHAHWHMDFPFWW--KEHEYGIH--KDRKGELFYYMHHQLIARFD  253
TdoHc1    M-----------------RQEAAVVRMNFTGT--IR--NPEQRVAYFGEDIGMNSHHSHWHMDFPFWW--KP-EYGVE--KDRKGELFYYMHHQLIARFD  256
PmaHc1    M-----------------TQTPAIIHMNFTGT--IR--NPDQWIAYLGEDVGLNSHHAHWHMDFPFWW--KAAEYGIE--KDRKGELFYYMHHQMIARYD  256
PgrHc1    M-----------------TQTPATIYMNFTGT--VR--NPEQWVAYLGEDVGLNSHHAHWHMDFPFWW--KAAEYGIE--KDRKGELFYYMHHQMIARYD  256
ScuHc1    M-----------------RQEPAVIHMNFTGT--VR--NPEQRVAYFGEDVGMNSHHAVFHMDWPFWW--NEEKYGLT--KDRKGELFWYMHHQLITRFD  251
MgeHc1    M-----------------RHHPVVIPMNFTGT--IR--NPEQRVAYFGEDIGLNTHHHYWHMNFPFWW--SP-HYDTK--FDRAGEMFWYMHHQLVARYD  253
TdoHex1   M-----------------RQENALIKMNYTHNRQLK--NEDQKVAYFSEDMGLNQFYSYYQMDHPFFY--KK-DYGTE--EDRKGELFYYMHQQLLARYD  263
PmaHex1   MQ----GEHYTAVDTVYKEGETYYIPANYSGWYYTQ--YPEQFISYFTEDVGVNAFHAYWHMDYPFWA--NSKYYNVK--FDRRGELFYYTQHQLMARYY  273
BdiHex    M----------SDVHLTAPKTYIFPVNYT----VA--NPEQELYYWYEDVGLNTYYAYYYFNYPTFF--NETEYGVH--FDRRGELFYYTRQQLYARQF  261
RflHex2   M----------WDHSLTSPKTHVFPANYT----VH--TPEQVLSYFTEDVGLSTYYLYYYYNYPTFF--NSTEYGVH--FDRRGEQFYYKIQQVLARYI  262
PamHex12  M----------KNAGSGEHHSHVIPVNFT----LR--TQDHLLAYFTSDVNLNAFNTYYRYYYPSWY--NTTLYGHN--IDRRGEQFYYTYKQIYARYF  260
RflHex1   M----------MHVGTTEHHTYIIPMNHT----MK--SKENLLYYFTEDVGLNAFNMYYRMYYPSWF--NVTEYGHK--FDRRGEMFLYVQHQLYARYS  261
LmiHex1   LR----------DVVSTRKEPYVFYANYSGFPVAN--NPEELVSYFTEDVGLNSFFAYLHYKSPFWL--NPANYSLP-ASKRRGDSFFFILQQLLARYY  264
LmiHex2   LR----------GEVGTKEAPYVFYSNYSGYPVAS--NPEELVSYFTEDIGLNSYFAYLSYKYPYWL--NPKNYSLP-EYQYRGESFFFVLQQLLARYY  264
RmiHx1    LQ----------GQSSSKETPYIFYSNYSGYPVAN--NPEELVSYFTEDVGLNSYFAYLSYKYPFWM--NPKNYSLP-ELEYRGQSFLFVLEQLLARYN  264
TmoHex2   M----------YSGQQGSEYNDKIIYANYSGHYLNL--HPEQSLSYYMEDVGLNSFYYYYNLYYPFWM--SGEEFNLK--YDNRGEAFYYMYQQILARYY  260
AgeHex    T-------HNRQQHHEKEGDYDYTIFANYSGHYLNL--HPEQSMSYYLEDVGINAFYYYFNLYYPFWM--SGEEYGLK--NDNRGEQFYYVHLQILARYY  268
LdeDP1    V------HNSRDVHQNPGSFPGYTIQTNYTHDHMNL--GHEQSLSYFLEDIDMNSLYYYYNLYYPFWM--SSEEFGWK--DSNRGYLYYFAHQQLLARYY  266
AgaHex2   MQG-YYGMKKVD------GVYTVTIPSNYTGWYMHT--NAEQKISYFTEDIGLNSYYYYLHTDYPFWL--GGELFGLS--KDRRGELYLYEHQQILARYY  246
MseAryla  MQDGFLNKDLAAYYGMYHENDNYVFYANYSNSLSYP--NEEERIAYFYEDIGLNSYYYYFHMHLPFWW--NSEKYGPF--KERRGEIYYYFYQQLIARYY  280
MseArylb  MQDGVVSADLAAQHGIVKEKNYYVYYANYSNSLVYN--NEEQRLSYFTEDIGLNSYYYYFHSHLPFWW--NSERYGAL--KSRRGEIYYYFYQQLIARYY  277
CfeHex2   MH--------GVRPTNVDNGDSYVIHANYSGNLVRP-YLDDYKLDYFMEDVGLNAYYYYVRQVMPFWL--SMKNFDIP--AQFRGHFYYFKHKQLLNRYY  268
BheHex    YN----------KLVEGNSYIIYVNYSGWYLNRAYDTEMRVNYFLEDIGLNTFYFFYRMDNPFWL--SSEEFGLQ--KNLRGEEFLYVHKTLLNRYN  267
StuHc2    M-----------------MHTPTIIDMHWTGS--IH--NPEQRVAYFGEDVGLNSHHSHWHKDFPFWW--KP-EYGIE--LDRKGELFFYNHHQMTSRFD  245
StuHc3    M-----------------RNKDAVVRVEFTGT--IH--NPEQHVAYFGEDIGMNSHHSHWHMDFPFWW--KK-DYPTQ--MDRKGELFWYAHHQLTTRFD  251
StuHc1    M-----------------KQVPATIKMHWTGT--IR--NPEQHVAYFGEDLGLNSHHSHWHMDFPFWW--KK-AYGTE--KDRKGELFFYSHHELTTRYD  260

EpiHc     AERLCNGMRRVKSLHDYDE-IIPEGYYPRLHSKISGTEYASRQANT----------------------------------------RMMDTLD-----  268
LpoHcI    CERLSNGMHRMFPFNDFHEEL-EG-YSPHLTSLISGLNYGTRPDGL----------------------------------------KLHDLHD-----  260
TtrHcA    CERLSNHMHRMSPFSNLHEEL-EG-YAPHLTSMISGLHYGVRPSGM----------------------------------------KLHDIDV-----  258
EcaHcE    CERLSNGMRRMIPFSNFDEKL-EG-YSAHLTSLVSGLPYAFRPDGL----------------------------------------CLHDLKD-----  259
NinHcE    CERLSNGMRRMIPFHNFEEEL-EG-YSAHLTSLVSGLQYASRPEGF----------------------------------------RLHDLKD-----  260
EcaHcG    CERLSNGLTRMIPFHNFKEKL-EG-YAPHLTSLVSGLHYASRPAGL----------------------------------------CLRDLSE-----  261
NinHcG    SERLSNGLNRMVAFHNFEEKL-EG-YAPHLTSLVSGLHYASRPQGF----------------------------------------SLRDLTE-----  260
CsaHc1    CERLCNGLNRMVPFHNFEEKL-EG-YAPHLTSLISGLHYASRPEGF----------------------------------------SLRDLVD-----  260
AauHc6    SERLSNGLQRMIPFHNFDEPL-EG-YAPHLTSLVSGLQYASRPEGY----------------------------------------SIHDLSD-----  260
LpoHcIV   CDRMSVGLQRMIPFQNFEETL-EG-YSAHLTSLVSGLHYASRPEGL----------------------------------------HIRDLND-----  261
EcaHcF    CDRLSTGLRRMIPFHNFDEKL-EG-YSPHLTSLVSGLNYASRPAGL----------------------------------------HLRDLVDF----  263
NinHcF    CDRLSTGLQRMIPYHNFNEKL-EG-YSPHLTSLVSGHHYANRPAGL----------------------------------------SLHDLNEL----  262
EcaHcD    CERLSVGLQRMIPFQNLDDEL-EG-YSPHLRSLVSGLSYGSRPAGM----------------------------------------HLRDIND-----  261
NinHcD    CDRLSVGLQRMIPFQNFDDKL-EG-YSAHLISLISGLNYASRPAGM----------------------------------------TLRDIRE-----  260
LpoHcII   CERLSNGMHRMLPFNNFDEPL-AG-YAPHLTHVASGKYYSPRPDGL----------------------------------------KLRDLGD-----  264
EcaHcA    CERLSNGLNRMIPFHNFNEPL-GG-YAAHLTHVASGRHYAQRPDGL----------------------------------------AMHDVRE-----  265
NinHcA    CERLSNGLTRMVPFHNFEEPL-EG-YAAHLTHIASGRHYAPRPDGL----------------------------------------AMTDLRL-----  265
LpoHcVI   CERLSNGMPRMEPFHNFHEPL-EG-YSSHLSSSINGLPYPSRPDGM----------------------------------------TLQDLKE-----  265
EcaHcB    SERLSNGMAPMVPFHNFHEPM-EG-YSSHLSSGINGMPYAFRPHGR----------------------------------------ILKDMRE-----  263
NinHcB    CERLSNHMPQMIPFHNFHEPL-EG-YSAHLSSNINGLPYSSRNAGR----------------------------------------KLADLEE-----  263
EcaHcC    CERLSNGLARMIPFHNFHEPL-EG-YNPHLSSTQNGLPYAFRPEPM----------------------------------------TLCDMHD-----  265
ScoHcA    SERLSNNLPRTEPFENWDDPLEEG-YAPHLTIHKTGYNYMFRPEGL----------------------------------------IVRDLPE-----  287
ScoHcB    AERLSNGLPRSTTFENWNDPIETG-YAPHLTIDRTGYRYQFRPDNL----------------------------------------VVRDLPE-----  292
ScoHcC    AERMSNGLARTRTFQNWNDPIDEG-YAPHISIMKTGYTYAYRPPGY----------------------------------------TLRDLPN-----  297
ScoHcD    TERLSNDLPRVRPFENWNDPIDEG-YSPHLIIDKTGYKYAYRPQGV----------------------------------------IVHDLPN-----  296
SpiHc1    SELLSVHLPRISSLDDWNKKVKIG-YAPHLTIQRTGYTYMNRPENL----------------------------------------EIEDLPE-----  283
GpuHc1    AERLSNHLDLVDEL-YWDR-PIKEGFAPHTTY-HYGGEFPTRPDNV----------------------------------------HFEDVDGL----  303
GroHc1    SERLSNHLDLVDEL-YWDR-PIEDGFAPHTTY-RYGGEFPTRPDHV----------------------------------------NFEDVDGL----  303
CcsHc     AERLSNGLDLVDEL-YWDK-PIVEGFAPHTTY-RYGGEFPARPDNV----------------------------------------NFEDVDGA----  304
EpuHc1    AERLSNHLDMVDEL-YWDK-PIYEGFAPHTTY-KFGGEFPSRPDNV----------------------------------------RFEDVDGV----  301
PleHc2    SERLSNWLDVVDEL-HWED-VIHEGFAPHTSY-KFGGEFPARPDNV----------------------------------------HFEDVDGV----  312
HamHcA    AERLSNWLDPVDEL-HWER-IIHEGFAPHTSY-KYGGEFPARPDNV----------------------------------------HFEDVDGV----  299
PinHcB    FERLSNWLDPVDEL-HWDR-IIREGFAPLTSY-KYGGEFPVRPDNI----------------------------------------HFEDVDGV----  283
PinHcA    FERLSNWLDPVDEL-HWDR-IIREGFAPLTSY-KYGGEFPVRPDNI----------------------------------------HFEDVDGV----  283
PelHc1    AERLSNWMEPVDEL-HWDD-IIHEGFAPHTSY-KYGGEFPVRPDNI----------------------------------------RFEDVDGV----  311
PelHc4    AERLSNWMEPVDEL-HWDD-IIHEGFAPHTSY-KYGGEFPVRPDNI----------------------------------------RFENVDGV----  312
PelHc3    AERLSNWLDPVAEL-HWVD-VIHEGFAPHASY-KHGGEFPTRPDNI----------------------------------------RFKNVDGV----  311
PelHc2    AERLSNWMDPVDEL-HWEE-VIHEGFAPHASY-KYGGEFPTRPDNT----------------------------------------QFKNVDGV----  311
CmaHc6    AERLSNYLDPVDEL-HWDD-VIHEGFVPHTMY-KYGGYFPSRPDNV----------------------------------------HFEDVDGV----  306
CmaHc4    AERLSNYLDPVDEL-HWDD-VIHEGFAPHTMY-KYGGYFPSRPDNV----------------------------------------HFEDVDGV----  305
CmaHc5    AERLSNHMDPVGEL-HWDD-VIHEGFAPHTMY-KYGGYFPSRPDNV----------------------------------------HFEDVDGV----  306
CsaHc     AERLSNYLDPVDEL-HWDD-MIHEGFAPHTMY-KYGGYFPSRPDNV----------------------------------------NFEDVDGV----  306
CmaHc3    AERLSNHLDPVDEL-HWDD-VIHEGFDPQAMY-KYGGYFPSRPDNI----------------------------------------HFEDVDGV----  301
PvaHc1    AERLSNYLDPVEEL-SWDK-PIVQGFAPHTTY-KYGGQFPSRPDNV----------------------------------------DFDDMDGV----  301
PvaHc     AERLSNYLDPVGEL-QWNK-PIVDGFAPHTTY-KYGGQFPARPDNV----------------------------------------KFEDVDDV----  297
PinHcC    AERLSNHLDPVEEL-SWNK-AIDEGFAPHTAY-KYGGYFPSRPDNV----------------------------------------HFSDVDGV----  289
PleHc     AERLSNFLPAVDEL-YWDR-PIKDGFAPHTTY-KYGGEFPARPDNK----------------------------------------EFEDVDGV----  296
CmaHc1    AERLSNHLPLVDEL-YWDR-PIKEGFAPHTSY-KYGGEFPTRPDNK----------------------------------------NFEDVDGV----  296
CmaHc2    AERLSNHLSPVDEL-YWDR-PIKEGFAPHTSY-KYGGEFPTRPDNK----------------------------------------NFEDVNGV----  296
HamPHc1   AERISNHLQKIEKL-HWER-NLHEGFDPHTSY-KNGEHFPFRHDDI----------------------------------------HIEDVDKV----  307
HamPHc2   AERISNHLQKIEKL-HWER-NLHEGFDPHTSY-KNGNPFPFRHDDI----------------------------------------HIEDVDKV----  305
CmaCC1    AERISNHLPPLEEL-KLDK-PLKQGFAPQTTY-NFGGPFATRNDNV----------------------------------------HLQDVDNV----  285
CmaCC2    AERISNHLPPLEEL-KLDE-PLKQGFTPQTTY-KFGAPFPIRNDDI----------------------------------------QLHDVERV----  304
PmaHc2    AERLSNWLPQVEPL-NWHH-EIEEGFAPAAMY-FNGQEFPMRPDGI----------------------------------------HFHDLPW-----  299
PgrHc2    AERLSNFLPQVEPL-DWHH-EIEEGFAPAAMY-FNGQEFPMRPDGM----------------------------------------HFHDLPW-----  299
CseHc2    AERLSNDLPAVEPL-EWDQ-QITEGFAPAATY-ENGQEFPMRPDNM----------------------------------------KFCDLPS-----  301
```

```
PamHc2     AERLSNDLPVVEPL-EWDQ-KIVEGFAPGATY-ENGQEFPMRPDNM----------------------------------------CFSDLPF-----  301
BduHc2     AERLSNDLPVVQPL-EWDK-KIVEGFAPGASY-ENGQEFPMRPDNM----------------------------------------QFSDLPW-----  302
HmeHc2     AERLSNNLPVVQPL-EWNR-KIVEGFAPGAMY-DNGQEFPMRPDNI----------------------------------------GFQDLPW-----  282
TdoHc2     AERLSNYLPVVEPL-DWEK-PIVQGFAPGAMY-ENGQEFPVRPDNM----------------------------------------NFHDLPW-----  280
SamHc1     LERLSNDLPFVEPL-YWTE-RIKDGFYPQTTY-RVGGEFPARPDNF----------------------------------------AFHDLQN-----  306
BduHc1     LERLSNDLPFVEPL-YWDE-KIVDGFYPQTTY-RVGGEFPARPDNF----------------------------------------EFQDLKN-----  309
PamHc1     AERLSNDLPIVEPL-YWDE-KIVDGFYPQTTY-RVGGEFPARPDNF----------------------------------------EFHDLEH-----  305
CseHc1     LERLSNDLPFVKPL-YWED-KIEDGFYPQTTY-RVGGEFPARPDNF----------------------------------------EFQDLQD-----  308
HmeHc1     LERLSNDLPFVEPL-SWED-KIVDGFYPQTTY-RVGGEFPARPDNF----------------------------------------EFQDLEH-----  291
CmoHc1     LERLSNDLPPVEPL-GWRE-RIVDGFYPQTTY-RVGGEFPARPDDF----------------------------------------EFQDLSS-----  307
CacHc1     LERLSNNLPFVEPL-SWDQ-KIANGFYPQTTY-RVGGEFPARPDNY----------------------------------------AFHDLEN-----  303
TdoHc1     LERLSNNLPVVRPL-DWEK-PIVNGFYPQTTY-RKGGEFPARPDNF----------------------------------------YFQDLETPY---  308
PmaHc1     FERLSNWLHFVEPI-SFED-EIEHGFYPQTTY-RVGGEFPARPDNF----------------------------------------HFHDLEH-----  306
PgrHc1     LERLSNWLPFVEPL-SFEE-KIEHGFYPQTTY-RVGGEFPARPDNF----------------------------------------HFHDLED-----  306
ScuHc1     AERLSNDLNEVEAL-HWDK-PIVEGFYPQTTY-RKGGEFPARPDNF----------------------------------------MFHDLKD-----  301
MgeHc1     LERLSNYLPEVEPL-EWFK-PIKSGFAPLTMY-RKGGEFPNRPDNM----------------------------------------LLHDLHD-----  303
TdoHex1    LERLANDLPTIETL-KLNK-YVKRGYAPKLSY-RQGEDFPLRPDNL----------------------------------------QLKDLDYEKPEE  318
PmaHex1    LERLSNGLKEIKPFSYFETQSHIPGYEPSLRY-PNGKEFPMRPEGV----------------------------------------SILNN-------  323
BdiHex     LERHSHDLGEVEPV-HYDR-PFQTEYYPRLRY-SNGQEVPPRPYEYSRRSLYYSNGNSYYYGNYYGGNNNYYTGNYYTGNYHPSYYYGYSTEHDY-----  353
RflHex2    LERLSHDLPEVQPF-HYDK-PFQTAYYPKLRY-ANGQEVPFRPYEYSKRNLYNYNGQGQYYGNYYGGNNEYYSGNYFTGNYKPTYYYGYANNYDY-----  354
PamHex12   LERLSNDLPDVYPF-YYSK-PVKSAYNPNLRY-HNGEEMPVRPSNM----------------------------------------YVTNFDL-----  310
RflHex1    LERMSNGMPEVEPF-VYNK-PLKTAYNPNLMY-HTGQEMPPRPSDM----------------------------------------LVTNFDT-----  311
LmiHex1    LERLSNRLPDVKPV-DYAN-PVLVGYYPELRL-QNGIEAPARPEGV----------------------------------------YPSNFDL-----  314
LmiHex2    LERLSNHLPDVKAI-DYNH-PVLVGYYPELRL-QNGREAPARPEGI----------------------------------------FARNVDI-----  314
RmiHx1     LERLSNHLPEIKAI-DYNH-PVLVGYYPDLRF-QNGNEAPARPEGI----------------------------------------FPRNTDI-----  314
TmoHex2    LERLSHGFGEIENF-DWEV-PFETGYYPSLCY-PNGLHFPTRPNYA----------------------------------------HLYEYFYNYGQK  315
AgeHex     LERLSNGFGEIPIF-NWEV-PVETPYYSSLEY-TNGLEFPSRPKFA----------------------------------------KLYEYFYNYGQS  323
LdeDPl     LERMANGAGDIHTL-DVDS-PIQTPYNPSMVY-PCGAEFPSRPKFA----------------------------------------KLHEYFFNYGKK  321
AgaHex2    LERLSNDLGHVPEF-SWWT-PIATGYYPDLQY-YNGHSFPARDNYY----------------------------------------HVDQESNY----  297
MseAryla   LERLTNGLGEIPEF-SWYS-PVKTGYYPMLY--GSYYPFAQRPNYY----------------------------------------DIHNDKNY----  330
MseArylb   FERLSNGLGDIPEF-SWYS-PVKSGYYPLMS--SYYYPFAQRPNYW----------------------------------------NVHSEENY----  327
CfeHex2    LERMSNDLGDIEDF-DWNK-PFYPGFHSILMY-NNGMVIPQRSRYT----------------------------------------NVPFYKY-----  318
BheHex     LERLANGLEKIEEF-LWEG-EFYPGYYPTMVY-GNGLAYPQRPGMS----------------------------------------RIPPYKY-----  317
StuHc2     LERLSNDLTISKPL-AWYR-PVVEGFSPDAIY-KHGFQFPMRPDNT----------------------------------------KFHDLST-----  295
StuHc3     LERLSNNLDVVKPL-AWDK-PIEHGFSPETVY-RTGDEFPVRPDDM----------------------------------------MFHDIHGI----  302
StuHc1     LQRLSNNLPIVGPL-AWDK-PIHNGFYPQAAY-RNGHEFPARPDDV----------------------------------------KFTDLDKDGFH-  314


EpiHc      ---------NTVIELERFRERIEHAISVGYIEL-PD--NT-KTPLNNE--QGIDILADLIEASNY----SLNGAYY-----GDLHNTGHVMLATAHDPDK  344
LpoHcI     ---------VTIQDMERWRERIHDAIDLKMVHD-HH--GK-EVAVDDE--HGIDILGALVESSHE----SVNQGFY-----GSLHNWGHVLTARAHDPEG  336
TtrHcA     ---------VTIQDMERWVQRIMEAIDLHLVND-TH--GN---KLDET--TGIDVLGALVEASHD----SINPEYY-----GSLHNWGHVITARAHDPEG  332
EcaHcE     ---------IDLKEMFRWRERILDAIDSGYYID-NE--GH-QVKLDIV--DGINVLGALIESSFE----TKNKLYY-----GSLHNWGHVMMARLQDPDH  335
NinHcE     ---------VDVQDMIRWRERILEAIDLGFVED-ES--HQ-QIKLTED--NGIDILGSIVESSYE----SKNKLFY-----GSLHNWGHVMMANITDPDG  336
EcaHcG     ---------LEVQDVERWRDRILDAYHLNHVHD-RE--NN-DVVLDAE--HGADILGAIIESSSD----SVNRRFY-----GSLHNWGHVMMARMTDPDR  337
NinHcG     ---------VDVQDMERWRERILEAIDLKHVHD-SK--GN-EVPLDET--NGANILGTIIEASSD----SPNKGFY-----GSLHNWGHVMMARMHDPDG  336
CsaHc1     ---------VDVQEMERWRERILKAIDLHFVHG-AN--GQ-TLRLDEE--HGADILGALIEASSS----SPNKGFY-----GSLHNWGHVMMARMHDPDA  336
AauHc6     ---------VDVQDMVRWRERILDAINMHYIVD-KD--NN-KIPLDIE--HGTDILGDIIESSDE----SKNVEYY-----GSLHNWGHVMMANITDPDH  336
LpoHcIV    ---------VSLQEMERWRERILEGINLGHVHD-DH--GK-EVELDEE--HGIDILGALIESSHE----SKNEEYY-----GSLHNWGHVMLARVHDHDG  337
EcaHcF     ---------VDVQDMARWRERLLYSIDIGHVID-HE--GQ-EIPLDAE--HGIDVLGALLESSHD----SLNDDYY-----GNLHNSGHVMMARIHDPDG  339
NinHcF     ---------VDVQDMARWRERLLEAIHLGVVID-DH--GN-EIVLTPE--HGIDMLGSMLESSYE----SKNREYY-----GNLHNSGHVMMARIHDPDG  338
EcaHcD     ---------CSVQDMERWRERILDAIHTGLVTD-SH--GK-EIKLTEE--NGLNILGALIESSHD----SVNKPFY-----GTLHNWGHVMIARIHDADG  337
NinHcD     ---------VDVQDMERWRERILSAIHTGQVID-SN--GQ-EVPLDLE--RGLDILGALIESSQE----SLNKGYY-----GTLHNWGHVMVAKIHDHDG  336
LpoHcII    ---------IEISEMVRMRERILDSIHLGYVIS-ED--GS-HKTLDEL--HGTDILGALVESSYE----SVNHEYY-----GNLHNWGHVTMARIHDPDG  340
EcaHcA     ---------VDVQDMERWTERIMEAIDLRRVIS-PT--GE-YIPLDEE--HGADILGALIESSYE----SKNRGYY-----GSLHNWGHVMMAYIHDPDG  341
NinHcA     ---------VDVQDMQRWTERILEAIHLGKVID-SE--GN-DIILDEE--TGADILGSLIESNLE----SKNRQFY-----GNLHNWGHVMMAYIHDPDG  341
LpoHcVI    ---------VSVQDLERWRDRISDAIHIGHVED-EN--GS-HVPLDDT--RGIDILGAMVEASYE----SINQAFY-----GSIHNWGHVISARVLDPDG  341
EcaHcB     ---------VSVQDLERSRERLLDAINLGYVVD-PN--GL-ETPLDEL--HGIDILGAIVESSND----SVNKSYY-----GSLHNWGHVIMSAVDDPDG  339
NinHcB     ---------CAVQDMERWRERILQSINLGVVVD-PN--GH-ETVLDEI--HGIDILGNIIESSYD----SVNVPFY-----GSLHNWGHVLMAAAHDPDG  339
EcaHcC     ---------VSVQDLERWRERILDAINLGEVTD-PN--GD-EYALDET--FGIDVLGAIIESSRD----SKNRESY-----GSLHNWGHVLMANIVDPDG  341
ScoHcA     ---------LNKNKMRQWKSRILHGIHLNVLYA-EN--GT-KISLDNE--HGIDLLGDAIESSLL----SVNRAFY-----GNIHCYAHVMAARIADPDG  363
ScoHcB     ---------LTKNHMRQWRDRILYAVHRGEALA-AN--GS-SVSLRDE--RGIDVLGNMVESSLQ----SINRPFY-----GNVHCYAHVIAARIADPDG  368
ScoHcC     ---------LPKNKMVEWAKRVLYSIHSGIFHF-SN--GT-DAHLDTE--HGIDELGNIVESSLT----SLNRDYY-----GNLHCYAHVIAGRIADPEG  373
ScoHcD     ---------LPKTKMFEWKNRIMVGIRKGSLIS-AN--KT-QVPLNND--HGIDLLGDVVESSLL----SVNRVFY-----GNLHCYAHVIAGKVTDPQS  372
SpiHc1     ---------LTKGELMQWKNRIMEAIARHNITL-KGGPGK-KLRTTPE--NGIDIFGHLIAATKN----STNRRYY-----GNLHSYAHVIAARIADSDG  361
GpuHc1     ---------VRVRDMIIHESRIRDAIAHGYITA-AD--GS-HININDE--HGIDHLGDIIESSLY----SPNAQYY-----GALHNDAHVILGRQADPHG  379
GroHc1     ---------VRVRDMIIHETRIRDAIAHGYITA-AD--GS-HININDE--HGIDHLGDIIESSLY----SPNAQYY-----GALHNEAHIILGRQADPHG  379
CcsHc      ---------VRVRDMIVHETRIRDAIAHGYITS-ED--GS-RVDIRDE--NGINLLGDIIESSVY----SLNAGYY-----GALHNDAHILLGRQSDPHG  380
EpuHc1     ---------ARIRDMIIYESRIRDAIAHGYVTA-KD--GS-HIDIRNE--HGIDVLGDVIESSTY----SPNAGYY-----GALHNLAHIILGRQGDPHG  377
PleHc2     ---------ARVRDMVILESRIRDAIAHGYIID-HS--GN-KIDIKNE--HGIDTLGDIIESSVY----SPNVQYY-----GALHNTAHIMLGRQGDPHG  388
HamHcA     ---------AHVRDMIIIESRIRDAIAHGYVTD-NH--GD-NINIRND--HGIDVLGDIIESSVY----SPNAQYY-----GALHNTAHIMLGRQGDPHG  375
PinHcB     ---------AHVHDLEITESRIHDAIDHGYITD-SD--GH-TIDIRQP--KGIELLGDIIESSMY----SSNVQYY-----GSLHNTAHAMLGRQGDPHG  359
PinHcA     ---------AHVHDLEITESRIHEAIDHGYITD-SD--GH-TIDIRQP--KGIELLGDIIESSKY----SSNVQYY-----GSLHNTAHVMLGRQGDPHG  359
PelHc1     ---------AHVHDMEITENRIRDAIAHGYITA-TD--GH-TIDIRQP--NGIELLGDIIESSMY----SSNPHYY-----GSLHNTAHMMLGRQGDPHG  387
PelHc4     ---------AHVHDMEITENRIRDAIAHGYITA-TD--GH-TIDIRQP--NGIELLGDIIESSMY----SSNPHYY-----GSLHNTAHMMLGRQGDPHG  388
PelHc3     ---------ARVHDMEITESRIRDAIAHGYITA-TD--GH-TIDIRQP--NGIELLGDIIESSMY----SSNPHYY-----GSLHNTAHMMLGRQGDPHG  387
PelHc2     ---------ARVRDMEITESRIRDAIAHGYITA-TD--GH-TIDIRQP--NGIELLGDIIESSMY----SSNPQYY-----GSLHNTAHMMLGRQGDPHG  387
CmaHc6     ---------ARVRDMLILESRIRDAIAHGYVTG-RD--GS-IISISDS--HGIDVLGDVIESSLY----SPNPEYY-----GALHNTAHMMLGRQGDPHG  382
CmaHc4     ---------ARVRDMLILESRIRDAIAHGYVTG-RD--GS-IISISDS--HGIDVLGDVIESSLY----SPNPEYY-----GALHNTAHMMLGRQGDPHG  381
CmaHc5     ---------ARVRDMLILESRIRDAIAHGYVTG-RD--GS-IISISDS--HGIDVLGDVIESSLY----SPNPEYY-----GALHNTAHMMLGRQGDPHG  382
CsaHc      ---------ARVRDMLILESRIRDAIAHGYFTG-RD--GS-VISIRDA--HGIDILGDVIESSTY----SPNPEYY-----GSLHNTAHVMLGRQGDPHG  382
CmaHc3     ---------ADVRDMLLYEERILDAIAHGYVRD-RN--GK-IVDLRNN--DGIDVLGDVIESSLY----SPNPQYY-----GALHNTAHMMLGRQGDPHG  377
PvaHc1     ---------ARIRDLLIIESRIRDAIAHGYIVD-KV--GN-HIDIMNE--RGIDVLGDVIESSLY----SPNVQYY-----GALHNTAHIVLGRQSDPHG  377
PvaHc      ---------ARIRDMVIVESRIRDAIAHGYIVD-SE--GK-HIDISNE--KGIDILGDIIESSLY----SPNVQYY-----GALHNTAHIVLGRQGDPHG  373
PinHcC     ---------ARVRDMSMTEDRIRDAIAHGYIDA-LD--GH-SIDIMNS--HGIEFLGDIIESSGY----SANPGFY-----GSLHNTAHIMLGRQGDPTG  365
PleHc      ---------ARIRDLKELESRIRDAVAHGYIIN-AD--GT-KTDINNE--HGIDILGDIIESSTY----STNAAYY-----GALHNQAHRVLGAQSDPKH  372
CmaHc1     ---------ARIRDLKEMENRIRDAIAHGYADN-TD--GT-HLDINND--EGINVLGAAIESSTS----SIHPSYY-----GALHNQAHRVLGQQADPHG  372
CmaHc2     ---------ARIRDMKIMESRIRDAIAHGYADN-TD--GT-HLDINND--EGINVLGAAIESSTS----SIHPSYY-----GALHNQAHRVLGQQADPHG  372
HamPHc1    ---------AEVRDMIVMENRIRDAIAHGYVID-KE--GN-KVDINNE--HGIDILGEIIESCVY----NPYNEYY-----GSLHNMGHMMLGHQGDPHA  383
HamPHc2    ---------AEVRDMIVMENRIRDAIAHGYVID-KE--GN-KVDINNE--HGIDILGDIIESCVY----NPYNEYY-----GSLHNMGHMMLGHQGDPHA  381
CmaCC1     ---------GRIHEIVHMEDRIHDAIAHGYVED-EQ--GN-KINIENE--QGIDILGDIIQSSLY----SPNRKYY-----GNLTTLAYTMLDHQTDPKN  361
CmaCC2     ---------GRIHEIVHLEDRIHDAIAHGYVED-EQ--GN-KINIEND--QGIDIIGDIIQSSLY----SPNRKYY-----GNLTTLAYNMLDHQTDPKN  380
PmaHc2     ---------FTVKDTEDYEDRIRNVIAKGYVKA-SD--GH-TIFLNGT--EGINILGLVVESLDH----DYNRHYF-----GKLHSNAHVLLSKVTDPEQ  375
PgrHc2     ---------FTVKDTEEYEDRIRDIIAKGYVKA-KD--GH-VVFLNGT--EGIDVLGLVVESLDH----DFNSHYF-----GRLHLNAHVLLSKITDPEQ  375
CseHc2     ---------LSVRDMKIVEGRIRDAIASSFVKT-AD--SR-LLSINNT--AGVNLLGEIIESSAN----SVNPVYY-----GQPHNDGHVMLSKVTDPLQ  377
PamHc2     ---------LTVQDMKIFEGRIRDAIASGYVKT-VD--SR-LMSLNNT--AGINLLGEIVESSTH----SVNPVFY-----GKLHNDGHVMLSKVTDPHL  377
BduHc2     ---------LTVQDMRLYEGRIRDAIASGFVRT-AE--GK-LVSLNNT--VGINYLGEVVESSVH----SVNPVFY-----GKLHNDAHVLLSKVTDPKL  378
HmeHc2     ---------LTVQDMLMYEGRIRDAITAGFVRA-YD--GN-YVSLNNT--EGINVLGEIVESSAH----SVNPAFY-----GQLHNDGHVMLSKVTDPKL  358
TdoHc2     ---------LTIEDMKGYEDRIRDAIASGFVIS-VD--DS-LVYLNDT--RGIDVLGAVIESSEH----SQNKELY-----GSLHNNAHVLLGKVTDYSL  356
SamHc1     ---------IKVQQMIDYTRRVRECISQQAVIT-ET--GD-LYNISSP--EGINVLGELIEPSTG----SKHREYY-----GALHNYGHIMLGQITDPKR  382
BduHc1     ---------IKVKDMVDYTRRIREAISQQAVIT-KN--GD-YYSLNDT--TGIDTLGALIEPSVD----SKHPEYY-----GALHNYGHIMLGQITDPKG  385
PamHc1     ---------IKVKDMMDYTRRIREAISQQAVVT-RT--GE-MVSLNNT--QGIDILGCMVEPSHD----SKHPEYY-----GALHNYGHIMLGQITDPKG  381
CseHc1     ---------IKVKDMVDYTRRIREAISQQSVIT-RW--GQ-NLPLNDT--MGINILGSLVEPSQE----SPNPQYY-----GALHNYGHILLGQITDPKG  384
HmeHc1     ---------IKVKDMVDYTRRIREAISQMAVVT-KS--GE-YYSLNNT--KGINTLGEIMEPSFD----SKHPEYY-----GALHNYGHIMLGQIVDPKG  367
CmoHc1     ---------IKVQDMVDYERRVREAISQQAVIT-MS--GD-YFSLNDT--TGINTLGEMMEPSTT----SKHRDYY-----GALHNYGHILLGKITDPKG  383
CacHc1     ---------IKIKDMIDYTRRIREAIAQQAVIT-KS--GE-YFYLNDS--KGIEVLGDLMEPSFD----SKHPEYY-----GALHNYGHILLGQITDPKG  379
TdoHc1     ---------IKVKHMIAYSQRIREAIARGVVLT-KS--GE-LYSINDT--TGINTLGELIEPSVF----SRHREYY-----GALHNYGHILLGRITDPKG  384
PmaHc1     ---------IKIKDMLDYTRRIKEAISKQKVRS-KN--GE-KIPLDAV--HGIDILGDLMEPSVE----SPHEDYY-----GSLHNDAHVLLGQITDPLG  382
PgrHc1     ---------IKIKDMLDYTRRIKEAIVKHTVIN-KN--GE-HIPLDAV--HGIDILGDLMEPSVE----SPHEDYY-----GSLHNYAHILLGKVTDPLG  382
ScuHc1     ---------HRVADLEAYEERIREAISAGVIFDAHD--PNTFISLNNT--EGIDKLGAIIEASSC----SINPSFY-----GSLHNLGHILLGRVVDPLG  379
MgeHc1     ---------LKVHDVVVFEERIKEAIDRGFVYN-KW-IGE-KIRLNNS-IEGIETLGRMIEASRL----SPDIDYY-----GSIHNLGHILLGEIMDPDH  381
TdoHex1    R--------LKVRDVNDYERRVRDAIDRGYIFT-DE--NN-QVPLNND--KGIDILGKIVGAT-H----DENDKYYGNKYHGSIKTMTHKIVGRVTDPED  399
PmaHex1    ---------YHVEEVFALERRIHDAIDLGFVFG-KD--GQ-KISLKEK--EGISILGDMIEGTED----STNKQFY-----GSLYNMLRTVYGHYADPMY  399
BdiHex     ---------YYPEDLQIYDRRVLDSIDYGYVFS-YP--DH-KYPLYEDYTKGIDYLGDVIEGNGD----TVNRRYY-----GSIYHFYRQLAGKNVDPYN  431
RflHex2    ---------YYPEDIKSYEGRIRDGIDFGYFFS-EG--GQPKYPLYDEYSKGINYLGDIIEGNGD----TVNKRVY-----GAIYQAYRQLAGQSADPYN  433
PamHex12   ---------YYIADIKNYEKRVEDAIDFGYAFD-EH--MK-PHSLYHD-VHGMEYLADMIEGNMD----SPNFYFY-----GSIYHMYHSMIGHIVDPYH  387
RflHex1    ---------YTIEDIKNYERRVADVIDFGYFKD-EH--LK-VHSMYED-NNGINYLGQMIEGSYN----SPHYYYY-----GSLFHFYRMMLGHMMDPFH  388
```

```
LmiHex1   ---------LFVERIQNYERRIRDAVDFGYLYG-YD--FK-TFNLNEK--DLTDIIGNVIEGNAE----SVNYEFY-----GSIYRYLISLFGHIADPYH  390
LmiHex2   ---------LYVEEIRNYERRIRDGIDYGYLAG-YN--YE-KYNVREK--DYTNVLGNILEGNED----SINKEYY-----GAFYNNLISLFGHIVDPVH  390
RmiHx1    ---------SYVEEIKDYDRRIRDSIDYGYFAG-YN--YE-KYNIREK--DHTNILGNILEGNAE----SINKEYY-----GSLYRNLITLFGHIVDPVQ  390
TmoHex2   YGF-NKYA-NSYSYVKDFERRIHDVIDSGYAHT-ES--GQ-TVELFSH--HGMNILGNLIEGNPD----SPYYHYY-----GAFQVFARHLLGYSQQPLT  398
AqeHex    WTIRNEYG-YSPTFVKDAERRINDAIDSGVAFT-HE--GK-MIDLYSD--EGMNVLGNLIEGNAD----SPYQAYY-----KALWYYARHLLGYSYQPLD  407
LdeDP1    WSW-SRFGTNSFDFMADYDRRMNDAIDQGFVFD-TK--GN-KIELDTP--EGFNVLGNLIQSNWD----SPNRKFY-----GALWSYLRHFFGYSYAPVN  405
AqaHex2   ---------REIRQVVDYEKRLRDVIDQGFFVL-PD--GK-KVNLSTP--ESIDVLGNLIQANPD----SYEHRFY-----KYVAMYARIIMGAAIEPVE  373
MseAryla  ---------EQIRFLDMFEMTFLQYLQKGHFKAFDK-----EINFHDV--KAVNFVGNYWQANADLYNEEVTKLYQ-----RSYEINARHVLGAAPKPFN  409
MseArylb  ---------EKVRFLDTYEMSFLQFLQNGHFKAFDQ-----KIDFHDF--KAINFVGNYWQDNADLYGEEVTKDYQ-----RSYEIIARQVLGAAPKPFD  406
CfeHex2   ---------KYLKEVEVLEKRIMDAIDLGYVHD-KD--GK-QVNIYTS--EGLSILANLIEGNVD----SCNRRFY-----GMYDALARDILGFNIDYKN  394
BheHex    ---------HYLRYIHDIEDRISTAIDLGYIID-SD--GS-HHNISSP--EGLNLLGNIIEGNED----SCNKNFY-----HSLDWYGRKVLGFNLEPKT  393
StuHc2    ---------VTVNHMRAYESRIHESIDFGHVYS-TN--GT-EVSLNDE--HGINILGEIVEASEH----SINPDYY-----GSLHNLAHVMLGRITDPEG  371
StuHc3    ---------VSVTDMKAMEYRILHTIDANLYVA-EN--GT-FPKLEVD--TGINTLGEIIEASEH----SVNPGFY-----KSIHTLSHVMLGKITDPEH  378
StuHc1    ---------IKVSQMKEYERRIRDAIAMKAVYG-KD--GH-AISLNNT--HGINTLAEIIEASAF----SVNPDFY-----GSIHNMAHIMLGELDDPQG  390


EpiHc     RFNSSDGVMGFVQTALRDPL-FYRWHKHIDNLLQNHKR-TLQPYTDKELI--ADKIEIKEASITSSQTKDPKNKLYTFFDTKQLNLTKGL-DFGNL----  435
LpoHcI    KFHENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRWHRTLDNLFQEYKE-SLSPYTKEELS--FPGVEVLSATV-KAKT---DNVIITSMVESELELTHGI-NFGT-----  422
TtrHcA    KFHENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRWHRFIDNVFQDYKE-SLHPYTKHELS--FTGIKVVNVSV-NAKVITARNVITTFIKKNELELTHGI-DFGT-----  421
EcaHcE    RFNENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRYHRFIDNIFQKYIA-TLPHYTPEDLT--CPGVHVVNVTV-NAKV---PNVVTTFMKEAELELSYGI-DFGS-----  421
NinHcE    RFNENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRYHRFIDNIFQDYKQ-TLKPYDKAQLD--FPGVQVVNVTV-NAKV---PNLVTTFMKTDDLELTHGI-DFGT-----  422
EcaHcG    SFEENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRWHRFVDNIFQEYKA-TLPSYTADDLN--FPGLRIVSVQV-NAKS---QNRVRTFLKQEELVLSHGI-NFGT-----  423
NinHcG    RFQENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRWHRFVDNIFQQYKS-TLQPYTWEQLS--FPGVKAVSCEV-KAKQ---NNVITTFIKDEELTLSHGI-NFGT-----  422
CsaHc1    RFQENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRWHRFVDNIFQQYKA-TLHPYTKEELS--FAGVKIVNAYV-KAKK---TNVVTTFMKDDHLDLSHGI-EFGT-----  422
AauHc6    RFQENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRWHRFIDNIFQEHKK-SFHPYTKEELS--FPGVEVVGVSI-NSKT---ANVITTLIKESLLELSHGI-NFGT-----  422
LpoHcIV   RFHENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRYHRFIDNMFQEYKA-SLHHYTKTELT--FPEISISHVTI-KAKV---PNIIHTFMATDELELSHGI-HL-------  421
EcaHcF    RFRENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRYHRFIDNIFQEYKA-TLPCYEKKDLE--FSGVEIVNCTV-NAKA---PNVINTYMKESTLEMSHGI-SF-------  423
NinHcF    RYKENPGVMSDTSTSLRDPI-FYRYHRFIDNIFQEYKA-TLPVYDKKDLD--FPGVSVVNVTV-NAKL---PNIVNTYLKEDQLEVSHGV-SL-------  422
EcaHcD    RYRTNPGVMDDTSTSLRDPI-FYRYHRWMDNIFQEYKH-RLPSYTHQQLD--FPGVRISRVTV-RSKV---PNLIHTYSKDSLLELSHGI-NL-------  421
NinHcD    RFKENPGVMDDTSTALRDPI-FYRYHRWMDNIFQEYKR-RLSSYTPQDLS--FPGVRVVNVTV-NAKV---PNLIHTYSKDAYLELSHGI-NL-------  420
LpoHcII   RFHEEPGVMSDTSTSLRDPI-FYNWHRFIDNIFHEYKN-TLKPYDHDVLN--FPDIQVQDVTL-HARV---DNVVHTFMREQELELKHGI-NPGN-----  426
EcaHcA    RFRETPGVMTDTATSLRDPI-FYRYHRFIDNVFQEYKK-TLPVYSKDNLD--FPQVTITDVKV-KAKI---PNVVHTFIREDELELSHCL-HFAK-----  427
NinHcA    RFRETPGVMTDTATSLRDPI-FYRFHRFIDNVFQEYKK-TLPVYSRDNLT--FPDIEITESKV-NAKI---TNVIHTFIREDELELTHCM-NFGS-----  427
LpoHcVI   RYHLNPGVMSDTATSLRDPI-FYRWHRFIDNMFQDYKE-TLPHYNHSDLE--FPGIEITKVLL-NAEH---TNNINTFKEFSVLDLSHAY-EFGR-----  427
EcaHcB    RYQLNPGVMSDTATSLRDPI-FYRWHRFIDDMFQEYKK-SLTPYS-SQLQ--FKGVIVKSVCV-RAKT---ADVVETTFANALLDISHAF-NFGR-----  424
NinHcB    RYKLNPGVMDDTATALRDPI-FYRWHRFIDDLFQEYKK-TLPPYTKDELS--FGNVFVKSLNV-KAEQ---PNTVKTFFREDFLDVSHAF-YFGR-----  425
EcaHcC    KYQTNPGVMDDTATSLRDPI-FYRWHRFIDDMFQEFKR-KLKPYTKDQLS--FTGVEIKNVKV-HAHE---ENVITTFVEDLLEISNAF-NFGR-----  427
ScoHcA    RYGEDNGVMHDVATSARDPL-FYRWHKFIDNIFLEYKD-NLDPYTQYELT--WPDVVLNDVTV-KPHKGDYDDEVHTYWEVDNYELGKGF-DYTR-----  452
ScoHcB    KYGEDNGAMYDVATSARDPL-FYQWHKFIDNLFHEYKD-ALKAYSSEDLT--YNDITIEEVNV-QGEGGSPANTVTTFLENSIVHLDEGF-SFTA-----  457
ScoHcC    KYGEDNGVMYDVATSARDPL-FYRWHKYIDNIFQEYKN-TLPPYTTEELTPQNSEFRVQGISV-VGET-SARDTVHTYWQHSLLKVGQGF-EFTK-----  463
ScoHcD    TYGEKNGAMYDVATSARDPL-FYSWHKFIDNIFQEHKE-TLQPYNKDELN--FPDVQVDSLRI-NVANGTYENIVRTYWQNSLFKIAKGF-TFTT-----  461
SpiHc1    EHMEDNGAMYDVATSARDPL-FYSWHKFIDKLFTEYQM-TLTPYTPYQLT--WPDVVVDGIHI-ENLKTHEENMIHTYYTSSTLRLSKGF-DYTK-----  450
GpuHc1    KFNLPPSVMEHFETATRDPA-FFRLHKYMDNIFKEHKD-SLPPYTAEEIG--FPGVHVTGVSI--------EGELETFFEDFEFDLKMAVDSSEAVA---  464
GroHc1    KFNLPPSVMEHFETATRDPA-FFRLHKYMDNMFKEHKD-SLAPYTAEEIG--FPGVHLTSVSI--------EGELETFFEDFEYDLKMAVDSSEAVA---  464
CcsHc     KFNLPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYMDGIFKEHKD-TLPAYTKEEIE--FSGISLEKISV--------DGPLETFFEDYEFDLSNAVDSSDKIE---  465
EpuHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDGIFKEHKD-SLPPYTKEEIE--FPDIAINAVGV--------KGELKTFFEDFEFDLQMAVDDTPEVQ---  462
PleHc2    KFDMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFKEHKD-TLPPYTKEDIA--FPGVVLDSVTI--------DGELKTYFDTFEFSLVNAVDQSDKVA---  473
HamHcA    KFNMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFKEHKD-SLPPYTKADIE--FTGVAVEEVEI--------VGQLNTFFDEFEFSLGNAVDELEKVH---  460
PinHcB    KFNLPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFKKHTD-SFPPYTHDDLE--FAGMVVDGIAI--------DGELITFFDEFQYSILNAVDSGENIE---  444
PinHcA    KFNLPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFKKHTD-SFPPYTHDNLE--FSGMVVNGVAI--------DGELITFFDEFQYSLINAVDSGENIE---  444
PelHc1    KFDMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFEHTD-SFPPYTHEDLE--FPGVSVDNIAI--------DGHLTTFFDQFKYSLVNAVDSGENVE---  472
PelHc4    KFDMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHRYMDNIFEHTD-SFPPYTHEDLE--FPGVSVENIAI--------DGHLTTFFDQFKYSLVNAVDSGENVE---  473
PelHc3    KFNMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFEHTD-SFPPYTHEDLE--FAGVSVDNIAI--------DGHLTTFFDQFKYSLVNAVDSGENVE---  472
PelHc2    KFDMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFKEHTD-SFPPYTHEDLE--FPGVSVENIAI--------DGHLTTFFDQFKYSLVNAVDSGENIE---  472
CmaHc6    KFDLPPGVLEHFETATRDPA-FFRLHKYMDNIFREHKD-SLTPYTKDELE--FPGVKIDSISL--------SNRLETYFEDFEYSLINAVDDTTKVA---  467
CmaHc4    KFDLPPGVLEHFETATRDPA-FFRLHKYMDNIFREHKD-SLTPYTKDELE--FPGIEIDSFSL--------SNRLETYFEDFEYSLINAVDDTAEIA---  466
CmaHc5    KFDLPPGVLEHFETATRDPA-FFRLHKYMDNIFREHKD-SLTPYTKDELE--FPGVAVESISL--------KNRLETYFEDFEYSLINAVDDTAEIA---  467
CsaHc     KFALPPGVLEHFETATRDPA-FFRLHKYMDNIFREHKD-SLTPYTKDDLE--FSGISVDSLDI--------SNRLETHFEDYEYSLINGVDDTVDVL---  467
CmaHc3    KFDLPPGVLEHFETATRDPA-FFRLHKYMDNIFRKHKD-SLPPYTKEELN--FEGVNIDNFYI--------KGNLETYFETFEYSLVNAVDDTEDVD---  462
PvaHc1    KYALPPGVLEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFKEHKD-SLPPYTVEELT--FAGVSVDSVAI--------EGELETYFEDFEYNLINAVDDTEQIA---  462
PvaHc     KFDLPPGVLEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFKEHKD-NLPPYTKADLE--FSGVSVTELAV--------VGELETYFEDFEYSLINAVDDAEGIP---  458
PinHcC    KFDLPPGVLEHFETSTRDPS-FFRLHKYMDNIFREHKD-SLTPYTRDELE--FNGVSIDSIAI--------EGTLETFFENFEYSLLNAVDDTVDIA---  450
PleHc     KFNMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYMDGIFKEHKD-NLPPYTEEDLL--YSNVKITGVDV--------TE-LSTFFEDFEFDLSNALDTTENVN---  456
CmaHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFKEQKD-KLPPYTTDDLK--YDNVEITDVDI--------DE-LSTFFEDFEFDLRNALDTSDNVG---  456
CmaHc2    KFNMPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYMDNIFEQKD-KLPPYTTDDLK--YDNVEIKSVDV--------DE-LSTFFEDFKFDLRNALDTSDGVG---  456
HamPHc1   KYYDTPSVLEHYETTLRDPA-FYKLHKYIDDLFRKHKD-HLKPYSRKELL--FPGIAINNIHI--------DGPLETYFEDYEYSLMNAMDDKEEMKWED  471
HamPHc2   KYYDTPSVLEHYETALRDPA-FYKLHKYIDDLFRKHKD-HLKPYSQEDLL--FPGVAVNMIDI--------DGPLETYFEDYEYSLMNAMDDKEEMIWED  469
CmaCC1    KYDTPPGVLAHLETLPRDPA-AWRLHKRIDNIFREHID-SLPPYTKEQLE--FTGITVSDVQI--------QGSLETYFEEYKYDLINGLNDNTTETE--  447
CmaCC2    KYDTPPGVLAHLETLPRDPA-AWRLHKRIDNIFREHID-SLPPYTKEQLE--FTGISVENVQI--------QGNLETYFEEYKYDLINGFNDNTTQTE--  466
PmaHc2    KFGTPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHIDNLFKQHKD-MLTPYTKEELD--FPGVTVDAVKVVGKSEDSTANQIVTFFDESHINLGNMWVHTPEK----  467
PgrHc2    KFGTPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHIDNLFKMHKE-MLSPYTKEELD--FPGVIVDAVKVVGKSEDSTANQIVTFFDESHINLGNMWAHTPEK----  467
CseHc2    RYGVPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHVDNLFKLHKD-LLLPYDVSELD--FPGVKIEAVKVVGSCKASTPNQLITYFDESHIDLNNIVENVGREQ---  470
PamHc2    RYGVPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHVDNLFKFHKD-LLVPYSFHELE--FPGVKIEAVKVIGTCKASTPNHLITYFDESHIDLNNIVDTSGQKE---  470
BduHc2    RYGVPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHVDNIFKLHKD-LLPPYDVSELE--FPGVKVEAVKVIGTCKASTPNQLITYFDESHIDLGNAVDTATHKQ---  471
HmeHc2    RYGLPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHVDNLFKMHKD-FLPPYQTHELL--FPEVTVEAVKVIGVCKASIPNHLITYFDESHIDLGNAVYTTGQRE---  451
TdoHc2    KYGLPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKLVDNLFKEHKD-LLPPYTKEDLA--FPGVSIDAVKVVGTCKASTPNQLVTYFDEFNIDLANAVEGHYKEG---  449
SamHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYIDNLFYEHKD-LLPRYTSEELE--LPGTSIEEVQI---------DPLETFFEYFDVDLLNALDDTEELP---  466
BduHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYIDNLFKLHKD-LLPKYTQAELS--FPGVKVSDVTV---------DELVTYFEDFDIDLLNALDDTQELD---  469
PamHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYIDNLFKLHKD-LLPHYTMEELG--FNGVTIQDLTV---------DDLVTYFEDFDIDMLNALDDTAELQ---  465
CseHc1    KFDMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYIDNLFKLHKD-MLPPYAREELE--FPGVAIQDVTV---------DDLVTYFEDFDIDLLNALDDTLELK---  468
HmeHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYIDNLFKIHKD-LLPVYTHEELD--FPGLKVVDLDV---------DVLQTYLEDFDIDLLNALDDTQELD---  451
CmoHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHIDNLFKLHKD-LLPPYKQEELV--LPGVKITDVAV---------EPLETYFEDFDADLLNALDDTIDLD---  467
CacHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYIDNLFKLHKD-LLPSYSKEELS--LDGVQIEDVQI---------DELTTYFEDFDIDLLNALDDTVELE---  463
TdoHc1    KFNMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKYIDNLFKEHKD-HLPHYTRDELL--LPGVSINSVEV---------DELVTYFEDFDIDLLNALDDTVELP---  468
PmaHc1    KFDLPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHIDNLFKMYKD-LLPPYTKAELE--FPGVKVLDWEI---------GNLVTYFEDFDIDMLNALDDTADLP---  466
PgrHc1    KFDLPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHIDNLFKMHKD-LLPPYTKAELE--FPGVKVLDWEI---------GNLVTYYEEFDIDMLNALDNTVDLP---  466
ScuHc1    KFGMPPGVMEHFETATRDPA-FFRLHKHIDNIFKEHKD-SLVPYTHEELD--VEGVDIKNVEV---------DDLVTYFEDFDIDMLNALDDAAGLT---  463
MgeHc1    KFNLPPGVMEHFETAMRDPV-FFSLHKHIDYIFKHYKD-TLVPYKREELD--FPGVKVENVEV---------DRLVTFFEPFDIDLYNALDDDKTVS---  465
TdoHex1   KYDQTPSVLEHYETSVRDPA-FYSIHKRINRLFQKHKE-NLPQYTRQDIQ--EQGVKVVNVEV---------DKLMTYFEDYDVDLTNVVDATL-KEGER  485
PmaHex1   QYEVAPSVLEHFTTALRDPA-YYTLYKRIDTLFKEYKK-LMPEYTYDELT--YPGVKVESVEI---------EKLVTYFDNFDIDLDNAVDVGVIEDGQ-  485
BdiHex    DSGFAPSALQNIYTALRDPA-NFHILKHINSYFQRYKG-YLPRYTYDELV--FPGVKIENVDV---------GKLVTYFDYFDVDIDNVVNVKVAEDGK-  517
RflHex2   NYGLAPSALQNIFTALRDPA-NYQILKRITYLFQRYKN-YLPQYTYQELA--YPGVTIENVEV---------GKLITYNDYFDIDLDNVVNVKVPEDGQ-  519
PamHex12  KMGLAPS-LEHPETVLRDPV-FYQLWKRVDHLFQKYKN-RLPRYTHDELA--FEGVKVENVDV---------GKLYTYFEQYDMSLDMAVYVNNVDQIS-  472
RflHex1   KHGLAPSALEQPETALRDPA-YYQLYKRMYHLVNKYKD-RLPRYTHEQLW--FEGVTVENVDV---------GKMYTYMENFEFSLGGTIYVAKEEDML-  474
LmiHex1   KYGAPASVLEQPETQLRDPL-FYRIAKRVISIFYQYKN-QLKPYTKNQLE--FPGVAIEGITF---------DKLVTFFDDFDIELNNALSFSKPEQGD-  476
LmiHex2   RYGVPASVLEQPETQLRDPL-FYRIGKRVLSIFYHYKN-LLRPYTHEDLY--LPGVTVEDITF---------DKLVTFFDTFDFEINNALTLSKPEEGA-  476
RmiHx1    RYGVPSSVLEHPETQLRDPL-FYRIARRIVSILHHYKS-HLKPYNHEELL--LPGVSVEDITF---------DKLVTYFDTFDFEINNAVAFSGTEDGS-  476
TmoHex2   YFKLHPSALEHFETSLRDPA-FYQLYKKLLSYFIRYQANHKHYNEHDLM--YQGVEVKNVEF---------DSLVTYFDYFYADLSNAVYVTPQEFVQD  486
AgeHex    KYKVAPSALEHFETSMRDPVFFFQLYKKIVLKFQRYKA-RLHPYTEEDLI--FQGVKVLNVEF---------DRLVTYFDKFYADINNAV-YNTQEELD-  493
LdeDP1    NYREVPSALEHYETCMRDPM-FFQIAKKMIMKFQRYLS-DLPPYTEEELL--FPGVSVEGLEF---------DPLITYNDWSYSDLTNGVFYNNQEDAK-  491
AgaHex2   PYQVIPSALEHYESAMRDPV-FYQIYKRIVAYYHQFKE-HLPEYTYEELY--YPGVKIDGVVV---------DKLQTYFDRFDVDITNAI----------  450
MseAryla  KYSFIPSALDFYQTSLRDPV-FYQLYDRIINYINEFKQ-YLQPYNQNDLH--FVGVKISDVKV---------DKLATYFEYYDFDVSNSV----------  486
MseArylb  KYTFMPSALDFYQTSLRDPM-FYQLYNRILKYIYEYKQ-YLQPYSSEKLA--FKGVKVVDVVV---------DKLVTFFEYYDFDASNSV----------  483
CfeHex2   KNKVVPSALQCYSTSLRDPG-FYRLTKRIMVYFFRYKK-NMPQYTQDELI--FPGVKFESVNI---------DKLVTYFDNCDTVINNAL----------  471
BheHex    PYQVIPSALESFSTCMRDPA-FYRLYNRYLSYWYRFKE-TLKPYSKNEIV--FSDLKFESIAV---------DKLITYFDYFDSTISNGL----------  470
StuHc2    KFDAPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYIDNIFKSHKD-HLTPYTHKELE--FPGVTVTAAKVVGLSHASTPNMLITHFNNFYIDLHNALDTTTTLG---  464
StuHc3    KYGMPPGVMEHFETSTRDPA-FFRLHKYIDNLFRTYKE-HLPPYTKEELA--VDGLKVNDVEV---------TELKTFFEDFEFDLTQGMELTGTGD---  462
StuHc1    KYGTPPGVMEHFETATRDPS-FFRLHKYIDSFFKEHKD-SLPPYTTDELD--FHGVEIVDVEV---------DKLMTFFDDFEIDLTMALDDTPELA---  474


EpiHc     -------EQS-------------------------ILVTITHLQHEEFTYNIKVNNNTGKDFTGTFRIFMAPKNDDL--DIPMEINEQRILMIEMDKFQ  500
LpoHcI    -------DHS-------------------------VKVKYNHLDHESFSYQIKVENTSGSTKHATVRVFLAPKYDEL--GNLLHPNDQRRLCIELDKFH  487
TtrHcA    -------TNS-------------------------VKVKYPHLEHEPFSFQITVENTSGAKKDATVRIFLAPKLDEL--GNQLPANIQR-LFIELDKFH  485
EcaHcE    -------DHS-------------------------VKVLYRHLDHEPFTYNISVENSSGGAKDVTMRIFLGPKYDEL--GNRLQPEQQRTLNIELDKFK  486
NinHcE    -------TKS-------------------------VKVKYQHLDHEPFTFNISVDNQSGGAKQATVRIFLGPKYDEL--GNRLDPEHQRTLCIELDKFQ  487
```

```
EcaHcG     -------EHT-------------------------VKVHYNHLDHEPFSYTINVDNSSGAVKHATVRIFLGPKCDEL--GNILEPNEQRRLFIELDKFH  488
NinHcG     -------DRK-------------------------VKVKYHHLDHEPFSITVNAQNSSGAPKHATVRVFLAPKFDEL--GNRLSPDEQRPLFIELDKFH  487
CsaHc1     -------EHK-------------------------VLVKYHHLDHEPFSLIINVDNTTSEIKHATIRVFLGPKYDEL--GNRLAPDEQRRLMIELDKFH  487
AauHc6     -------DQS-------------------------VKVKYHHLDHEPFTYNIVVENNSGAEKHSTVRIFLAPKYDEL--NNKLEPDEQRRLFIELDKFF  487
LpoHcIV    -------DGS-------------------------TKVKYHHLNHEAFSYEIQVENHSDTVKHGTFRVFLAPKYDEL--GNRLILNEQRRLFIELDKFH  486
EcaHcF     -------KGA-------------------------VKVKYQHLDHDPFTYSISVENTTGDVKHATVRIFLGPTQDEL--GNRLRLNEQRRFYIELDKFH  488
NinHcF     -------KGS-------------------------VKVKYHHLDHEPFAYNISCENSSGATKHATVRIFLGPVFDEL--GNKLSLNEARRFFIELDKFH  487
EcaHcD     -------KGH-------------------------IQVKYEHLDHEPYNYEIEVDNRTGEARETCVRIFLAPKYDEL--GNRLILEEQRRLYIELDKFH  486
NinHcD     -------KNK-------------------------IKVKYEHLDHEPFSYTIAATNATGAAKKTTVRIFLAPKYDEL--GNRLVLEDQRRLYIELDKFT  485
LpoHcII    -------ARS-------------------------IKARYYHLDHEPFSYAVNVQNNSASDKHATVRIFLAPKYDEL--GNEIKADELRRTAIELDKFK  491
EcaHcA     -------PGS-------------------------VRARYHHLDHESFSYIISAQNNSNADKQATVRIFLAPTYDEL--GNDISLDEQRRLYIEMDKFY  492
NinHcA     -------PGS-------------------------VKARYHHLDHESFSYIFNANNNGSEEKKGTVRIFLAPKYDEL--GNVIPLDEQRRLYIEMDKFD  492
LpoHcVI    -------DGA-------------------------VKVRFSHLNHEDFHYKIQVENHTSKTKPATVRIFMAPKYDEL--GNELDTKNLRRLMIEMDKFH  492
EcaHcB     -------TGP-------------------------VKVRYNHLTHEPFTYKIVVDNAGTKTRKATVRIFLGPEHDNL--GNEFDIGRLRRLMIELDKFT  489
NinHcB     -------TGS-------------------------VKVRYQHLDHEPFTYQFVVENTGTKTRHAKVRIYLGPKNDHL--GNPIKISNIRRLMIELDNFH  490
EcaHcC     -------TGA-------------------------VKVRYQHLDHEPFVYDIEVENHSARLRHGTCRIFLAPVHDEL--QNQLTPEELRRLMIELDRFR  492
ScoHcA     -------KTT-------------------------ATVKVRHLQHEDYHYEIDIDNNAGKAKKAVFRIFLAPKYNEK--GELFPVNEQRQLLVELDKFV  517
ScoHcB     -------RGH-------------------------ARVKVQHLQHEGFNYQIKV-NNAGGEHKVVFRVFLAPKYDEE--HHEFDFNEQRGMAIELDKFV  521
ScoHcC     -------HTP-------------------------AYVKVKHLQHESFTYVIDV-ENRGRTRTGFFRIFAAPKYNEL--GQKWHINDQRLIMVEMDKFI  527
ScoHcD     -------EGS-------------------------VLVKVKHLNHETFYYNLEVTNNALEEKHGVVRIFGAVINDER--GHPYILNDQRHLVIELDKFT  526
SpiHc1     -------DSE-------------------------AKVIVEHTDHDDFVYVIDIDNNARVEKTAVLRIFLAPKYDER--GHPLTLKEQRVMMIELDKFK  515
GpuHc1     -------EVE-------------------------VKAHVDRLNHKDFAYNFDIKSDS-ADQHAVVRVFLCPRRDNN--GIQFTFDEGRWNCIEMDKFW  528
GroHc1     -------EVE-------------------------VKAHVDRLNHKDFAYNFDIKSDS-ADQHAVVRVFLCPRRDNN--GIQFTFDEGRWNCIEMDKFW  528
CcsHc      -------RVA-------------------------VNASIKRLNHKDFNLKFEINSNNDVEKHGVVRTFICPRKDAH--GVIFSFEEGRWNCIELDKFW  530
EpuHc1     -------DVP-------------------------ITAIVSRLNHEPFSLTADITNNHGGDVFATIRVFLCPRYDAN--EILFDLNEGRWHCIEIDKFW  527
PleHc2     -------DVA-------------------------ISADVHRLNHQEFSYNIDVSNNNGGKVLGTIRIFLCPVKDSN--GVTFTWEEGHWHCIEMDKFY  538
HamHcA     -------DVA-------------------------ISAYVHRLNHEEFSYKILVQNNNEGDILATVRIYLCPTVDNN--HIHIPLSEGHWTCIEMDKFY  525
PinHcB     -------DVD-------------------------INARVHRLNHNEFTYKITMSNNNDGERLATFRIFLCPIEDNN--GITLTLDEARWFCIELDKFF  509
PinHcA     -------DVE-------------------------INARVHRLNHKEFTYKITMSNNNDGERLATFRIFLCPIEDNN--GITLTLDEARWFCIELDKFF  509
PelHc1     -------DVA-------------------------IYANVHRLNHEEFTYEIEVRNHN-EEKFATVRIFLCPTEDNN--GITLNLDEERWLCLEMDKFW  536
PelHc4     -------DVA-------------------------IYANVHRLNHEEFTYEIEVRNHN-EEKFATVRIFLCPTEDNN--GITLNLDEARWLCLEMDKFW  537
PelHc3     -------DVA-------------------------IYANVHRLNHEEFTYDIEVRNHNEEEKFATVRIFLCPTEDNN--GITLNLDEARWLCLEMDKFW  537
PelHc2     -------DVE-------------------------IYANVHRLNHEEFTYVIEVSNAN-EVHLATVRIFLCPTEDNN--GITLNLDEERWLCLELDKFW  536
CmaHc6     -------DVP-------------------------ISTIVKRLAHKDFTVESVITNNNEHEVMATVRIFAWPMYDNN--DVEFSFNDGRWNAIEMDKFW  532
CmaHc4     -------DVP-------------------------ISTVVKRLTHKSFTAKCVINNNNEHDVIATVRIFAWPKYDNN--HVEFSFNDGRWNAIEMDKYW  531
CmaHc5     -------DVP-------------------------ISTVVKRLAHKDFTAECVINNNNENEVMATVRIFAWPKYDNN--HVEFSFNDGRWNAIEMDKFW  532
CsaHc      -------DVP-------------------------ISTVVSRLTHNDFKVKIGITNSQNHEVLATVRIFAWPKYDNN--HVEFSFNEGRWNAIELAKFW  532
CmaHc3     -------DVD-------------------------IFTYISRLNHKEFSFVGDVTNELDHDVLATVRIFAWPHEDNN--GVAFSFNDGRWNAIEMDKFW  527
PvaHc1     -------DVD-------------------------ISTYVPRLNHKEFKIKVDVSNNKG-EEVSYRHIFAWPHLDNN--GIKFTFDEGRWNAIELDKFW  526
PvaHc      -------DVE-------------------------ISTYVPRLNHKEFTFRIDVENGGA-ERLATVRIFAWPHKDNN--GIEYTFDEGRWNAIELDKFW  522
PinHcC     -------DVE-------------------------ILTYIERLNHKKFSFLILVTNNNNTEVLATVRIFAWPLRDNN--GIEYSFNEGRWRALELDRFW  515
PleHc      -------EVS-------------------------VKTHISRLNHKPFSLNIHAHAEH--DDKVTVRVYISAKHDEN--HIALDIDESRWGAILLDTFW  519
CmaHc1     -------DVT-------------------------VKAHVSRLNHKPFYYNIHYNAKQ--DDKVTVRVYLTPVRDEN--GIKLDINDNRWSAIMIDTFW  519
CmaHc2     -------DVT-------------------------VYAHVPRLNHKPFGYNINYHAKS--AERVTVRVYLTPKYDEN--GVQREMEVGRWHAILLDTFW  519
HamPHc1    -------NME-------------------------ISAIIPRLRHKDFSFKVNIMNNNDENKLATIRIFAWPHRDVN--GVIMPFNEGRWHAIELDKFW  536
HamPHc2    -------SME-------------------------ISAIIPRLRHKDFSFKVNIMNNNDENKLSTIRIFAWPHRDVN--GVIMPFNEGRWHAIELDKFQ  534
CmaCC1     -------FYG-------------------------IYATMPRLNHKEFSYKIHVQNNNGASKKAVIRLLAMPYRDGN--GAIIPFDEGRWLAIEMDLFV  512
CmaCC2     -------FYG-------------------------IYATMPRLNHKEFTYKINVQNNNGTPKKSVIRILAMPYRDGN--GAIISFDEGRWLAIEMDLFV  531
PmaHc2     --------VG-------------------------IEVTMKRLNHEAFKYVITATAEK--ETEGIVRIFLSPTYNWF--GQEITLQDGHWGAIEMDRFP  529
PgrHc2     --------VG-------------------------IEVTTKRLNHESFKYVITATADK--DTEGIVRIFLSPTYNWF--GQEITLQDGHWGVIEMDRFP  529
CseHc2     -------PVD-------------------------IKAVVSRLNHEPFKYVITVNSKK--PVRGIVRIFLAPKLNWF--GQRVPLDVARWGFIELDRFP  533
PamHc2     -------VVD-------------------------IKALVGRLNHEPFKYVITVHSEK--PVRAIVRVFPLPKYNWF--GQMVPLDEARWGAIELDRFP  533
BduHc2     -------VVD-------------------------IKAVVSRLNHEPFKYVITVNSKR--PVNAIVRIFLAPKYDWF--GQKVPLDAARWGVIELDRFP  534
HmeHc2     -------QVD-------------------------IKAVVSRLNHEPFKYVITVNSKK--AVHGVARIFLSPKYNWF--GQKIPLHVARWGMIELDRFP  514
TdoHc2     -------DVQ-------------------------IKASVNRLNHEPFKYVITVHSDK--VAEGIVRIFIAPKYDWF--GEVVPLDKIRWSLIELDRFP  512
SamHc1     -------DVS-------------------------IHARVRRLNHKPFVFSVRVNSEA--ERFVTVRVFLGPKYDWF--GQEIPINEKRHYIVEIDKFV  529
BduHc1     -------DVE-------------------------IKARVRRLNHKPFTFHITINSEL--DATAAVRVFLGPKYDWF--GQEIPINEKRLYMVEIDKFV  532
PamHc1     -------DVD-------------------------IKARVRRLNHKPFSVQVTVNSER--DAMAVVRIFLAPKYDWF--GQEIPINEKRLYMIEIDKFV  528
CseHc1     -------DVE-------------------------IKARVRRLNHRPFTFSITVNSNQ--EQMAAVRIFLGPKFDWF--GQEIPINEKRLYVIELDKFV  531
HmeHc1     -------DVE-------------------------IKARVRRLNHQPFTFRVTVSSEK--NANVAVRVFLGPKYDWF--GVQIPLNEKRLYMVEIDKFY  514
CmoHc1     -------DVE-------------------------IKARVRRLNHKPFTVQITAESER--ETLATVRIFLGPKYDWF--GQEIPLEEKRQYLVEIDKFV  530
CacHc1     -------DVE-------------------------IKARVRRLNHKPFNFKIEVNSDK--EYTAAVRVYIGPKYDWF--GQEITLDEKRLYMVEIDKFV  526
TdoHc1     -------DVE-------------------------IKARVRRLNHRPFTYTINLNSDK--DATVIVRVFLGPKYDWF--GQEIPLEKKRLYMIELDKFV  531
PmaHc1     -------DVD-------------------------VKARVQRLNHEPFTWALHMESDK--EVTAAFRVFLGPKKDWY--ESDFTINEVRPYLIEIDKFV  529
PgrHc1     -------NVE-------------------------VKARVQRLNHEPFTWALHVESDK--EVTAAFRVFLGPKQDWY--GSDFTINTVRPYVIEIDKFV  529
ScuHc1     -------DVD-------------------------IKARVQRLNHKPFGIKIIANSAA--EKTVTVRLFLAPKYDWY--GREVPLDIQRWKFIELDKFA  526
MgeHc1     -------DIE-------------------------IKARVQRINHKPFTYHINVESDV--ERKVVVRTFIGPKYDWY--HQEVPVNEKRWEMVELDKFL  528
TdoHex1    QQFQQDQEVI-------------------------IKARVKRINHKPFTVKVEVESDN--NKNAMVRVFLGPKYNYL--GQELSLEEKRQYMVELDRFP  555
PmaHex1    -------KVN-------------------------IQARQMRLNHKPYTYKVKVVSDK--AATSMVRVFLGPKYDFY--GNEYTLDKMREYMVELDRFT  548
BdiHex     -------YVD-------------------------YRARQTRLNHKPFTYNIEVNSEQ--ATDVYVRVFLGPKYDYL--GREYDLNDRRHYFVELDRFP  580
RflHex2    -------YVD-------------------------YRARQTRLNHKPFTYSIDVTSDK--ATEVYVRVFLGPKYDYL--GREYNINDRRHYFVEIDRFP  582
PamHex12   -------NVD-------------------------VQLAV-RLNHKPFTYNIEVSSDK--AQDVYVAVFLGPKYDYL--GREYDLNDRRHYFVEMDRFP  534
RflHex1    -------GVN-------------------------LHVRQPRLNHKPFTYKIEVSSEK--AVDAYVRVFLGPKHNYL--DEEWDLNERRHFFVEMDRFR  537
LmiHex1    -------NFN-------------------------FIARQYRLNHKPFYYQLKVKSEK--EVDAVVRVFIGPKYDSY--GREFTLDEKKQYYFLLDIFN  539
LmiHex2    -------GFS-------------------------YVARQYRLNHKPFFYHLKVKSEK--EVDSVVRVFIGPKYDAL--GREYSLEERKQYYVLLDTFN  539
RmiHx1     -------KVN-------------------------YLARQYRMNHKPFFYHLKVKSDK--EVDSVVRVFIGPKYDAL--GRELSLEERKQYYVLLDIFN  539
TmoHex2    -------SFK-------------------------VQVAQQRLNHKPFTYKIYVNSDR--ETDAVVKVFLGPKYDEY--GRFINLTDNWMNFVQFDHFV  549
AgeHex     -------QDKHPN----------------------FRVMQYRLNHKPFNYKVVVKSDK--TAKAVVKVFVGPKYDQY--GRKINLNENRLNMLQIDHFV  559
LdeDP1     -------TFD-------------------------IRVRQYRLNHKPFTYKIKVTSDK--AQKAVVKVFMGPAYDKN--GETMFLNENRLNFLILEHFV  554
AgaHex2    -------DIE---PEPYVPGKYEGFGEIEYKPDPVVIKARTMRLNHKPFTYKISLTADK--PAKAAVRVFLGPKYDEY--GGLYTLNENRENFYELDYFV  536
MseAryla   -------FVSKKDIK-NFPYG---------------YKVRQPRLNHKPFSVSIGVKSDV--AVDAVFKIFLGPKYDSN--GFPIPLAKNWNKFYELDWFV  559
MseArylb   -------FWSKEEVKSSYPHD---------------FKIRQPRLNHKPFSVSIDIKSEA--AVDAVVKIFMAPKYDDN--GFPLKLENNWNKFFELDWFT  557
CfeHex2    -------SVESFQ---EGMKLR--------------VKARRYCLNHKPFTYRFTINSDK--ETKAVLKIFLGPAFDDIRTKDLSHLRESYKYFFEMDHFE  545
BheHex     -------PITSKQDADNLM----------------IKVRQSRLNNKHFTVHFALNSDK--AQKVAIQLFLGPKYDAL--GNLLDFSESYKDFYEIDYWI  542
StuHc2     -------DVD-------------------------IKARIGRMAHEPFKYTINVNSER--PVTATVRIFLAPAYNWY--GEEIHLDEGRWLAVELDKFA  527
StuHc3     -------DAH-------------------------IKAVMARINHKPFHYTIKVNSDV--KRTGMVRIFLAPKYDWY--GEEIDITHNAWQTVELDKFL  525
StuHc1     -------DVP-------------------------IKAISHRLNHAPFTYLLKMKSDA--SHVATVRIFLGPKYNSY--GEELSLDTKRWMMVEMDKFV  537


EpiHc      LKLSPGENNITRKSEDSNVTLHKEMTWEMIENQPD------TSGPSSQHYCACGWPHHLLIPKGSAQGTAFHCFIMITDWKTDEVKSSKKP---TCQDAV  591
LpoHcI     KELKAGKNEITRNSVDSSVTISTLHTFDELESGV-------GVNENADEYCSCGWPKNMLVPRGNNKGMTFELFVMLTDWEHDNVGGKGSD-NHMCDDAV  579
TtrHcA     KELISGQNIITHNAADSSVTVSTLRTFEDLKAGK-------GVSEDATEYCSCGWPQNMLIPRGNRKGMVFELFVMLTDWQKDNVDGGGG----FCSDAV  574
EcaHcE     ATLDPGKNVVTRDHRNSTVTVEQSVPVKKLREEG-------GV---AGEYCSCGWPEHMLIPKGNHRGMDFELFVIVTDYAQDAVNGHGEN-A-ECVDAV  574
NinHcE     VELAAGKNAITRDHKLSSVTVSETHTFKQLLAGE-------GVSENTTEFCSCGWPEHMLIPRGSHKGSEFDLFVILTDYEQDAVGGEASG---VCVDAI  577
EcaHcG     KELGPGLNTINRNSVESNVTVAHTYTFDELREGK-------LAPEDATEYCNCGWPRHMLIPKGTHRGMEFQLFVMLTDYTVDNPCGGAGK-I-VCADAV  579
NinHcG     KQLAPGNNVISRNAIDSNVTLSHTYTFDELRAGQ-------SASADASEYCSCGWPEHMLVPRGTHKGMDFQLFVMLTDYSEDNPEGANVK-T-ICNDAV  578
CsaHc1     KELKPGKNFIHRNAFDSNVTLSHTYTFDELRSGL-------SASQDATEYCSCGWPEHMLIPRGTTKGIEFELFVMATDYTHDNPEGADVK-T-ICGDAV  578
AauHc6     YTLTPGKNTIVRNHQDSSVTISKVRTFDQLGAGE-------GVSEDSTEYCSCGWPEHMLIPRGSHKGMEFELFVMLTDHDEDTVAGLSEN-A-VCSDAV  578
LpoHcIV    HGIHKGHNTIVRNSTESSVTVSKIHTFNELKAGV-------GVDEKNTEYCSCGWPQHMLVPRGNEKGMDFQLFVMVTDWEGDHVNGEPSL---ICADAV  576
EcaHcF     AELAAGKNTITRKSSESSVTVSHTPTFEELQRGE-------GVDENTTEFCSCGWPEHLLVPRGTYKGMDFQLFVMLTDYEDDHVGSHNGQ-T-LCADAV  579
NinHcF     AELAPGKNTVTRKSTESSVTVKPTPKFSQLQSGE-------GISENSTEFCSCGWPEHLLVPRGTHKGMDFYLFVMLTDYEHDHVNGLNEK-S-ICADAV  578
EcaHcD     RRLEPGKNVLVRASGDSSVTLSKVPTFEELESG--------NANVNPNEYCSCGWPEHMLVPRGKERGMDFYLFVMLTDYEEDKVQGAGEQ-T-ICSDAV  576
NinHcD     TTLEPGRNTINRRSVDSSVTLSHVPTFEELEKGE-------NIPNRETEYCSCGWPEHMLVPRGTPRGMVFHLFVMLTDYVEDKVLDDSAT-V-VCSDAV  576
LpoHcII    TDLHPGKNTVVRHSLDSSVTLSHQPTFEDLLHGV-------GLNEHKSEYCSCGWPSHLLVPKGNIKGMEYHLFVMLTDWDKDKVDGSESV---ACVDAV  581
EcaHcA     HTLRPGKNTIVRSSTDSSVTLSSVHTFKELLRGE-------DLVEGQTEFCSCGWPQHLLVPKGNEKGMQFDLFVMLTDASVDRVQSGDGT-P-LCADAL  583
NinHcA     TDLRPGKNIIVRSSTDSTVTISSTYTFKELLHGE-------DLEEDRSEFCSCGWPQHLLVPKGSNKGMVFDLFVMITDAEKDKVPTSGKK---LCNDAL  582
LpoHcVI    AEIHPGHNTIVRHSKDSSVTISSARSFGQLAHGE-------GINEHANEYCSCGWPDHLLVPRGDEKGMPFHLFVMLTDWLHDQVGDHGKT-G-MCTDAV  583
EcaHcB     TVLEPGENVIERDSIDSSVTIREQYTYRQLQDGR--------SNREQTEYCSCGWPNDLLVPKGNEHGMKFRLFVMLTDAVQGQVGDHGAT-G-LCTDAV  579
NinHcB     VELKPGTNTVERRSIDSSVTLSKQPTLKELLQGK-------GTDRRGDEYCSCGWPDHLLIPKGDSSGMKFHLFAIFTNYFEDTVNDHGRT-N-ECVDAV  581
EcaHcC     VELKPGVNHNHRHSRDSSVTISKQPKFDELLKGK-------GTNN-ANEYCSCGWPDHLLVPKGNDRGMPFHLCVMITDYLYDLVGDYGYD-T-PCVDAV  582
ScoHcA     ATLEPGHNVIERQSKESSVTMSKDHVFGEIRNLA------------DDHQCSCGWPDYLLLPKGKYEGMTYQLFVVATDYEEDHVEDAGE--ECQCRDSM  603
ScoHcB     ATVPAGSSTVEQHSSKSSVTQSNDNFYGSSATRS------------SENHCSCGWPDYLLIPKGNHQGVQFNVYVIATSYDEDHVES-DE--SCHCGDSL  606
ScoHcC     EKLYPGKNTIERHSEDSTVTMSSASIFSDISSEQ------------SEDHCSCGWPDYLLVPKGNFEGFPMEVFVIVTDYEEDKVEGPDE--GCACHDAL  613
ScoHcD     VNLKPGKNSVRQPCYNSAVTAKYDVFYGDVESQK------------PQEGCNCGWPDYMLLPKGKYEGLRFRVFAIVTNHDEDKVSD-QE--TCLCGDAV  611
SpiHc1     ATLKPGHNVVRRCSNESSVTMPVDHIYGDITRTV------------DEDHCHCGWPEYLLVPQGDYDGMHYELFVMATNYDEDKAQDTDL--SCKCH-AH  600
GpuHc1     TKLAAGDNHIKRKSSESSVSVPDVPSFASLIHDADAAVASGSELHLEDFDRSCGLPQRMLLPKGTEEGLDFLLVVAVSDGTTDAQHDALE---AVDAHGH  625
```

```
GroHc1    TKLAAGDNHIKRKSSESSVTVPDVPSFASLIHDADAAVASGSDLHLEEFDRACGLPQRMLLPKGTEEGLEFLLVVAVSDGTTDAQHDALE---AVDAHGH  625
CcsHc     TKLAPGVNSITRSSKDSSVTVPDVPSFKRLIADTKAALAEDKEVKFEEYHRSCGIPNRLLLPKGSSEGMKFVLAVAVTEASSDAHPEILE---IQGAHSH  627
EpuHc1    RTLHSGDNHLERKSSDASTTVPDIPSYESLMKMADAAVASGEELHIEQFTRSCGIPNRLLLPKGTPEGMEFALFVAVTDGSKDAAIEGLE--KDEHGGSH  625
PleHc2    KSLAPGINHIVRKSTDSSVTVPDRPSFNILKSKTDRAVSSHSKLDLHKFERSCGIPNRLLLPKGKARGMDFALFVGVTNGDEAKTVDDPE----ELGATH  634
HamHcA    KQLKTGSNKIDRKSTESSVTVPDSLSLAELHEKTDQAVASGSKLDLHEYERSCGLPARLLLPKGTVNGMDFDLFVAVTNGDEDKVTDHPE--TDEHGGTH  623
PinHcB    QKVPSGPETIERSSKDSSVTVPDMPSFQSLKEQADNAVNGGHDLDLSAYERSCGIPDRMLLPKSKPEGMKFNLYVAVTDGDKDTEGHNG---GHDYGGTH  606
PinHcA    QKVPKGPETIERSSKDSSVTVPDMPSFQSLKEQADNAVNGGHDLDLSAYERSCGIPDRMLLPKSKPEGMEFNLYVAVTDGDKDTEGHNG---GHDYGGTH  606
PelHc1    RKLANGKNLIERSSKDSSVTVPDMPSFESLKHQADEAVKNGEDLDLSAYERSCGIPDRMLLPKSKPQGMEFNLYVVVTDGDKDTDGSDGD---HDHHGTH  633
PelHc4    KKLANGKNLIERSSKDSSVTVPDMPSFESLKHQADEAVKNGEDLDLSAYERSCGIPDRMLLPKSKPQGMEFNLYVAVTDGDKDTDGSDGD---HDHHGTH  634
PelHc3    KKLGNGLNMIERSSKDSSVTVPDMPSFESLKHQADEAVKNGEDLDLSAYERSCGIPDRMLLPKSKPQGMEFNLYVAVTDGDKDTDGSDGD---HDHHGTH  634
PelHc2    TKLANGKNLIERSSKDSSVTVPDMPSFESLKHQADEAVKNGEDLDLSAYERSCGIPDRMLLPKSKPQGMEFNLYVAVTDGDKDTDGSDGD---HDHHGTH  633
CmaHc6    IKLASGTNTITRSSKDSSITVPDVPSFQDLIEKTKEAVSSGSELHLEEYVSGLGLPNRFLLPKGTTQGMKFHLVVFVSDGAKDAAIDGLE----ENTSFN  628
CmaHc4    TKLTPGPNTITRSSMDSSVTVPDVPSFLTLIEKTEEAVSSGSELHLEDYVSGLGLPNRFLLSKGTTKGMDFHLVVFVSDGAKDAAIDGLL----ENTSFN  627
CmaHc5    TKLAPGPNTITRSSKDSSVTVPDVPSFLTLIEKTEEAVSSGSELHLEDYVSGLGLPNRFLLSKGTTEGMKFHLVVFVSDGAKDAAIDGLY----ENTSFN  628
CsaHc     TKLNSGSNIIERSSKDFGVTVPDVPSFQTLMDMTDEALGSGSALHLEDYESGLGLPDRFLLPKGKTEGMDFHVVVFVSDGAKDAAVDGLH----ESTTYN  628
CmaHc3    VMLHPGHNHIERSSHDSSATVPDIPSFQFIKDRTNEAIAQNKELHIEEFESGLGLPNRFLIPKGNVKGLDMDVMVAITSGEADAAVEGLH----ENTSFN  623
PvaHc1    VKLPGGTHHIERKCSESAVTVPDVPSFATLFEKTKEAL-GGADSGLKDFESATGIPNRFLIPKGNEQGLEFDLVVAVTDGAADAAVDGLH----ENTEFN  621
PvaHc     VSLKGGKTSIERKSTESSVTVPDVPSIHDLFAEAEAG-----GAGLAKFESATGLPNRFLLPKGNDRGLEFDLVVAVTDGDADSAVPNLH----ENTEYN  613
PinHcC    VKVKHGHHQITRQSTESSVTVPDVPSLQTLIDRADAAISSGCALHLEDYESALGLPNRFLLPKGQAQGMEFNLVVAVTDGRTDAALDDLH----ENTKFI  611
PleHc     TEVHAGDNEIKRKSSESSVAIPDRVSFPQLIHDADEAVANGAELP-HKESRSCGHPQRLLLPKGKEQGMDFWLDIIITSGD-DAVQDDLT--VNAHGSTH  615
CmaHc1    TEVKAGTHNHRRSGFESNVAIPDRISFEELIKETDEAVDNNLELSLNSG-RSCGHPQRLLLPKGNEEGLQFWLNVYVTSGE-DAVHDDLH--TDIHG-NH  614
CmaHc2    VDVEAGDHVYHRDASQSNVAIPDRISFEELIKETDEAVANNEELSLNSG-RSCGHPQRLLLPKGNEEGLACWFTVYVTSGG-DGVHDDLQ--TNDYGSNH  615
HamPHc1   KYLAPGENEVTRKCDESSVTVPDVPSLKSLHEQAEAAIAGISELNLEEFVSATGLPNRLLIPKGNAAGVEFKLVVAVTDGEADSVNDEIN----LTTKFH  632
HamPHc2   KELIPGENTITRKSSESSVTVPDVPSLKSLHEQTEAAIAGSSELNLDEFVSATGLPNRLLIPKGNEAGVEFKLVVAVTDGVADSVNDEIN----LTTKFH  630
CmaCC1    KTLTSGDNEIDRKSSEASITVPDVPTYKTLVEKT------ENRENLEMYESSTGIPNRLLLPKGCEEGTEFRLPVAVTDAENDVNDESII----TMQKYH  602
CmaCC2    KTLTEGKNEIIRKSSEASITVPDVPTYKTLVEMT------EDHQSLERYESATGIPNRLLLPKGNEKGTEFRLVVAATNAEEDINDESII----TMNKYH  621
PmaHc2    VKLTAGENVITRSGKKSVVTIDEPMSFAEI----HKAVADKDATHFHKEFRHCGFPHRLLVPKGRPEGMHYKLMVVITDYHKDVVVPDMDVEHMDKLQSV  625
PgrHc2    VKLTAGENVITRSGKKSVVTIDEPMSFAEI----HKAVADKDATHFHKEFRHCGFPHRLLVPKGRPEGMHYKLMVVITDYHKDVVVPDMDVEHMDKLQSV  625
CseHc2    VRLASGDNIVSRNSVDSIITVPEPRSFSNLVSDVEKAIRGEQVFSYDKYYRHCGFPHRLLLPKGKPEGMVYQLYVVVTDYDKDIVEPGIQPEDVENLSSL  633
PamHc2    VSLVHGDNIVTRNSEDSTVTIPEPRSFPDLMSDVQKAIRGEQDFKYDIHHRHCGFPHRLLLPKGKPEGMVYRLFVVVTDYDKDVVAPGMSPDDVNTLSSL  633
BduHc2    VKLVNGDTVITRSSDQSTVTVPEPKSYPELVNDVEARVRGEVDFVYDKHHRHCGLPHRLLLPKGKPEGMDFKLYVVISDFDKDVVSSEVNVDDLHHISSL  634
HmeHc2    VKLEAGDNVITRNSEDSIVTIPEPRSFPHLINYVERAINGEEEYVVDKYHRHCGFPHRLLLPKGKPEGMTYRIYVIITDYNKDIITSDWKPEDIENLSSL  614
TdoHc2    VHLRQGDNVIVRSSQDSTVTIPEPRSFPLIKEIEDALNGQDEYAIDKYHRHCGLPHRLLLPKGTSGGMVFNLYVTITNYEQDKVHPGVTVDEVDNLTSL  612
SamHc1    AKVNAGKTVIARKSSESSVTIPDRETTKVLTQRVEDAIAGKVQLTVNKDVRHCGYPDRLLLPKGRRDGMPFTLFVVLTDYEKDKVNDLPF--DYDYGGSV  627
BduHc1    AKVNKGTTVVQRKSSESSVTIPDRETTKDLVKKVHDALEGKSSFYVCKDVRHCGYPDRLLLPKGKKEGMPFTLYVIVTDFEKEKVNDLPW--DYDYGGSI  630
PamHc1    TKVNKGTTVVQRKSSESSVTIPDRETTKVLTKRVEEALQGKTTYMVNKDVRHCGYPDRLLLPKGKKDGMIFTMYVIVTDYETEKVNDLPY--DYEYGGAI  626
CseHc1    AKVNKGATVIQRKSSESSVAIPDRETTKILVRRVDDALQGKATYTVNKDVRHCGYPERLLLPKGKRDGMPFSLFVILTDFDKEKVNDLPW--DYDYGGSI  629
HmeHc1    TTVNKGTTVIERKSSESSVTIPDRETTKVLQKKVEDAIQGNGAFLVNKDVRHCGYPDRLLLPKGKKDGMPFTFYVIVTDFDKEKVNDVPL--DYNYGGSI  612
CmoHc1    TKVNSGKTTIQRKSSESSVTIPDRETTKLLVAKVENAINGKATINVNKDVRHCGYPDRLLLPKGKKGGMPFTLYVILTDFNKEKVNDLPY--DYDYGGSL  628
CacHc1    TKLTAGHNNIFRKSSESSVTIPDRETTKVLHKKVKDALKNSTPLLVNKDVRHCGYPGRLLLPKGKIEGMPFPLYAIVTDFEQEKVNDLPF--DYDYGGSI  624
TdoHc1    AKVSAGQTPIQRKSSESSVTIPDRETTKVLVQRVKDALEDKTTWNVNKDLRHCGFPDRLLLPKGKKEGMPFTLFVMVTDWEKEKVNDVPY--DYDYGGSI  629
PmaHc1    TKVVAGKSVIHRKSSESSVTIPDRETTKVLLEKVEHALEGKETLNVNKDERHCGYPDRLLLPKGRNTGMPVQIYVIVTDFEKEKVNDLPY--DYDYGGSL  627
PgrHc1    AKVVAGKSVIHRKSSESSVTIPDRETTTLLLDRVDLALDGKETLNVNKDERHCGYPDRLLLPKGRKQGMPYQIYVIVTDFEKEKVNDLPY--DYDYGGSL  627
ScuHc1    VKLTAGENAIVRKSSESSVTIPDPVSTHDLRKLVDDAIAGTATLEVDKDVRHCGVPDRLLLPKGKTNGMKYTMFVMLSDFEEDKVNDLPH--DYEYGGFV  624
MgeHc1    THIPAGKSVIERLSTESTVTTPDYESFRSLVNRVDEALKGNKEFIIDEEFRHCGLPDRLLIPKGNEEGYPVKFFVIVTDWEEDKVNQEVE--NHRYGNVY  626
TdoHex1   VQLTSGKNVIQRESKDFNSIVPDHIPTKNLKHMVKSAVEGEQTFYVQKGKRQCGLPEHLLLPKGKKAGLPFTLFIMVTENENNEQD------NVNYKQPF  649
PmaHex1   FKMTSGENVIERNSYDSSVTVADKTAYRQLFKKVDKAIAGEEQFFVDETERHCGWPQRLLLPKGKKGGMTFRFFVMVTPFDETSVTDM----KHLDFTSM  644
BdiHex    YKVQAGKTTITRNSRESSVVSHDYPSFRTLLRKVFDAYEGKEQFYYDKSERYCGYPERLLLPKGKTGGQTYTFYVMVTPYVKQDDHDF----EPYNYKSF  676
RflHex2   HKIQEGKTTIKRNSRDSSVVTPDYPSYRTLLRKVSDALEGKEQFYIDRSERYCGYPERLLLPRGKKGGQSFTFYVILTPYVQQGEHEF----EPYNYKSF  678
PamHex12  YHVGAGKTVIERNSHDSNIIAPERDSYRTFYKKVQEAYEGKSQYYVDKGHNYCGYPENLLIPKGKKGGQAYTFYVIVTPYVKQDEHDF----EPYNYKAF  630
RflHex1   HHVPAGKSVIERNSHDSSIIAPTPDSYRTFVKKVQDAYDGKTQYFIDKSHNYCGFPENLLLPKGQKGGETFTFYVIITPYVKQDEHDF----EPYDYKAF  633
LmiHex1   QKLNAGENEIKRSSKEFTLFAKEAPSYYDLYQTTFRALKGEDKFSLDKFRSHFGFPQRLALPRGTRSGLPLSVFAIVTPAVQGSEHPVL-----------  628
LmiHex2   YKLVAGENDIKRSSNDFPFYAKEAPSWYDLYKATSSAIKGEDKFFLDKFRSHFGFPQRLALPRGTRSGLPLSVFTIVTQASPDAKNPIL-----------  628
RmiHx1    QKLAVGENDIKRSSNDFPLYGKDAPHHSDLFYKTSSALKGEDKFFLDEFRSHFGFPHRLALPRGTRSGLPLSVFAIITPAVPEANHRFL-----------  628
TmoHex2   YKLKAGDNIISRDSHEIYNYMHDRTSYYELYQKAFGVHDQSHSFQFHHDQFWYGYPQRYMLPMGSRGGMTYQFYVMVSKQLPYKTH-----------TTV  638
AgeHex    YDLKTGENVITRNSEDNYFFTPDRTSYYEMYKQVLGASNGQ-DYHVDGRQNYFYFPQRYMLPKGTEDGMTFQFYVIVSPYKAFHGHQQHH--DQDHYFNY  656
LdeDP1    HDLKAGENVITRSSHEMRFYAPDKMSFRDMYKRVKAALEGDGEFKIDERQNYFHWPQRFMLPRGSSAGTPYRFFVIVYPEYPHE-------GKYETDGI  647
AgaHex2   QELTAGKNVLTRSSVNFNGYVKDRTSFYELYRSVMAGYTGAEKFQLDMSEAHCGFPNRLMLPKGKKGGMPFQLYVIVSPYKAPQVS------QYSGFDPV  630
MseAryla  HKVMPGQNHIVRQSSDFLFFKEDSLPMSEIYKLLDEGKIPS-----DMSNSSDTLPQRLMLPRGTKDGYPFQLFVFVYPYQAVPKEMEPF----------  644
MseArylb  YKFVAGDNKIVRNSNDFLIFKDDSVPMTELYKLLEQNKVPH-----DMSEDYGYLPKRLMLPRGTEGGFPFQFFVFVYPFNADSKDLAPF----------  642
CfeHex2   VTLKQGTNTIERHSSDSVFTMPDLVSSDTFYKQLERAMSGSAPFTY--VEKFFTLPERLVLPKGKPEGMRFKMFFYLSTLDGSKVRNVELP-IF------  636
BheHex    TDVNAGLNKLERTSHDFIFLMADRDPSEILYKRVLKALDGSEKFMY--KKNLYGIPERLLLPKGKRAGSIFQLFAYVSPVTQPVTYKSRVF---------  631
StuHc2    VKLHEGENVITRLSKDSTITIPDMKSHKDMIREVESALAGELEYHIDEHHRHCGFSQGLLIPKGSEAGTHFKVFIMLTDWDKDHANADAHP-EDDYGGSI  626
StuHc3    VPLDPGENVIVRKSDESTVTIPDPPSYAQLVKEVEDALSGTSVLKVHKFHRHCGIPDRMLLPKGKVGGMEFMLLVVVTDGGADKGVTIHD--DHIYGGST  623
StuHc1    VHLHSGNSEILRKSTESSVTIPDPKGYKGMVEAVKSAIAGDSEFKVNKEHRHCGIPDRLLLPKGSKEGTPFTLFVMVTDFDDDNANTDVES-THDYGGSI  636

                                                  ***********************************************
EpiHc     SYCGII--NDLYPDKKPMGFPFDRLIPSDLATFVSRSNMKIFDISIIHREKK-------------------------------------------  641
LpoHcI    SYCGAK--DSKYPDKKPMGFPFDRRIDAHDIEEFLTPNMALTDVKIKFEG----------------------------------------------  627
TtrHcA    SYCGAK--DHKYPDKKPMGFPFDRKIENEHLEDFLTTNMGVSDIKIQFMG----------------------------------------------  622
EcaHcE    SYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRVIEGLTLEEFLTPSMSCTDVRIKYTDIK---------------------------------------------  624
NinHcE    SYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRVITADTVAEFLTPNMSCTDVKIKHVI------------------------------------------------  625
EcaHcG    SYCGAK--DQKYPDTKPMGFPFDRPTKIHTAEEILTPNMSLTDVVIQYVGHE----------------------------------------------  629
NinHcG    SYCGAK--DQKYPDKKPMGFPFDRPLLSSVAAKLPTENTCVTDIKIKFLG------------------------------------------------  626
CsaHc1    SYCGAK--DQKYPDKKPMGYPFDRPTTARSAQELLTDNMSLTTVKIQYLGYKRACYGN----------------------------------------  634
AauHc6    SYCGAR--DDRYPDKKAMGFPFDRKIEARTAAEFLTPNMGLTDIKIKFHG------------------------------------------------  626
LpoHcIV   SYCGAR--DHKYPDKKPMGFPFDRPIDARTPSQFATPNMSFTDIRIQFSH----------------------------------------------  624
EcaHcF    SYCGAK--DSKYPDKRAMGFPFDRVIKARTVADFRTTNMSFTDVKIQFKDQV----------------------------------------------  629
NinHcF    SYCGAK--DQKYPDKKSMGFPFDRVIKARTLAEFSSANMKFQEVKIQFKE------------------------------------------------  626
EcaHcD    SYCGAK--DQKYPDKKAMGYPFDRPIQVRTPSQFKTPNMAFQEIIIQYEGHKH----------------------------------------------  627
NinHcD    SYCGAK--DQKYPDRRAMGYPFDRPIKARTPSQFKTQNMSFTEVRIQYGGYKA----------------------------------------------  627
LpoHcII   SYCGAR--DHKYPDKKPMGFPFDRPIHTEHISDFLTNNMFIKDIKIKFHE----------------------------------------------  629
EcaHcA    SYCGVL--DQKYPDKRAMGYPFDRKITADTHEEFLTGNMNISHVTVRFQD------------------------------------------------  631
NinHcA    SYCGVM--DEKYPDKRAMGYPFDRTITAQSHEEFITPNMKISNITVRFQD------------------------------------------------  630
LpoHcVI   SYCGAK--DQLYPDRRPMGFPFDRHIELEHLKDWVLPNMKDTLITVTHHEEVHNHNH--------------------------------------  638
EcaHcB    SYCGAK--DQLYPDRYPMGFPFDRDIKADSIPEWLHPNMHFSEVTITHHQ------------------------------------------------  627
NinHcB    SYCGAK--DQLYPDKRAMGFPWDREIVANDFNEWRQPNMISIPIDIVHS--------------------------------------------------  628
EcaHcC    SYCGAK--DSLYPDRRAMGFPFDRPIPEGHASNLHQPNVSFSQIKIQHH--------------------------------------------------  629
ScoHcA    SYCGSV--EHKLPDNKPLGYPFDRRIDGTGFEEFKTQNMYYGDVVIQFTGETVTH--------------------------------------------  656
ScoHcB    SYCGAL--YDKYPDRRPMGYPFDRHADAQTFDEFKTKNMNSVTVTIKHTGEVKDA--------------------------------------------  659
ScoHcC    TYCGGI--DYHFPDKRAMGFPFDRPIKQRNFNAFKTKNMGKVTVDVKFTGETIAPE---DFHNQH----------------------------------  673
ScoHcD    AYCGAH--NQKYPDKKPMGFPFDRRIDERTFEHFHTPNMIATDVIIKFTGEFLPPKGDI----------------------------------------  668
SpiHc1    SYCGNI--LGEYLDKRPLGYPFDRKIKATGWAEFKTQNMCDADIVIKFSGKNK----------DH----------------------------------  653
GpuHc1    AQCGVH--GEKYPDHQPMGFPLDRRIPDDRIFL-SADNIEKLIVTVHHKH------------------------------------------------  672
GroHc1    AQCGVN--GEKYPDHQPMGFPLDRRIPDDRIFL-SADNIEKLLVTVTHKH------------------------------------------------  672
CcsHc     AQCGVQ--GEKYPDSKPMGFPLDRRIEDERILL-SSSNLKYTVVKITHKH------------------------------------------------  674
EpuHc1    AQCGIH--GEVYPDKRPLGFPLDRQIPDERILE-HFPNLHKSIVVVHHEEHHKDH--------------------------------------------  677
PleHc2    AQCGIH--GEKYPDKKPMGYPVDRSVPDNRVFL-ESPNIKRVYVKVFHDEHHDEHQ------------------------------------------  687
HamHcA    AQCGAH--GEKYPDKKPMGYPLERSIPDERVFH-DVANINVTHVKVFFKEEH------------------------------------------------  672
PinHcB    AQCGVH--GEAFPDNRPLGYPLERRIPDERVID-GVSNIKHVVVKIVHHLEHHD----------------------------------------------  657
PinHcA    AQCGVH--GEAYPDNRPLGYPLERRIPDERVID-GVSNIKHVVVKIVHHLEHHD----------------------------------------------  657
PelHc1    AQCGIH--GEQYPDHRPLGYPLERRIPDERVFD-GVSNIKHALVKIVHDPELRA----------------------------------------------  684
PelHc4    AQCGIH--GEQYPDHRPLGYPLERRIPDERVFD-GVSNIKHALVKIVHDPELRA----------------------------------------------  685
PelHc3    AQCGIH--GEQYPDHRPLGYPLERRIPDERVFD-GVSNIKHALVKIVHDPELRA----------------------------------------------  685
PelHc2    AQCGIH--GEQYPDHRPLGYPLERRIPDERVFD-GVSNIKHALVKIVHDPELRA----------------------------------------------  684
CmaHc6    HY-GAH--NGKYPDKRPHGYPMDRRVDDKRIFS-GVTNIKCMNVKVYHVETQ------------------------------------------------  676
CmaHc4    HY-GAH--SGKYPDKQPHGYPLDRRVDDKRIIT-GVTNFKGMDVKVYHVEEQ------------------------------------------------  675
CmaHc5    HY-GAH--NGKYPDKQPHGYPLDRRVDDERIIT-GVTNFKGVDVKVYHVETQ------------------------------------------------  676
CsaHc     HY-GCH--DGTYPDNQPHGYPLDRRVDDERIIT-GVSNFKAVDVKVYHVEDH------------------------------------------------  676
CmaHc3    HY-GCA--DGTYPDKRPHGYPLDRHVDDERIIN-DLHNFKHIQVKVFHHA--------------------------------------------------  669
PvaHc1    HY-GSH---GVYPDKRPHGYPLDRKVPDERVFE-DLPNFGHIHLKVFNHGEHIHH--------------------------------------------  671
PvaHc     HY-GSH---GVYPDKRPHGYPLDRKVPDERVFE-DLPNFKHIQVKVFNHGEHIH----------------------------------------------  662
PinHcC    HY-G-Y--DRQYPDKRPHGYPLDRRVDDERIFE-ALPNFKQRTVKLYSHEGVDG-G--------------------------------------------  661
PleHc     GYCGIH--GEKYPDKRPMGFPFDRPIPDLRVFK--VQNQHGQVVKIFHH--------------------------------------------------  660
CmaHc1    GYCGIQ--GAKYPDKRPMGFPFERRVPDIRVIK-NLPNFFGKIVDVYHKDH------------------------------------------------  662
CmaHc2    GYCGIQ--GAKYPDKRPMGFPYERRIPNKFLVL-GLPNHHSQEVNVYHKEE------------------------------------------------  663
```

```
HamPHc1   HY-GHH--G-VYLDKKSHGYPLDRRVPDERLFH-EIPNFGETIVKVFNHNEHVHRHE-------------------------------------------  684
HamPHc2   HY-GHH--G-VYLDKKPHGYPLDRRVPDERLFH-EIPNFGETIVKVFNRDEHVYHH--------------------------------------------  681
CmaCC1    HY-GVR--G-VQPDNRPFGYPLDRRVPDEHIVD-EVSNIKATMVKVYNHNVFIPLS-------------------------------------------  653
CmaCC2    HY-GVR--G-VQPDKRPFGYPLDRRVFDEHIVN-EVSSIKETMVKVYNHDVLIRLPHY-------------------------------------------  674
PmaHc2    GYCGVM--EGKIPDGKPMGYPFDRRISCEESFI--TKNMKFVDITVKTRV----------------------------------------------------  671
PqrHc2    GYCGVM--EGKIPDGKPMGFPFDRPVPCEETFI--TKNMKFVDITVKTRV----------------------------------------------------  671
CseHc2    GYCGVM--DGKIPDGRPMGFPFDRRIVSPEQFL--TPNMEVVDITIKNVNQKPAE------------------------------------------------  684
PamHc2    GYCGVM--DGKMPDGKPMGFPFDRRVPSEETFY--TPNIKTIDLTIKNVKQKPTE------------------------------------------------  684
BduHc2    GYCGVL--DGKIPDGKPMGFPFDRRIPSEELFL--TPNMKVVNLVIKNVRQKPVE------------------------------------------------  685
HmeHc2    GYCGVL--EGKIPDARPMGFPFDRRITSEEEFF--TQNMKVVDVTIPNVKENR--------------------------------------------------  663
TdoHc2    GYCGVL--DGVIPDGRPMGYPYDRPIPDKEVFN--IPNSKVIEVTIKNAK-----------------------------------------------------  658
SamHc1    SYCGTL--GHRYPDAKPMGFPFDRRIDQD-SFF--TKNIYQRDVTITFKGSV---------------------------------------------------  674
BduHc1    SYCGVL-SGHKYPDSKPMGFPFDRHIDGD-HFF--TENMYQKEVKITFQDNE---------------------------------------------------  678
PamHc1    SYCGTL-AGHKYPVNKPMGFPFDRQIDGD-NFC--TPNMFQKDVIITFKDTI---------------------------------------------------  674
CseHc1    SYCGTV-SGHKYPDSKPMGFPFDRQINSD-NFF--RSNIYQKDVVITFKDSE---------------------------------------------------  677
HmeHc1    SYCGTL-AGHKYPDNKPMGFPFDRRIDED-HFF--TPNMGQKEVTISFKEVP---------------------------------------------------  660
CmoHc1    SYCGTI--NHKYPDSRPMGFPFDRRLSTE-EFS--MPNFCSKDVTITFKGDSS--------------------------------------------------  676
CacHc1    SYCGTL--GHKYPDSKPMGYPFDRPI-GR-EFY--YPNMFEKDVVITHKES----------------------------------------------------  669
TdoHc1    SYCGTL--NHKYPDTQPMGYPFDRRIENVEEFL--TPNMYVKDVVITHN-DAE--------------------------------------------------  677
PmaHc1    SYCGVV-GGHKYPDTKAMGFPFDRRIYSREDFF--TDNMYTKDVTITFKENHHH-------------------------------------------------  678
PgrHc1    SYCGVV-GGHKYPDTKAMGFPFDRRIYSREDFF--TDNMYTKDVTITFNENHKH-------------------------------------------------  678
ScuHc1    SYCGTI--NHKYPDKKPMGWPLDRKICKDSFHD--VTNMYFRDVEIKFEHTH---------------------------------------------------  672
MgeHc1    SYCGTY-GDRLYPDKKAFLYPFDRVIKDVNVFK--TPNMFGKYVSIYHKDISELNRVVPVVEE----------------------------------------  686
TdoHex1   ILCGVK--EGKYPDTKPMGYPFDRKFDERDIKS--ATNVYVKDVLIYHKRDVSESSDKYSQYDDLY---------------------------------------  711
PmaHex1   PYCGVG-KHGVYPDSYSMGYPFDRTIEHY-DFFYNAPNMHFDDVIIFHKTAEELNIKVHH---------------------------------------------  702
BdiHex    SYCGVG-ANHKFPDDKPFGYPFDRVLYSQ-EFV--TPNMYFKDVVIYHKKYEEINAATVQQ------------------------------------------  733
RflHex2   SYCGVG-FNNKYPDYKPLGYPFDRPIYGS-DFY--TTNSYFKDVVIFHKKEEEVNTAITQ-------------------------------------------  734
PamHex12  SYCGVG-SERKYPDNKPLGYPFDRKIYSN-DFY--TPNMYFKDVIIFHKKYDEVGVQGH---------------------------------------------  685
RflHex1   SYCGVG-QDRKYPDDMPLGFPFDRQIHSK-DFY--THQHVLQGCTIFPQETRRSQYSHPLGQQCEISTSHLLSGNGFSISKPKATDILQSDVLTLVNIIL-------  729
LmiHex1   ----------PYYDNQAAGFPFDRRVVEF-EFD--VPNVYFGETYVVHRRVEDINTTA-----------------------------------------------  673
LmiHex2   ----------EHGDLHAAGFPFDRRVVEF-EFD--VPNAHFDETFVVHRRVEDLNATA-----------------------------------------------  673
RmiHx1    ----------KSGDNHAAGFPFDRRIVEL-EFD--VPNAHFDETFVVHRRLEDINSTA-----------------------------------------------  673
TmoHex2   PMIGS---GMQYVDSYPMGYPFDRPVYWEQVFY-DIPNSYFHEVKIYHEHHDHGYEQHLEHEATHYMV-------------------------------------  702
AgeHex    PKVGT---AGQYVDGYALGHPFDRHIKFEKMWH-NVPNSYFYETKIYHKHSYDDHIHHHLHHEHYTEL-----------------------------------  720
LdeDPl    PAPGS---GGVFIDNRTAGFPFDRVIRFEKMWY-PLANGQFQEAKVYFKDIYDINAPHH---------------------------------------------  702
AgaHex2   LSCGVG-SGARYMDSYAFGYPFDRPIDEKLFYA--VPNAFFQDVSIYHKSE------------------------------------------------------  678
MseAryla  --------KSIVPDSKPFGYPFDRPVHPEYFKQ---PNMHFEDVHVYHEGEQFPYKFNVPFYVPQKVEV-------------------------------  702
MseArylb  --------EAFIQDNKPLGYPFDRPVVDAYFKQ---HNMFFKDVFVYHDGEYFPYKFNVPSHVMHSNVVPKH-----------------------------  703
CfeHex2   --------GKLTLDEKPLDFPLDKPMHPW-KFF--TPNMLMKDVYIYHIPGNTINENRMTDDTMIENWMNENWLNEDRVNEDRLNEDTMNKSWLKEHRMN  725
BheHex    --------GSYQYYMKPGGFPLDRPIYYP-HFQ--GPNMFFKDITIYHKTDVDPNATT---------------------------------------------  678
StuHc2    GYCGAL--WAKYPDKKPMGFPFDRHIQDEEDFF--TENMKLIDVVIKNIK------------------------------------------------------  672
StuHc3    SLCGIR--GEKYPDKRALGFPFDRYIHSVEDFV--TPNMFCKDVVITHVPHA----------------------------------------------------  671
StuHc1    SYCGTLTEGQKYPDKKPMGFPFDRHIEDVHDFK--TKNMIVKDVVVTHKSDH----------------------------------------------------  686

          *************************
EpiHc     -------------------------    -
LpoHcI    -------------------------    -
TtrHcA    -------------------------    -
EcaHcE    -------------------------    -
NinHcE    -------------------------    -
EcaHcG    -------------------------    -
NinHcG    -------------------------    -
CsaHc1    -------------------------    -
AauHc6    -------------------------    -
LpoHcIV   -------------------------    -
EcaHcF    -------------------------    -
NinHcF    -------------------------    -
EcaHcD    -------------------------    -
NinHcD    -------------------------    -
LpoHcII   -------------------------    -
EcaHcA    -------------------------    -
NinHcA    -------------------------    -
LpoHcVI   -------------------------    -
EcaHcB    -------------------------    -
NinHcB    -------------------------    -
EcaHcC    -------------------------    -
ScoHcA    -------------------------    -
ScoHcB    -------------------------    -
ScoHcC    -------------------------    -
ScoHcD    -------------------------    -
SpiHc1    -------------------------    -
GpuHc1    -------------------------    -
GroHc1    -------------------------    -
CcsHc     -------------------------    -
EpuHc1    -------------------------    -
PleHc2    -------------------------    -
HamHcA    -------------------------    -
PinHcB    -------------------------    -
PinHcA    -------------------------    -
PelHc1    -------------------------    -
PelHc4    -------------------------    -
PelHc3    -------------------------    -
PelHc2    -------------------------    -
CmaHc6    -------------------------    -
CmaHc4    -------------------------    -
CmaHc5    -------------------------    -
CsaHc     -------------------------    -
CmaHc3    -------------------------    -
PvaHc1    -------------------------    -
PvaHc     -------------------------    -
PinHcC    -------------------------    -
PleHc     -------------------------    -
CmaHc1    -------------------------    -
CmaHc2    -------------------------    -
HamPHc1   -------------------------    -
HamPHc2   -------------------------    -
CmaCC1    -------------------------    -
CmaCC2    -------------------------    -
PmaHc2    -------------------------    -
PgrHc2    -------------------------    -
CseHc2    -------------------------    -
PamHc2    -------------------------    -
BduHc2    -------------------------    -
HmeHc2    -------------------------    -
TdoHc2    -------------------------    -
SamHc1    -------------------------    -
BduHc1    -------------------------    -
PamHc1    -------------------------    -
CseHc1    -------------------------    -
HmeHc1    -------------------------    -
CmoHc1    -------------------------    -
CacHc1    -------------------------    -
TdoHc1    -------------------------    -
PmaHc1    -------------------------    -
PgrHc1    -------------------------    -
ScuHc1    -------------------------    -
```

```
MgeHc1     -------------------------    -
TdoHex1    -------------------------    -
PmaHex1    -------------------------    -
BdiHex     -------------------------    -
RflHex2    -------------------------    -
PamHex12   -------------------------    -
RflHex1    RFSGMCCRILW--------------  740
LmiHex1    -------------------------    -
LmiHex2    -------------------------    -
RmiHx1     -------------------------    -
TmoHex2    -------------------------    -
AgeHex     -------------------------    -
LdeDP1     -------------------------    -
AgaHex2    -------------------------    -
MseAryla   -------------------------    -
MseArylb   -------------------------    -
CfeHex2    KDTINESWLKENRMKDTMDENTMNL  750
BheHex     -------------------------    -
StuHc2     -------------------------    -
StuHc3     -------------------------    -
StuHc1     -------------------------    -
```

8.2.2.3. Detaillierte Stammbäume

Im Folgenden sind die detaillierten Stammbäume der drei pylogenetischen Analysen dargestellt. Neighbor-joining Stammbäume wurden mit PHYLIP 3.66 (Felsenstein, 2004) oder dem BioNJ-Algorithmus (Gascuel, 1997) erstellt. Die Zuverlässigkeit der erhaltenen Bäume wurde mittels Bootstrapping mit 100 „Pseudosamples“ überprüft (Felsenstein, 1985). Bayes`sche Analysen erfolgten mit MrBayes 3.1 (Huelsenbeck und Ronquist, 2001) unter Annahme des WAG-Modells (Whelan und Goldman, 2001) und einer Gamma-Verteilung der Substitutionsraten. Es wurde ein „Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) sampling“ mit einer *cold chain* und drei *heated chains* für 4.000.000 Generationen durchgeführt. Das Sampling der Bäume fand alle 100 Generationen statt, wobei von den letzten 35.000 (burnin = 5.000) die „posterior probabilities“ abgeschätzt wurden. Maximum likelihood Analysen erfolgten mit RAxML 7.0.3 (Stamatakis, 2006) in zwei unabhängigen Läufen unter Verwendung des WAG-Evolutionsmodells. Auch hier wurde die Zuverlässigkeit der Bäume mittels Bootstrapping überprüft.

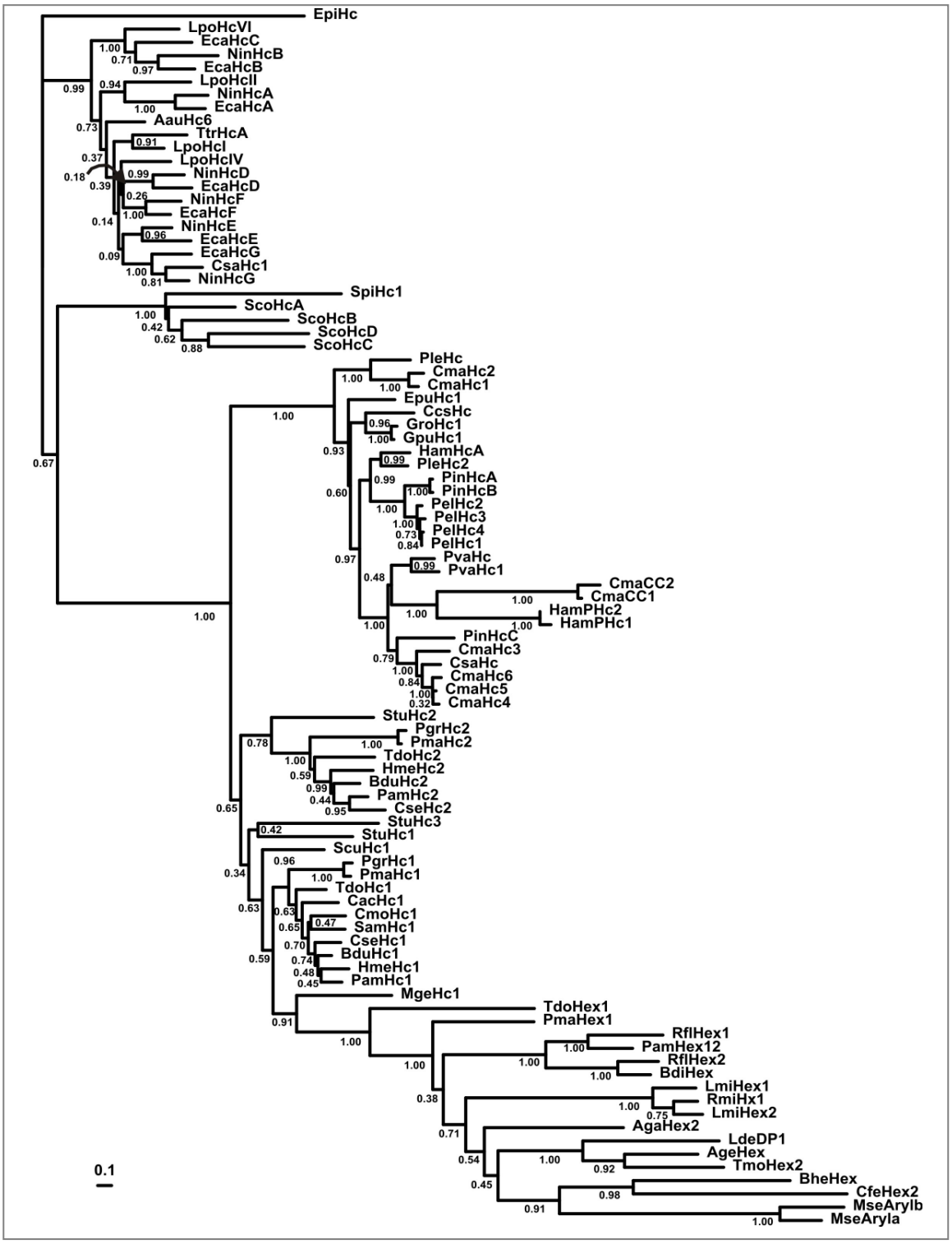

Abb. G.1: Detaillierter Stammbaum der Neighbour-joining Analyse

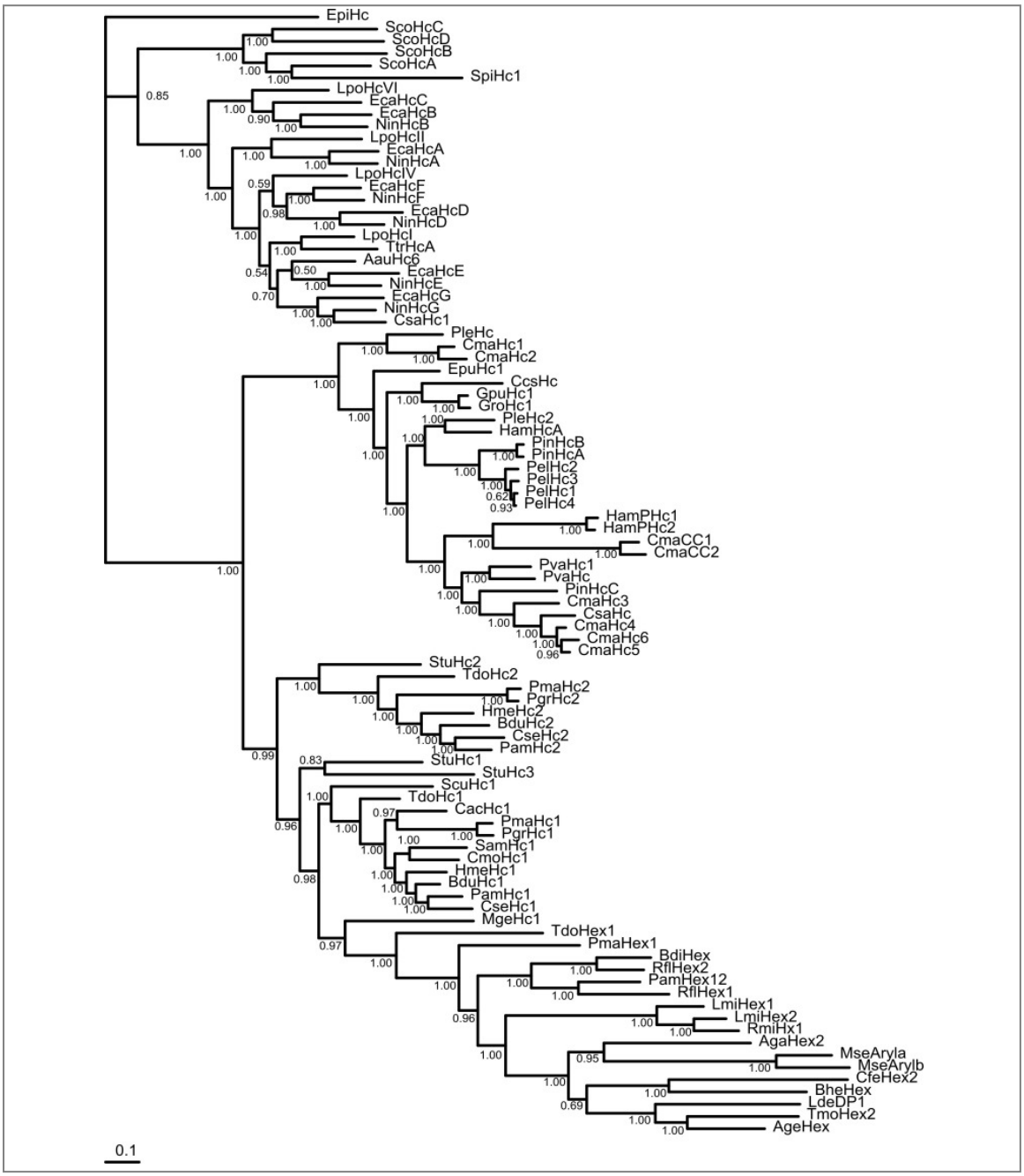

Abb. G.2: Detaillierter Stammbaum der Bayes`schen Analyse

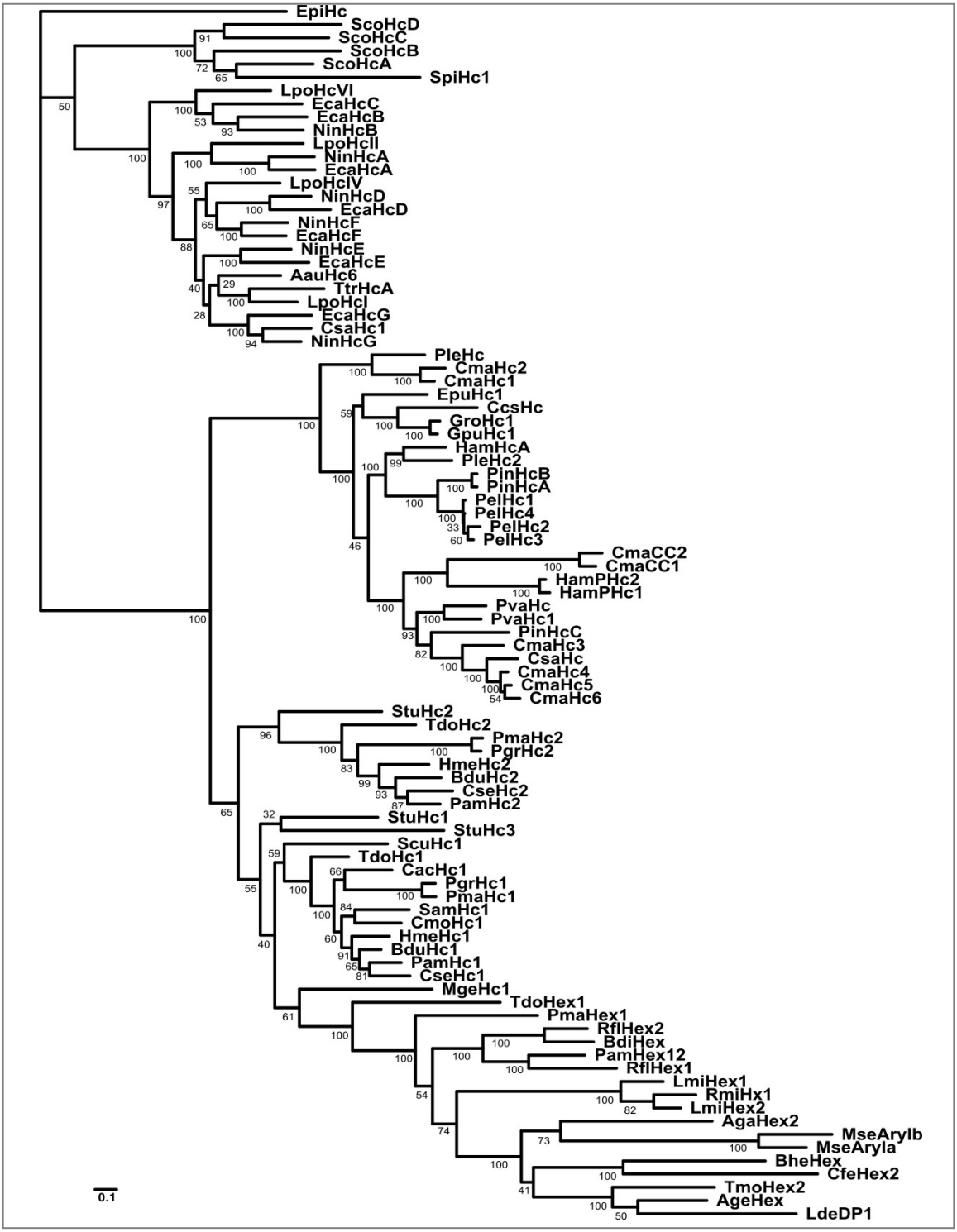

Abb. G.3: Detaillierter Stammbaum der Maximum likelihood Analyse

Erfolg,
das ist eine unberechenbare Mischung aus
Talent, Glück, Arbeit
und oft auch ein Missverständnis

(Carl Zuckmayer)

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für eine interessante, vielschichtige Themenstellung und die ausgezeichneten Forschungsbedingungen.
Herrn Prof. Dr. Konrad Wiese danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Tierphysiologie danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Unterstützung im Laboralltag, all den Spaß auf den vielen Partys und und und… Besonders danken möchte ich an dieser Stelle Dr. Miriam Blank, Samantha Didier, Dr. Frank Gerlach, Cindy Hefenbrock, Günter Jacobs, Wiebke Krohn, Maria Machola, Dr. Julia Marxen, Dr. Christian Pick, Falko Roeding, Marco Bert Schneuer, Jessica Tiedke, Agnes Wawrowski, Irena Werner, Jessica Wollberg und Heike zur Borg.

Ein ganz großes DANKE geht an meine drei Bürokollegen Dr. Frank Gerlach, Dr. Christian Pick und Falko Roeding, die mir seit meinem ersten Tag in der AG immer mit Rat und Tat zur Seite standen!!! Vielen Dank für die äußerst hilfreiche, fachkundige Unterstützung in allen Aspekten der Molekularbiologie. Christian danke ich zudem für seine ausgezeichnete Einführung in die für mich sehr mysteriöse Welt der phylogenetischen Analysen.

Agnes Wawrowski und Jessica Tiedke… Danke, dass ich mich JEDERZEIT auf Euch verlassen konnte!!! Eure fröhliche und hilfsbereite Art sowie Eure Kreativität in Sachen Gartenarbeit haben mich auch in der letzten, stressigen Phase meiner Doktorarbeit immer wieder motivieren können.
Bei Dr. Julia Marxen möchte ich mich ganz besonders für ihre stets offene Tür und für die vielen motivierenden Gespräche bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich auch meine „Nachbarin“ Jessica Wollberg erwähnen, die es mit viel Kaffee, lustigem Gesprächsstoff und ihrer ruhigen Art blendend verstanden hat, mich mit ihrer guten Laune anzustecken. Dörte Heyden möchte ich herzlich für die tolle Zusammenarbeit und jede Menge Spaß in der Zellkultur danken.

Ein großer Dank gebührt Irena Werner für die großartige Unterstützung im Labor! Deine Hilfsbereitschaft in den kleinen und großen Dingen des (Labor-)alltags sowie Dein Engagement und Optimismus haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen! Bedanken muss ich mich auch bei Cindy Hefenbrock und Samantha Didier, die sich beide im Rahmen ihrer Diplomarbeit mit der rekombinanten Expression von Hämocyaninen beschäftigt haben.

All meinen Freunden, die mir während meiner Studien- und Promotionszeit immer zur Seite standen, möchte ich ebenfalls ganz herzlich danken. Insbesondere Marc Benckert und Petra Haunhorst schulde ich eine Menge für ihre Unterstützung, auf die ich immer zählen konnte. Meine allergrößte Dankbarkeit gilt aber meiner Familie, die all meine Entscheidungen mitgetragen und mich immer unterstützt hat!! Ohne Euch wäre ich sicherlich nicht an diesem Punkt angelangt.