Identifikation und Charakterisierung von Perlucin Spleißvarianten der marinen Abalone *Haliotis laevigata*.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt dem Promotionsausschuss

des Fachbereichs 2 (Biologie und Chemie)

der Universität Bremen

von

Tanja Dodenhof

aus Wilhelmshaven

Universität Bremen

2014

Tag des öffentlichen Kolloquiums. 25. April 2014

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. rer. nat. Sørge Kelm

PD. Dr. rer. nat. Ingrid M. Weiss

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **7**

Summary **9**

1. Einleitung **13**

1.1 Biomineralisation 13

1.2 Calciumcarbonat 15

1.3 Abalone 15

1.4 Perlmutt 17

1.4.1 Wachstum von Perlmutt 19

1.5 Biomineralisierende Proteine 20

1.5.1 Perlmuttproteine 21

1.6 C-Typ Lektine 24

1.7 Problemstellung und Ziel der Arbeit 25

2. Material und Methoden **27**

2.1 Verwendetes Tiermaterial 27

2.2 Kits 27

2.3 Lösungen und Medien 28

2.4 Eukaryontische Zelllinien 30

2.5 Bakterienstämme 30

2.6 Vektoren 30

2.7 Antikörper 31

2.8 Isolierung von Gesamt-RNA 31

2.9 Aufreinigung von Plasmid DNA aus *E. coli* Kulturen 32

2.10 Aufreinigung von PCR-Produkten 33

2.11 Restriktionsverdau 33

2.12 Agarosegel-Elektrophorese 33

2.13 Ligation 34

2.14 Transformation in Bakterien 34

2.15 PCR Techniken 34

2.15.1 Nested-PCR 36

2.15.2 cDNA Synthese 36

2.15.3 RACE 37

2.15.4 Sequenzierung 38

2.16 Verwendete Oligonukleotide 40

2.17 Klonierungsstrategien 41

2.17.1 Transiente eukaryontische Expression 41

2.17.2 Stabile eukaryontische Expression 41
2.17.3 Bakterielle Expression 42
2.18 Säugetierzellkultur 42
2.19 Transfektion in COS-7 Zellen 43
2.20 Transfektion in CHO LecI Zellen 43
2.21 Transfektion zur stabilen Expression der Perlucin Spleißvarianten 44
2.22 Präzipitation von rekombinanten Perlucin-R0 45
2.23 Ko-Transfektion der Perlucin Spleißvarianten 45
2.24 Proteinaufreinigung aus Zellkulturüberstand von eukaryontischen Zellen 45
2.25 Überexpression in Bakterien 46
2.26 Proteinaufreinigung aus Bakterienlysat 46
2.26.1 Proteinaufreinigung über den His-Tag 46
2.26.2 Proteinaufreinigung über den C-terminalen Strep-Tag 47
2.26.3 Dialyse und Proteinkonzentrationsbestimmung 47
2.27 SDS-PAGE 47
2.28 Coomassie Färbung 48
2.29 Silberfärbung 48
2.30 Westernblot 48
2.31 2D-Elektrophorese des nativen Perlucins 49
2.32 MALDI-ToF MS und LC-ESI-MS 50
2.33 Immunfluoreszenz 50
2.34 Erstellung phylogenetischer Stammbäume von Perlucin 51
2.35 Proteinmotiv Vorhersage 52
2.36 $CaCO_3$-Präzipitation 52
2.37 Dynamische Lichtstreuung 53
2.38 Rasterelektronen Mikroskopie von $CaCO_3$ 54

3. Ergebnisse 55
3.1 Identifikation von Perlucin Spleißvarianten 55
3.2 Proteinmotiv Vorhersage 57
3.3 Erste Sequenzergebnisse von Perlucin aus Haliotis varia 58
3.4 Nachweis der Spleißvarianten in der Schale von H. laevigata 59
3.4.1 2D-Elektrophorese von nativen Perlucin 59
3.4.2 MALDI-ToF MS und die Identifizierung des „DSLHANLQQR“ Peptides 60
3.5 Phylogenetische Analysen von Perlucin 62
3.5.1 Perlucin aus *Haliotis spec.* im Vergleich mit C-Typ Lektinen 62
3.5.2 Einordnung der Perlucine von *Haliotis spec.* in die C-Typ Lektin Gruppen 64
3.6 Eukaryontische Transfektion der Perlucin Spleißvarianten 67

3.6.1 Transiente Transfektion 67
3.6.2 Stabile Transfektion der Perlucin Spleißvarianten 69
3.7 Präzipitation von rekombinanten Perlucin 70
3.8 Koexpression der Perlucin Spleißvarianten 72
3.9 Perlucin Expression in Bakterienzellen 73
3.10 Der Einfluss von Perlucin Spleißvarianten auf die Präzipitation von $CaCO_3$ 75
3.11 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von $CaCO_3$-Mineralen 78
3.12 Dynamische Lichtstreuung 81

4. Diskussion 82
4.1 Perlucin Spleißvarianten 82
4.2 Repeat-Peptid 83
4.3 Phylogenetische Analysen 84
4.4 Posttranslationale Modifikation 87
4.4.1 Glykosylierung 87
4.4.2 Phoshorylierung 87
4.5 $CaCO_3$ -Präzipitation 88
4.6 Aggregation 90
4.7 Kristallbildung 93
4.8 Ausblick 95

5. Literatur 97

Anhang 106
A I cDNA Sequenzen der neuen Perlucin Spleißvarianten 106
A II Alignments 114
A IV Vektorkarten 121
A V IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide 121
A VI Danksagung 122

Zusammenfassung

Perlmutt ist ein faszinierendes Polymer mit erstaunlichen Eigenschaften und deswegen für die Materialwissenschaften von großem Interesse. Eines der ersten Proteine, das aus dem Perlmutt der australischen Abalone *Haliotis laevigata* aufgereinigt und sequenziert wurde, ist Perlucin. Obwohl Perlucin als eines der Proteine der organischen Matrix identifiziert wurde, ist bisher wenig über seine Funktion bekannt. In dieser Arbeit wurde das Perlmutt-Protein Perlucin untersucht, um einen detaillierteren Einblick in die Rolle dieses Proteins während der Biomineralisation von Perlmutt zu erhalten. Perlucin-Proteinpräparationen aus der Schale von *H. laevigata* zeigen nach SDS-PAGE und Proteinfärbung häufig ein heterogenes Bandenmuster (Blank *et al*., 2001 [1] und Weiss *et al*., 2000 [2]). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die auch von anderen Arbeitsgruppen postulierte Expression verschiedener Isoformen von Perlucin sein (Mann *et al*., 2000 [3]). Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde aus dem Mantelepithel einer australischen Abalone *H. laevigata* RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Auf Basis der Aminosäuresequenz des nativen Perlucins von *H. laevigata* (Mann *et al*., 2000 [3]) wurden degenerierte *Primer* eingesetzt, mit denen sieben, bisher nicht beschriebene, Spleißvarianten des Proteins identifiziert werden konnten. Diese Spleißvarianten unterscheiden sich vor allem durch das Vorhandensein und die Anzahl eines zehn Aminosäuren langen Peptides (*Repeat*), dass sich zwei-, drei-, fünf-, sechs- oder achtmal am C-Terminus des Proteins wiederholt. Von diesen sieben Spleißvarianten wurden drei näher charakterisiert: Perlucin-R0 (ohne *Repea*t), Perlucin-R5 (mit fünf *Repeats*) und Perlucin-R8 (mit acht *Repeats*). Durch MALDI-ToF MS des nativen Perlucins wurden drei dieser Spleißvarianten und außerdem das *Repeat*-Peptid in der organischen Matrix der Schale von *H. laevigata* nachgewiesen.

Für Folgeversuche wurden die Perlucin Spleißvarianten fusioniert mit dem *Maltose-Binding Protein* (MBP) in einem bakteriellen Expressionssystem exprimiert. Nach einer Tandem-Aufreinigung über einen N-terminalen His-Tag und einen C-terminalen Strep-Tag führte dies zu sehr reinen MBP-Perlucin Spleißvarianten.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass natives Perlucin zu einer schnelleren Präzipitation von $CaCO_3$ führt (Weiss *et al*., 2000 [2]). Diese aufgereinigten Proteinfraktionen bestehen aus einem heterogenen Proteingemisch, welche wahrscheinlich auch die hier neu identifizierten Spleißvarianten beinhalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MBP-Perlucin Spleißvarianten einen differentiellen Einfluss auf die Präzipitation von $CaCO_3$ haben und sogar das stark die Präzipitation hemmende MBP überwinden können. Die Präzipitation von

$CaCO_3$ in Gegenwart der Perlucin Spleißvarianten führt zu Mineralen, die im Rasterelektronenmikroskop als klar definierte Präzipitate mit glatten Oberflächen erscheinen. Diese Minerale scheinen schichtartig aufgebaut zu sein.

Die Perlucin-Spleißvarianten könnten verschiedene Funktionen bei der Biomineralisation von $CaCO_3$ haben: Erstens könnten sie als Nukleationskeim, durch Oligomerisierung und durch Bildung von großen Aggregaten von bis zu 1 µm, fungieren und zweitens könnten sie einen modulierenden Effekt auf die Mineralisation von $CaCO_3$, durch regulierte Expression der Spleißvarianten mit einem differentiellen Einfluss auf diesen Prozess, haben.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde Perlucin von *H. laevigata* mit anderen potentiellen Perlucinen aus der Datenbank GenBank phylogenetisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich alle potentiellen und sogenannten Perlucine deutlich von C-Typ Lektinen von Nematoden, Schlangen, Fische und Menschen abgrenzen. Durch die in dieser Arbeit vorgelegte phylogenetische Studie wurden nur fünf Proteine als Perlucin definiert. Bei der phylogenetischen Einordnung in die C-Typ Lektin Gruppen, wurden diese fünf Proteine der Tetranektin-Familie und den Collectinen zugeordnet.

Summary

Mother of pearl is a polymer of significance for material sciences due to its fascinating properties. A frequently investigated protein in mother of pearl from the Australian Abalone *Haliotis laevigata* is the protein Perlucin. Despite its importance relatively little is known about the role of Perlucin in detail in the biomineralisation of mother of pearl.

After SDS-PAGE and staining with Coomassie the native protein from *H. laevigata* shows a heterogenic band pattern (Blank *et al*., 2001 [1] und Weiss *et al*., 2000 [2]) postulated to be an expression of Perlucin isoform variability. Focus of the submitted thesis is to test this hypothesis by synthesizing cDNA from the mantle epithelium of the Australian Abalone *H. laevigata*. Assembling degenerated *primer* based on the amino acid sequence of the native Perlucin of *H. laevigata* (Mann *et al*., 2000 [3]) seven previously unknown splice variants of the protein have been identified. These splice variants differ mainly in the number of a ten amino acid long peptide (*repeat*) with zero, two, three, five, six or eight repetitions at the C-terminu*s* (of the protein). Three of the seven splice variants have been characterised in detail: Perlucin-R0 (no *repea*t), Perlucin-R5 (five *repeats*) and Perlucin-R8 (eight *repeats*). The splice variants as well as the *Repeat*-peptide have been identified in the organic matrix of the shell from *H. laevigata* using MALDI-ToF MS. For subsequent experiments the Perlucin splice variants were fused with the maltose-binding protein (MBP) using a bacterial expression system. After tandem purification via the N-terminal His-Tag and a C-terminal Strep-Tag very pure MBP-Perlucin splice variants were obtained.

Native Perlucin can lead to a faster precipitating of $CaCO_3$ (Weiss *et al*., 2000 [2]) consisting of a heterogeneous protein mixture potentially containing the here newly identified splice variants. The here presented thesis demonstrates that the different variants expressed as MBP fusion proteins in *E. coli* showed strong differences in their influence on precipitating $CaCO_3$. These differences might be due to a splice variant specific formation of large protein aggregates influenced by the number of the 10mer peptide.

In the presence of the MBP-Perlucin splice variants, the precipitation of $CaCO_3$ leads to precipitates with well-defined surface structures, which might grew first followed by a tree structure, but the passing into a very regular layer-by-layer structural pattern.

The newly discovered Perlucin splice variant could potentially have multiple functions during the mineralisation of $CaCO_3$. First, they could act as a nucleation-seed by oligomerisation and formation of aggregates of up to 1 µm and second, they could have a modulatory effect on the mineralisation of $CaCO_3$, influenced by the differing length of the *repeat*-region.

Summary

Phylogenetic comparison of *H. laevigata* Perlucin with other related proteins from the GenBank database showed that all Perlucins differ substantially from C-type lectins of nematodes, snakes, fish and human. The phylogenetic study in this thesis defined five proteins as Perlucin. Based on a subsequent phylogenetic classification in the C-type lectin group, these five proteins can be assigned to the Tetranectin-family and Collectins.

Abkürzungen

α-MEM	Minimum Essential Medium Eagle (Nährmedium)
ACC	Amorphes Calcium Carbonat
AFM	Raster Kraft Mikroskop (*Atomic Force Microscope*)
BCA	Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*)
BSA	Rinder Serum Albumine (*Bovine Serum Albumin*)
CA	Kalifornien
CDD	Konservierte Domänen Datenbank (Conserved Domain Database)
cDNA	Kodierende Desoxyribonukleinsäure (*coding deoxyribonucleic acid*)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CRD	Zucker Erkennungsdomäne (*carbohydrate-recognition domain*)
CTLD	C-Typ Lektin Domäne
CY3	Cyanofarbstoff 3
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
dd	doppelt destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Nährmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*Deoxyribonucleic acid*)
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DLS	Dynamische Lichtstreuung (*Dynamic light scattering*)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	*Expressed Sequence Tags*
FCS	Fetales Kälber Serum
g	Schwerebeschleunigung
GFP	Grünes Fluoreszenz Protein (*green fluorescent protein*)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
kDa	Kilo Dalton
LB	Lurea Broth (Nährmedium)
ESI	Elektronenspray Ionisation
mA	Milliampere
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)
MBP	Maltosebindendes Protein (*Maltose Binding Protein*)
MO	Missouri
MWCO	Molekulare Massen Porengröße (*Molecular Weight Cut Off*)
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NTA	Nitrilotriessigsäure
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)
PFA	Paraformaldehyd

Pi	Isoelektrischer Punkt
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendfluorid
PEI	Polyethylenimin
RACE	*Rapid amplification of cDNA Ends*
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid)*
SP	Sequenzspezifische *Primer*
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SOC	Super Optimales Broth (*with catabolite repression*)
T4	vom Bakteriophagen T4 abstammend
Taq	*Thermus aquaticus*
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	*Tobacco etch* Virus
Tm	Schmelztemperatur
TNE	Tris, NaCl, EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USA	*United States of America*
UTR	Untranslatierte Region (*untranslated region*)
v/v	Volumenverhältnis
WI	Wisconsin

1. Einleitung

1.1 Biomineralisation

Biomineralien sind eine Gruppe der Mineralien, die von Lebewesen gebildet werden. Sie sind meist im Verbund mit organischem Material [4]. Viele Organismen entwickelten über die letzten 3500 Millionen Jahren die Fähigkeit zur Biomineralisation. Heute sind etwa 64 Minerale bekannt [5]. Die ältesten mineralischen Fossilien von Skeletten und Gehäusen verschiedener Phyla sind 580 Millionen Jahre alt und stammen aus dem Phanerozoikum, dem frühen Kambrium [6]. Im frühen Kambrium kam es zu einer großen Explosion von Organismen, die harte Skelette und Gehäuse bilden konnten (Kambrische Explosion). Diese Gehäuse boten und bieten unter den oxidierenden Konditionen im Seewasser Schutz vor Prädatoren, mikrobieller Degradation und Bioturbation [6]. Eine Erklärung, wie es zu dieser massiven Entstehung von Skeletten und Gehäusen in verschiedenen Organismen kam, ist, dass die Komponenten der Mineralisationsmaschinerie schon bei den Vorfahren der Kambrischen-Explosion vorhanden waren [7]. Es wird angenommen, dass es auch vorher Organismen mit der Fähigkeit gab Biomineralien zu bilden, diese jedoch nicht als Fossilien gefunden wurden [6]. Eine von dieser Annahme abweichende Erklärung führt die Kambrische Explosion auf die Veränderung der Umweltbedingungen durch geologische Prozesse (Vulkanausbrüche, Verwitterungsprozesse, etc.) zurück [8]. Diese Prozesse, so die Vermutung, führten zu einer Veränderung des Salzgehaltes, zu einem sinkenden pH-Wert des Meerwassers und dadurch zu einer Freisetzung von Calcium und anderen Mineralien, welche dann zur Skelett und Schalenbildung genutzt werden konnten [8].

Der Prozess der Mineralisation ist bei den Organismen, die Biomineralisation betreiben, auf bestimmte Gewebe und Zellen beschränkt [9]. Die Nukleation und das Wachstum eines Biominerals benötigt einen abgeschlossenen Raum, der die übersättigte Lösung zurückhalten kann [8]. Meist ist dieser Raum durch eine physikalische Grenze von der Umgebung abgetrennt (z.B. wie hier Mantelepithel und Schale), so dass eine Diffusion ausgeschlossen werden kann. Dieser Raum muss zumindest in der Lage sein, die Aktivität eines der Bestandteile zu verändern und vielleicht andere Ionen hinzuzufügen, wobei die Elektroneutralität gewahrt werden muss [8]. Bei den Mollusken wird dieser Raum aus dem einzelligem Mantelepithel und der Schale gebildet.

Die mineralisierenden Zellen haben zwei grundlegende Rollen: (A) Sekretion der organischen Matrix und Proteine [10] und (B) strukturelle, chemische sowie räumliche Kontrolle [11].

Die Biomineralisation unterteilt sich in zwei Arten: (A) Die induzierte sekundäre [12] und (B) die kontrollierte Mineralisation [11] [8]. Die beiden Arten der Biomineralisation sollen im Folgenden eingehender betrachtet werden.

Biologisch induzierte Mineralisation

Minerale, die biologisch induziert geformt werden, sind generell extrazelluläre Minerale [8]. Die sekundäre Mineralisation ist das Ergebnis einer chemischen Reaktion zwischen einer biologischen Aktivität und der Umgebung [13]. Der Organismus sezerniert ein oder mehrere metabolische Produkte, welche dann mit den Ionen oder anderen Komponenten aus der Umgebung reagieren [13]. In diesem Fall wirkt die Zelloberfläche als Nukleationskeim, an der das Kristallwachstum stattfindet [13]. Das biologische System hat wenig Kontrolle über Typ und Aussehen der Kristalle, diese sind sehr heterogen im Aussehen, bezüglich ihres Wassergehalts und der elementaren Zusammensetzung [8]. Die biologisch induzierte Mineralisation ist vor allem wichtig für Bakterien in anaeroben Habitaten, Tiefseeböden oder an oxischen / anoxischen Grenzflächen [13].

Biologisch kontrollierte Mineralisation

Es gibt verschiedene Ausprägungen der biologisch kontrollierten Mineralisation, die in der Folge näher erläutert werden. Gemeinsam ist allen, dass die Mineralisation in einem abgeschlossenen Raum stattfindet und ein für die jeweilige Spezies charakteristisches Mineral gebildet wird [8]. Es gibt drei Arten der biologisch kontrollierten Mineralisation, sie sind jeweils abhängig von der Seite der Mineralisation, bezogen auf die mineralbildenden Zellen [8]:

- biologisch kontrollierte extrazelluläre Mineralisation

In der biologisch kontrollierten extrazellulären Mineralisation, erzeugt der Organismus außerhalb der Zelle eine Matrix in dem Bereich, an dem das Mineral gebildet wird [8]. Die Kationen werden entweder aktiv aus der Zellmembran gepumpt und diffundieren durch das Konzentrationsgefälle zur organischen Matrix [8] oder große Vesikel, in denen in der Zelle die Kationen gesammelt wurden, werden sekretiert, diffundieren zur extrazellulären Matrix und öffnen sich dort [8].

- biologisch kontrollierte interzelluläre Mineralisation

Die biologisch kontrollierte interzelluläre Mineralisation ist eine Variante der extrazellulären Mineralisation und kommt bei Einzellern vor, die in einer Gemeinschaft leben [8]. Die Matrix und auch die Kristallnukleation erstrecken sich über die gesamte Zelloberfläche und können alle Räume zwischen den einzelnen Zellen ausfüllen [8].

- biologisch kontrollierte intrazelluläre Mineralisation

Die biologisch intrazelluläre Mineralisation findet innerhalb der Zelle, in den Vesikeln oder Vakuolen statt [8]. Die Kristalle werden entweder durch die Vesikel und Vakuolen sezerniert, oder es wird der fertige Kristall aus der Zelle sezerniert [8]. In seltenen Fällen verbleiben die Kristalle innerhalb der Vesikeln in der Zelle [8].

1.2 Calciumcarbonat

Heute lebende Organismen bilden eine ganze Reihe verschiedene Mineralien [14]. Die meisten Biominerale sind Phosphate und Carbonate der Calciumsalze, die häufig in Exoskeletten genutzt werden [14].

Calciumcarbonat ($CaCO_3$) existiert in der Natur in sechs verschieden Formen:

Die drei kristallinen Morphen: Calcit (z.B. als Exoskelett), Aragonit (z.B. als Exoskelett) und das metastabile Vaterit, zwei hydrate Phasen: Monohydrocalcit ($CaCO_3$–H_2O) und Ikait ($CaCO_3$–$6H_2O$) sowie das amorphe Calciumcarbonat (ACC) [14, 15]. Die beiden wichtigsten Carbonat-Minerale in Seewasser sind Calcit und Aragonit [16]. Calcit ist das stabilste Mineral unter normalen Druckverhältnissen, während Aragonit das stabilere Mineral in Hochdruck-Umgebungen (z.B. in der Tiefsee) ist, es kann sich aber auch bei normalem Druck entwickeln [15]. Das metastabile Vaterit wird entweder in eine andere Morphe, Calcit oder Aragonit, umgewandelt oder es wird durch Wasseradsorption an der Oberfläche stabil [15]. Die Unterschiede zwischen den Calciumcarbonat-Morphen, Calcit und Aragonit, lassen sich durch unterschiedliches Arrangieren der CO_3-Ionen in der Kristallstruktur erklären [15].

1.3 Abalone

In dieser Arbeit wurde eine australische Meeresschnecke der Art *Haliotis laevigata* verwendet (Abbildung 2). Das Grüne Seeohr gehört zu der Familie der *Haliotidae*, die auch Abalone oder Seeohren genannt werden. Die *Haliotidae* treten von der Gezeitenzone bis hin zu einer Tiefe von 80 - 90 Meter auf [17]. Die Abalone bilden eine Gattung mit über 100 bekannten Arten, die über die ganze Welt, aber vor allem im südwestlichen Pazifik [18, 19], in Japan und Australien sowie in anderen Teilen des Pazifiks vor Kalifornien (z.B. *Haliotis rufescens*), in Südafrika (z.B. *Haliotis midae*), im Mittelmeerraum und im atlantischen Ozean (z.B. *Haliotis tuberculata*) vorkommen.

H. laevigata ist eine australische Abalone, die im südlichen Teil Australiens gefunden werden kann [20] (Abbildung 1). In Tasmanien, South Australia und Viktoria findet man zudem zahlreiche Abalone Farmen, die *H. laevigata* züchten, weil das wirtschaftliche Interesse an

diesen Schnecken in den frühen 90er Jahren stark gestiegen ist; Hauptabnehmer der Abalone sind mit 80 % Asien, hier vor allem Japan und China [20].

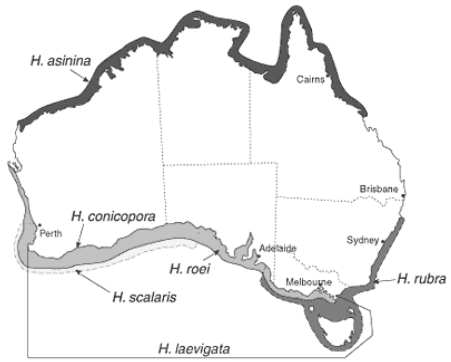


Abbildung 1: Verteilung der Abalone in Australien.
Haliotis laevigata ist im südlichen Teil an der Küste Australiens zu finden (Übernommen aus [20]).

Die Schale der Abalone ist als flache Spirale aufgebaut, mit einer Reihe von Löchern an der Außenseite, die zur Atmung und für die Sinnesorgane genutzt werden (Abbildung 2). Zwischen der Schale und dem Eingeweidesack befindet sich der Extrapallialraum, der durch das einzellige Mantelepithel begrenzt wird und den Eingeweidesack umschließt. An den Eingeweidesack schließt sich der Fuß an. In Abbildung 2 A ist die Schale einer juvenilen *H. laevigata* von oben mit der Calcit-Schicht und dem Periostrakum (besetzt mit Seepocken) zu sehen. Abbildung 2 B zeigt dieselbe Schneckenschale mit der Sicht auf die innere Perlmuttschicht (P), an der das Mantelepithel (ME) ansetzt. Dies lässt sich auch in Abbildung 2 C an der noch lebenden Schnecke beobachten: Zu sehen ist der große Fuß (F), der an den Eingeweidesack anschließt, der vom Mantelepithel (ME) umschlossen wird und an der Perlmuttschicht der Schale anheftet. In Abbildung 2 D ist der Querschnitt durch das Mantelepithel einer adulten *H. tuberculata* (entnommen aus [21]) zu sehen. Hier wird deutlich, dass das Mantelepithel aus zwei Falten besteht: Das innere Epithel (ie), dass an der zum Körper gewandten Seite liegt, sezerniert die Komponenten für die innere Calcit-Schicht. Das äußere Epithel (oe), welches zur äußeren Schale gewandten Seite positioniert ist, sezerniert die meisten Komponenten der äußeren Calcit-Schicht [22]. Dazwischen liegt die Periostrakalgrube, die das Periostrakum bildet. Das Mantelepithel (ME) sezerniert die organische Matrix in den Extrapallialraum. Die Mineralisation erfolgt am äußeren Ende der Schale im Extrapallialraum. Die im äußerem Mantelepithelium lokalisierten Zellen, die verantwortlich für die Bildung von Perlmutt sind, sind nicht an derselben Stelle lokalisiert, wie die Mantelepithelzellen, die für die Calcit-Bildung verantwortlich sind [23].

Die ionische Zusammensetzung und der Salzgehalt des Extrapallialraumes der marinen Mollusken entspricht in etwa der Zusammensetzung von Meerwasser [8, 24].

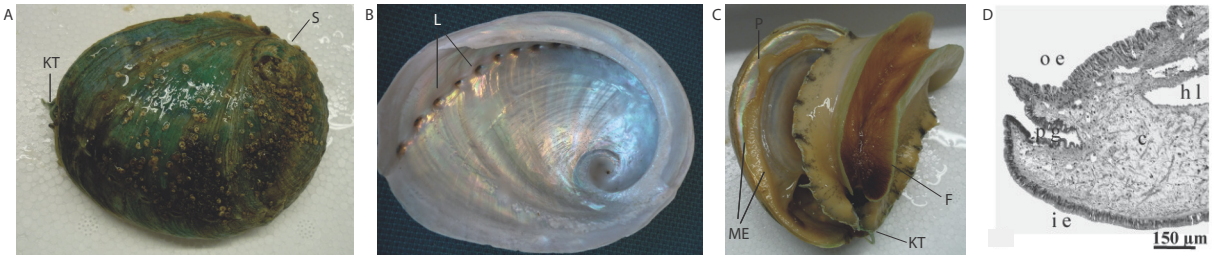


Abbildung 2: Photographie und histologischer Schnitt einer Abalone.
A bis C zeigt die Photographie einer juvenilen Abalone *H. laevigata*, D zeigt den histologischen Schnitt durch den Mantel einer adulten Abalone *H. tuberculata* (übernommen und verändert aus [21])
KT = Kopftentakeln, S = Spirale, L= Luft –oder Atemlöcher, P= Perlmutt, ME = Mantelepithel, F = Fuß.
A: Die äußere Calcit-Schicht mit dem Periostrakum und darauf gewachsenen Seepocken. B: Die innere Perlmutt-Schicht mit den charakteristischen Atemlöchern (L). C: Das selbe Tier, noch lebend, auf dem Rücken liegend – zu sehen ist der grüne Rand am Fuß, der für das grüne Seeohr namensgebend war. D: Die lichtmikroskopische Aufnahme eines histologischen Schnittes durch das Mantelepithel von *H. tuberculata* aus [21]: ie = inneres Epithel; oe = äußere Epithel; pg = Periostracle Grube; hl = Hämolymphatische laguna.

1.4 Perlmutt

Perlmutt ist ein biologisches Kompositmaterial biologischen Ursprungs. Es ist sehr regelmäßig aufgebaut und zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität, Biegefestigkeit, Umweltverträglichkeit und Korrosionsresistenz gegenüber Algen, Bakterien und Seewasser aus. Perlmutt entsteht bei normalem Druck und Raumtemperatur.. Während die einzelnen Komponenten des Materials keine besonderen mechanischen Eigenschaften haben, weisen sie im Zusammenspiel des Perlmutts außerordentliche mechanische Eigenschaften auf [25]. Die Bruchfestigkeit von Perlmutt ist (3,3 – 9 MPa), 3 bis 9 mal so hoch wie bei einem monolithischen Aragonit-Kristall (ca. 1 MPa) [26]. Die Schale besteht zu ca. 95 % aus Calciumcarbonat [25] und zu ca. 5 % aus der organischen Matrix. Obwohl die organische Matrix einen geringen Anteil des Perlmutts ausmacht, spielt sie doch eine große Rolle in der Kontrolle der Nukleation, beim Wachstum der Kristalle sowie für die Bruchfestigkeit des Perlmutts [27].

Die Schale von Mollusken setzt sich in der Regel aus drei Schichten zusammen [28]: Das äußere Periostrakum besteht aus gehärteten Proteinen, die innere oder mittlere Schicht aus Calcit und die zum Molluskenkörper gewandte Schicht aus Perlmutt (Abbildung 3). Das Perlmutt besteht aus der $CaCO_3$-Morphe Aragonit und aus der sogenannten organischen

Matrix, die sich aus dem Polysacharid Chitin und Proteinen [29] zusammensetzt. Das Chitin ist, neben dem Mineral, das häufigste Nicht-Protein in der Schale der Mollusken [30-32]. In der Perlmuttschicht von Abalone sind die orthorhombischen Aragonit-Kristalle sehr gleichmäßig angeordnet, sie liegen wie ein Stapel von Münzen aufeinander [33] (Abbildung 3). Sie sind im Durchschnitt 5-10 µm groß und haben eine Höhe von ca. 500 nm [33]. Zwischen diesen orthorhombischen Aragonit-Kristallen befindet sich die organische Matrix [33].

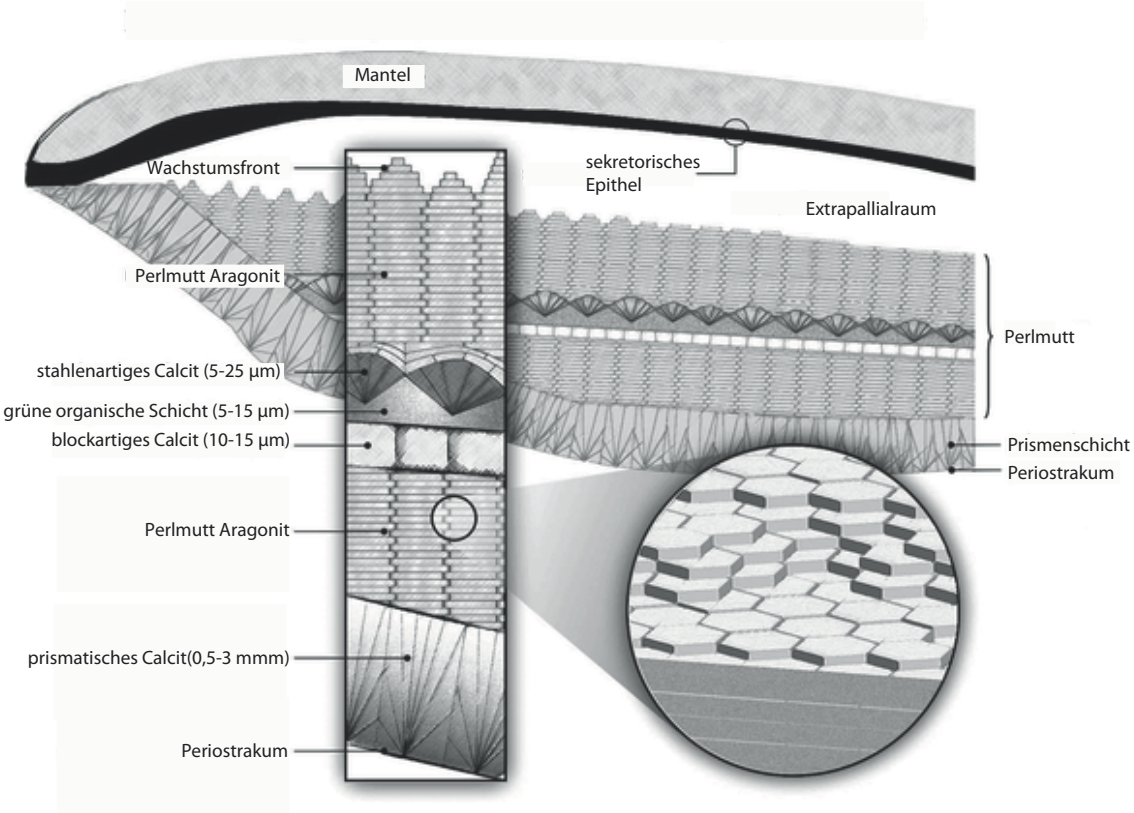


Abbildung 3: Schematische Darstellung des vertikalen Querschnitts durch die Wachstumszone der Schale der roten Abalone *H. rufescens*.
Die Vergrößerung zeigt die einzelnen Zonen der Schale mit der Größendimension, übernommen und verändert aus [34].

Die organische Matrix ist ein Bestandteil des Perlmutts und wird vom Mantelepithel sezerniert. Sie besteht aus Makromolekülen, wie dem Polysaccharid Chitin, Proteinen, Glykoproteinen und Lipiden. Die Matrix enthält eine hohe Konzentration an sauren Aminosäuren wie Asparaginsäure und Asparagin [29, 35-37]. Sie kann in eine lösliche und in eine unlösliche organische Matrix unterteilt werden [9]. Die lösliche organische Matrix, die z.B. durch Auflösen der Schale mittels milder Essigsäure gewonnen wird, besteht aus den wasserlöslichen organischen Bestandteilen der Schale, wie z.B. Proteinen. Die unlösliche

organische Matrix, die z.B. durch Auflösen der Schale mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) gewonnen wird, enthält Chitin, Lipide und Proteine. Durch Röntgenbeugung konnte gezeigt werden, dass die größten Komponenten der organischen Matrix β-Chitin und Seidenfibroin-ähnliche Proteine sind [29]. Das Seidenfibroin-ähnliche Protein liegt wahrscheinlich wie ein Gel innerhalb des Chitingerüstes vor [38].

In vielen Organismen ist die Mineralbildung ein von der organischen Matrix gelenkter Prozess (siehe biologische extrazelluläre Mineralisation). Die Organismen bilden ein organisches Gerüst, in welches die gebrauchten Ionen und Proteine aktiv hineingebracht werden. Der Mineraltyp und die kristallographische Struktur sind genetisch kontrolliert [12]. Wahrscheinlich wird bei der Bildung von Abalone-Perlmutt das wabenartige Chitingerüst, zusammen mit Proteinen und Lipiden, in das amorphes Calciumcarbonat (ACC) integriert. Durch Proteine aus der organischen Matrix wird zunächst das äußere Calcit und anschließend das innere Aragonit gebildet, wobei angenommen wird, dass polyanionische Proteine in diesem Prozess eine große Rolle spielen [12, 28, 39-41].

Wie genau das geordnete Wachstum der Calciumkristalle in oder an der organischen Oberfläche abläuft, ist noch nicht geklärt. Zum Wachstum von Perlmutt gibt es verschiedene Theorien [11, 25], die im Folgendem dargestellt werden (siehe 1.4.1).

1.4.1 Wachstum von Perlmutt

Ionotropisches Modell

Das ionotropische Modell basiert auf dem Auffinden hydrophiler Gruppen und anionischer Sulfatgruppen in der organischen Matrix von Mollusken. An die organischen Matrix bindet sich Calcium, welches ein lokales Anbinden von anionischen Sulfaten und Carbohydraten bewirkt und in der Folge darauf eine Calcium-Bindung induziert wird [42]. Eine hohe Konzentration dieser Vorläufer-Ionen des Calciums führt zu einer lokalen Übersättigung und zur Nukleation von $CaCO_3$ [42].

Epitaxie Modell

In der Biomineralisation bedeutet Heteroepitaxie die Mineralisation an einer organischen Matrix, deren chemische Gruppen so ausgerichtet sind, dass das nukleierende Mineral perfekt hineinpasst [25]. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass das Mineral auf organischer Matrix wächst [43]. Durch Röntgenbeugung zeigte sich, dass ein Protein aus der interlamellaren Schicht in β-Faltblatt vorlag und senkrecht zum β-Chitin steht. Diese räumliche Anordnung passt zu den Achsen eines Aragonit Plättchens [29]. In der löslichen Matrix der Mollusken sind mehrere saure Proteine mit vielen sauren Aminosäuren (Asx)

nachweisbar [35], die sich in ihrer Sequenz wiederholen [36]. Weiner *et al.* [10] nehmen an, dass der Abstand der Carboxylgruppen der sauren Aminosäuren, genau mit dem Abstand der Ca^{2+} -Ionen zueinander, übereinstimmt. Sie folgerten daraus, das sich Ca^{2+} -Ionen zwischen die Carboxylgruppen lagern [10].

Amorphes Calciumcarbonat Modell

In diesem Modell wird angenommen, dass Aragonit aus Perlmutt nicht direkt aus der Lösung kristallisiert, sondern über einen Vorläufer (*precursor*), dem amorphen Calciumcarbonat (ACC) [25], welches zu Aragonit kristallisiert [44]. Dieses amorphe Calciumcarbonat wird von spezialisierten Zellen gebildet und durch Vesikel zum Ort der Mineralisation gebracht. Dort mineralisiert es an der Matrix, in einem mit einem Gel aus Seidenfibroin-ähnlichen Proteinen angefüllten Raum [45]. Bisher konnte amorphes Calciumcarbonat jedoch nicht in Perlmutt direkt, sondern nur bei Larven in der Schale von Schnecken und Muscheln nachgewiesen werden [44, 46].

Dynamische mechanisches, räumliches Modell [47]

In diesem Modell bilden Zellen eine gerichtete und asymmetrische Membran, welche an mehreren Stellen an das schon vorhandene Perlmutt geheftet ist. Kleine saure Proteine diffundieren in beide Richtungen durch die Chitinmembran und dienen als Transportmoleküle von Ca^{2+} und H^{+}-Ionen, um den elektrochemischen Gradienten aufrecht zu erhalten [47]. Die Nukleation von Aragonit durch Pif97 / Pif80-Komplexe [48] an einer bestimmten Seite wird als Funktion der CO_2-Diffusion [47] beschrieben. Die kristallografischen Achsen von Aragonit sind ausgerichtet am β-Chitin (a-Achse) und an der Sekundärstruktur des Seidenfibroin-ähnlichen Proteins (b-Achse) [29], der Pif97 / Pif80-Komplex könnte als c-Achse und so als dreidimensionale Nukleationsseite dienen [47].

1.5 Biomineralisierende Proteine

Es wurden zahlreiche Proteine aus der Calcit- und Perlmuttschicht der Schalen verschiedener Spezies der Mollusken isoliert und sequenziert [7, 48-67]. Ein Charakteristikum, das in vielen biomineralisierenden Proteinen der Mollusken gefunden wurde, ist ihre modulare Organisation, wobei jedes Modul einer funktionellen Domäne entspricht, so dass viele dieser Proteine multifunktional sind [23]. Viele dieser Domänen bestehen aus hintereinander geschalteten *Repeats*, die sehr kurz sein können, aber dennoch durch die Dominanz einzelner sich wiederholender Aminosäuren, die Gesamtaminosäure-Komposition beeinflussen [23].

Die genaue Funktion, die die Proteine in der Mineralisation von Perlmutt haben, ist bisher

nicht geklärt [68]. Einige dieser Proteine spielen eine Rolle in der Bildung und Stabilität von Aragonit-Kristallen [68-71], andere beschleunigen in *in-vitro* Versuchen die Kristallisation von $CaCO_3$, wie z.B. Perlucin [1, 2, 72], andere inhibieren *in-vitro* das Wachstum von $CaCO_3$-Kristallen [1, 2, 72-74]. Die bisher bekannten Perlmuttproteine lassen sich in drei Gruppen einteilen [68]. Eine Gruppe beinhaltet Proteine, die mit dem β-Chitin assoziiert sind und aus der unlöslichen organischen Matrix extrahiert werden, wie z.B. Pif [48] oder AP7 [75]. Eine weitere Gruppe sind die intrakristallinen Proteine, die aus der löslichen organischen Matrix extrahiert werden, wie z.B. Perlucin und Perlustrin [2] und eine Gruppe von Proteinen, die mit der Formation und der Ablagerung von Perlmutt assoziiert werden [54, 68].
Mehrere der Proteine, die mit Aragonit assoziiert sind, haben einen pI (Isoelektrischer Punkt) von 4,5 bis 7,5, mit Ausnahme der Proteine Perlustrin, Perlwapin und Lustrin A [23].
In einer Studie zeigte Evans [68], dass alle untersuchten Perlmuttproteine eine oder mehrere Regionen haben, die intrinsisch unstrukturiert (*intrinsically disordered*) sind, und viele zur Aggregation neigende Regionen haben. Intrinsisch unstrukturierte Proteine oder Protein-Regionen sind unorganisiert ohne eine definierte 3-dimensionale Struktur [76, 77]. Es wird vermutet, dass das Vorhandensein und das Ausmaß der intrinsischen unstrukturierten Regionen der Perlmuttproteine im Zusammenhang steht mit ihrer Funktion und mit der Anzahl und der Natur ihrer Interaktionspartner in der organischen Matrix [68].

1.5.1 Perlmuttproteine

Pif (*Pinctada fucata)*

Pif sind zwei Proteine aus der Perlmuttschicht der japanischen Auster *P. fucata*. Die cDNA codiert für ein 1007 Aminosäure langes Protein, welches posttranslational in zwei Proteine, dem N-terminalen 97 kDa großen Pif 97 und dem C-terminalen Pif 80, gespalten wird [48].
Pif 97 hat ein Von-Willebrand-Faktor Typ A, eine Chitin-Bindungsdomäne sowie eine hohe Anzahl an sauren Aminosäuren [48]. Pif 80 hat ein sich 17 mal wiederholendes vier Aminosäure langes Peptid, welches durch die hohe Anzahl an Asparagin eventuell an Aragonit bindet [48]. Es wird postuliert, dass Pif 97 wahrscheinlich an Chitin bindet und mit anderen Proteinen größere Aggregate bildet [48]. Pif 80 bewirkt eine Konzentration von Calciumcarbonat, induziert das Kristallwachstum und die Kristallorientierung [48].

Perlustrin (*H. laevigata*)

Perlustrin wurde aus der löslichen Matrix des Perlmutts von *H. laevigata* isoliert [2]. Es ist ein 84 Aminosäure langes Protein und hat eine Masse von ca. 14 kDa. Perlustrin hat Sequenzähnlichkeit mit dem *Insulin-like-growth-factor-binding*-Protein, an welches es auch

binden kann [78]; es zeigt aber keinen Einfluss auf $CaCO_3$ [25].

Perlwapin (*H. laevigata*)

Perlwapin wurde aus der Schale von *H. laevigata* isoliert [74]. Es besteht aus 134 Aminosäuren. Perlwapin hat drei WAP-Domänen (*Whey acidic protein-type-four domain*), mit acht Cysteinen, die in einem bestimmten Muster voneinander entfernt stehen und durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Zur *Whey acidic protein-type-four* Proteinen gehören auch Proteaseinhibitoren. Perlwapin zeigt eine inhibierende Wirkung auf das $CaCO_3$-Wachstum [74].

Perlinhibin (*H. laevigata*)

Perlinhibin ist ein kleines Protein aus der Schale von *H. laevigata*. Es hat eine Masse von ca. 4,7 kDa und eine Länge von 41 Aminosäuren. Es besteht zu fast 20 % aus Cystein, zu 17 % aus Histidin und zu fast 15 % aus Arginin. Perlinhibin zeigt eine inhibierende Wirkung auf das Kristallwachstum von Calcit, indem es sich an die Wachstumskanten des Kristalls legt [73].

Lustrin A (*H. rufescens*)

Das größte Protein, das bisher aus der Perlmuttschicht von *Haliotis spec*. isoliert wurde, ist Lustrin A. Die für das Protein codierende DNA hat 4439 Basenpaare und kodiert für ein 1,428 Aminosäure langes Protein [79]. Das native Protein, nach posttranslationaler Modifikation, hat eine Masse von 65 kDa und eine sich wiederholende Aminosäuresequenz, die cysteinreich ist und sich achtmal wiederholt [79]. Es wird vermutet das Lustrin A eine Komponente eines Klebstoffes zwischen den Aragonit-Plättchen ist [80].

AP7 (*H. rufescens*)

AP7 ist ein Protein aus der unlöslichen Matrix und wurde mit EDTA aus der Perlmuttschicht der Schale von *H. rufescens* gelöst. Das Protein ist 66 Aminosäuren lang und hat eine Masse von ca. 10 kDa. AP7 hat im Wechsel hydrophile und hydrophobe Aminosäureabschnitte mit einer Länge von 10 Aminosäuren [75]. Die am N-Terminus befindliche 30 Aminosäuren lange Domäne hat eine *random-coil-like*-Struktur und die Fähigkeit die Kristallisation von $CaCO_3$ zu hemmen [81, 82]. Die am C-Terminus befindliche 36 Aminosäuren lange Domäne ist eine intrinsisch unstrukturierte Region und kann mit amorphen $CaCO_3$ und Aragonit-Kristallen Aggregate bilden [83, 84].

AP8 α, β (*H. rufescens*)

AP8α, mit 8,7 kDa, und AP8β, mit 7,7 kDa, sind extrem saure Proteine aus der Perlmuttschicht von *H. rufescens*. Das Wachsen von abgerundeten $CaCO_3$-Kristallen in Anwesenheit von AP8 führte zu der Annahme, dass beide Proteine spezielle Stellen am

Kristall bevorzugen [85].

AP24 (*H. rufescens*)

AP24 wurde aus der unlöslichen Matrix des Perlmutts von *H. rufescens* isoliert. Es ist ein 171 Aminosäure langes Protein und hat eine Masse von ca. 20 kDa [75] sowie zwei potentielle Zuckerbindungsstellen. AP24 legt sich genau wie AP8 an die Enden der Wachstumsfronten von $CaCO_3$ und hemmt das weitere Wachstum des Kristalls. Es wird vermutet, dass die N-terminale Sequenz von AP24 eine *random-coil-like*-Struktur hat [82].

Perlucin (*H. laevigata*)

Das biomineralisierende Protein Perlucin wurde aus der Perlmuttschicht der Schale der australischen Meeresschnecke *H. laevigata* aufgereinigt [2] und durch Edman-Abbau und MALDI-MS sequenziert [3]. Es ist ein 155 Aminosäure langes Protein, welches am N-Terminus eine C-Typ Lektin Domäne mit einer Länge von 135 Aminosäuren besitzt. Gefolgt von einer 10 Aminosäuren langer Sequenz, die sich zweimal am C-Terminus wiederholt (*Repeat*). Bei der Aminosäuresequenzierung durch Edman-Abbau konnten an 12 Positionen alternative Aminosäuren gefunden werden [3]. In der SDS-PAGE zeigte das native Protein ein sehr heterogenes Bild mit Banden bei 15 und 17 kDa [2] sowie bei 17, 20 und 26 kDa [1]. MALDI-MS Daten zeigten bei Perlucin eine Massenverteilung von 17 bis 21 kDa, welche auch mit dem Banden in der SDS-PAGE des aufgereinigten Proteins aus der Perlmuttschicht von *H. laevigata* korrelierten [2]. Außerdem wiesen die Masseverteilungen in der MALDI-MS darauf hin, dass es neben dem 155 Aminosäuren langen Protein noch weitere Varianten geben könnte, wie z.B. eine Variante des Proteins ohne diese *Repeat*-Region, eine Variante mit nur einem *Repeat* oder eine Variante mit mehreren dieser *Repeats* [3].

Die C-Typ Lektin Domäne enthält die sechs hoch konservativen Cysteine, die potentiell Disulfidbrücken ausbilden können. In Versuchen mit (Neo-) Glykoproteinen konnte gezeigt werden, dass Perlucin in einem Bereich von pH 5,5 bis pH 7 D-Galactose und D-Mannose binden kann [3]. Dabei ist unklar, ob beide Zucker entweder in derselben oder an überlappende Bindungsstellen binden [3].

In Calcium-Präzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass natives Perlucin, aufgereinigt aus der Perlmuttschicht von *H. laevigata*, die Präzipitation von $CaCO_3$ beschleunigt [2]. Durch AFM (*Atomic Force Microscope*) Experimente konnte dies direkt an einer $CaCO_3$-Oberfläche bestätigt werden [1]. Zudem wurde gezeigt, dass Perlucin in einer übersättigten $CaCO_3$-Lösung, in die sich bildenden $CaCO_3$-Kristalle einbaut und es durch milde Essigsäure wieder heraus gelöst werden kann, wobei es weiterhin funktionsfähig bleibt [1]. Gezeigt haben dieses auch Weber *et al.* [86], die Perlucin fusioniert mit GFP innerhalb

von $CaCO_3$-Kristallen durch Fluoreszenz sichtbar machen konnten. Wang *et al.* [72] konnten aus der cDNA der asiatischen Meeresschnecke *Haliotis discus discus* die cDNA für ein 151 Aminosäure langes Perlucin (mit Signalpeptid) isolieren und fusioniert mit MBP überexprimieren. Das Perlucin von *H. discus discus* hat eine C-Typ Lektin Domäne mit den konservierten Cysteinen [72]. Auch rekombinantes Perlucin von *H. discus discus* zeigt eine beschleunigende Wirkung auf die Präzipitation von $CaCO_3$ [72]. Verschiedene Experimente zeigten eine beschleunigende Wirkung von Perlucin auf die $CaCO_3$-Präzipitation [1, 2, 72], zudem gibt es Hinweise darauf, dass Perlucin an Aragonit bindet [87].
Die codierende DNA-Sequenz des Proteins von *H. laevigata* war bisher nicht bekannt, jedoch wurde ein synthetisches Gen von Perlucin erstellt und dafür ein Patent angemeldet [88].

1.6 C-Typ Lektine

C-typ Lektine gehören zu der Gruppe der Lektine. Lektine sind häufig komplexe, Multidomänen-Proteine, deren zuckerbindende Fähigkeit meist auf eine Proteindomäne zurückgeführt werden kann [89]. Diese Domäne wird als *Carbohydrate recognition domain*, kurz CRD beschrieben. Die CRDs von Lektinen tierischen Ursprungs können in viele Proteingruppen eingeteilt werden, wie z.B. Calnexin, L-Typ, P-Typ, Galektine, I-Typ, R-Typ und C-Typ Lektine [90].
C-Typ Lektine sind Proteine die Ca^{2+} -abhängig Glykane binden können und die eine ähnliche primäre und sekundäre Proteinfaltung ihrer Zuckerbindungsdomäne CRD (*Carbohydrate recognition domain*) besitzen. Diese C-Typ Lektin Faltung ist eine Struktur mit sehr variablen Proteinsequenzen. Diese Faltung findet sich auch bei Proteinen, die keine Zucker binden (C-Type Lektin Domäne (CTLD) enthaltende Proteine) [91]. C-Typ Lektine und Proteine mit CTLD sind Transmembran-Proteine oder extrazelluläre Proteine und sind in allen Organismen zu finden [91]. Die CTLD hat verschiedene Funktionen im strukturellen und funktionellen Kontext wie z.B. Adhäsion, Endozytose und Neutralisation von Pathogenen durch das Immunsystem [92]. Zu dieser großen Gruppe gehören Collektine, Selektine, endozytotische Rezeptoren und Proteoglykane [91]. Sie bilden häufig Oligomere, was ihre Affinität zu multivalenten Liganden erhöht [91]. Viele C-Typ Lektine bilden Trimere [91], wie z.B. das Mannose-Binding Protein A der Ratte (MBP-A) [93]. Bei C-Typ Lektinen, die Trimere bilden, ist die CRD zur der Seite von der Stamm-Region angewinkelt, über die das Trimer gebildet wird [91].
Die CTLD besteht aus einer charakteristischen Doppelschleife (*double loop*) und weist hydrophobe und polare Regionen auf [94]. Die Schleifen werden durch konservierte

Disulfidbrücken stabilisiert [94]. Die Cysteine der Disulfidbrücken befinden sich an der Basis der Schleifen. Die erste Schleife hat am N-Terminus und am C-Terminus ß-Stränge, die so nahe nebeneinander liegen, dass sie antiparallel zueinander verlaufen (ß1+ß5). Die zweite Schleife (*long loop*) liegt darin und ist für die Ca^{2+}-abhängige Zuckerbindung und für das Domänenswapping und die Dimerisierung verantwortlich [94]. Einige Proteine benutzen ihre CTLD Faltung um andere Proteine, Lipide, anorganische Moleküle (z.B. $CaCO_3$) oder Eis (z.B. *Antifreeze* Proteine) zu binden [91].

Die C-Typ Lektine werden in 17 Gruppen (I bis XVII) eingeteilt [90, 95, 96]. Die Gruppeneinteilung erfolgt anhand von phylogenetischen Beziehungen oder nach der Domänenstruktur [91].

1.7 Problemstellung und Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollen die molekularen Details der Protein / Mineral Wechselwirkung während der Biomineralisation untersucht werden. Es wird das Perlmutt-Protein Perlucin der australischen Abalone *Haliotis laevigata* untersucht, um einen detaillierteren Einblick in die Rolle dieses Proteins während der Biomineralisation von Perlmutt zu erhalten.

Obwohl das Protein seit fast 15 Jahren bekannt ist, ist die genaue Funktion bisher nicht bekannt. Es wurde zwar ein synthetisches Gen erststellt [88], aber die genaue DNA-Sequenz, die für das Protein kodiert, ist bisher nicht bekannt. Das heterogene Erscheinungsbild in der SDS-PAGE [1, 2] könnte durch verschiedene Isoformen des Proteins hervorgerufen werden. Diese Isoformen können durch verschiedene Gene oder posttransskriptional durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen. Alternatives Spleißen ist ein grundlegender Mechanismus der Genregulation um die Vielfalt und Funktionen von Proteinen zu erhöhen. Eine andere Möglichkeit diese Heterogenität zu erklären sind posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Abspaltungen am N- oder C-Terminus des Proteins, Spaltung eines größeren Proteins zu mehreren kleineren Proteinen, Phosphorylierung oder Glykosylierung. Außerdem könnten die zwölf alternativen Aminosäuren in der Sequenz von Perlucin auf verschiedene Allele hinweisen.

Daher erscheint es sinnvoll zu sein zunächst die Sequenz der mRNA für Perlucin zu ermitteln um die Ursache der beschrieben Isoformen zu eruieren.

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst RNA aus dem Mantelepithel von *H. laevigata* zu isolieren und daraus cDNA zu synthetisieren. Mit degenerierten *Primern*, die auf Basis der bekannten Aminosäuresequenz von Mann *et al.* [3] entwickelt werden, wird die cDNA für Perlucin amplifiziert.

Um Rückschlüsse auf die Funktion von Perlucin ziehen zu können, werden Säugetierzellen und Bakterien mit Plasmid-Perlucin-DNA transfiziert und rekombinantes Perlucin aus Säugetier und Bakterien zu erhalten. Die Funktionalität des rekombinanten Perlucins, wird durch ein $CaCO_3$-Präzipitationsexperiment überprüft.

Phylogenetische Analysen bieten die Möglichkeit, durch die phylogenetische Einordnung auf die Funktion der Proteine zu schließen und Rückschlüsse auf die Art und Wiese wie das System der Biomineralisation geformt wurde, zu ziehen [23]. Durch die phylogenetische Einordnung von Perlucin in eine Gruppe der C-Typ Lektine könnte auf die Struktur und Funktion geschlossen werden. In den Gendatenbanken sind viele Proteine als Perlucine oder Perlucin-ähnliche Proteine benannt. Ob es sich bei diesen Proteinen um potentielle Orthologe von Perlucin oder C-Typ Lektine handelt, soll durch phylogenetische Analysen geprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendetes Tiermaterial

In dieser Arbeit wurde eine australische Meeresschnecke der Art *Haliotis laevigata*, Donovan (1808) [97] verwendet. Sie wurde freundlicherweise von der Abalone Farm Great Southern Waters (Great Southern Waters Pty Ltd., The Esp Indented Head, Victoria, Australien) zur Verfügung gestellt. Außerdem wurde eine Meeresschnecke der Art *Haliotis varia*, Linnaeus (1758) [98] verwendet, die bei 25 ° C im Aquarium gehalten wurde.
Die Schnecken wurden solange mit Eis gekühlt bis sie tot waren. Das Mantelepithel wurde heraus präpariert und entweder sofort in flüssigen Stickstoff oder in RNAlater (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) zur späteren RNA-Isolation überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2 Kits

SV total RNA Isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA)
RevertAid H Minus First strand cDNA synthesis Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
TRI Reagent® RNA Isolation Reagent (Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, USA)
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific)
GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific)
GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific)
CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific)
NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande)
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific)
ECL advanced Western blotting detection Kit (Amersham, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Großbritannien)
Pierce ECL Western blotting substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific)

2.3 Lösungen und Medien

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
13,37 g DMEM
3,7 g $NaHCO_3$
auf 1 Liter auffüllen mit dd H_2O

α-MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification)
10,2 g α-MEM
auf 1 Liter auffüllen mit dd H_2O

LB Medium (Lurea Broth)
15 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
auf 1 Liter auffüllen mit dd H_2O

LB Ampicillin Agar
15 g Agar
1 Liter LB Medium
50 µg/ml Ampicillin

LB Kanamycin Agar
15 g Agar
1 Liter LB Medium
25 µg/ml Kanamycin

SOC Medium (Super Optimal broth with Catabolite repression)
20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
2,5 ml KCl (1M)
auf 1 Liter auffüllen mit dd H_2O

Agarose Gelelektrophorese Ladungspuffer (6X)
0,09 % Bromophenolblau
60 % Glycerol
60 mM EDTA

SDS-PAGE Gelelektrophorese Laufpuffer (10X)
30,3 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS
auf 1 Liter auffüllen mit dd H_2O

SDS-PAGE Sammelgelpuffer
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
0,4 % SDS in dd H_2O

SDS-PAGE Trenngelpuffer
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,4 % SDS in dd H_2O

SDS-PAGE Probenpuffer (2x)
0,125 M Tris/HCl, pH 6,8
4 % SDS
20 % Glycerol (v/v)
0,02 % Bromphenolblau

TAE Puffer (10x) (Agarose Gelelektrophoreselaufpuffer)
0,4 M Tris Acetat
10 mM EDTA, pH 8,3

TBS (Tris gepufferte Saline)
10 mM Tris/HCl, pH 7,4
150 mM NaCl

TBS-T
10 mM Tris/HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
0,15 % (w/v) Tween 20™

PBS (Phosphat gepufferte Saline)
137 mM NaCl
2,7 mM Na_2HPO_4
1,5 mM K_2HPO_4

Citratpuffer
20 mM Na-Citrat
20 mM Citronensäure, pH 4,8

TNE Lysepuffer (NP-40 Lysepuffer)
20 mM Tris
150 mM NaCl
5 mM EDTA
1 % NP-40
pH 7.4

Trypsin/EDTA
0,5 g Trypsin
0,2 g EDTA
1 Liter steriles 1x PBS

Western Blot Puffer
25 mM Tris/HCl
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol

4 % PFA
4 g Paraformaldehyd in 50 ml dd H_2O bei 65 °C, 5 bis 10 µl 10 N NaOH dazugeben, bis es gelöst ist.
10 ml 10x PBS
mit dd H_2O auf 100 ml auffüllen

20mM $NaHCO_3$
20 mM $NaHCO_3$
500 mM NaCl, p H8

20mM $CaCl_2$
20 mM $CaCl_2$ *2 H_2O
500 mM NaCl, pH 8

Lösung A (Silberfärbung)
30 % Ethanol (30 ml)
0,5 M Natriumacetat * 3 H_2O (6,8 g)
0,2 % $Na_2S_2O_3$ (0,2 g)
auf 100 ml auffüllen

0,5 % Glutaraldehyd (Silberfärbung)
2 ml 25 % Glutaraldehyd zu 98 ml dd H_2O

Lösung B (Silberfärbung)
0,1 % $AGNO_3$ (100 mg)
0,02 % Formaldehyd (54 µl 37 % Formaldehyd)

Lösung C (Silberfärbung)
2,5 % Na_2CO_3 (2,5 g Na_2CO_3)
auf 100 ml
pH 11,3 – 11,8

0,01 % Formaldehyd (Silberfärbung)
27 µl 37 % Formaldehyd zu 100ml dd H_2O
Lösung D

0,05 M EDTA (Silberfärbung)
1,68 g Na_2EDTA, pH 8

Puffer (Proteinaufreinigung)
100 mM Tris/HCl
500 mM NaCl, pH 8

Ni-NTA Waschpuffer
100 mM Tris/HCl
20 mM Imidazol
500 mM NaCl, pH 8

Ni-NTA Elutionspuffer
100 mM Tris/HCl
250 mM Imidazol
500 mM NaCl, pH 8

StrepTactin Elutionspuffer
100 mM Tris/HCl,
500 mM NaCl,
1 mM EDTA,
2.5 mM Desthiobiotin, pH 8

2.4 Eukaryontische Zelllinien

COS-7 Zellen (*Cercopithecus aethiops,* Grüne Meerkatze, Nieren-Fibroblasten Zellen) (DSMZ, Braunschweig, Germany) in DMEM mit 10 %igem hitzeinaktiviertem FCS (Fetales Kälber Serum) (DSMZ, Heidelberg)

CHO LecI (Chinesischer Hamster, Ovarien Zellen, Glycosylierungs-Mutante) in α–MEM mit 5 %igem hitzeinaktivierten FCS (DSMZ, Heidelberg) bzw. in Ex-Cell CD CHO (Sigma/Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.5 Bakterienstämme

Zur Klonierung wurden verschiedene Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* genutzt.

Xl1Blue, Plasmidpräparation, (StrataGene, Santa Clara, USA)

DH5α, Plasmidpräparation, zur Verfügung gestellt von Dr. Kipp, Ruhr-Universität, Bochum

BL21 (DE3), bakterielle Expression, (Novagen, Merck Darmstadt)

Rosetta (DE3) placI , bakterielle Expression, (Novagen, Merck Darmstadt)

2.6 Vektoren

Vektor	Restriktions-schnittstelle	Anwendung	Zielorganismus
pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	TA-Überhang	Klonierung, Sequenzierung	Xl1blue
pJET1.2 (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	blunt	Klonierung, Sequenzierung	Xl1blue
pcDNA3-Strep [99] (Invitrogen)	(*BamHI/EcoRI*)	Transiente eukar. Expression	DH5α COS-7
pDEF-Strep [100]	*(XbaI/SmaI)*	Stabile eukar. Expression	DH5α CHO LecI
pDEF-SNAP-Strep [100]	*(XbaI /BamHI)*	Stabile eukaryontische Expression	DH5α CHO LecI
pET28a(+) (Novagen, Merck, Darmstadt)	(*NcoI/EcoRI*)	Bakterielle Expression	BL21 (DE3)
pETM41 (EMBL)	(*NcoI/NotI*)	Bakterielle Expression	Rosetta (DE3) placI
pET28b(+) (Novagen)	(*NcoI/EcoRI*)	Bakterielle Expression	BL21 (DE3)

Tabelle 1: Tabelle der in dieser Arbeit genutzten Vektoren, ihre Anwendung und die Zielorganismen.

2.7 Antikörper

Polyklonaler affinitätsgereinigter Schaf anti-Strep-Tag (Dr. Frank Dietz, Universität Bremen, Deutschland) 0,4 mg Stock Lösung, 1:1000, in der Immunfluoreszenz und im Westernblot.
Peroxidase-konjugierter (POD), affinitätsgereinigter Esel anti-Schaf vom Esel IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, Deutschland) 0,45 mg/ml, 1:20.000 im Westernblot.
Cy3-konjugierter, affinitätsgereinigter Esel anti-Schaf IgG (H+L), (Dianova, Hamburg, Deutschland) 0,75 mg/ml, 1:500, in der Immunfluoreszenz.

2.8 Isolierung von Gesamt-RNA

Das in flüssigen Stickstoff gefrorene Mantelepithel wurde im Mörser zerkleinert und anschließend mit Hilfe des SV total RNA Isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA), den Angaben des Herstellers folgend, die Gesamt-RNA isoliert.
Das Mantelepithel in RNAlater (Sigma Aldrich) wurde zur weiteren Verwendung in PeqGold-TriFast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) überführt und die Gesamt-RNA nach der Thiocyanat-Phenol-Chloroform Methode nach Chomczynski und Sacchi [101] isoliert. PeqGOLD-TriFast enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Das Mantelepithel in PeqGOLD-TriFast wurde mit einem Ultra-Turrax (S25_N-8G 0,3-3 ml, IKA®-Werke, Staufen, Deutschland) jeweils 1 Minute zerkleinert, um das Eindringen von TriFast in das ganze Gewebe zu gewährleisten.
Das zerkleinerte homogenisierte Mantelepithel wurde in vier Aliquots von jeweils 1 ml aufgeteilt und drei weitere Aliquots bei -20 °C gelagert und ein Aliquot mit 200 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zentrifugation bei 12.000 x g für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) führte zu einer Trennung des Homogenats in drei Phasen. Die RNA ist in der oberen wässrigen Phase enthalten, die DNA in der organischen und der Interphase. Die Proteine befinden sich in der organischen, unteren Phase. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt, für 10 Minuten inkubiert und im Anschluss zur Präzipitation der RNA bei 12.000 x g für 10 Minuten 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wurde zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen und in RNAse und DNAse-freiem Wasser gelöst. Die Quantität und Reinheit der RNA wurde mit dem Nanodrop Spektralphotometer (ND1000, Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

2.9 Aufreinigung von Plasmid DNA aus E. coli Kulturen

5ml LB Bakterien-Übernachtkulturen wurden bei 6800 x g in einer Eppendorf-Zentrifuge (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Bakterienpellet wurde mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) aufgereinigt. Dazu wurde das Bakterienpellet zunächst in 250 µl Resuspensionslösung aufgenommen und gemischt. Nach der Zugabe von 250 µl Lysispuffer wurde das Probengefäß mit der Suspension vier bis sechsmal invertiert, danach 350 µl Neutralisationspuffer dazugegeben, wieder vier bis sechsmal invertiert und für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf das im Kit enthaltende Zentrifugationsröhrchen übertragen und für eine Minute zentrifugiert. Die Membran des Zentrifugationsröhrchens wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und die aufgereinigten Plasmide mit 50 µl Elutionspuffer in einem frischen 1,5 ml Probengefäß eluiert. Die Quantität und Reinheit wurde mit dem Nanodrop Spektralphotometer ND1000 (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

Zur DNA-Präparation mit dem Nucleobond Xtra Plus Midiprep Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wurden ca. 200 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum der Wahl mit Plasmid enthaltenden Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Bakterienschüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation der Kultur (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) für 15 Minuten bei 4 °C und 6000 rpm wurde die DNA aus dem resultierendem Bakterienpellet aufgereinigt. Die Bakterienzellen wurden in 8 ml Resuspensionspuffer (RES) aufgenommen und anschließend mit 8 ml Lysepuffer (LYS) lysiert und anschließend bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Vor dem Auftrag auf die Filter-Säule wurden 8 ml Neutralisationslösung (NEU) dazugegeben und die Suspension invertiert. Der Filter wurde mit 5 ml Äquibrilierungsspuffer (EQU) gewaschen, anschließend der Filter verworfen. Nach Waschen der Membran mit 8 ml Waschpuffer (WASH) wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml Elutionspuffer (ELU) eluiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und auf die im Kit enthaltende Filtermembran geladen und mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 800 bis 1000 µl Tris (TRIS) aufgenommen und die Quantität und Reinheit am Nandrop Spektralphotometer (ND1000, Peqlab, Erlangen) bestimmt.

2.10 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) nach den Angaben des Herstellers.
Es wurde das gleiche Volumen an Bindungspuffer zum PCR-Ansatz pipettiert und auf die im Kit enthaltende Zentrifugationssäule gegeben und für eine Minute in einer Tischzentrifuge bei 12.000 x g zentrifugiert. Im Falle der Aufreinigung aus dem Agarosegel wurde die DNA-Bande ausgeschnitten, gewogen und das gleiche Volumen an Bindungspuffer dazu gegeben und die Agarose bei 50 °C für 10 Minuten aufgelöst, auf die im Kit enthaltende Zentrifugationssäule gegeben und für 1 Minute bei 12.000 x g zentrifugiert.
Zum Waschen der PCR-DNA wurden 700 µl Waschpuffer dazugegeben und für eine Minute bei 12.000 x g zentrifugiert. Die PCR-DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer eluiert und die Quantität und Reinheit am Nandrop Spektralphotometer (ND1000, Peqlab, Erlangen) bestimmt.

2.11 Restriktionsverdau

Es wurden Enzyme der Firma Fermentas (Thermo Fisher Scientific) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Restriktionsnukleasen wurden dazu verwendet, um Plasmide und PCR-Produkte an definierten Stellen zu schneiden. Es wurden konventionelle Restriktionsenzyme oder *FastDigest* Enzyme genutzt, an dessen Verdau sich ein DNA-Aufreinigung mittels des PCR-Purifikation Kit anschließt. Jedes Restriktionsenzym benötigt den passenden Puffer der 10-fach konzentriert vorhanden war.
Jeder Restriktionsverdauansatz wurde wie folgend pipettiert:

1 µg DNA
1-2 Einheiten des Enzyms
das entsprechende Volumen des 10-fachen Puffers
mit dd H_20 auf das gewünschte Volumen auffüllen

Der Ansatz wurde für mindestens 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen des Restriktionsverdaus wurde der Ansatz bei 70 °C für 10 Minuten erhitzt.

2.12 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden DNA-Bruchstücke nach der Größe aufgetrennt.
Für 1 %ige Agarosegele wurden 2,5 g Agarose (Biozym, Oldendorf, Deutschland) in 250 ml TAE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden

0,1 µg/ml Ethidiumbromid dazu gegeben und die Agarose in eine Kammer gegossen, die die für die Probentaschen entsprechenden Kämme enthielt. Für analytische Gele wurden Taschen mit 12 µl Fassungsvermögen, für präparative Gele wurden Taschen mit 120 µl Fassungsvermögen verwendet.
Die DNA wurde mit dem entsprechenden Volumen des 6-fach konzentrierten Ladungspuffers (MassRuler^{TM} DNA Loading Dye, Fermentas) versetzt und mit einem Größenstandard (MassRuler^{TM} DNA Ladder Mix, Fermentas) in die Taschen des Gels aufgetragen und bei 100 Volt für ca. 45 Minuten elektrophoretisch getrennt.
Das Ethidiumbromid interagiert mit der DNA und fluoresziert unter UV-Licht, so dass die DNA sichtbar gemacht und fotografiert werden kann.

2.13 Ligation

Aufgereinigte PCR-Produkte wurden mit Hilfe der T4-Ligase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) in den Vektor der Wahl ligiert. Dazu wurden 20 ng Vektor der Wahl, 5-facher molarer Überschuss an Insertions-DNA, 2 Einheiten der T4-Ligase und der entsprechende Puffer auf einen 20 µl Ansatz pipettiert. Der Ligationsansatz wurde gut durchmischt und bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten inkubiert.

2.14 Transformation in Bakterien

Chemisch kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* wurden auf Eis angetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt. Die Bakterien mit dem Ligationsansatz wurden für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Zur Öffnung der Bakterienmembran wurde der Ansatz genau für 90 Sekunden bei 37 °C einem „Hitzeschock“ unterzogen und vier Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde zu den Bakterien SOC-Anzucht Medium gegeben, 45 Minuten bei 37 °C geschüttelt und auf vorgewärmte LB Platten mit dem Antibiotikum der Wahl ausplattiert. Plasmid enthaltende Klone wachsen über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.15 PCR Techniken

Die Polymerase Kettenreaktion zur spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen wurden im Mastercycler oder im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf durchgeführt. Die Taq-Polymerase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) und Pfu-Polymerase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) wurden zur Klonierung, die GoTaq-DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) wurde zur ersten Amplifizierung der Perlucin cDNA nach den Angaben der

Hersteller verwendet.

Für einen PCR-Reaktionsansatz mit der Taq-Polymerase wurde folgendes auf Eis pipettiert:

1 µl Matrizen DNA (1-10 ng) oder eine gepickte Bakterienkolonie
5 µl 10-fach Taq-Puffer ohne MgCl
3 µl MgCl (25 M)
1 µl dNTP's (10 mM je ATP, GTP, CTP, TTP)
1 µl *sense Primer*
1 µl *antisense Primer*
1 µl Taq-Polymerase (5 Einheiten/µl)
mit dd H_2O auf 50 µl auffüllen

Für eine PCR mit der GoTaq Polymerase (Promega) wurde folgendes auf Eis pipettiert:

1 µl Matrizen DNA (1-10 ng)
21 µl dd H_2O
25 µl GoTaq *Green* Master Mix (mit Polymerase, dNTP's je 400 µm, 3 mM MgCl)
1 µl *sense Primer*
1 µl *antisense Primer*
1 µl DMSO

Die Pfu-Polymerase hat durch die 3'-5' Exonuklease-Aktivität eine Fehlerlese-Funktion und wurde deshalb zu Amplifikation von DNA verwendet, wenn diese in die Plasmide, die zur Exprimierung von rekombinanten Protein in Bakterien oder eukaryontischen Zellen genutzt wurden, ligiert werden sollte.

Für einen PCR-Reaktionsansatz mit der Pfu-Polymerase (Fermentas) wurde folgendes auf Eis pipettiert:

1 ng Matrizen-DNA
1 µl *sense Primer*
1 µl *antisense Primer*
1 µl dNTP's (10mM)
5 µl Reaktionspuffer mit $MgSO_4$ (10-fach konzentriert)
0,5 µl Pfu-Polymerase (2,5 Einheiten/µl)
mit dd H_2O auf 50 µl auffüllen

Das Programm wurde der jeweiligen Methode und der Schmelztemperatur (Tm) der jeweiligen *Primer* (siehe Tabelle 2) angepasst.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen in einen Thermocycler der Firma Eppendorf durchgeführt.

3 bis 5 Minuten bei 95 °C	(Initiale Denaturierung)
29 bis 35 Zyklen	
30 Sekunden bei 95 °C	(Denaturierung)
0,5 bis 1 Minute bei 50 °C bis 65 °C	(Annealing, *Primer* Anbindung)
1 Minute bei 72 °C (Taq & GoTaq)	(Polymerisation, Strangverlängerung)
2 Minuten bei 72 °C (Pfu)	
3 bis 7 Minute bei 72 °C	(Finale Verlängerung)
Kühlen bei 4 °C	

2.15.1 Nested-PCR

Die Nested-PCR ist eine verschachtelte PCR, die genutzt werden kann, wenn die zu amplifizierende DNA nur in sehr geringer Menge vorhanden ist. Es werden zwei PCR-Reaktionen hintereinander ausgeführt. Das erste PCR-Amplifikat wird verdünnt und als DNA-Matrize für die zweite PCR-Reaktion genutzt. In der ersten PCR werden zwei äußere *Primer* genutzt, um das gewünschte Amplifikat spezifisch zu amplifizieren. In der zweiten PCR werden *Primer* genutzt, die innerhalb der äußeren *Primer downstream* binden, so dass die amplifizierte DNA sehr spezifisch und großen Mengen amplifiziert wird.

2.15.2 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wurde mit dem RevertAid H Minus First strand synthesis Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) und dem darin enthaltenen Oligo d(t) *Primern* nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Dazu wurde in einem 1,5 ml Probengefäß folgendes

2 µg Gesamt-RNA
1 µl Oligo d(t) *Primern*
mit Nuklease-freiem H_2O auf 12 µl aufgefüllt.

auf Eis zusammen pipettiert. Der Ansatz wurde zunächst auf 65 °C für 5 Minuten erhitzt, kurz zentrifugiert und auf Eis gekühlt.

Zu dem Ansatz wurden

4 µl Reaktionspuffer (im Kit enthalten)
1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 Einheiten/µl)
2 µl 10 mM dNTP Mix

pipettiert.

Der Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und

dann 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 Einheiten/µl) dazugegeben.

Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 42 °C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für 10 Minuten, gestoppt.

2.15.3 RACE

Die Aufklärung der vollständigen Perlucin cDNA-Sequenz erfolgte nach der Methode RACE (Rapid amplification of cDNA ends) von Frohman *et al.* und Scotto-Lavino *et al*. [102, 103].

Für die Synthese der 5'-cDNA wurde zunächst die mit einem sequenzspezifischen *Primer* (SP1 5'-GTTCATGCGGCGTTGTCCTTC-3') cDNA synthetisiert (Kapitel 2.15.2) und mittels PCR-Aufreinigungs-Kit (Fermentas) (Kapitel 2.10) aufgereinigt.

Anschließend wurde durch das Enzym Terminale Transferase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) an das 3'-Ende der cDNA-Einzelstränge dATP's (Desoxyadenosintriphosphate) gehängt. Dazu wurde in einem 1,5 ml Probengefäß folgendes pipettiert:

4 µl Rektionspuffer (5-fach konzentriert)
dATPs (2 mM, Fermentas)
20 µl aufgereinigter cDNA

Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und danach auf Eis heruntergekühlt, bevor 1,5 µl des Enzyms Terminale Transferase dazu pipettiert wurde.

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und anschließend die Reaktion bei 70 °C für 10 Minuten gestoppt und auf Eis gekühlt.

Zur weiteren Verwendung wurde die „A-*tailed*"-cDNA wiederrum mittels des PCR-Aufreinigungs-Kit (Fermentas) aufgereinigt.

Im nächsten Schritt wurde in einer Nested-PCR und dem RACE Anker *Primern* sowie zwei sequenzspezifischen *antisense Primern* (Sp2 und SP3) die 5'-enden der cDNA amplifiziert.

Für die erste PCR-Reaktion wurde der RACE-Anker *Primer* (AB05 5'-GACTCGAGTCGACATCTGTTTTTTTTTTTTTTTT-3') als *sense Primer*, der an die angehängten ATP's bindet und die Anker-Sequenz enthält sowie einem sequenzspezifischer *antisense Primer* (SP2 5'-GTTCAGATCAGAAGCACCAAG-3') genutzt. Die PCR wurde mit der aufgereinigten "*A-tailed"*-cDNA als Matrize und Taq-Polymerase bei 56 °C Anlagerungs-Temperatur durchgeführt. Das Amplifikat wurde in einem Verhältnis 1:100 verdünnt und als Matrize für die zweite PCR-Reaktion genommen. In der zweiten PCR-Reaktion wurde der zweite RACE-Adapter *Primer* (AB07 5'-GACTCGAGTCGACATCTG-3'), der nur die Anker-Sequenz enthält sowie ein weiterer sequenzspezifischer *Primer*, der weiter *up-stream*

bindet, genutzt.

Die PCR-Reaktion wurde wie die vorherige mit Taq-Polymerase durchgeführt und folgendes Programm genutzt:

3 Minuten bei 95 °C	(Initiale Denaturierung)
29 bis 35 Zyklen	
40 Sekunden bei 95 °C	(Denaturierung)
30 Sekunden bei 56 °C	(Annealing, *Primer* Anbindung)
1 Minuten bei 72 °C	(Polymerisation, Strangverlängerung)
7 Minuten bei 72 °C	(Finale Extension, Verlängerung)
Kühlen bei 4 °C	

Zur Synthese der 3'-cDNA wurde cDNA mit dem RACE-Anker *Primer* (AB05 5'-GACTCGAGTCGACATCTGTTTTTTTTTTTTTTTT-3') mit dem RevertAid H Minus First strand synthesis Kit synthetisiert (Kapitel 2.15.2) und als Matrize für die PCR-Reaktion genommen. Als *sense Primer* wurde ein sequenzspezifischer *Primer* (SP4 5'-ATATGGCTGTGGGAAGGACAACGCC-3') und als *antisense* der RACE-Adapter *Primer* (AB07 5'-GACTCGAGTCGACATCTG-3') genommen. Die PCR-Reaktion wurde mit der Taq-Polymerase und 1 % DMSO (Dimethylsulfoxid) durchgeführt. Durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Matrizen-DNA unterbunden und so die Amplifizierung GC-reicher DNA-Bereiche erleichtert [104].

Für die 3' RACE PCR-Reaktion wurde folgendes Programm genutzt:

3 Minuten bei 95 °C	(Initiale Denaturierung)
29 bis 35 Zyklen	
40 Sekunden bei 95 °C	(Denaturierung)
30 Sekunden bei 60 °C	(Annealing, *Primer* Anbindung)
1 Minuten bei 72 °C	(Polymerisation, Strangverlängerung)
7 Minuten bei 72 °C	(Finale Verlängerung)
Kühlen bei 4 °C	

Die 5' und 3' RACE Amplifikate wurden im Agarosegel überprüft und nach der Aufreinigung mit dem GeneJET Cloning Kit (Fermenats) in den pJET 1.2 Vektor kloniert und sequenziert (Kapitel 2.15.4).

2.15.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt. Dafür wurden 200 bis 500 ng Plasmid-DNA mit BigDye Terminator und *Primer* versetzt. Der BigDye Terminator besteht aus einer

Polymerase, dNTP's und ddNTP's (Dideoxynucleotid Triphosphate, Terminations-Nukleotide) welche zyklisch nacheinander an die Nukleotide der Ziel-DNA gehängt werden. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 2 Minuten, die Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden, die Anlagerung der *Primer* (Hybridisierung der *Primer*) bei 56 °C für 15 Sekunden und die Verlängerung bei 60 °C für 4 Minuten, in 60 Zyklen.

2.16 Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die degenerierten *Primer* wurden nach dem IUPAC Code (siehe Anhang) erstellt.

Primer-Name	Sequenz	*Annealing*-Temperatur	Anwendung
Perlucin 2.2 (*Sense*)	5'-TGYTACTGGTTCWSN-3'	50 °C	Perlucin PCR
Perlucin 7 (*Antisense*)	5'-YTTYTGRCAYTGRTARTCRTTCCA-3'	50 °C	Perlucin PCR
Aktin (*Sense*)	5'-GTCACCAACTGGGACGA-3'	56 °C	cDNA
Aktin (*Antisense*)	5'-ACCTGACCGTCGGGAA-3'	56 °C	cDNA
pJET1.2 (*Sense*)	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	56 °C	Sequenzierung
pJET1.2 (*Antisense*)	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	56 °C	Sequenzierung
SP1 (*Antisense*)	5'-GTTCATGCGGCGTTGTCCTTC-3'		5'RACE cDNA Synthese
SP2 (*Antisense*)	5'-GTTCAGATCAGAAGCACCAAG-3'	56 °C	5'RACE
SP3 (*Antisense*)	5'-CAC CAA GCC AGT AAT TGA AAG C-3'	56 °C	5'RACE
SP4 (*Sense*)	5'-ATATGGCTGTGGGAAGGACAACGCC-3'	60 °C	3'RACE
AB05*	5'-GACTCGAGTCGACATCTGTTTTTTTTTTT-3'	60 °C (3'RACE), 56 °C (5'RACE 1. PCR)	RACE Adapter
AB07*	5'-GACTCGAGTCGACATCTG-3'	56 °C (5'RACE 2. PCR)	RACE Anker
Perl out (*Sense*)	5'-GAGTTGAAGTCACCCGCATG-3'	56°C	Nested pcDNA3
Perl in (*Sense*) *BamHI*	5'-CGGGATCCATGCACGTCGAGGTCCTGTCT-3'	56 °C	pcDNA3
Perl out V2 (*Antisense*)	5'-TGGAAAACAAACATGTTACAG-3'	56 °C	Nested pcDNA3
Perl in V2 (*Antisense*) *EcoRI*	5'-CGGAATTCCAGTTCCTTTTCACAAAT-3'	56 °C	pcDNA3
Perl out V3 (*Antisense*)	5'-ACTGTCCCTCTGTTACAG-3'	56 °C	Nested pcDNA3
Perl in V3 (*Antisense*) *EcoRI*	5'-CGGAATTCCAGGTTTCCATGCAAACT-3'	56 °C	pcDNA3
Pfor *XbaI* (*Sense*)	5'-GCTCTAGAATGCACGTCGAGGTCCTGTCT-3'	56 °C	pDEF [100]
Prew *BamHI* R0 (*Antisense*)	5'-CGGGATCCCAGTTCCTTTTCACAAAT-3'	56 °C	pDEF SNAP-Strep [100]
Prew *BamHI* R5 /8 (*Antisense*)	5'-CGGGATCCCAGGTTTCCATGCAAACT-3'	56 °C	pDEF SNAP-Strep [100]
Strep *SmaI* (*Antisense*)	5'-CGCCCGGGTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGC-3'	56 °C	pDEF Strep [100]
Perlucin *NcoI* (*Sense*)	5'-GCCCATGGGATGCCCACTCGGA-3'	56 °C	pETM41
Strep *NotI* (*Antisense*)	5'-GCGCGGCCGCTTATTTTTCGAACTGCGG-3'	56 °C	pETM41
His-MBP (*Sense*)	5'-GCCCATGGGCCATCACCATCACCATCAC-3'	56 °C	MBP in pET28b
TEV (*Antisense*)	5'-GCGAATTCGCCCTGAAAATAAAGATTCTC-3'	56 °C	MBP in pET28b
Perlspez (*Sense*)	5'-TGCTACTGGTTCTCAACCAT-3'	56 °C	*H. varia*

Perlspez (*Antisense*)	5'-CGTTCCACAGATAGTTTCCTA-3'	56 °C	*H. varia*
Hvaria SP4	5'-CCTGATAATGCGGGAGGTATCGAACAC-3'	56 °C	*H. varia* RACE

Tabelle 1: Darstellung der in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide. Die degenerierten Oligoneukleotide wurden nach dem IUPAC Code (siehe Anhang) entwickelt und von Eurofins MWG-Biotech (Ebersbach, Deutschland) synthetisiert. Mit * (Asterix) markierte Oligonukleotide, wurden aus der Arbeit von Annette Becker [105] übernommen.

2.17 Klonierungsstrategien

Zur Charakterisierung der Perlucin Spleißvarianten wurden diese in verschiedenen Systemen überexprimiert. Zunächst wurden die Perlucin Spleißvarianten in eukaryontischen COS-7 und CHO LecI Zellen und anschließend in *E. coli* Bakterien des Stammes Rosetta (DE3) placI exprimiert.

2.17.1 Transiente eukaryontische Expression

Zur transienten Expression von Perlucin Spleißvarianten in eukaryontischen COS-7 Zellen wurde der pcDNA3 Vektor genutzt, in welchem die kodierende Sequenz für den Strep-Tag schon vorhanden war [99]. Die Spleißvarianten wurden in einer Nested-PCR (Kapitel 2.15.1) mit sequenzspezifischen *Primern* amplifiziert.

Die erste PCR-Reaktion wurde mit Pfu-Polymerase und dem äußeren *Sense Primer* (Perl out 5'-GAGTTGAAGTCACCCGCATG-3') und *Antisense* für Perlucin-R0 (Perl out V2 5'-TGGAAAACAAACATGTTACAG-3') und Perlucin-R5 und Perlucin-R8 (Perl out V3 5'-ACTGTCCCTCTGTTACAG-3') durchgeführt. Die zweite PCR-Reaktion erfolgte mit Pfu-Polymerase und mit dem *Sense Primer* der in der Sequenz weiter *down-stream* bindet (Perl in 5'-CGGGATCCATGCACGTCGAGGTCCTGTCT-3') und als *Antisense Primer* für Perlucin-R0 (Perl in V2 5'-CGGAATTCCAGTTCCTTTTCACAAAT-3') und für Perlucin-R5 und Perlucin-R8 (Perl in V3 5'-CGGAATTCCAGGTTTCCATGCAAACT-3'). Die Amplifikate wurden im Agarosegel überprüft (Kapitel 2.12) und mit dem PCR-Purification-Kit (Fermentas) aufgereinigt (Kapitel 2.10) und über die Schnittstellen *BamHI*/*EcoRI* in den Vektor pcDNA3 ligiert, so dass der Strep-Tag im Leserahmen liegt und im exprimierten Protein am C-Terminus vorlag.

2.17.2 Stabile eukaryontische Expression

Zur stabilen Transfektion in eukaryontischen CHO LecI Zellen wurde der pDEF-Vektor [100] mit dem SNAP-Strep-Tag oder nur mit dem Strep-Tag genutzt.

Für die pDEF SNAP-Strep Konstrukte [100] wurden die Perlucin Spleißvarianten mit den

Primern (Pfor *XbaI* 5'-GCTCTAGAATGCACGTCGAGGTCCTGTCT-3') und für (Prew *BamHI* R0 5'-CGGGATCCCAGTTCCTTTTCACAAAT-3') bzw. für Perlucin-R5 und Perlucin-R8 (Prew BamHI R5/R8 5'-CGGGATCCCAGGTTTCCATGCAAACT-3') aus dem pcDNA3 Perlucin mit Pfu-Polymerase heraus amplifiziert und über die Schnittstellen *XbaI/BamHI* in den pDEF Vektor hineinkloniert, so dass im exprimierten Protein der SNAP-Tag C-terminal war: Für die pDEF Strep-Tag Konstrukte wurden die Perlucin Spleißvarianten mit (Pfor *XbaI* 5'-GCTCTAGAATGCACGTCGAGGTCCTGTCT-3') und (Strep *SmaI* 5'-CGCCCGGGTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGC-3') aus pcDNA3 Perlucin heraus amplifiziert und über die Schnittstellen *XbaI/SmaI* in den pDEF-Vektor hinein ligiert.

2.17.3 Bakterielle Expression

Das bakterielle Protein MBP kann zu einer höheren Löslichkeit von eukaryontischen Proteinen in bakteriellen Expressionssystemen führen [106-110]. Hier wurde der pETM-41 Vektor (EMBL, Hamburg, Deutschland) genutzt, um Perlucin fusioniert mit MBP, in Bakterien des Stammes *E. coli* Rosetta (DE3) placI bakteriell zu exprimieren. Der Vektor pETM-41 (EMBL) (Abbildung 33) hat seinen Ursprung in einem pET-Vektor [111] und dient zur Expression von Proteinen mit N-terminalen 6-Histidin-Tag (His-Tag) an dem sich das MBP anschließt. Die für Perlucin kodierende DNA wurde mit dem *sense Primern* (Perlucin *NcoI* 5'-GCCCATGGGATGCCCACTCGGA-3') und für Perlucin R0, R5 und R8 über die Strep-Tag kodierende Sequenz mit dem *antisense Primer* (Strep *NotI* 5'-GCGCGGCCGCTTATTTTTCGAACTGCGG-3') aus dem Plasmid pcDNA3-Strep Perlucin heraus amplifiziert und über die Schnittstellen *NcoI/NotI* in den Vektor pETM-41 (EMBL) subkloniert.

Zur Überexpression von MBP-Strep wurde das MBP mit den N-terminalen 6-Histidin-Tag aus dem Vektor pETM-41 mit dem *sense Primer* (His-MBP 5'-GCCCATGGGCCATCACCATCACCATCAC-3') und dem *antisense Primer* (5'-GCGAATTCGCCCTGAAAATAAAGATTCTC-3') heraus amplifiziert und in einen pET28b Vektor, der schon die kodierende Sequenz für den Strep-Tag [99] enthielt, über die Schnittstellen *NcoI* / *EcoRI* subkloniert.

2.18 Säugetierzellkultur

Säugetierzellen wurden unter einer Sterilbank bearbeitet und in H_2O gesättigter Luftfeuchte und einer CO_2-Konzentration von 5 % im Brutschrank bei 37 °C und 10 % (v/v) hitzeinaktivierten FCS auf sterilen Zellkulturplatten in der gewünschten Menge kultiviert.

Alle Komponenten für die Zellkulturarbeiten waren steril filtriert. Waren die Zellen bis zu einer Dichte von ca. 80 % konfluent, wurden die Zellen auf mehrere Platten verteilt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit sterilem PBS gewaschen und dann jeweils 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung zu den Zellen gegeben und sofort wieder entfernt. Nach einer Inkubation von 3 bis 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C, wurden die Zellen mit Zellkulturmedium abgespült und in mehrere sterile Zellkulturschalen mit frischem Medium überführt.

2.19 Transfektion in COS-7 Zellen

Zur Transfektion wurden die Zellen auf DMEM mit 2 % FCS Medium gesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml sterilem PBS gewaschen. In einem 1,5 ml Probengefäß wurden 150 mM NaCl vorgelegt (so dass das Endvolumen 1 ml ergibt) und mit 15 µg Plasmid-DNA (pcDNA3-Perlucin) gemischt, und anschließend 25 µl Polyethylenimin (PEI, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in einer Verdünnung von 1:750 in 150 mM NaCl dazugegeben, durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor es zu den Zellen gegeben wurde. Das stark verzweigte, basische PEI komplexiert die DNA und wird von den Zielzellen aufgenommen [112]. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die ersten Zellkulturüberstände genommen. Im Anschluss daran wurden die Zellen weitere 24 Stunden in DMEM mit 0 % FCS inkubiert und danach der Zellkulturüberstand wiederholt entnommen. Die Zellkulturüberstande wurden jeweils im Verhältnis 1:4 mit eiskaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C präzipitiert.
Die Zellen wurden auf der Zellkulturplatte zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde zunächst 10 ml TNE-Puffer mit Protease-Inhibitoren (Protease Inhibitor Tablette, Roche, Mannheim, Deutschland) versetzt, und davon jeweils 1 ml auf die Zellen gegeben und für 5 Minuten lysiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (Eppendorf) bei 30.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C der Zelldebris pelletiert. Der klare Überstand wurde für weitere Anwendungen genutzt.

2.20 Transfektion in CHO LecI Zellen

Die eukaryontische Zelllinie CHO LecI wurde im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO_2-Begasung in α-MEM mit 5 % FCS kultiviert bis sie zu 80 % konfluent waren. Die Zellen wurden vor der Transfektion mit PBS gewaschen und in α-MEM Medium mit 2 % FCS inkubiert. 25 µg Plasmid-DNA wurde mit 1 ml 150 mM NaCl (steril) versetzt, gemischt und

anschließend mit 25 µl PEI (1:1000) versetzt, erneut gemischt und vor Zugabe zu den Zellen für 10 Minuten inkubiert. Nach etwa 24 Stunden konnte der Zellkulturüberstand abgeerntet werden (siehe 2.17.1).

2.21 Transfektion zur stabilen Expression der Perlucin Spleißvarianten

Für eine Transfektion zur stabilen Expression der Perlucin Spleißvarianten erfolgt die Aufnahme der DNA des Vektors dauerhaft in das Genom des Wirtes, mit dem Ziel einer dauerhaften Expression des Zielproteins. Der pDEF-Vektor enthält das Resistenzgen Hygromycin B Phosphotransferase (HygR), so das Zellen, die mit dem pDEF-Konstrukt stabil transfiziert sind, auch eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin aufweisen und selektiert werden können [113].

Die stabile Transfektion der CHO LecI Zellen erfolgte zunächst in der gleichen Weise wie die transiente Transfektion. Am Tag nach der Transfektion wurde die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst und in 5 ml α-MEM resuspendiert. Es wurden mehrere Quadrate in der Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Durch die Multiplikation mit 10^4 wurde die mittlere Zellanzahl/ml Medium ermittelt. Die Zellzahl wurde auf 500.000 Zellen/ml, mit Penicillin/Streptomycin als Antibiotikum, eingestellt.

In eine vorbereitete 96-*well* Platte mit 0,1 % Kupfersulfat ($CuSO_4$) in den Randvertiefungen, wurden jeweils 100 µl der Zellen gegeben und mit Hygromycin (PAA, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) in aufsteigender Konzentration von 100 µg/ml bis 600 µg/ml versetzt. Nach zwei bis drei Wochen wurde die 96-*well* Platte nach konfluent gewachsenen Zellkolonien durchsucht und gewachsene Kolonien trypsinisiert und auf eine 24-*well* Platte, mit der entsprechenden Konzentration von Hygromycin, übertragen. Der Transfektionserfolg wurde durch Immunfluoreszenz der Zellen und Westernblot der Zellkulturüberstände bestimmt.

Bei nachweislicher Überexpression des Proteins der Wahl wurden die Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen angezüchtet und an das serumfreie Medium Ex-Cell CD-CHO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit 8 mM L-Glutamin und der entsprechenden Konzentration von Hygromycin, adaptiert.

2.22 Präzipitation von rekombinanten Perlucin-R0

Perlucin ist ein Protein der extrazellulären Matrix, welches vom Mantelepithel in den Extrapallialraum der Schnecke sezerniert wird. Die ionischen Zusammensetzungen des Extrapallialraumes entsprechen in etwa denen von Meerwasser, wobei Meerwasser Konzentrationen von 460 mM Na^+ und ca. 540 mM Cl^- [114], künstliches Meerwasser eine Konzentration von etwa 400 mM NaCl [115] und der Extrapallialraum von Mollusken eine Konzentration von etwa 440 mM Na^+ [116] aufweist. Das native, aus der Schale von *H. laevigata* aufgereinigte Perlucin liegt in Citratpuffer, pH 4,8 vor [2].
Es wurden zwei Proben, mit je 150 ng/µl rekombinantem Perlucin-R0 aus dem über dem Strep-Tag aufgereinigten Überstand von COS-7 Zellen verwendet. Das rekombinante Protein wurde in 50 µl Citratpuffer bzw. in 50 µl Citratpuffer mit 500 mM NaCl gelöst. Als Kontrollprobe wurden 10 µl der Proteinlösung vorher abgenommen. Die übrigen 40 µl werden in einem 1,5 ml Probengefäß (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) bei 4 °C und 250 rpm auf einen Schüttler über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 13.000 rpm 6 Minuten zentrifugiert. Die obersten (Überstand) und untersten 10 µl (Pellet) wurden als Probe aufgenommen, die restlichen 20 µl wurden verworfen.

2.23 Ko-Transfektion der Perlucin Spleißvarianten

Die Perlucin Spleißvarianten erscheinen nach der Aufreinigung aus der Schale von *H. laevigata* als ein heterogenes Bandenmuster in der SDS-PAGE [1, 2]. Um zu testen, ob die verschiedenen Spleißvarianten von Perlucin miteinander agieren, wurden jeweils eine 10 cm Zellkultur Schale mit COS-7 Zellen mit den pcDNA 3 Perlucin Plasmiden gemeinsam transfiziert. Jede Spleißvariante wurde einzeln, jeweils mit einer der anderen Spleißvarianten und alle drei Spleißvarianten zusammen transfiziert (wie beschrieben in Kapitel 2.19).
Die Zellkulturüberstände und Zellen wurden nach 24 Stunden abgeerntet und die Proteine mit Aceton 1:4 präzipitiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE und anschließendem Westernblot immunologisch mit einem primären polyklonalen Schaf Anti-Strep Antikörper und einem sekundären POD konjugierten Esel anti-Schaf (IgG H+L) Antikörper dargestellt.

2.24 Proteinaufreinigung aus Zellkulturüberstand von eukaryontischen Zellen

Der Zellkulturüberstand von eukaryontischen CHO LecI Zellen wurden zunächst mit 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,02 % Natriumazid versetzt und anschließend für eine Stunde mit

125.000 x g in einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) bei 4 °C zentrifugiert. Der geklärte Zellkulturüberstand wurde in Ultrafiltrationseinheiten (Vivacell®, Sartorius, Göttingen) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa ca. 100-fach aufkonzentriert. Dabei wurde der Puffer zweimal gegen 100 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8 gewechselt.

2.25 Überexpression in Bakterien

Zur bakteriellen Überexpression von Perlucin-Spleißvarianten wurden Bakterien der Gattung *E. Coli* der Stämme BL21(DE3) oder Rosetta(DE3) placI verwendet. Rosetta(DE3) erlaubt die Expression von Genen in denen seltene Kodons für Arginin durch Expression spezifischer tRNAs erkannt werden. Eine 5 ml LB Medium Übernacht-Bakterienkultur wurde mit Ampicillin oder Kanamycin, entsprechend den Resistenzen der verwendeten Vektoren, genutzt um 1 Liter LB Medium (1 : 200, vol/vol) anzuimpfen. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C und 270 rpm im Brutschrank geschüttelt. Bei einer optischen Dichte OD_{600} von 0,5 bis 0,6 wurde mit einer Endkonzentration von 0,01 mM IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid, Fermentas, Thermo Fisher Scientific) und 1 % Glucose (1 M Stock) die Expression gestartet und unter ständigem Schütteln über Nacht bei 4 °C inkubiert.
Die Überexpression des Maltose Binding Proteins (MBP) erfolgte für 3 bis 4 Stunden unter ständigem Schütteln im Inkubator bei 37 °C. Die Bakterienzellen wurden bei 6000 x g (Sorvall, Thermo Fisher Scientific) für 15 Minuten pelletiert und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Das Bakterienpellet wurde in 2 % des Ausgangsvolumen in Puffer (100 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8) aufgenommen und viermal für 30 Sekunden bei 300 Watt Ultraschallwellen ausgesetzt. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Bakterien für 30 Minuten bei 11.000 x g (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde im „Batchverfahren auf Protino®Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) geladen und zunächst über den 6-Histidin-Tag und anschließend über den Strep-Tag (IBA, Göttingen, Deutschland) aufgereinigt (siehe Proteinaufreinigung 2.26).

2.26 Proteinaufreinigung aus Bakterienlysat

2.26.1 Proteinaufreinigung über den His-Tag

Zur Aufreinigung über den N-terminalen 6-Histidin-Tag wurde die Protino®Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) mit dem Puffer 100 mM Tris/HCl 500 mM NaCl, pH 8 äquilibriert und dann die löslichen Proteine dazugegeben. Das Protein/Ni-NTA Agarose-Gemisch wurde für mindestens eine Stunde unter kontinuierlicher Bewegung gemischt und dann bei 500 x g für 5

Minuten zentrifugiert (Eppendorf). Der Überstand wurde abgenommen und die nicht gebundenen Proteine zweimal mit Ni-NTA Waschpuffer durch Zentrifugation entfernt. Die über das Nickel am 6-Histidin gebundenen Proteine wurden mit 5 ml Ni-NTA Elutionspuffer, der 250 mM Imidazol enthält, eluiert.

2.26.2 Proteinaufreinigung über den C-terminalen Strep-Tag

Die aus der bakteriellen Überexpression über den 6-Histidin Tag gereinigten Proteine wurden im Säulenverfahren über StrepTactin® beads (IBA, Göttingen) aufgereinigt. Dazu wurde das Eluat der His-Tag Aufreinigung mit 5 ml des Puffers 100 mM Tris/HCl 500 mM NaCl, pH 8 versetzt und auf eine Säule mit StrepTactin® beads gegeben und anschließend mit dem Puffer 100 mM Tris/HCl 500 mM NaCl, pH 8 gewaschen. Danach wurden die gebundenen Proteine durch den StrepTactin® Elutionspuffer, welcher Desthiobiotin enthält, von der Säule kompetitiv verdrängt.

2.26.3 Dialyse und Proteinkonzentrationsbestimmung

Die doppelt aufgereinigten Proteine wurden dreimal gegen das 10-fache Volumen mit 20 mM $NaHCO_3$ 500 mM NaCl, pH 8,7 bei 4 °C unter konstantem Rühren dialysiert. Die Konzentration des rekombinanten Proteins wurde mittels des BCA Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Dazu wurden in Doppelbestimmung in einer Mikrotiterplatte jeweils 100 µl des Reaktionsgemisches aus dem BCA Kit vorgelegt und jeweils 5 µl des zu bestimmenden Proteins dazugegeben. Der Ansatz wurde abgedeckt, gemischt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde bei 562 nm am Photometer Multiscan Ascent (Thermo Fisher Scientific) gemessen und die Proteinkonzentration mittels einer BSA (Bovine Serum Albumine) Eichreihe von 0,25 bis 2 mg/ml errechnet.

2.27 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) erfolgte nach der Methode von Laemmli [117] in einer MiniProtean III Kammer (BioRad, Hercules, CA, USA) unter denaturierenden Bedingungen. Es wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst im 4% Sammelgel gesammelt und dann im 12 % Trenngel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proben enthielten 1 bis 10 µg Protein in 10 µl Probenvolumen und wurden mit 2-fach konzentriertem Probenpuffer mit DTT (20 mM) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Minigele wurden mit den Proteinen und einem Molekulargewichtsstandard

(PageRuler prestained Protein ladder, Fermentas, Thermo Fisher Scientific) beladen und bei 15 mA pro Gel 1,5 bis 2 Stunden laufen gelassen. Die Minigele wurden anschließend entweder zum Anfärben der Proteine durch Coomassie brilliant blue (PageBlue, Fermentas, Thermo Fisher Scientific) in dd H_20 gewaschen oder für Westernblot im Westernblotpuffer äquilibriert.

2.28 Coomassie Färbung

Der Coomassiefarbstoff lagert sich an basische Seitenketten der Aminosäuren an und färbt so Proteine unspezifisch. Zur Coomassiefärbung wurden die SDS-PAGE Gele zweimal 15 Minuten in dd H_2O gewaschen und anschließend mindestens eine halbe Stunde in PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) gefärbt. Zum Entfärben wurde gründlich mit dd H_2O gewaschen.

2.29 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung wird ausgenutzt, dass Ag^+ mit den Resten von Glutamat, Asparagin und Cystein der Proteine Komplexe bildet. Durch das alkalische Formaldehyd wird das Ag^+ zu Ag reduziert und dadurch können die Proteine sichtbar gemacht. Es können Proteine bis zu einer Proteinmenge von 5 ng sichtbar gemacht werden. Die Färbung der Proteine ist jedoch nicht quantifizierbar [118].
Die Silberfärbung erfolgte nach folgendem Protokoll für 2 Gele:
2 ml 25 % Glutaraldehyd Lösung wird zu 98 ml Lösung A (siehe 2.3) gegeben, 30 min schüttelnd inkubiert und anschließend dreimal 20 Minuten mit dd H_2O gewaschen.
Es werden 0,1 g $AgNO_3$ zu 100 ml dd H_2O und 54 µl 37 % Formaldehyd zu den Gelen gegeben und für 30 Minuten schüttelnd inkubiert. Anschließend wird sofort dreimal mit großen Mengen dd H_2O gewaschen.
27 µl 37 % Formaldehyd werden zu 100 ml Lösung C (siehe 2.3) gegeben, davon werden 50 ml zu den Gelen gegeben bis sie sich braun verfärben. Zum Stoppen der Färbung werden die Gele für 10 Minuten in 50 bis 100 ml Lösung D gegeben und anschließend mindestens dreimal mit dd H_2O gewaschen.

2.30 Westernblot

Westernblot wird der Transfer von Proteinen aus dem SDS-PAGE Gel auf eine Membran, hier auf eine Polyvinylidendfluorid (PVDF) Membran (Millipore, Schwalbach, Deutschland),

genannt [119]. Der Westernblot kann genutzt werden um Proteine spezifisch durch Immunodetektion z.B. durch spezifische Antikörper nachzuweisen.

Nach der SDS-PAGE wurden die Minigele zunächst in Westernblotpuffer äquilibriert. Im Sandwichverfahren wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF Membran transferiert. Dazu wurde die Membran zunächst in 100 % Methanol aktiviert, dann in dd H_2O gewaschen und in Westernblotpuffer äquilibriert, auf das Minigel gelegt und in eine Mini Trans-Blot®–Electrophoretic Tranfer Cell (BioRad, Hercule, CA, USA) eingesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 100 Volt für eine Stunde und 4 °C.

Für die Immunodetektion von rekombinanten Perlucin-Strep Konstrukten wurde anschließend die PVDF-Membran in TBS-T gewaschen und um unspezifische Bindungen zu blockieren in 5 % BSA Fraktion V (PAA, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Großbritannien) in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln inkubiert. Der erste Antikörper, ein polyklonaler Schaf anti Strep-Tag, wurde in 1 ml TBS-T mit 5 % BSA 1:1000 verdünnt, auf die Membran gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T wurde der sekundäre Antikörper, ein polyklonaler, POD-konjugierter Esel anti-Schaf Antikörper (1:20000, Dianova, Hamburg, Deutschland), in TBS-T + 5 % BSA appliziert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran über die Peroxidase mit dem Enhanced Chemiluminescence System (ECL, Amersham, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Großbritannien) entwickelt und eingeschweißt auf einem Röntgenfilm (Amersham) exponiert. Die Röntgenfilme wurden in einer Agfa Curix 60 Filmentwicklungsmaschine nach individuellen Expositionszeiten entwickelt.

2.31 2D-Elektrophorese des nativen Perlucins

Das native Perlucin, aufgereinigt aus der Perlmuttschicht einer Schale der australischen Meereschnecke *H. laevigata,* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Monika Fritz (Biophysik, Universität Bremen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das native Protein wurde nach der Methode von Weiss *et al.* [2] aus einer Schale von *H. laevigata* aufgereinigt.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Görg [120]. Sie kombiniert die isoelektrische Fokussierung (IEF) und SDS-PAGE miteinander, so dass die Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) (1. Dimension, IEF) und danach anhand ihres Molekulargewichtes (2. Dimension, SDS-PAGE) aufgetrennt werden.

Die IEF erfolgte auf einen immobilisierten pH-Gradienten (IPG) Streifen (7cm, BioRad, München, Deutschland) mit einem linearen Gradienten von pH 3 bis pH 10. Für die IEF

wurde natives Perlucin aus der Schale von *H. laevigata* mit Aceton 1:4 präzipitiert. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20 °C. Das präzipitierte Perlucin wurde bei 20.000 x g bei 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert und in 125 µl 8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 50 mM Dithiothreitol, 0,2 % Bio-Lyte Ampholythe (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) aufgenommen. Die Probe wurde in die Fokussierungskammer pipettiert, der IPG Streifen mit der Gelseite in die Probe gelegt und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die PROTEAN®IEF Anlage (BioRad) mit folgendem Programm: 50 µA für 12 Stunden, 250 V für 15 Minuten, 250 - 4000 V für 2 Stunden, 4000 – 20.000 V für 5 Stunden) gestartet.
Die zweite Dimension, die SDS-PAGE, erfolgte direkt im Anschluss mit einen 12 %igem Polyacrylamidgel ohne Sammelgel in einer MiniProtean III (BioRad, Hercules, CA, USA). Der in SDS-haltigem Puffer (6 M Harnstoff, 2% SDS (w/v), 0,05 M Tris / HCl pH 8,7, 20% Glycerol (v/v)) äquilibrierte IPG-Streifen wurde direkt auf das Polyacrylamidgel gelegt und für 1,5 bis 2 Stunden bei 15 mA laufen gelassen. Das Gel wurde im Anschluss in dd H_2O gewaschen und mit Coomassie angefärbt.

2.32 MALDI-ToF MS und LC-ESI-MS

MALDI-ToF MS und LC-ESI-MS von nativem Perlucin, aufgereinigt aus der Schale von *H. laevigata*, erfolgten an der Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn von Dr. Sebastian Franken. Dafür wurden im Anschluss an die 2D-Elektrophorese und Coomassie Färbung (PageBlue, Fermentas, Thermo Fisher Scientific) die Proteinspots der Wahl ausgestochen und per MALDI-ToF MS bzw. LC-ESI-MS analysiert. Die MALDI-ToF MS wurde nach der Methode beschrieben in [99] und die LC-ESI-MS [121] durchgeführt.

2.33 Immunfluoreszenz

Eukaryontische COS-7 Zellen wurden in einer 24-*well* Platte in 1 ml DMEM-Medium bis zu einer Dichte von ca. 80 % Zellbedeckung wachsen gelassen. Sie wurden mit den Plasmiden der Wahl transfiziert (siehe 2.19) und über Nacht im H_2O gesättigten Brutschrank bei 37 °C bei 5 % CO_2 Begasung wachsen gelassen. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Pro *well* wurden 300 µl 4 % PFA (Paraformaldehyd) gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Entfernung des PFA und zweimaligem Waschen der Zellen wurden jeweils 250 µl eiskaltes Methanol hinzugefügt und für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Das Methanol wurde entfernt und die Zellen zweimal mit PBS + 3 % BSA gewaschen. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungen wurden jeweils 1 ml DMEM mit 10 % FCS dazu gegeben und 30

Minuten inkubiert. Als primärer Antikörper wurde ein polyklonaler Schaf anti-Strep-Tag Antikörper, (1:1000 in PBS + 3 % BSA) zu den Zellen gegeben und bei Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen gründlich mit PBS + 3 % BSA gewaschen und im Anschluss der sekundäre Antikörper, ein mit einem Cyanofarbstoff (CY3) konjugierter polyklonaler Esel anti-Schaf Antikörper, appliziert und für 90 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt. Bevor die Zellen unter Fluoreszenzlicht am Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht wurden, wurden sie gründlich gewaschen.

2.34 Erstellung phylogenetischer Stammbäume von Perlucin

Für Perlucin kodierende DNA-Fragmente von *Haliotis spec*. wurden durch eine Suche von Perlucin-R8 als Query mit BLASTN (Nukleotid Datenbank) und BLASTP (Protein Datenbank) und mittels Durchsuchen der Datenbank NCBI nach Perlucin gefunden. Zum Vergleich wurden schon experimentell gestetete C-Typ Lektine von Vertebraten und Invertebraten (*Homo sapiens, Caenorhabditis elegans, Bungarus fasciatus und Clupea harengeus*) herangezogen.

Zur Erstellung der phylogenetischen Bäume wurde zunächst aus den vollständigen Proteinsequenzen ein Alignment mit T-Coffee [122, 123] über den T-Coffee-Server (http://tcf_dev.vital-it.ch/apps/tcoffee/index.html) erstellt und in Geneious [124] manuell nachbearbeitet indem am N-Terminus am ersten Cystein und am C-Terminus am letzten Cystein der CTLD, der Sequenzbereich begrenzt wurde. Die cDNA Sequenzen wurden entsprechend der Länge der Proteinsequenzen gekürzt und zusammen mit dem T-Coffee Alignment in Revtrans 2.0 beta (http://www.cbs.dtu.dk/services/RevTrans-2.0/web/) [125] geladen und dort in ein cDNA-Alignment rückübersetzt. Dieses Alignment wurde in MEGA 5 [126] geladen, um das beste Modell zur Berechnung des Stammbaumes hervorsagen zu lassen (HKY85 Substitutionsmodel [127] mit 4 invarianten Gamma-Kategorien, HKY85 G+I berechnet).

Im Falle des phylogenetischen Stammbaumes der potentiellen Perlucine der *Haliotidae* im Vergleich mit Beispielproteinen der C-Typ Lektin Gruppen [90, 95, 96] wurden die Beispielproteine von der C-Typ Lektin Datenbank auf der Seite https://www.imperial.ac.uk/animallectins/ctld/mammals/humanvmousedata.html (Arbeitsgruppe von Kurt Drickamer am Imperial College London, Großbritannien) ausgewählt. Das T-Coffee Aminosäurealignment wurde wie oben beschrieben begrenzt und in MEGA 5 geladen, um das beste Model zur Berechnung hervorsagen zu lassen (WAG

Substitutionsmodel [128] mit 4 Gamma-Kategorien, (WAG+G) berechnet).
Mit dem Geneious Plugin Mr.Bayes [129] wurden die phylogenetischen Stammbäume errechnet und mit dem Programm FigTree v1.4.0 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) nachbearbeitet.

2.35 Proteinmotiv Vorhersage

Die Proteinmotiv Vorhersage ist ein Teilgebiet der Bioinformatik. Hier wird sie genutzt um die Proteinmotive der Perlucin Spleißvarianten hinsichtlich sogenannter *Coiled-coils* (α-Helix, die wiederum zu einer Helix gewunden ist) und intrinsisch unstrukturierter Regionen vorherzusagen.
Für die Vorhersage der potentieller *Coiled-coils* werden die Programme COILS (http://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html) [130] und Paircoil2 (http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil2/paircoil2.html) [131] sowie Logicoil (http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/LOGICOIL/) [132] zur Vorhersage der Anzahl der Oligomere genutzt. Zur Vorhersage der potentiellen intrinsisch unstrukturierten Regionen werden die Programme PrDOS (Protein DisOrder prediction System) (http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi) [133], DisEMBL (http://dis.embl.de/) [134] und ANCHOR (http://anchor.enzim.hu/) [135] genutzt.

2.36 $CaCO_3$-Präzipitation

Für das native Perlucin aus der Schale von *H. laevigata* wurde gezeigt, dass es die Präzipitation von $CaCO_3$ beschleunigen kann [1, 2, 72].
Es wird der pH-Wert gemessen um die Präzipitation von $CaCO_3$ in Anwesenheit der Perlucin Spleißvarianten zu testen. Dieser wurde nach der Methode von Heinemann *et al.* [136] und Wheeler *et al.* [137] mit kleinen Veränderungen gemessen. Das Probenvolumen wurde auf kleine Volumina von 500 µl angepasst. Damit die Zusammensetzung derjenigen von Meerwasser vergleichbar ist, wurde mit einer NaCl Konzentration von 500 mM gemessen.
Es wurden 250 µl einer Proteinlösung von 100 µg/ml in 20 mM $NaHCO_3$, 500 mM NaCl, pH 8,7 unter konstantem Rühren mit einem Mikromagnetfisch in einem 1,5 ml Kryogefäß mit Schraubdeckel (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) vorgelegt. Nachdem der pH-Wert konstant blieb wurden 250 µl einer 20 mM $CaCl_2$, 500 mM NaCl Lösung dazu pipettiert und so die Reaktion gestartet. Das dabei entstehende $CaCO_3$ fällt aus, das freie H^+ führt zu einer Änderung des pH-Wertes.

Der pH-Wert wurde über eine Ross Micro pH-Elektrode (Thermo Fisher Scientific) und einem pH-Meter (Portamess, Knick, Berlin, Deutschland) alle 5 Sekunden über ca. 3000 bis 4500 Sekunden gemessen.
Im Anschluss an jede Messung wurde die pH-Elektrode für eine Stunde mit HCl / Pepsin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gewaschen und anschließend mit 3 M KCl regeneriert. Mit jeder Spleißvariante wurden drei unabhängige Messungen unternommen und jeweils der Mittelwert und die Standartabweichung bestimmt. Für die Konzentrationsabhängigen Messungen des pH-Wertes wurden jeweils nur eine Messung unternommen.

2.37 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) wird dazu genutzt z.B. die Größe von Nanopartikeln in Flüssigkeit zu messen [138]. Die Messung der DLS, die hier verwendet wurde, basiert auf Photo-Korrelations-Spektroskopie (PCS), bei der ein Laser auf die Probe fokussiert ist und das Licht, dass in einem bestimmten Streuungswinkel streut, von einem Photomultiplier empfangen wird.
Der hydrodynamische Durchmesser der drei mit MBP fusionierten Spleißvarianten, Perlucin-R0, Perlucin-R5 und Perlucin-R8 sowie MBP in Lösung, wurden durch DLS unter der Mithilfe von Malte Kleemeier am Fraunhofer Institut (IFAM, Bremen, Deutschland) bestimmt.
Der hydrodynamische Durchmesser wurde am L.i.SA [139] mit einem Lichtstreuungswinkel von 90 ° bestimmt. Jede Spleißvariante wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in 20 mM $NaHCO_3$ 500 mM NaCl, pH 8,7 in einer sauberen 1 ml Acryl-Küvette in zwei Altersstufen (Ein-Monat-alt und Zwei-Monate-alt, gelagert bei -20 °C) bei 25 °C mit einem Helium-Neon Laser als Lichtquelle gemessen. Jede Probe wurde über eine Stunde gemessen. Die Daten der DLS-Messung wurden durch die xsize-Software analysiert um den hydrodynamischen Partikeldurchmesser der Fusionsproteine zu bestimmen.
Die theoretisch errechneten hydrodynamischen Durchmesser wurden nach [140, 141] errechnet. Bei der Berechnung wird für native, nicht denaturierte Proteine eine Kugelform angenommen und für denaturierte Proteine eine Aneinanderreihung der Aminosäuren. Daraus ergibt sich Folgendes:

Für native Proteine: $ln\ (rh) = 0{,}29\ ln\ (Anzahl\ der\ Aminosäuren) + 1{,}56$
Für denaturierte Proteine: $ln\ (rh) = 0{,}57\ ln\ (Anzahl\ der\ Aminosäuren) + 0{,}79$

(*rh* = Radius)

2.38 Rasterelektronen Mikroskopie von $CaCO_3$

Um den Einfluss der Perlucin Spleißvarianten auf die Wachstum von $CaCO_3$ zu testen wurden $CaCO_3$-Präzipitate am Rasterelektronenmikroskop abgebildet.

Es wurde jeweils ein Tropfen von der 20 mM $CaCO_3$-Lösung mit jeweils 100 µg/ml MBP-Perlucin Fusionsprotein auf einen Objekthalter gegeben und vor Verunreinigung geschützt, an der Luft getrocknet. Die entstandenen Minerale wurden am Rasterelektronenmikroskop FEI Helios nach der Methode beschrieben in [142] am Institut für Klebstoffe und Polymerchemie, AG BioInspirierte Materialien am Fraunhofer-Institut (IFAM, Bremen) abgebildet.

3. Ergebnisse

Das native Perlucin aus der Schale *H. laevigata* weist nach SDS-PAGE und Proteinfärbung häufig ein heterogenes Bandenmuster auf [1, 2]. Um den Grund dieses heterogenen Bandenmusters zu klären, wurde aus dem Mantelepithel einer Meeresschnecke der Art *H. laevigata* mRNA isoliert und cDNA synthetisiert. Auf der Grundlage der Aminosäuresequenz von Perlucin wurden degenerierte *Primer* erstellt. Die degenerierten *Primer* wurden zusammen mit der cDNA für die Isolierung eines Teilstückes der für Perlucin kodierenden DNA genutzt. Die fehlenden 3'- und 5'-Enden wurden durch RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*) amplifiziert. Es wurden zunächst vier verschiedene Varianten der für Perlucin kodierenden DNA identifiziert. Diese Varianten unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz durch die Anzahl eines am C-Terminus befindlichen *Repeats* (Abbildung 4).

3.1 Identifikation von Perlucin Spleißvarianten

Mit der cDNA aus dem Mantelepithel von *H. laevigata* wurde mit den *Primern* Perlucin 2.2 (*sense*) und Perlucin 7 (*antisense*) zunächst ein Sequenz der Perlucin cDNA amplifiziert, dessen 5' und 3' Enden fehlten. Diese Sequenz hat einen offenen Leserahmen von 327 Basenpaaren und kodiert für 109 Aminosäuren. Die 109 Aminosäuren decken 67 % von der ursprünglichen Perlucin Aminosäuresequenz von Mann *et al*. [3] ab (Abbildung 4).

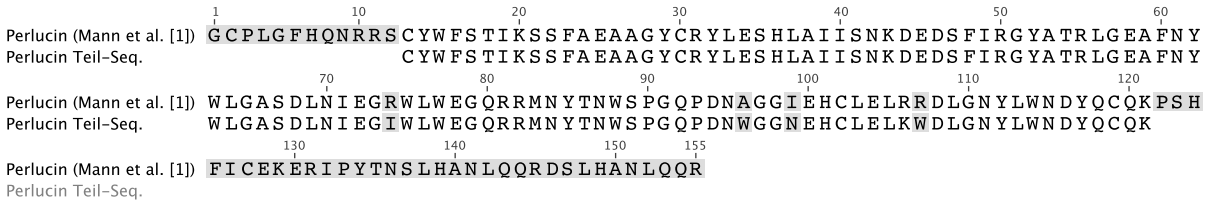


Abbildung 4: Aminosäurealignment der Perlucin-Sequenz publiziert von Mann *et al.* [3] mit der noch nicht vollständigen Perlucin-Sequenz.
Die cDNA der noch nicht vollständigen Sequenz wurde in Aminosäuren übersetzt und deckt 67 % der ursprünglichen Sequenz von Mann *et al.* [3] ab.
Unterschiede und Lücken (Gaps) im Alignment sind in grau unterlegt.

Auf der Grundlage dieser an den 5'- und 3'-Enden unvollständigen für Perlucin kodierenden DNA-Sequenz (Abbildung 4) wurden für die RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*) sequenzspezifische *Primer* (SP1, SP2 und SP3 für die 5' RACE und SP4 für die 3' RACE, siehe Tabelle 2) erstellt, um die vollständige kodierende DNA-Sequenz für Perlucin zu

erhalten.

Mit diesen sequenzspezifischen *Primern* (SP2, SP3 und SP4) und cDNA aus dem Mantelepithel von *H. laevigata* wurden die 5'- und 3'-Enden der für Perlucin kodierenden DNA amplifiziert. Es wurden zunächst vier verschiedene Spleißvarianten identifiziert, von denen drei in dieser Arbeit weiter charakterisiert wurden (Abbildung 5, cDNA siehe Anhang I).

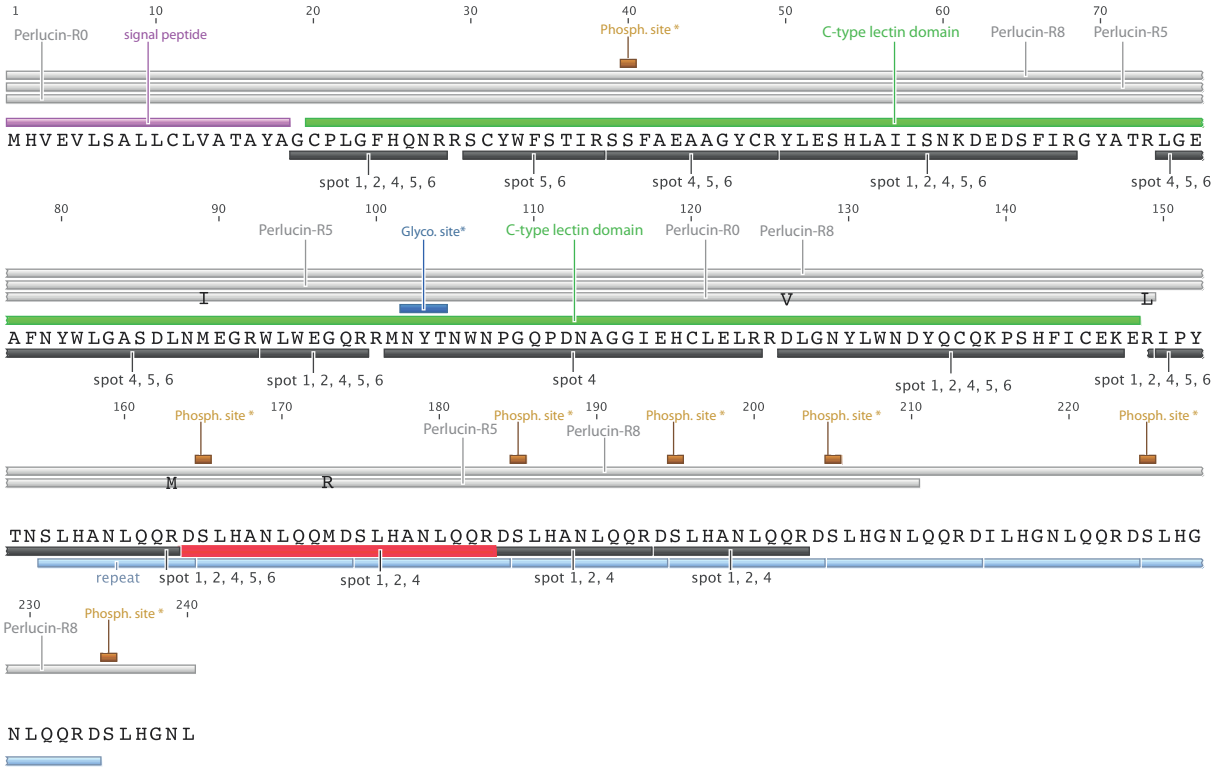


Abbildung 5: Die neu identifizierten Spleißvarianten Perlucin-R0, Perlucin-R5 und Perlucin-R8. Dargestellt ist als Beispiel die Spleißvariante Perlucin-R8 mit acht Wiederholungen des *Repeats* und in grau darüber sind die Spleißvarianten Perlucin-R0 (ohne *Repeat*-Region) und Perlucin-R5 (mit fünf Wiederholungen des *Repeats*). Hervorgehoben sind das Signalpeptid (lila), die C-Typ Lektin Domäne [143] (grün), die *N*-Glycosylierungsstelle (blau), die potentiellen Phosphorylierungsstellen [144] (braun) und die *Repeats* (blau).
Die durch MASCOT (siehe Ergebnisse 3.4.2) identifizierten Peptide der MALDI-Tof MS (schwarz) und das durch LC-ESI MS identifizierte Peptid DSLHANLQQMDSLHANLQQR, welches in Proteinspot 1, 2 (in hohen Intensitäten) und in Proteinspot 4 (in niedriger Intensität) nachgewiesen wurde (rot), sind unterhalb der Sequenz als Balken dargestellt.

Bei weiteren RACE-Analysen wurde ein zweites Signalpeptid erkannt und drei zusätzliche Spleißvarianten identifiziert (Abbildung 6).

Die Signalpeptide haben jeweils eine Länge von 18 Aminosäuren, welches durch SignalP 4.0 [145] mit hoher Wahrscheinlichkeit, als Signalpeptid bestätigt wurde. Dem Signalpeptid folgt eine CTLD von 130 Aminosäuren. Die Spleißvarianten wurden nach dem Vorhandensein und

der Anzahl, des sich am C-Terminus befindlichen zehn Aminosäuren langen Peptides benannt (siehe Abbildung 5). Im Folgenden wird dieses als *Repeat* oder auch abgekürzt mit R bezeichnet. Perlucin-R0 und Perlucin-R0-2 ohne *Repeat*-Region entsprechen einer CTLD. Perlucin-R2, Perlucin-R3, Perlucin-R5, Perlucin-R6 und Perlucin-R8 weisen neben der CTLD in unterschiedlicher Anzahl die *Repeats* am C-Terminus auf.

Abbildung 6: Regionen- und Domänenstruktur der *H. laevigata* Perlucin Spleißvarianten.
Es wurden zwei Signalpeptide und insgesamt sieben verschiedene Varianten des Perlucins identifiziert. Diese Varianten unterscheiden sich vor allem durch das Vorhandensein und der Anzahl eines 10 Aminosäuren langen Peptids, dass sich zwei-, drei-, fünf-, sechs- oder achtmal wiederholt. Sowohl die Perlucine ohne *Repeat-Region* als auch die Perlucine mit *Repeats* haben jeweils die gleiche 3' UTR, unabhängig davon welches Signalpeptid sie haben.

Die Spleißvarianten haben jeweils die für C-Typ Lektine konservierten sechs Cysteine.

Perlucin-R0 hat im Vergleich zu den anderen identifizierten Perlucinen drei Aminosäureaustausche: An der Position 89 von Methionin zu Isoleucin, an Position 126 Asparagin zu Valin und an Position 149 Arginin zu Leucin (siehe Abbildung 5).

Bei dem anderen Perlucin ohne *Repeat*-Region, Perlucin-R0-2, wurden diese Aminosäureaustausche nicht gefunden.

Das *Repeat*-Peptid SLHA(G)NLQQR(M)D kommt in den Varianten R2, R3, R5, R6 und R8 vor. Alle Varianten mit der *Repeat*-Region haben auf der mRNA-Ebene die gleiche 3'UTR (Untranslated Region). Die Varianten ohne *Repeat*-Region haben ebenso eine gleiche 3'UTR (Abbildung 6, cDNA-Sequenzen im Anhang I).

Mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,95 durch NetPhos 2.0 [144] sind die Serine in der *Repeat*-Region phosphoryliert, es sei denn, das vorherige *Repeat* enthält ein Methionin anstelle des Arginin. Dies resultiert in sechs potentiellen Phosphorylierungsstellen in der *Repeat*-Region von Perlucin-R8 (siehe Abbildung 5).

3.2 Proteinmotiv Vorhersage

Eine wichtige Fragestellung für die Funktion der *Repeat*-Region ist ihr potentieller Einfluss auf das Struktur- und Bindungsverhalten der Perlucin Spleißvarianten. *In silico* Analysen mit verfügbaren Vorhersage-Programmen können einen ersten Eindruck vermitteln.

Werden die Aminosäuresequenzen von Perlucin-R5 und Perlucin-R8 in *Coiled-coils* Vorhersage-Programmen eingegeben, so ergibt sich mit dem Programm COILS [130] für Perlucin-R5 und Perlucin-R8 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,7, dass die Proteine innerhalb der *Repeat*-Region *Coiled-coils* bilden. Im Gegensatz dazu liegen die Wahrscheinlichkeiten bei dem Programm Paircoil2 [131] mit 0,05 über dem Schwellenwert von 0,025.

Das Programm Logicoil [132] prognostiziert den wahrscheinlichen Oligomerisierungs-Zustand der *Coiled-coils* Regionen. Es prognostiziert das Perlucin-R5 und Perlucin-R8 über diese Region Tetramere oder Trimere bilden könnten. Das *Repeat*-Peptid, das wahrscheinlich *Coiled-coils* bildet, ist: NLQQR(M) DSLHANLQQM DSLHANLQQR DSLHANLQQR.

Werden die Aminosäuresequenzen der Perlucin Spleißvarianten in die Proteinstrukturvorhersage-Programme eingegeben, um die Wahrscheinlichkeit zu intrinsisch unstrukturierten Regionen vorherzusagen, so ergibt sich für Perlucin-R5 und Perlucin-R8 mit dem Programm PrDOS [133], dass die letzten 15 Aminosäuren, und mit dem Programm DisEMBL [134], dass die letzten 9 Aminosäuren der *Repeat*-Region intrinsisch unstrukturiert sein könnten. Das Programm ANCHOR [135] kalkuliert die Wahrscheinlichkeit, dass die intrinsisch unstrukturierten Regionen sich mit anderen globulären Proteinen oder Regionen verbindet.

Perlcuin-R5 hat mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,6 in der Region von Aminosäure 187 bis zur Aminosäure 192 und Perlucin-R8 von Aminosäure 192 bis 240 eine Bindungsregion innerhalb der intrinsisch unstrukturierten Region.

Für Perlucin-R0 werden weder *Coiled-coils* Regionen noch intrinsisch unstrukturierte Regionen vorhergesagt.

3.3 Erste Sequenzergebnisse von Perlucin aus Haliotis varia

Als Vergleich zur kodierenden DNA von *H. laevigata* Perlucin wurde aus dem Mantelepithel einer Schnecke der Art *Haliotis varia* cDNA isoliert und die für Perlucin kodierende DNA amplifiziert. Die für Perlucin spezifischen *Primer* (Perlspez for 5'-TGCTACTGGTTCTCAACCAT-3') und (Perlspez rev 5'-CGTTCCACAGATAGTTTCCTA-3') wurden genutzt, um die für Perlucin kodierende Sequenzabschnitte aus *H. varia* cDNA zu amplifizieren. Die erhaltende Sequenz war unvollständig. Das 5' und 3'-Ende wurde mittels RACE amplifiziert und es konnte eine erste vollständige Sequenz erhalten werden. Die Aminosäuresequenz entspricht in der Länge der von Perlucin-R0. Die cDNA-Sequenz hat jedoch in ihrem 3' UTR Bereich eine Sequenz, die

in der DNA-Sequenz und in der Region nach dem Stop-Codon, in Aminosäuren übersetzt, das dem *Repeat* von *H. laevigata* sehr ähnlich ist (Abbildung 7) (cDNA siehe Anhang I).

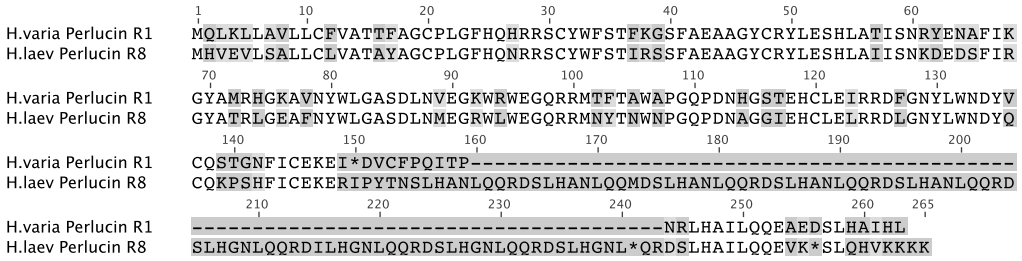


Abbildung 7: Aminosäurealignment von potentiellem *H. varia* Perlucin mit *H. laevigata* Perlucin-R8. Das 3'UTR von *H. varia* Perlucin ist dem *Repeat*-Peptid von Perlucin-R8 in der cDNA-Sequenz sehr ähnlich, wenn man diese Region, nach dem Stop-Codon von *H. varia* Perlucin in Aminosäuren übersetzt, ist diese Ähnlichkeit ebenfalls gegeben (cDNA siehe Anhang I).
Lücken (Gaps) und Sequenzunterschiede im Alignment sind mit grau unterlegt.

3.4 Nachweis der Spleißvarianten in der Schale von H. laevigata

Es stellte sich die Frage, ob die hier neu identifizierten Perlucin Spleißvarianten ein Bestandteil der organischen Matrix des Perlmutts von *H. laevigata* sein könnten und so einen Teil der beobachteten Heterogenität des nativen Proteins erklären könnte. Deshalb wurde das native Perlucin zunächst in einer 2D-Elektrophorese aufgetrennt (siehe 3.4.1) und später verschiedene Proteinspots ausgestochen und durch MALDI-Tof MS analysiert (siehe 3.4.2).

3.4.1 2D-Elektrophorese von nativen Perlucin

Das native Perlucin aus der Schale von *H. laevigata* wurde nach dem Protokoll beschrieben in [2] aufgereinigt und freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Monika Fritz (Institut für Biophysik, Universität Bremen, Deutschland) zu Verfügung gestellt.
Mit Aceton präzipitiertes Perlucin aus der Schale von *H. laevigata* wurde zunächst in der isoelektrischen Fokussierung nach dem pI der Proteine und anschließend nach dem Molekulargewicht in der SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Zum Vergleich wurde das native Protein parallel in einem 12 %igem Polyacrylamid Gel aufgetrennt.
Das native Perlucin weist in der 2D-Elektrophorese (siehe Abbildung 8, A) eine weite Verteilung entlang des pH-Gradienten auf, von ca. pH 5,5 bis zu pH 9,5. Außerdem zeigt diese Perlucin-Präparation eine Verteilung des elektrophoretischen Laufverhaltens mit Proteinbanden im Bereich von ca. 12 kDa bis ca. 26 kDa. Die Hauptproteinspots sind bei ca. 25 kDa, bei ca. 20 kDa und bei ca. 15 kDa auszumachen.

Die Abbildung 8 B zeigt die SDS-PAGE des nativen Perlucins aus der Schale von *H. laevigata* aufgereinigt. Es sind drei prominente Banden zu erkennen bei 25 kDa, bei ca. 20 kDa und bei 15 kDa. Diese Banden entsprechen der Molekulargewichtverteilung der Proteinspots aus der 2D-Elektrophorese (siehe Abbildung 8, A). Für die MALDI-MS Analysen wurden deshalb jeweils zwei Proteinspots bei ca. 25 kDa (Proteinspot 1 und 2), bei 20 kDa (Proteinspot 3 und 4) und bei 15 kDa (Proteinspot 5 und 6) untersucht.

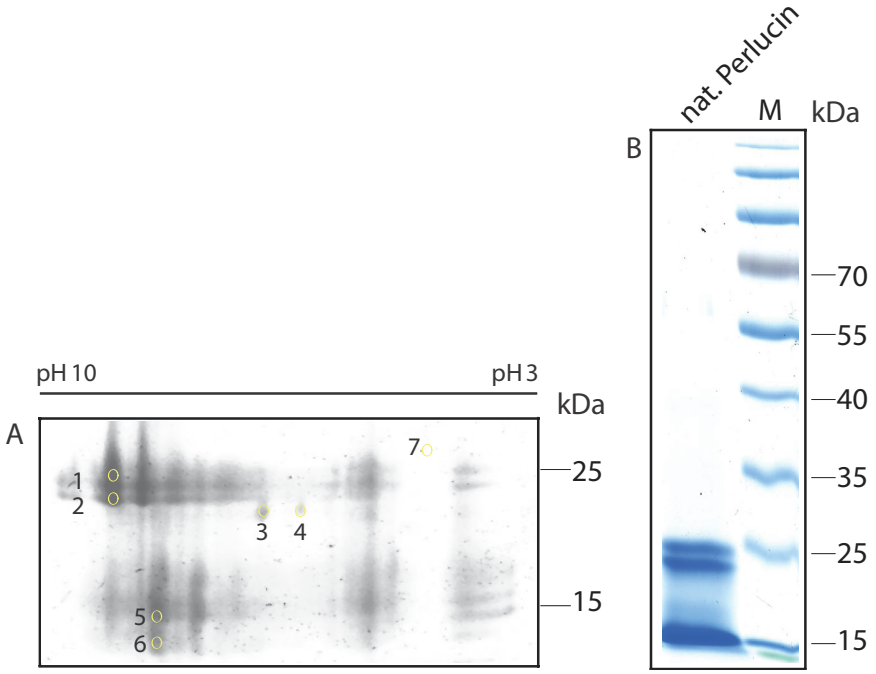


Abbildung 8: 2D-Elektrophorese und SDS-PAGE vom nativen Perlucin.
Das native Perlucin aus der Schale von *H. laevigata* aufgereinigt [2] wurde mittels 2D-Elektrophorese (A) und SDS-PAGE (B) auf 12 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. A: In der 2D-Elektrophorese des nativen Perlucins zeigen die Proteinspots eine weite Verteilung entlang des pH-Gradienten von pH 9 bis pH 5 und eine Massenverteilung von ca. 12 kDa bis ca. 26 kDa. Für die MALDI-MS Analysen wurden Proteinspots bei 26 kDa, bei 20 kDa und bei 15 kDa ausgestochen (gelb eingekreist). Spot 7 wurde zur Negativ-Kontrolle ohne angefärbtes Protein genommen. B: Die SDS-PAGE aus derselben Proteinpräparation weist drei Banden bei ca. 25 kDa, 20 kDa und bei ca. 15 kDa auf.

3.4.2 MALDI-ToF MS und die Identifizierung des „DSLHANLQQR“ Peptides

Aus der 2D-Elektrophorese (Abbildung 8, A) wurden sieben Proteinspots zur MALDI-ToF MS Analyse ausgestochen und analysiert. Die MALDI-ToF MS Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Sebastian Franken am Institut für physiologische Chemie (Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn, Deutschland) durchgeführt.

Proteinspot Nr.	Perlucin	MASCOT-Score	Sequenzabdeckung	Anzahl Peptide
1	+	81	52 %	6
2	+	79	52 %	6
3	–	–	–	–
4	+	79	73 %	8
5	+	81	72 %	9
6	+	92	72 %	9
7 (Kontrolle)	–	–	–	–

Tabelle 3: MASCOT Ergebnisse der aus der 2D-Gelelektrophorese ausgestochenen Proteinspots (Abbildung 8, A) wurden mit der Aminosäuresequenz von nativen Perlucin [3] verglichen.

In allen Proteinspots, außer Proteinspot 3 und der Kontrolle (Spot 7), konnte Perlucin identifiziert werden, die gefunden Massen entsprachen denen der von Mann *et al.* [3] publizierten Perlucin-Sequenz. Die Tabelle 4 stellt den MASCOT-Score, die Sequenzabdeckung zu der von Mann *et al.* [3] publizierten Sequenz und die Anzahl der Peptide dar.

Abbildung 5 zeigt die Sequenzabdeckung der Proteinspots innerhalb der drei neuen Spleißvarianten. Es wurde, bis auf kleinere Peptide, die Sequenz der Spleißvarianten fast vollständig abgedeckt. Interessanterweise wurde ein Peptid gefunden, welches nur in der Spleißvariante Perlucin-R0 vorkommt, weil es anstelle eines Methionins ein Isoleucin enthält. Dieses Peptid wurde nicht nur in Proteinspot 5 und 6 (ca. 15 kDa) gefunden, sondern auch in Proteinspot 4, welcher bei ca. 20 kDa läuft. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es diese Aminosäureaustäusche, wie in der Variante Perlucin-R0, auch in anderen Spleißvarianten, die bisher nicht gefunden wurden, geben könnte. Ein Peptid konnte nur in Proteinspot 4 identifiziert werden. Dieses Peptid findet sich nicht in den Aminosäuresequenzen der neu identifizierten Spleißvarianten, sondern nur in der von Mann *et al.* [3] publizierten Sequenz, weil sich nur in dieser Sequenz an der Position 97 ein Serin anstelle eines Asparagins befindet. Dieses Peptid enthält zudem die potentielle Glykosylierungsstelle.

Durch LC-ESI-MS (Abbildung 5) der Proben wurde in hohen Intensitäten in Proteinspot 1 und 2, in niedrigen Intensitäten in Proteinspot 4, aber nicht in Proteinspot 5 und 6 das Peptid DSLHANLQQMDSLHANLQQR identifiziert. Dieses aus der 2D-Elektrophorese gefundene Peptid, welches in den Spleißvarianten Perlucin-R5 und Perlucin-R8 vorkommt, demonstriert deutlich, dass diese Spleißvarianten Proteine der organischen Matrix der Schale von *H. laevigata* sind.

3.5 Phylogenetische Analysen von Perlucin

Phylogenetische Analysen bieten die Möglichkeit, durch die phylogenetische Einordnung mit anderen Proteinen auf die Funktion der Proteine zu schließen. In den Gendatenbanken sind viele Proteine als Perlucine oder Perlucin-ähnliche Proteine benannt. Ob es sich bei diesen Proteinen um Orthologe von Perlucin oder um andere C-Typ Lektine handelt, soll durch phylogenetische Analysen geprüft werden (3.5.1). Die weitere phylogenetische Einordnung von Perlucin in eine Gruppe der C-Typ Lektine [90, 95, 96] könnte Rückschlüsse auf die Struktur und Funktion von Perlucin zulassen (3.5.2).

3.5.1 Perlucin aus *Haliotis spec.* im Vergleich mit C-Typ Lektinen

In genetischen Datenbanken von GenBank sind viele Proteine oder Genprodukte von *Haliotis spec*. als Perlucine bezeichnet, obwohl diese Gruppe von Proteinen sehr heterogen ist. Einige dieser Proteine erfüllen nicht die Kriterien zur Einordnung in die Gruppe der C-Typ Lektine wie z.B. das putative Perlucin 2 von *H. discus discus* und wurden deshalb nicht zur phylogenetischen Analyse herangezogen. Aufgrund der Heterogenität dieser Gruppe von Proteinen oder Proteinprodukten wurde untersucht, ob diese Gene Orthologe zu anderen C-Typ Lektin-Genen aus der Datenbank sind, die schon experimentell als C-Typ Lektine nachgewiesen wurden. Dazu wurde die phylogenetische Beziehung der CTLD von Perlucinen aus der Datenbank von *Haliotis spec*. mit der C-Typ Lektine Domäne verschiedener Vertebraten und Invertebraten, wie in Material und Methoden beschrieben (siehe 2.34), mit dem Hasegawa-Kishino-Yano, 85 Algorithmus [127] und 4 invarianten Gammakategorien (HKY85(G+I)) errechnet (Alignment siehe Anhang). Das Antifreeze Protein (GenBank: S65819.1) des Atlantischen Herings (*Clupea harengus*) wurde als Außengruppe verwendet.
Der resultierende Baum (Abbildung 9) der CTLD teilt sich in zwei Gruppen. Alle potentiellen und sogenannten Perlucine von *Haliotis spec*. grenzen sich deutlich von den C-Typ Lektinen der Nematoden, Schlangen, Fischen und Menschen ab. Sie bilden eine Gruppe, während die C-Typ Lektine der anderen Spezies von Invertebraten und Vertebraten zusammen in der unteren Gruppe verbleiben, zudem gruppieren sie sich dort nicht nach ihrer Tiergruppe.
Die obere Gruppe besteht ausschließlich aus den CTLD von *Haliotis spec*. und wird in Abbildung 9 farblich unterlegt. Der Ast der potentiellen und sogenannten Perlucine von *Haliotis spec.* teilt sich in drei weitere Äste. Eine dieser Äste repräsentiert eine Gruppe von Proteinen, die als Perlucine benannt werden (in Rosa unterlegt). In dieser Gruppe befinden sich die beiden Proteine, bei denen schon experimentell eine Perlucinaktivität nachgewiesen wurde, *H. laevigata* Perlucin [1-3] und Perlucin 5 von *H. discus discus* [72]. Außerdem

befinden sich in dieser Gruppe zwei Genprodukte der Art *H. asinina* (Hasi499 und Hasi551). Eines der Genprodukte, Hasi551, hat mehr Ähnlichkeit mit dem Perlucin von *H. varia* (HvarPerl) als mit dem anderen Protein von *H. asinina* (Hasi499). Eine zweite Gruppe (blau unterlegt) wird als Perlucin-ähnliche Proteine bezeichnet. Diese Proteine werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit mit Perlucin als Perlucin-ähnliche Proteine benannt. Diese Gruppe von Proteinen könnte eine Perlucinaktivität besitzen, diese ist aber noch nicht experimentell nachgewiesen worden. In grün unterlegt sind die beiden anderen Äste mit Proteinen, die wahrscheinlich andere C-Typ Lektine sind.

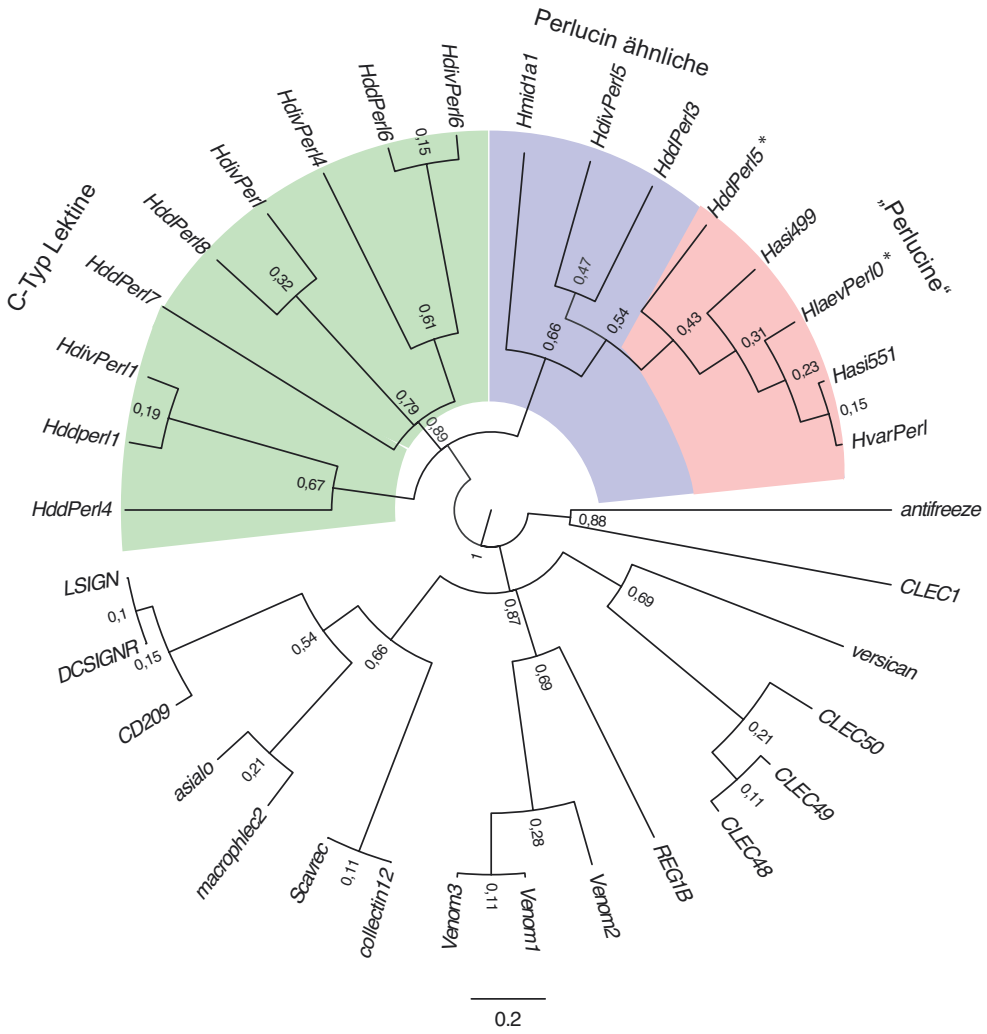


Abbildung 9: Phylogenetischen Analyse der Perlucine von *Haliotis spec*. mit verschiedenen C-Typ Lektinen der Vertebraten und Invertebraten.

Die für Perlucin kodierenden DNA-Fragmente wurden nach dem Vorgehen in Kapitel 2.34 der Material und Methoden, bestimmt. Der phylogenetische Baum wurde mit dem HKY85 Substitutionsmodel [127], mit 4 invarianten Gamma-Kategorien (HKY85 G+I) errechnet. Das *Antifreeze*-Protein des Atlantischen Herings (*Clupea harengus*) (GenBank: S65819.1) wurde als Außengruppe genutzt. Rosa hervorgehoben sind die potentiellen Perlucine, blau unterlegt sind die Perlucin-ähnlichen Proteine, grün markiert sind die Proteine mit CTLD von *Haliotis spec*.. Das cDNA-Alignment das zur Berechnung des Baumes herangezogen wurde befindet sich im Anhang II. *Homo sapiens*: Asialo = asialoglycoprotein receptor H1; CD209 = DC-SIGN; collectin12 = collectin sub-family member 12; DCSIGNR = sDC-SIGN1A type III; LSIGN; macrophlec2 = macrophage lectin 2; REG1B = regenerating islet-derived 1 beta; Scavrec = Scavenger receptor; Versican = chondroitin sulfate proteoglycan 2; *Haliotis laevigata*: HlaevPerl0* = Perlucin R0; *Haliotis varia*: HvarPerl = putative Perlucin; Haliotis asinina: Hasi551; Hasi499; *Haliotis discus discus*: Hddperl1 = putative Perlucins 1; HddPerl3 = putative Perlucin 3; HddPerl4 = putative Perlucin 4; HddPerl5* = putative Perlucin 5; HddPerl6 = putative Perlucin 6; HddPerl7 = putative Perlucin 7; HddPerl8 = putative Perlucin 8; *Haliotis diversicolor:* HdivPerl = putative Perlucin; HdivPerl1 = putative Perlucin 1; HdivPerl4 = putative Perlucin 4; HdivPerl5 = putative Perlucin 5; HdivPerl6 = putative Perlucin 6; *Haliotis midae*: Hmid1a1 = putative Perlucin; *Bungarus fasciatus:* Venom1 = Venom gland lectin 1; Venom2 = Venom gland lectin 2; Venom3 = Venom gland lectin 3.
(Accsession-Nummern befinden sich im Anhang III.)

3.5.2 Einordnung der Perlucine von *Haliotis spec.* in die C-Typ Lektin Gruppen

Die C-Typ Lektine werden nach ihrer Domänenstruktur und phylogenetischen Beziehung in verschiedene C-Typ Lektin Gruppen (I bis XVII) eingeordnet [90, 95, 96]. Eine Einordnung von Perlucin in eine dieser Gruppen könnte Rückschlüsse auf die Funktion und Struktur von Perlucin nach sich ziehen.

Die aufgrund der phylogenetischen Analyse als potentielle Perlucine (Abbildung 9, rosa) eingeordneten Proteine sollten in Hinblick auf ihre Stellung innerhalb der Gruppen der C-Typ Lektine untersucht werden. Die CTLD der Beispielproteine der C-Typ Lektin Gruppen wurden mit der CTLD der Perlucine von *Haliotis spec.* (Abbildung 9, rosa unterlegt) mittels des WAG (G) Algorithmus [128] und 4 Gammakategorien berechnet. Das C-Typ Lektin Antifreeze Protein des Atlantischen Herings (*Clupea harengus)* (GenBank: S65819.1) wurde als Außengruppe genutzt (Abbildung 10).

Hierbei zeigt sich, dass die Perlucine von *Haliotis spec*. in diesem phylogenetischen Stammbaum zur Tetranektinfamilie und den Collectinen zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu werden die Perlucine bei einer Suche in der Datenbank von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) über die konservierten Domänen (CDD) [146] zu der DC-SIGN Gruppe zugeordnet. Wird zur Suche in der Datenbank DELTA-BLAST [147, 148] genutzt, so gruppieren sich die Perlucin von *H. laevigata* und *H. asinina* zu der C-Typ Lektin Familie 17, HddPerl5 von *H. discus discus* aber zu den Neurocanen, welche in die C-Typ Lektin Gruppe der Proteoglycanen eingeordnet wird (Tabelle 4).

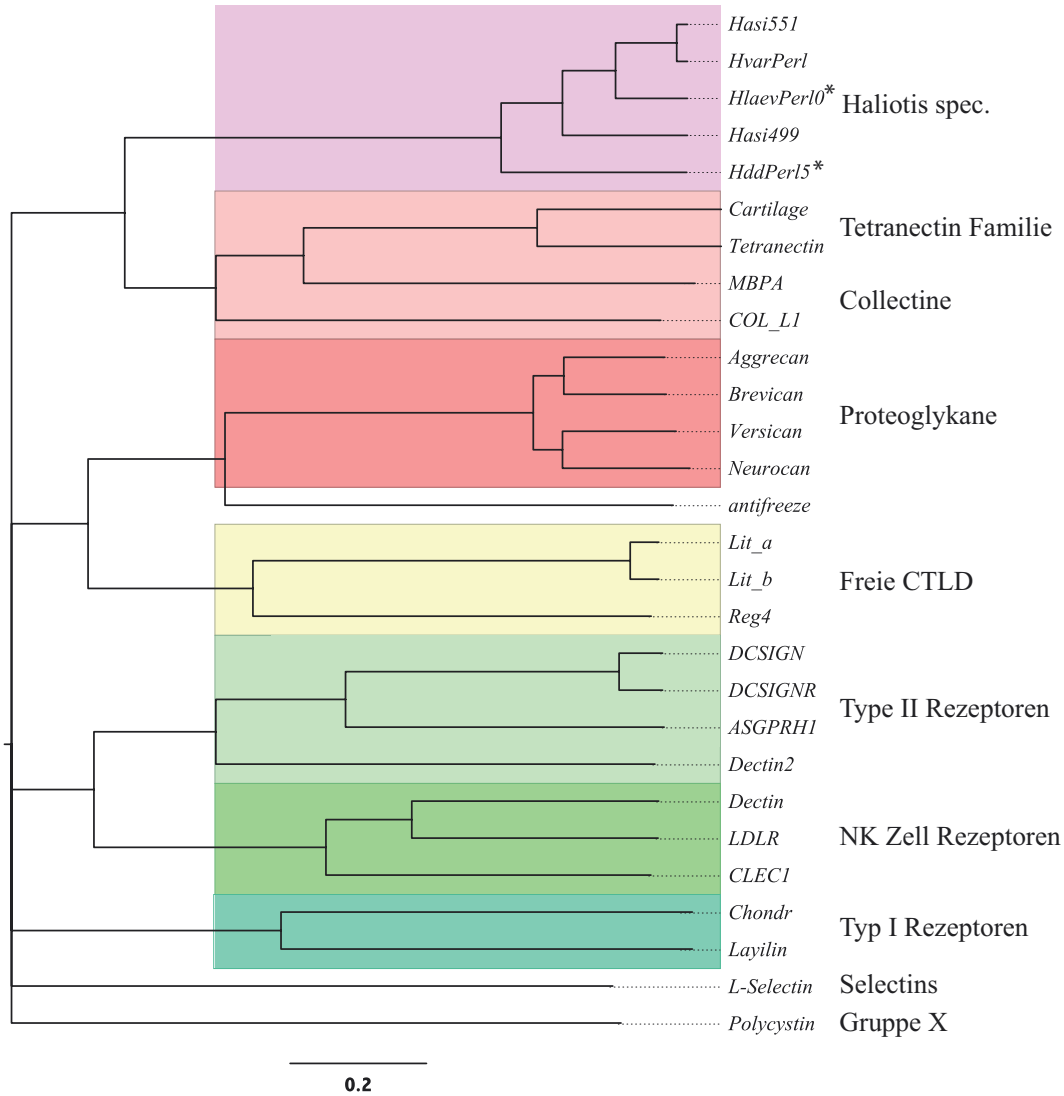


Abbildung 10: Phylogenetische Einordnung der Perlucin von *Haliotis spec*. in die C-Typ Lektingruppen [90, 95, 96].
Der phylogenetische Baum vergleicht die CTLD der Perlucine (Abbildung 9, rosa unterlegt) der *Haliotidae* mit der CTLD von Beispielproteinen der C-Typ Lektingruppen [90, 95, 96]. Die Perlucine (rosa) werden zur Tetranektin Familie und den Collectinen zu geordnet.
Die Beispielproteine der C-Typ Lektin Gruppen wurden wie beschrieben in Material und Methoden (2.34) ausgewählt. Der phylogenetische Baum wurde mittels WAG Algorithmus [128] mit 4 Gamma-Kategorien (WAG+G) berechnet. Das *Antifreeze*-Protein des atlantischen Herings (*Clupea harengus*) (GenBank: S65819.1) wurde als Außengruppe genutzt.
DC-SIGN = CD209 (*H. sapiens*); collectin = collectinsub-family member 12 (*H. sapiens*); DCSIGNR = sDC-SIGN1A type III (*H. sapiens*); LSIGN = CD209L (*H. sapiens*); macrophlec2 = macrophage lectin 2 (*H. sapiens*); Reg1B = regenerating islet-derived 1 beta; Scavrec = Scavenger receptor; versican = chondroitin sulfate proteoglycan 2 (*H. sapiens*); Cartilage Cartilage-derived C-type lectin (*H. sapiens*); Tetratnectin = plasminogen-binding protein (*H. sapiens*); COL_L1 = Collectin Liver 1 (*H. sapiens*); Aggrecan (*H. sapiens*); Brevican (*H. sapiens*); Versican (*H. sapiens*); Neurocan (*H. sapiens*); Lit_a = Lithostathine alpha (*H. sapiens*); Lit_b = Lithostatin beta (*H. sapiens*); Reg4 = regenerating islet-derived protein 4 (*H. sapiens*); DCSIGN= CD209 antigen isoform 6 (*H. sapiens*); ASGPRH1= Asialoglyco protein receptor (*H. sapiens*); Dectin2 = Dendritic cell-associated C-type lectin 2 (*H. sapiens*); Dectin = Dendritic cell-associated C-type lectin 1 (*H. sapiens*); LDLR = oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (*H. sapiens*); CLEC1 = C-type lectin domain family 1 member A (*H. sapiens*); Chondr = chondrolectin isoform a (*H. sapiens*); Layilin (*H. sapiens*); L selectin (*H. sapiens*); Polycystin = Polycystic kidney disease-associated (*H. sapiens*); MBPA = Mannose Binding Protein A (*Mus Musculus*). (Accsession-Nummern befinden sich im Anhang III.)

	CTLD (CDD) [146]	DELTA BLAST [147, 148]
Perlucin-R0	DC-SIGN	Family 17
Hasi551	DC-SIGN	Family 17
Hasi499	DC-SIGN	Family 17
Hdd-Perl5	DC-SIGN	Neurocan

Tabelle 4: Einordnung der potentiellen Perlucine von *Haliotis spec*. in die CTLD Gruppen. Um die CTLD Gruppen zu bestimmen, wurden die Proteine in der Gendatenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information) einzeln nach Conserved Domains (CDD) [146] und mit DELTA BLAST [147, 148] durchsucht (siehe Material und Methoden 2.34).

3.6 Eukaryontische Transfektion der Perlucin Spleißvarianten

Um die Perlucin Spleißvarianten in großen Mengen zu exprimieren, wurden zunächst eukaryontische COS-7 Zellen mit den Konstrukten pcDNA3-Perlucin Strep (Perlucin-R0, Perlucin-R5, Perlucin-R8) transfiziert. Der Transfektionserfolg wurde durch Immunfluoreszenz der Zellen und anschließend mittels Westernblot- und SDS-PAGE-Analyse der Zellkulturüberstande und der Zelllysate auf exprimiertes rekombinantes Perlucin nachgewiesen.

3.6.1 Transiente Transfektion

COS-7 Zellen wurden transient mit pcDNA3-Perlucin (R0, R5 und R8) Strep transfiziert (Abbildung 11).

In allen transient transfizierten Zellkulturen (Abbildung 11) ist der geringe Transfektionserfolg erkennbar, obwohl zahlreiche Zellkerne sichtbar sind (Abbildung 11, rechts). Gut zu erkennen ist die Lokalisation des Signals in dem Bereich des endoplasmatischen Retikulum, was für den korrekten Transfer des Proteins über die Signalpeptidsequenz spricht (Abbildung 11, links).

In Abbildung 12 sind die Zellkulturüberstände von eukaryontischen COS-7 Zellen zu zwei Zeitpunkten, nach ca. 24 Stunden und nach ca. 48 Stunden, und das Zelllysat nach 48 Stunden im Westernblot dargestellt. Perlucin-R0 weist jeweils eine deutliche Bande bei ca. 17 kDa auf, wobei die Expression von Perlucin-R0 im Zellkulturüberstand am höchsten zu sein scheint. Perlucin-R5 und Perlucin-R8 zeigen nach 24 Stunden und nach 48 Stunden ein sehr schwaches Signal, bei 20 kDa für Perlucin-R5 und bei 25 kDa für Perlucin-R8. Wobei die Signale von Perlucin-R5 und Perlucin-R8 aus dem Zelllysat der COS-7 Zellen sehr prominent erkennbar sind.

Die rekombinanten Proteine waren zwar in der Immunfluoreszenz (Abbildung 11) und im Westernblot der Zellkulturüberstände (Abbildung 12) nachweisbar, aber die Aufreinigung der Proteine über den C-terminalen Strep-Tag aus dem Zellkulturüberstand führte nicht zu Erträgen, die durch eine SDS-PAGE darstellbar waren.

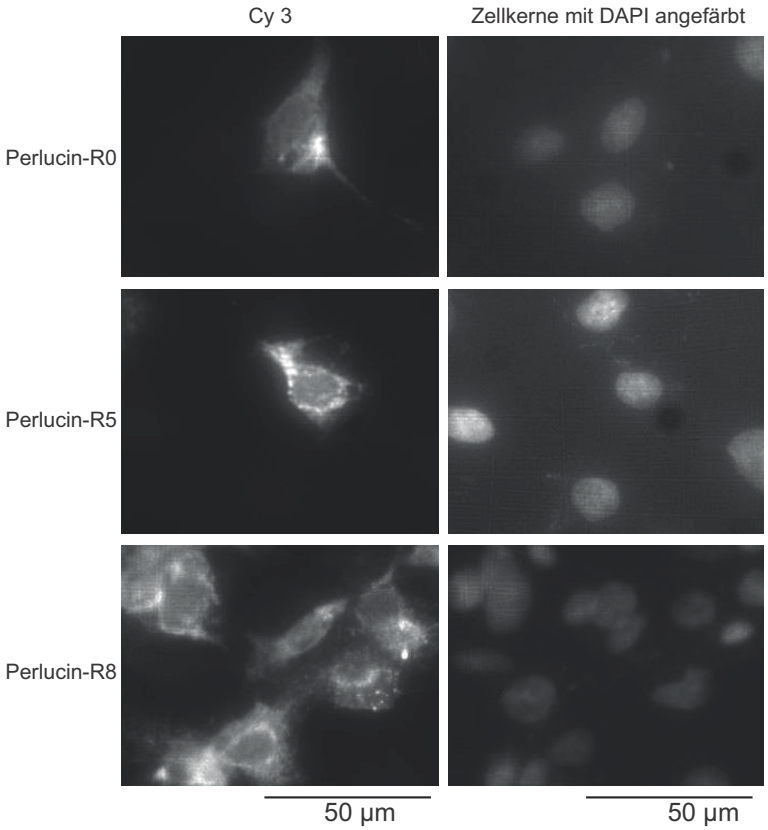


Abbildung 11: Immunfluoreszenz von transient transfizierten COS-7 Zellen und Expression von Perlucin-R0, Perlucin-R5 und Perlucin-R8.
Linke Seite: Immunologischer Nachweis über einen Schaf anti-Strep-Tag Antikörper und über einen Cy3 gelabelten sekundären Antikörpers gegen Schaf IgG (H+L). Rechts: Nachweis der Zellkerne durch DAPI.

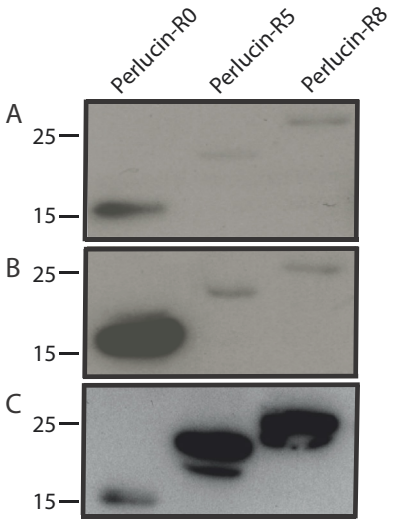


Abbildung 12: Westernblot von transient transfizierten COS-7 Zellen und Expression von Perlucin-R0, Perlucin-R5 und Perlucin-R8.
Dargestellt sind Westernblots von Zellkulturüberständen (A und B) und Zelllysaten (C) von COS-7 Zellen, die mit den Plasmiden pcDNA3 Perlucin (Perlucin-R0, Perlucin-R5, Perlucin-R8) transient transfiziert wurden. Die Zellkulturüberstände sind zu zwei Zeitpunkten genommen worden: A: Nach ca. 24 Stunden und B nach ca. 48 Stunden. Das Zelllysat (C) wurde nach ca. 48 Stunden genommen. Perlucin-R0 zeigt bei ca. 17 kDa ein Signal, Perlucin-R5 bei ca. 20 kDa zwei Banden und Perlucin-R8 ein Signal bei ca. 25 kDa. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE in 12 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Immunologische Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen Schaf anti-Strep-Tag Antikörper und einem polyklonalen sekundären Esel anti-Schaf (POD) IgG (H+L) Antikörper und wurde über Chemilumineszenz bei einer Expositionszeit von 10 Minuten auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

3.6.2 Stabile Transfektion der Perlucin Spleißvarianten

Zur Steigerung des Ertrages des rekombinanten Proteins wurden CHO LecI Zellen mit pDEF Perlucin-Strep bzw. mit pDEF SNAP-Strep-Perlucin stabil transfiziert. Die rekombinanten Perlucine waren zwar in der Immunfluoreszenz (Abbildung 13) und im Westernblot (Abbildung 14) nachweisbar, aber eine Aufreinigung des Proteins über den C-terminalen Strep-Tag aus dem Zellkulturüberstand war nicht möglich.

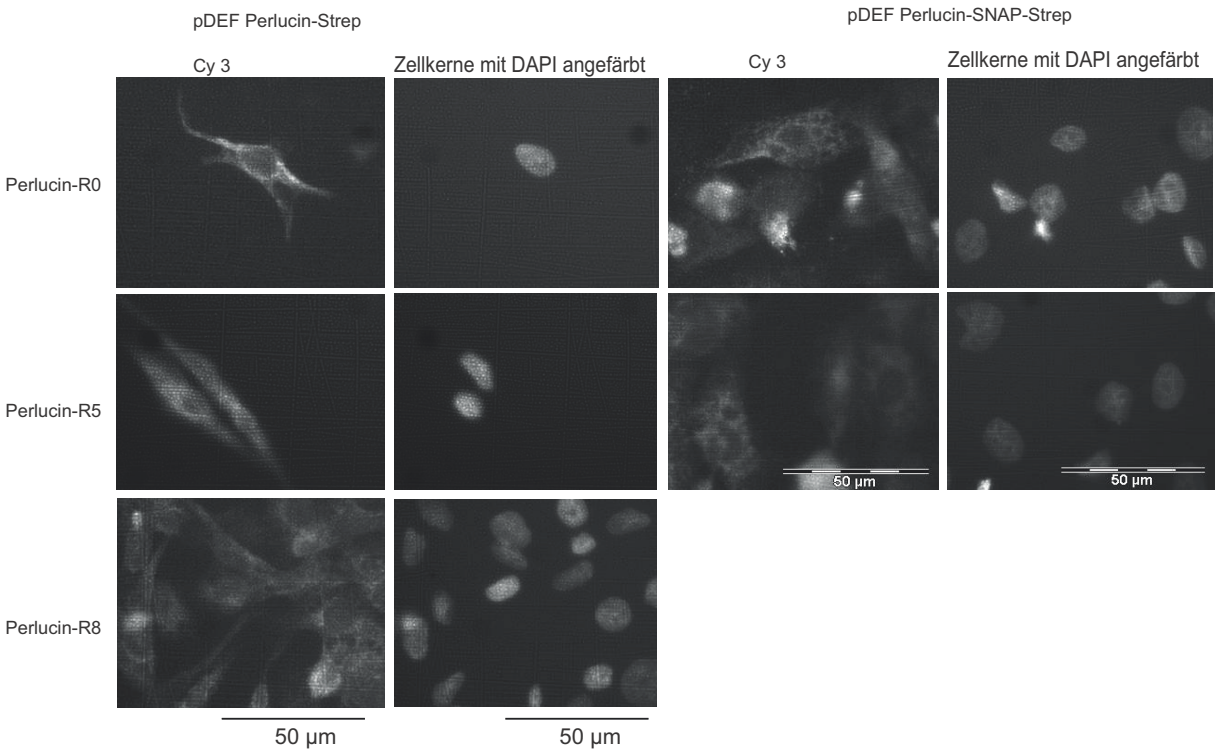


Abbildung 13: Immunfluoreszenz der stabile transfizierten CHO LecI Zellen mit pDEF Perlucin-Strep, bzw. mit pDEF SNAP-Strep-Perlucin.
Der Immunologischen Nachweise erfolgten über einen polyklonalen Schaf anti-Strep-Tag Antikörper und einen Cy3-gelabelten sekundären Esel anti-Schaf IgG (H+L) Antikörper. Die Zellkerne wurden durch DAPI sichtbar gemacht

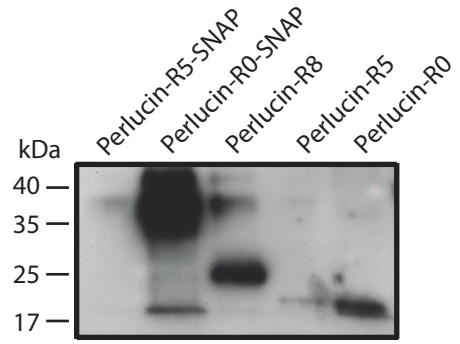


Abbildung 14: Westernblot vom Zellkulturüberstand stabil transfizierte CHO LecI Zellen und pDEF Perlucin-Strep bzw. mit pDEF SNAP-Strep-Perlucin.
Die Zellkulturüberstände wurden in 12 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen Schaf anti-Strep-Tag Antikörper und einem polyklonalen sekundären Esel anti-Schaf (POD) IgG (H+L) Antikörper und wurde über Chemilumineszenz bei einer Expositionszeit von 10 Minuten auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

3.7 Präzipitation von rekombinanten Perlucin

Perlucin ist ein Protein, welches vom Mantelepithel in den Extrapallialraum der Schnecke sezerniert wird. Die ionischen Zusammensetzungen des Extrapallialraums entsprechen in

etwa denen von Meerwasser, sie haben u.a. beide in etwa eine NaCl Konzentration von 500 mM. Das native aus der Schale von *H. laevigata* aufgereinigte Perlucin liegt in Citratpuffer, pH 4,8 vor [2].

Rekombinantes Perlucin-R0, aufgereinigt über den N-terminalen Strep-Tag, wurde hinsichtlich seiner Präzipitationseigenschaften in beiden Puffersystemen getestet. Es wurden jeweils 150 ng/µl Protein in 50 µl Citratpuffer bzw. in 50 µl mit 500 mM über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden 10 µl Proteinlösung abgenommen und auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 15). Der „Auftrag" entspricht dem Protein vor der Inkubation bei 4 °C über Nacht, der „Überstand" (oberen 10 µl) und „Pellet" (unteren 10 µl) (siehe Material und Methoden 2.22) dem nach der Inkubation. Deutlich zu erkennen ist im Citratpuffer und in Citratpuffer mit 500 mM NaCl die Oligomerisierung von Perlucin-R0. Es bildeten sich wahrscheinliche Dimere bei ca. 37 kDa und Trimere bei ca. 55 kDa. Außerdem lässt sich das Protein in beiden Lösungen im „Pellet" durch Zentrifugation anreichern. Perlucin-R0 scheint sich im Citratpuffer mit 500 mM NaCl im „Pellet" weniger anzureichern.

Um das Puffersystem, in dem das rekombinante Perlucin inkubiert wurde, dem NaCl-gehalt von Meerwasser anzugleichen, wurde in den folgenden Versuchen eine NaCl Konzentration von 500 mM genutzt.

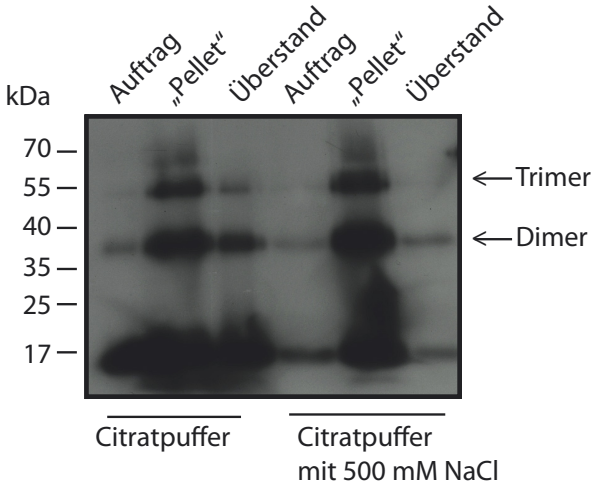


Abbildung 15: Präzipitation von Perlucin-R0 durch Zentrifugation.
Jeweils 150 ng Perlucin-R0 lagen in Citratpuffer und Citratpuffer mit 500 mM NaCl vor. Nach einer Inkubation über Nacht konnte Perlucin-R0 im Pellet durch Zentrifugation angereichert werden. Zudem sind hier deutliche Oligomere, wahrscheinlich Di- und Trimere zu erkennen.
Die Proben wurden mittels SDS-PAGE in 12 %igem Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der immunologische Nachweis erfolgte durch einen polyklonalen Schaf anti-Strep-Tag Antikörper und einem sekundären polyklonalen Esel anti-Schaf (POD) IgG (H + L) und über Chemilumineszenz bei einer Expositionszeit von 5 Minuten auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

3.8 Koexpression der Perlucin Spleißvarianten

Das native Perlucin aus der Schale von *H. laevigata* aufgereinigt zeigt ein heterogenes Bild in der SDS-PAGE mit Banden bei 17 kDa 20kDa und 25 kDa (Abbildung 8). Um mögliche Effekte der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Spleißvarianten zu untersuchen, wurden die Varianten Perlucin-R0, R5 und R8 in COS-7 Zellen koexprimiert.

Mittels SDS-PAGE wurden die Zellkulturüberstände und die Zelllysate aus Einzel- und Ko-Transfektionen unter nicht reduzierenden (–DTT) und reduzierenden Bedingungen (+DTT) aufgetragen und immunologisch durch Westernblot mit Antikörpern gegen den Strep-Tag sichtbar gemacht (Abbildung 16).

In den Zellkulturüberständen unter reduzierenden Bedingungen (+DTT) sind jeweils die einzelnen Banden, bei den zu erwartenden molekularen Massen der rekombinanten Proteine zu erkennen (siehe Abbildung 16, oben rechts). Im Gegensatz dazu zeigen die Zellkulturüberstände unter nicht reduzierenden Bedingungen (–DTT) Doppelbanden bei Perlucin-R5 und schwach bei Perlucin-R8 (siehe Abbildung 16, oben links), wobei jedoch das prominentere Signal dieser Doppelbanden von Perlucin-R5 und Perlucin-R8 im Zelllysat detektiert wird (siehe Abbildung 16, unten links). Diese Doppelbanden sind offenbar nicht Reduktionsmittel-abhängig, weil sie auch in der Abbildung der reduzierten Proben des Zelllysates (+DTT) vorhanden sind (siehe Abbildung 16, unten rechts).

Im Zelllysat der nicht reduzierten Ansätze (–DTT) ist jeweils in den Proben mit Perlucin-R5 eine weitere Bande bei ca. 37 kDa zuerkennen, welche auf eine Dimerisierung von Perlucin-R5 hindeutet (siehe Abbildung 16, unten links). In der Koexpression von Perlucin-R5 mit Perlucin-R0 (Zelllysate, siehe Abbildung 16, unten links) ist eine deutliche Bande etwas unterhalb von 35 kDa und bei der Koexpression von Perlucin-R5 mit Perlucin-R8 ist eine deutliche Bande etwas oberhalb von 35 kDa zu erkennen. Interessanterweise sind diese Banden mit langsameren elektrophoretischen Laufverhalten abhängig vom Reduktionsmittel und sind nicht sichtbar unter reduzierenden Bedingungen (siehe Abbildung 16, Zelllysate, unten rechts). In den Einzeltransfektionen von Perlucin-R0 und Perlucin-R8 sind diese möglichen Homo- und/oder Hetero-Oligomere nicht detektierbar.

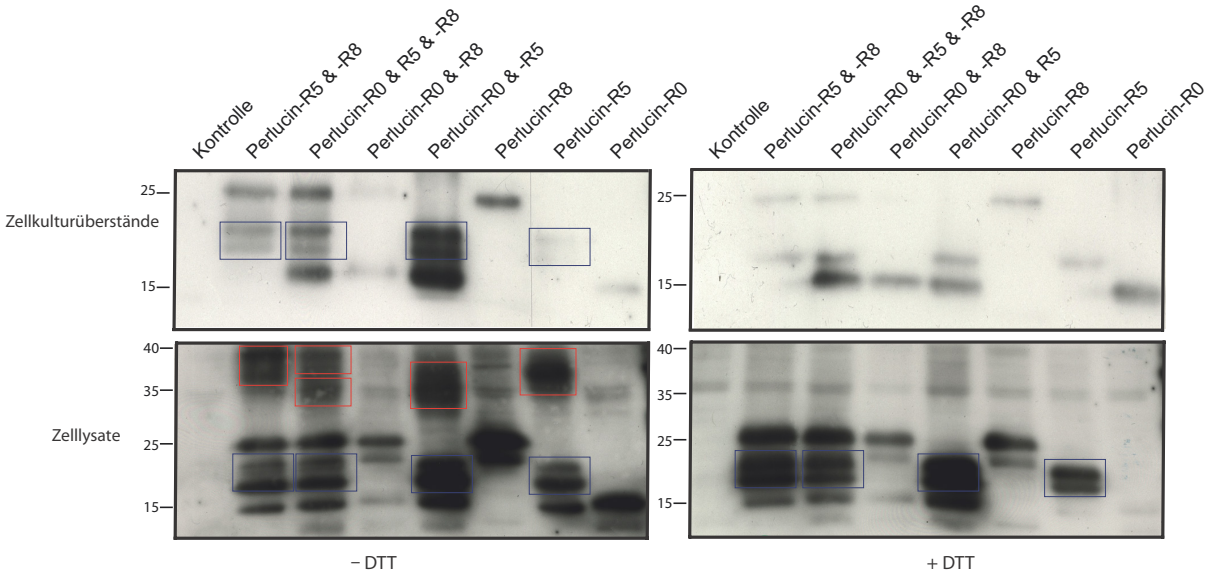


Abbildung 16: Einzel- und Koexpression der Perlucin Spleißvarianten R0, R5 und R8 in COS-7 Zellen.
In den oberen Westernblots sind die Zellkulturüberstände aufgetragen, in den unteren die Zelllysate. Auf der rechten Seite sind die Proben vor dem Auftrag auf die SDS-PAGE mit dem Reduktionsmittel DTT versetzt worden (+DTT). Perlucin-R5 und Perlucin-R8 weisen Doppelbanden (blau) auf, die nur im nicht reduzierten Zellkulturüberstand (–DTT) nachzuweisen sind. Außerdem bildet Perlucin-R5 Oligomere, wahrscheinlich sogar Heteromere mit Perlucin-R0 und Perlucin-R8 (rot).
Die Zellkulturüberstände wurden mit Aceton über Nacht präzipitiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE in 12 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet.
Der immunologische Nachweis erfolgte durch einen polyklonalen Schaf anti-Strep-Tag Antikörper und einem sekundären polyklonalen Esel anti-Schaf (POD) IgG (H+L) und über Chemilumineszenz bei einer Expositionszeit von 10 Minuten auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

3.9 Perlucin Expression in Bakterienzellen

Aufgrund der Tatsache, dass aus den eukaryontischen Expressionssystemen keine Proteinmengen generiert werden konnten, mit denen man die Perlucin-Spleißvarianten in Folgeexperimenten charakterisieren könnte, wurde ein Expressionsansatz in Bakterien etabliert. Die Spleißvarianten wurden im Expressionsvektor pETM-41 (EMBL) über die Schnittstellen *NcoI/NotI* kloniert und in dem *E. coli* Stamm Rosetta (DE3) placI über Nacht exprimiert. Die löslichen Proteine aus dem Bakterienlysat wurden über eine Doppel-Tag Tandem-Strategie, zunächst über den N-terminalen 6-Histidin-Tag mit Ni-NTA Agarose und anschließend über den C-terminalen Strep-Tag mit StrepTactin®-Sepharose, aufgereinigt (Abbildung 17). Das hochkonzentrierte Bakterienlysat wurde zunächst im *batch*-Verfahren zur Nickel-NTA Agarose gegeben und anschließend das Eluat über eine StrepTactin-Säule weiter aufgereinigt. Wie in Abbildung 17 und Abbildung 18 gut zu erkennen ist, liegt das resultierende MBP-Perlucin nach der StrepTactin-Aufreinigung hoch aufgereinigt vor. Die aufgereinigten, MBP-Perlucin Varianten wurden umgehend gegen den Puffer (100 mM

Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0) oder gegen Natriumcarbonat Puffer (20 mM $NaHCO_3$, 500 mM NaCl, pH 8,7) dialysiert. Nach der Aufkonzentration konnten Proteinmengen von bis zu 2 mg/ml gemessen werden (Abbildung 18).

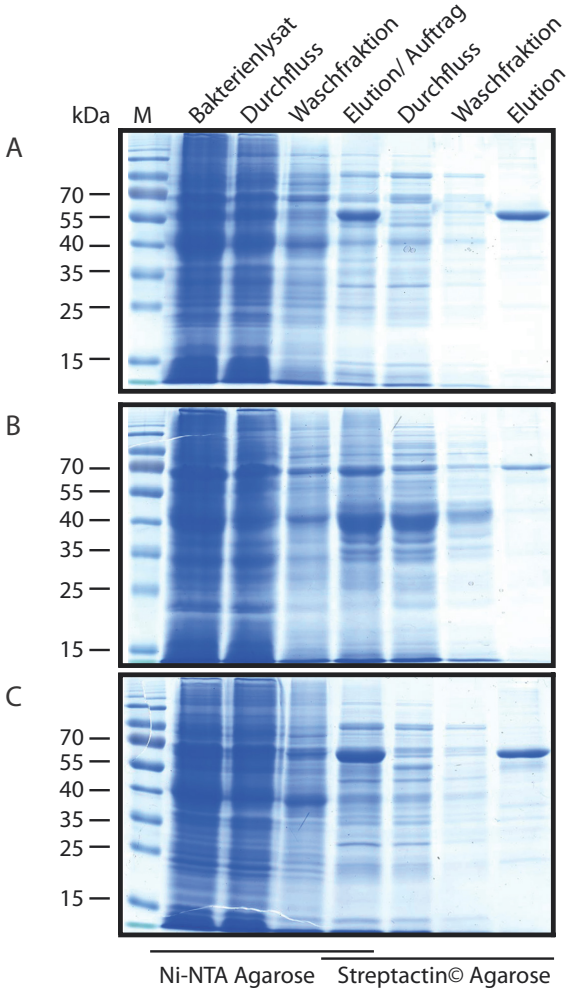


Abbildung 17: Darstellung der Tandem-Aufreinigung von MBP-Perlucin-R0 (A), MBP-Perlucin-R5 (B) und MBP-Perlucin-R8 (C).
Aufgetragen sind das hochkonzentrierte Bakterienlysat, der Durchfluss, die nicht an die Ni-NTA Agarose bindenden Proteine repräsentiert, Die Waschfraktion mit den Proteinen, die von den Ni-NTA Agarose durch Imidazol (10mM) Waschpuffer herunter gewaschen wurden, und die Proteine, die mittels 300 mM Imidazol von der Agarose eluiert werden konnten (Elution/Auftrag der StrepTactin-Säule). Die mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigte Proteinfraktion wurde auf eine StrepTactin-Säule gegeben (Elution/Auftrag und Durchfluss), mit Puffer gewaschen (Waschfraktion) und anschließend die Proteine mit StrepTactin-Elutionspuffer eluiert (Elution). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE auf 12 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

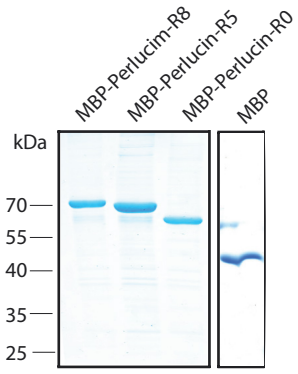


Abbildung 18: Darstellung der aufgereinigten MBP-Perlucin Fusionsproteine.
Die SDS-PAGE zeigt die bakteriell exprimierten Proteine, die nach der Tandem-Aufreinigung gegen 20mM $NaHCO_3$ umgepuffert wurden. Die exprimierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE auf 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

3.10 Der Einfluss von Perlucin Spleißvarianten auf die Präzipitation von $CaCO_3$

In den Studien von Weiss *et al.* [2] und Blank *et al.* [1] wurde der Einfluss des nativen Perlucins auf das Präzipitationsverhalten von $CaCO_3$ untersucht. Da es sich bei dem nativen Perlucin um ein Gemisch aus mehreren Proteinen handelt (Abbildung 8), lag es nahe, die rekombinanten Perlucin Spleißvarianten auf einen möglichen differentiellen Einfluss auf die Präzipitation von $CaCO_3$ zu untersuchen.

Hierzu wurden 250 µl 20 mM $NaHCO_3$ mit jeweils 100 µg Protein in ein Gefäß gegeben und die Präzipitation von $CaCO_3$ durch 250 µl 20 mM $CaCl_2$ induziert. Die Präzipitation wurde über die Veränderung des pH-Wertes ermittelt. Jede Spleißvariante wurde jeweils dreimal gemessen und der Mittelwert der Messungen (farbige Linien) und die Standardabweichungen (in gestricheltem Grau) abgebildet (Abbildung 19).

Die Messungen starteten jeweils bei einem pH von 8,7 und fielen dann ohne Zugabe von Protein auf einen pH-Wert zwischen 7,8 und 7,6 innerhalb der ersten 500 Sekunden ab (siehe Abbildung 19). Sobald 100 µg/ml BSA (Bovine Serum Albumine) oder MBP im System vorhanden waren, sank der pH-Wert zunächst auf pH 8,4 bei BSA bzw. auf pH 8,3 bei MBP und blieb dann konstant, d.h. die weitere Präzipitation von $CaCO_3$ wurde inhibiert (siehe Abbildung 19, A).

Bei der Zugabe von MBP-Perlucin in einer Konzentration von 100 µg/ml fiel der pH-Wert in Abhängigkeit von der eingesetzten Spleißvariante (Abbildung 19, B). Bei MBP-Perlucin-R0 (blaue Linie) fiel der pH-Wert zunächst auf pH 8,5, blieb konstant, bis er nach ca. 1000 Sekunden langsam auf pH 7,8 fiel. MBP-Perlucin-R5 (rote Linie) zeigte im Mittel eine

inhibierende Wirkung auf die Präzipitation von $CaCO_3$. Im Gegensatz dazu zeigte MBP-Perlucin-R8 im Mittel eine beschleunigende Wirkung auf die Präzipitation von $CaCO_3$ (Abbildung 19, B grüne Linie). Der Vergleich von MBP-Perlucin-R8 mit MBP-Perlucin-R0 verdeutlichte, dass der pH-Wert bei MBP-Perlucin-R8 kontinuierlich sank, bis er nach ca. 1000 Sekunden pH 7,8 erreicht hat. Bei MBP-Perlucin-R0 sank der pH-Wert nach der anfänglichen Absenkung zunächst nur langsam, um dann nach ca. 1000 Sekunden kontinuierlich zu sinken.

	Δ pH 0 bis 100 Sekunden	Δ pH 100 bis 500 Sekunden	Δ pH 500 bis 1500 Sekunden	Δ pH 1500 bis 3000 Sekunden
MBP-Perlucin-R0	0,17 ± 0,01	0,00 ± 0,02	0,28 ± 0,22	0,20 ± 0,18
MBP-Perlucin-R5	0,36 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,40 ± 0,01
MBP-Perlucin-R8	0,14 ± 0,01	0,26 ± 0,16	0,46 ± 0,23	0,05 ± 0,02
MBP	0,35 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	-0,01 ± 0,00
BSA	0,17 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,15 ± 0,26
ohne Protein	0,21 ± 0,02	0,78 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,01

Tabelle 5: Die Δ pH-Werte als Folge der $CaCO_3$-Präzipitation in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Perlucin Spleißvarianten im Vergleich zu den Kontrollen mit MBP und ohne Perlucin. Es ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Wiederholungen pro Ansatz angegeben.

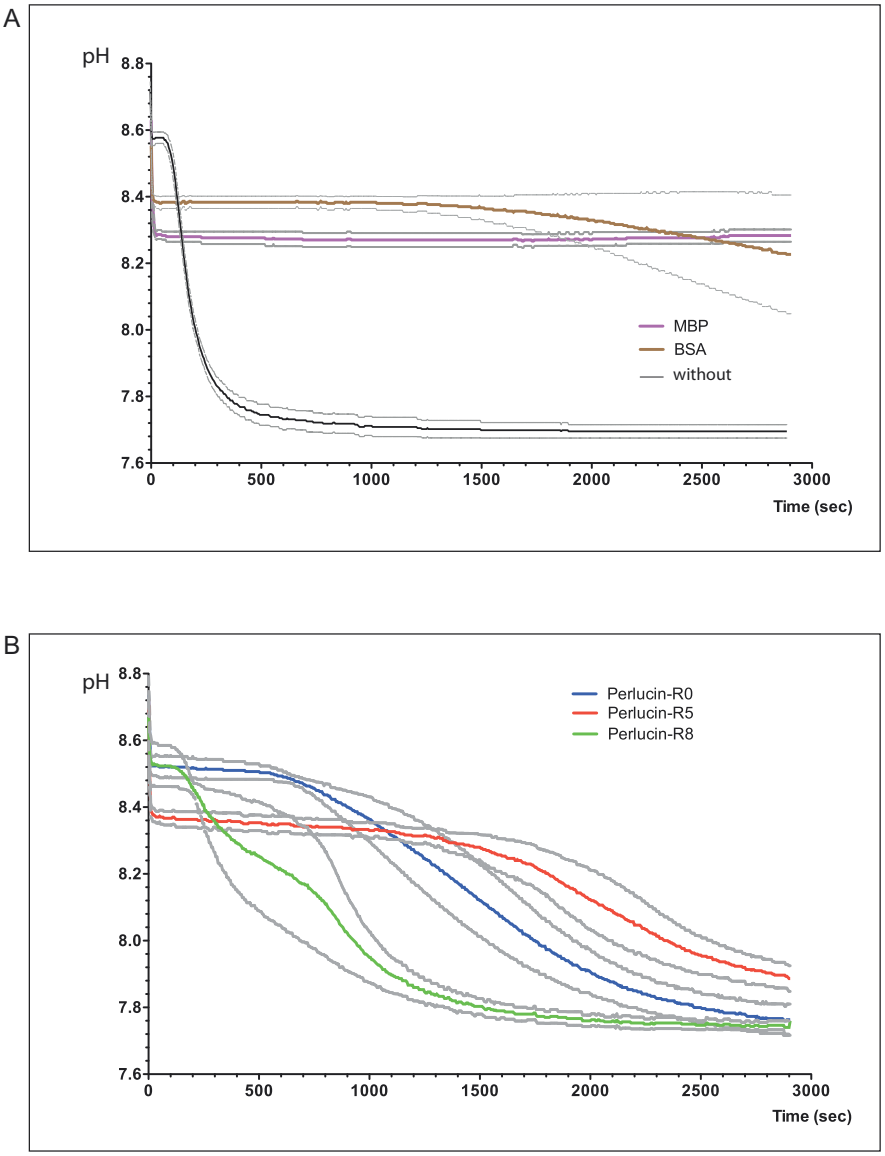


Abbildung 19: Die Präzipitation von $CaCO_3$, gezeigt durch die daraus resultierende pH-Wert Veränderung.
Es wurde der Mittelwert (farbige Linien) und die Standardabweichung (grau) von jeweils drei unabhängigen Wiederholungen aufgetragen. Die Reaktion startete nach Zugabe von 250 µl 20 mM $CaCl_2$ zu 250 µl 20 mM $NaHCO_3$ mit jeweils 500 mM NaCl. Es wurde alle 5 Sekunden ein Messpunkt genommen und über einen Gesamtzeitraum von 3000 Sekunden gemessen.
A zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von Proteinen (schwarz), mit Zugabe von 100 µg/ml MBP (lila) und 100 µg/ml BSA (braun).
B zeigt die Veränderung des pH Wertes nach Zugabe von jeweils 100 µg/ml MBP-Perlucin-R0 (blau), MBP-Perlucin-R5 (rot) und MBP-Perlucin-R8 (grün). Die grauen Linien unter und über den farbigen Linien geben die Standardabweichungen an.

Auffällig ist, dass 100 µg/ml MBP eine hemmende Wirkung auf die Präzipitation von $CaCO_3$ (Abbildung 19 A) ausübt. Im Gegensatz dazu zeigen 100 µg/ml MBP-Perlucin Spleißvarianten eine beschleunigende Wirkung auf die Präzipitation von $CaCO_3$ (Abbildung 19 B). Um diese Abhängigkeit der Perlucin-Konzentration auf die $CaCO_3$-Präzipitation

genauer zu untersuchen, wurde das Experiment so modifiziert, dass die absolute Proteinkonzentration immer jeweils 150 µg/ml beträgt (Abbildung 20). Unter diesen Bedingungen zeigen 50 µg/ml MBP-Perlucin-R8 mit 100 µg/ml MBP nur eine leichte Präzipitation von $CaCO_3$ (Abbildung 20, rote Linie). Bei 100 µg/ml MBP-Perlucin mit 50 µg/ml MBP startet die Präzipitation nach 2500 Sekunden, um dann auf einen pH-Wert von 7,8 zu sinken (Abbildung 20, grüne Linie). Werden ausschließlich 150 µg/ml MBP-Perlucin-R8 eingesetzt, sinkt der pH-Wert ab ca. 250 Sekunden sehr stark von pH 8,6 auf pH 7,8 (Abbildung 20, blaue Linie).

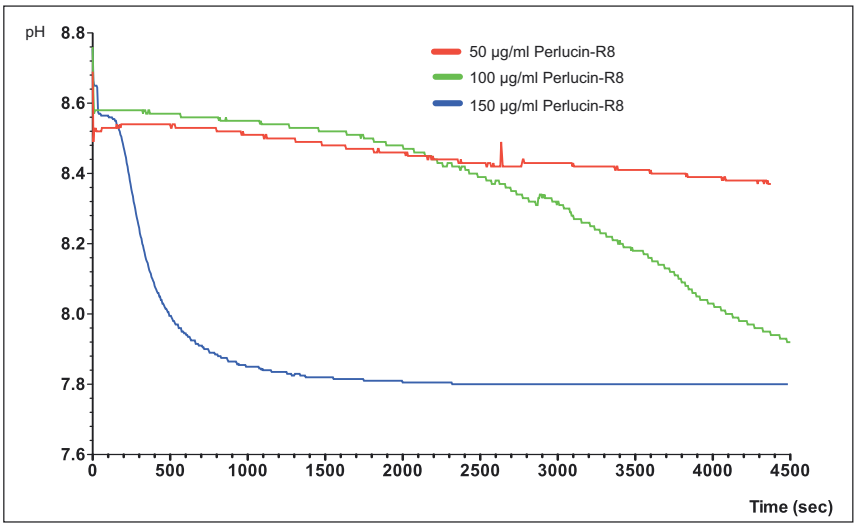


Abbildung 20: Präzipitation von $CaCO_3$ in Abhängigkeit von der Perlucinkonzentration.
Die Reaktion startete nach Zugabe von 250 µl 20 mM $CaCl_2$ zu 250 µl 20 mM $NaHCO_3$ mit jeweils 500 mM NaCl.
Es wurde alle 5 Sekunden ein Messwert genommen und über einen Gesamtzeitraum von 4500 Sekunden gemessen. Rote Linie: 100 µg/ml MBP + 50 µg/ml MBP-Perlucin-R8. Grüne Linie: 50 µg/ml MBP + 100 µg/ml MBP-Perlucin-R8. Blaue Linie: 150 µg/ml MBP-Perlucin-R8. Mit zunehmender Konzentration von Perlucin-R8 steigt die Geschwindigkeit der $CaCO_3$ -Präzipitation.

3.11 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von $CaCO_3$-Mineralen

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Perlucin in $CaCO_3$ inkorporiert werden kann [1, 86]. Wang *et al*. [72] zeigte, dass aus einer übersättigten $CaCO_3$-Lösung in Anwesenheit von MBP-Perlucin von *H. discus discus* abgerundete $CaCO_3$-Kristalle wuchsen.

Um den Einfluss der Perlucin Spleißvarianten auf das Wachstum von $CaCO_3$ zu eruieren, wurde eine Lösung von 20 mM $CaCO_3$ mit jeweils 100 µg Perlucin-Fusionsprotein auf einem Objektträger, vor Verunreinigungen geschützt, getrocknet. Nach der Trocknung wurden die

entstanden Präzipitate am Rasterelektronen Mikroskop Helios Fei am Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung IFAM (Bremen, Deutschland) abgebildet.

In der Abbildung 21 sind die gewachsenen $CaCO_3$-Minerale abgebildet. Auf der linken Seite ist jeweils die niedrigere Auflösung, auf der rechten Seite die jeweils höhere Auflösung abgebildet. Alle Minerale, die sich in Gegenwart der Perlucin Spleißvarianten gebildet haben, zeigten in den Rasterelektronenmikroskopischen (REM)-Aufnahmen mit baumartigen Ausläufern an den Ecken der Präzipitate. Die gebildeten Minerale erscheinen im REM sehr regelmäßige aufgebaut und die Form von Rhomboeder oder Skalenoeder (Sechs ungleichseitige Dreiecke oben und unten) [149] anzunehmen. Außerdem scheinen sich in den Mineralen Schichten gebildet zu haben (Abbildung 21).

Als Kontrolle diente auch hier MBP in $CaCO_3$. Die Minerale, die sich in der Gegenwart von MBP bildeten, weisen keine Baumstruktur, kein Schichtwachstum und kein regelmäßiges Mineralwachstum auf.

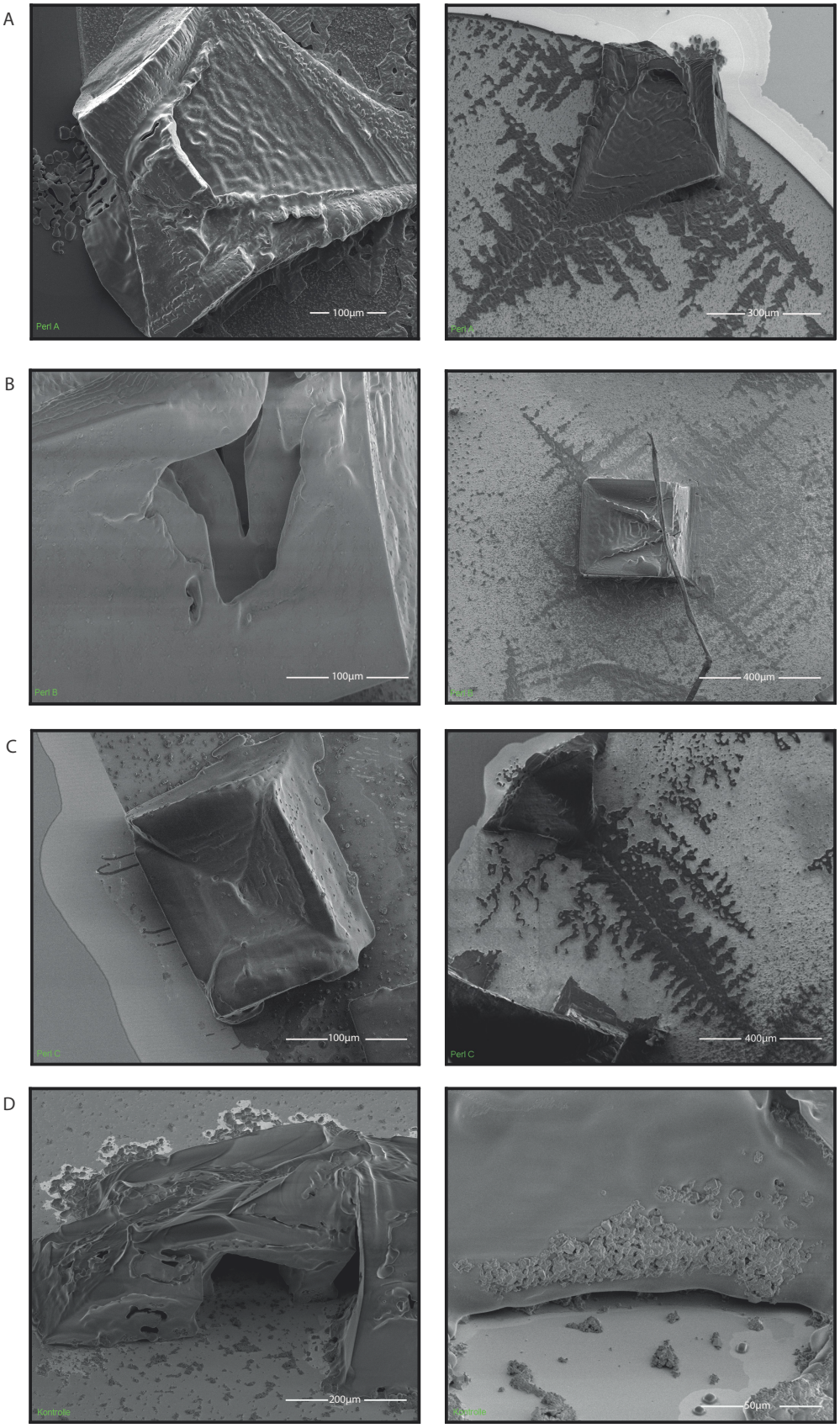


Abbildung 21: Darstellung von Rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen von $CaCO_3$-Mineralen, die in Gegenwart von MBP-Perlucin gewachsen sind.
Die Fusionsproteine lagen in 20 mM $CaCO_3$-Lösung in einer Konzentration von 100 µg/ml vor.
A zeigt die Minerale mit MBP-Perlucin-R0, B mit MBP-Perlucin-R5, C mit MBP-Perlucin-R8 und D zeigt die Kontrolle mit MBP, in jeweils gleicher Konzentration.

3.12 Dynamische Lichtstreuung

Innerhalb des gesamten Projektes trat immer wieder die Problematik auf, dass das rekombinante Perlucin, welches über einen längeren Zeitraum gelagert wurde, zu einer schnelleren $CaCO_3$-Präzipitation führte, als die Protein-Präparationen, die sofort frisch eingesetzt wurden. Dieser Umstand und die vorherige Beobachtung der Oligomerisierung der Perlucin Spleißvarianten (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16) warfen die Frage auf, ob es zu einer zeitabhängigen Bildung größerer Proteinkomplexe kommt. Um diese möglichen Proteinaggregate zu untersuchen, wurde der hydrodynamische Durchmesser der mit MBP-fusionierten Perlucin Spleißvarianten über DLS bestimmt. Mit dem Ziel, eine Zeitabhängigkeit nachzuweisen, wurden die Fusionsproteine für 1 Monat und 2 Monate in 20 mM $NaHCO_3$, 500 mM NaCl, pH 8,7 bei 4 °C gelagert. Als Kontrolle diente MBP unter den gleichen Pufferbedingungen wie die Spleißvarianten und 20 mM $CaCO_3$ ohne Protein (Tabelle 6).

Beide Kontrollen zeigten kein auf ein Aggregation-Ereignis hinweisendes Ergebnis (hydrodynamischer Durchmesser < 10 nm). Im Gegensatz dazu zeigten alle Perlucin-Spleißvarianten nach einem Monat Lagerung im Puffer zehnmal größere und nach zwei Monaten Lagerung bis zu 100-fach größere hydrodynamische Durchmesser als der theoretisch errechnete. MBP-Perlucin-R5 und MBP-Perlucin-R8, mit fünf bzw. acht *Repeats*, zeigten zudem eine bimodale Partikelverteilung und es konnten Durchmesser von bis zu 860 nm gemessen werden.

	1 Monat	2 Monate	nativ. theoretischer Durchmesser	denaturiert theoretischer Durchmesser
$CaCO_3$	< 10 nm			
MBP	< 10 nm	< 10 nm	2,7 nm	6,8 nm
MBP-Perlucin-R0	< 10 nm	45 nm	3,1 nm	8,8 nm
MBP-Perlucin-R5	130 nm	42 / 860 nm	3,2 nm	9,3 nm
MBP-Perlucin-R8	91 nm	49 / 760 nm	3,2 nm	9,4 nm

Tabelle 6: Der über DLS gemessene, zeitabhängige hydrodynamische Radius der MBP-Perlucin Fusionsproteine. Die Werte jeder Probe wurden über eine Stunde, fünfmal gemessen und gemittelt. Für die Perlucin Spleißvarianten Perlucin-R5 und Perlucin-R8 ergab sich nach zweimonatiger Lagerung eine bimodale Partikel Verteilung.

4. Diskussion

4.1 Perlucin Spleißvarianten

Eines der Proteine aus der Perlmuttschicht der australischen Abalone *Haliotis laevigata* ist Perlucin. Das aus der Schale von *H. laevigata* aufgereinigte native Perlucin zeigt in der SDS-PAGE ein sehr heterogenes Bild (Abbildung 8), mit distinkten Banden bei 26 kDa, bei ca. 20 kDa und bei ca. 15 kDa. In Studien von Blank *et al.* 2003 [1] und Weiss *et al.* [2] wurde diese Heterogenität in der SDS-PAGE des nativen Proteins ebenso gezeigt.

Eine Möglichkeit, multiple Bandenmuster bei der elektrophoretischen Auftrennung von Perlucin in der SDS-PAGE zu erklären, sind Proteinvarianten, die auf alternatives Spleißen zurückzuführen sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alternatives Spleißen durchaus einen Teil dieser Heterogenität erklären kann.

In dieser Arbeit wurden sieben neue Spleißvarianten des Perlmuttproteins Perlucin in der cDNA von *H. laevigata* identifiziert. Diese Varianten unterscheiden sich vor allem durch das Vorhandensein sowie durch die Anzahl der Wiederholungen eines zehn Aminosäuren langen Peptides am C-Terminus (Abbildung 5 und Abbildung 6). Drei der sieben neuen Spleißvarianten weisen ein anderes Signalpeptid auf.

In der cDNA-Sequenz haben alle Spleißvarianten ohne *Repeat* die gleiche 3'UTR, während alle Spleißvarianten mit *Repeat* die gleiche 3'UTR haben. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Perlucin-Varianten durch alternatives Spleißen entstanden sind. Alternatives Spleißen ist bisher für keine der biomineralisierenden Proteine aus den Mollusken bekannt. Es wird für Lustrin A [79], Shematrin-2 und MSI31 [23] diskutiert, aber bisher ist es nicht experimentell nachgewiesen worden.

Die Variante Perlucin-R0 ohne *Repeat*-Region am C-Terminus hat drei Aminosäureaustausche (Met89Iso, Val129Asp, Arg149Leu), die bei Perlucin-R02 und den anderen Perlucinen mit *Repeats* nicht gefunden wurden (Abbildung 5). Außerdem wurde in der MALDI-ToF MS ein Peptid mit diesen Aminosäurenaustauschen in einer Variante mit *Repeat* gefunden (Abbildung 5, 20 kDa). Diese Beobachtung deutet auf mindestens ein weiteres Allel hin und darauf, dass es weitere Varianten mit diesen Aminosäureaustauschen gibt. Diese Sequenz-Heterogenität wurde auch schon in der ursprünglich veröffentlichten Aminosäuresequenz von Perlucin beschrieben, in welcher an zwölf Positionen die Aminosäuren nicht eindeutig identifiziert wurden [3]. Eine solche Mikroheterogenität wurde auch für Lustrin A [79] aus der Perlmuttschicht von *H. rufescens* und bei N16 [63] aus der

Perlmuttschicht von *P. fucata* beschrieben.

Das *Repeat*-Peptid am C-Terminus wiederholt sich zwei-, drei-, fünf-, sechs- oder achtmal und möglicherweise gibt es mehr Varianten, die noch nicht identifiziert wurden. Schon bei der Sequenzierung des nativen Proteins zeigten sich Hinweise, dass sich das Peptid mehr als zweimal wiederholen könnte [3]. Die ursprüngliche Aminosäuresequenz wurde durch Edman-Abbau, bzw. durch MALDI-MS ermittelt [3], so dass potentielle Wiederholungen des *Repeat*-Peptides in Mehrzahl, schwierig oder gar nicht hätten identifiziert werden können.

Ein wichtiger Punkt war die Aufklärung der Frage, ob die hier neu identifizierten Spleißvarianten auch in der Schale von *H. laevigata* aufzufinden sind. Durch die MALDI-ToF-MS der ausgestochenen Proteinspots aus der 2D-Elektrophorese (Abbildung 8) wurden drei der sieben gefundenen Spleißvarianten in der Schale von *H. laevigata* nachgewiesen (Tabelle 3). Das Peptid DSLHANLQQMDSLHANLQQR-COOH findet sich nur in den neuen Spleißvarianten von Perlucin, jedoch nicht in der ursprünglichen Aminosäuresequenz [3]. Durch die LC-ESI MS ließ sich dieses Peptid in Proteinspots mit den molekularen Massen von 25 kDa und 20 kDa nachweisen. Es wurde jedoch nicht in den Proteinspots mit der molekularen Masse von 15 kDa gefunden. Interessanterweise wurde genau dieses Peptid in der ursprünglichen Aminosäuresequenz des nativen Proteins nicht gefunden [3]. Die Autoren folgerten jedoch aus ihren gewonnenen MALDI-MS Daten, dass es weitere Varianten von Perlucin, sowohl ohne *Repeat* als auch mit einem *Repeat* und / oder eine flexible Struktur der *Repeats*, in der Schale von *H. laevigata* geben könnte. Diese Annahmen werden durch die Identifizierung der Spleißvarianten in dieser Arbeit mit der unterschiedlichen Anzahl an *Repeats* und der MALDI-ToF-MS und LC-ESI MS Daten (Tabelle 3) bestätigt.

Das Vorhandensein von *Repeats* wird als ein Charakteristikum von biomineralisierenden Proteinen aus Mollusken beschrieben [23]. Diese *Repeats* können hintereinander arrangiert oder alternierend, wie bei Lustrin A [79] oder extrem kurz oder lang sein [23].

4.2 Repeat-Peptid

Die *Repeats* der hier gefundenen Perlucin Spleißvarianten mit zwei, drei, fünf, sechs oder acht Wiederholungen wurden bisher nicht in den Sequenzdatenbanken (GenBank, Swiss-Prot) weder als Aminosäuresequenz noch als DNA-Sequenz gefunden. Allerdings lassen die ersten Sequenzergebnisse aus der cDNA von *H. varia* (Abbildung 6) darauf schließen, dass mit einer ähnlichen Strategie wie für *H. laevigata* Perlucin (PCR mit degenerierten *Primern* aus cDNA) die Varianten mit *Repeats* auch in anderen Arten der *Haliotidae* oder anderen Mollusken

gefunden werden könnten. Dafür spricht auch die Annahme, dass Perlucin, ebenso wie Lustrin A [11] und Mucoperlin [46], ein evolutiv konserviertes Protein in der Schale der Mollusken ist [150]. In der Proteomstudie einer Schale der australischen Abalone *H. asinina* wurde außer Perlwapin keine weiteren bisher bekannten Proteine aus der Schale von *H. laevigata* und *H. rufescens* gefunden [70]. Im Gegensatz dazu wurden bei der Suche nach Perlucin und der *Haliotidae* in GenBank (NCBI) zwei EST's (Expressed Sequence Tags) von *H. asinina* entdeckt, die Perlucin-R0 ähnlich sind. Unklar ist jedoch bislang, inwieweit diese Perlucine in der Schalenbildung von *H. asinina* eine Rolle spielen.

Es gibt Hinweise, dass die Proteine, die an der Biomineralisation beteiligt sind, in chronologischer Abfolge exprimiert werden [151]. Jackson *et al.* [150] zeigten, dass 85 % der Sequenzen (EST) der während der Schalenbildung von *H. asinina* sezernierten Proteine noch unbekannt sind. Im Vergleich mit dem Sekretom aus *H. asinina* mit dem Genom aus der Meeresschnecke *Lottia scutum* zeigt sich, dass nur 19 % der sezernierten Proteine von *H. asinina* Orthologe zu Proteinen von *Lottia scutum* sind [150]. Es wird angenommen, dass ein komplexes Sekretom aus Proteinen an der Schalenbildung beteiligt ist, welches durch sich schnell evolvierende Gene kodiert wird [150]. Davon ausgehend ließe sich postulieren, dass die Perlucin-Spleißvarianten zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Schalenbildung oder des Schalenwachstums exprimiert und sezerniert werden. Wenn sich diese Gene, die für die biomineralisierenden Proteine kodieren, tatsächlich schnell verändern, könnte es sein, dass Perlucin aus anderen Arten der Abalone auch in veränderten Spleißvarianten exprimiert wird oder als Varianten die durch verschiedene Allele oder genetische Mutationen entstanden sind. Die Spleißvarianten von Perlucin mit den unterschiedlicher Anzahl der *Repeats* könnten jedoch eine evolutive Neuerung der Art *H. laevigata* sein, an deren Basis ein C-Typ Lektin ohne *Repeats* steht. Um dies abschließend beurteilen zu können, müsste das Transkriptom von *H. laevigata* mit dem von anderen Arten der *Haliotidae* verglichen werden. Einen ersten Hinweis darauf, dass es diese *Repeats* auch in anderen Arten der *Haliotidae* gibt, zeigen die ersten Sequenzergebnisse von *H. varia*. In der potentiellen Perlucin-Sequenz von *H. varia* wurde im 3'UTR, ein Bereich, der für die *Repeats* von *H. laevigata* kodierende DNA-Sequenz sehr ähnlich ist, identifiziert.

4.3 Phylogenetische Analysen

Viele Proteine in der Datenbank von GenBank (NCBI) wurden als Perlucine oder Perlucin-ähnliche benannt. Um diese sehr heterogene Gruppe von Proteinen näher zu betrachten, wurden phylogenetische Analysen mit den C-Typ Lektinen von *Haliotis spec.* durchgeführt

(Abbildung 9 und Abbildung 10), die in der Datenbank als Perlucin oder Perlucin-ähnlich ausgewiesen werden.

Der resultierende phylogenetische Baum (Abbildung 7) weist zwei Gruppen auf. Die potentiellen Perlucine der *Haliotidae* trennen sich klar von den anderen C-Typ Lektinen der Vertebraten und Invertebraten, zu denen C-Typ Lektine von Nematoden, Fische, Schlangen und Menschen gehören. Diese anderen C-Typ Lektine gruppieren sich dabei nicht ausschließlich nach ihrer Spezies, wie das bei den C-Typ Lektinen der *Haliotidae* zu beobachten ist.

Die C-Typ Lektine von *Haliotis spec*. wurden anhand des phylogenetischen Baumes in drei Gruppen eingeteilt: In Perlucine, Perlucin-ähnliche Proteine und C-Typ Lektine.

Die zwei Proteine HlaevPerl0 von *H. laevigata* und HddPerl5 von *H. discus discus*, für die eine Perlucinaktivität (Beschleunigung der $CaCO_3$-Präzipitation) bereits bestätigt wurde [1-3, 72] sind nahe verwandt mit den wahrscheinlichen Perlucinen von *H. asinina* (Hasi551, Hasi499) und *H. varia* (HvarPerl). Diese große Übereinstimmung legt nahe, dass diese Proteine von *H. asinina* (Hasi551, Hasi499) und *H. varia* (HvarPerl) Perlucin Orthologe sind und deshalb Perlucine genannt werden können.

Viele andere Gene von *H. discus discus* und *H. diversicolor* wurden in Datenbanken als Perlucine bezeichnet, aber nur drei von ihnen (Hmid1a1, HdivPerl5 und HddPerl3) teilen mit der Perlucin-Hauptgruppe den gemeinsamen Stamm in der phylogenetischen Analyse (Abbildung 9, blau) und werden deshalb als Perlucin-ähnliche benannt.

Die anderen Proteine gruppieren sich zusammen in einem eigenen Ast. Sie sind phylogenetisch weiter entfernt voneinander. Voraussichtlich zeigen sie keine Perlucin-Aktivität, wie die Beschleunigung der $CaCO_3$-Präzipitation und sind vermutlich andere C-Typ Lektine der Gattung *Haliotis*. Die endgültige Zuordnung zu den Gruppen, wie sie in Abbildung 9 vorgenommen wurde, muss experimentell noch bestätigt werden.

Setzt man nur die durch phylogenetische Analyse bestimmten potentiellen Perlucine (Abbildung 9, rosa) mit den verschiedenen Gruppen der C-Typ Lektine in eine phylogenetische Beziehung, zeigt sich, dass diese 5er Gruppe der Perlucine der Gruppe der Collectine [152] und der Tetranektin-Familie [153] zugeordnet werden kann (Abbildung 10). Ob diese Zuordnung verifiziert werden kann, muss durch weitere Analysen geklärt werden, da die Gruppeneinteilung der C-Typ Lektine ursprünglich eine Einteilung für C-Typ Lektine der Vertebraten ist [96].

Wenn mit DELTA BLAST [147, 148] oder mit CDD [146] von NCBI die Sequenzdatenbank nach den einzelnen Proteinen durchsucht wird, ergibt sich eine andere als die durch den

phylogenetischen Baum errechnete Zuordnung zu den C-Typ Lektin Gruppen.

CDD (Conserved Domain Database) ist ein Teil der NCBI Entrez und vereinigt eine Suche nach konservierten Domänen, 3D Strukturen und Literaturangaben [146]. DELTA BLAST durchsucht eine Datensatz mit vorkonstruierten *positions specific Score matrix* (PSSM), bevor es eine Sequenz Datenbank durchsucht [147]. Die Einteilung mit DELTA BLAST von Perlucin-R0 von *H. laevigata* und den beiden Proteinen von *H. asinina* in die Gruppe 17, der C-Typ Lektine, ist eher unwahrscheinlich. In dieser Gruppe werden Proteoglykane nach ihrer Domänenstruktur eingeordnet, die weder die Ca^{2+}-bindenden Aminosäuren noch strukturell die lange Schleife (*long loop)* haben [96, 154]. Für Perlucin von *H. laevigata* ist aber eine Ca^{2+}-abhängige Zuckerbindungsaktivität gezeigt worden [3].

Die Gruppeneinteilung der C-Typ Lektine basiert auf phylogenetischen Beziehungen oder Domänenarchitekturen von Proteinen mit einer CTLD [96]. Ursprünglich wurden alle löslichen Ein-Domänen C-Typ Lektine in die Gruppe VII zusammengefasst, obwohl diese Gruppe phylogenetisch heterogen ist, funktionell sehr divers erscheint und sowohl Proteine von Invertebraten als auch von Vertebraten vereinigt [96]. Diese heterogene Gruppe wurde daher in mehrere verschiedene Gruppen eingeteilt, VII Lithostatine, IX Tetranektin-Familie und XII (EMBP) [96]. Perlucin wird in der phylogenetischen Analyse (Abbildung 10) zu der Gruppe IX, der Tetranektin-Familie, zugeordnet. Die Tetranektin-Familie sind lösliche Proteine mit einer langen N-terminalen α-Helix Domäne, die in die *Coiled-coil* Bildung involviert ist [96].

Die Suche mit CDD ergibt für die Perlucine eine Einteilung zu den DC-SIGN (Tabelle 4), einer Untergruppe der Gruppe II (Asialoglycoproteinrezeptor und DC Rezeptoren) [96]. Diese Gruppe hat eine charakteristische Domänenarchitektur mit einem cytoplasmatischen Ende, einer Transmembrandomäne und einer extrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist in die Oligomerisierung involviert [96]. Keine der Perlucine hat eine solche Domänenarchitektur, so dass eine Zuordnung zu den DC-SIGN nicht sinnvoll erscheint.

Beide phylogenetischen Bäume (Abbildung 9 und Abbildung 10) entsprechen einer Studie, in der die Domänenorganisation von *Drosophila* Proteinen mit einer CTLD untersucht wurden [95]. Diese Studie zeigt, dass die Domänenorganisation der *Drosophila* Proteine unterschiedlich zu der von Säugetieren und von *Caenorhabditis elegans* ist [95]. Zudem weisen die Drosophila C-Typ Lektin Sequenzen untereinander eine größere Ähnlichkeit auf, als zu denen von *C. elegans* oder von Säugetieren [90]. Dies zeigte sich in beiden phylogenetischen Analysen dieser Arbeit, in denen sich die Sequenzen von *Haliotis spec*. untereinander ähnlicher sind (Abbildung 9 und Abbildung 10). Die in dieser Arbeit als

Perlucin definierten Proteine lassen sich aber dennoch zu den C-Typ Lektin Gruppen zuordnen (Abbildung 10). Dieses Phänomen beschreiben auch Dodd *et al.* [90]; sie zeigen, dass die potentiellen Galactose- und Mannose-bindenden C-Typ CRD's (*Carbohydrate recognition domains*) verschiedener Spezies in ihrer Gesamtproteinsequenz untereinander verschiedener sind, als innerhalb ihrer eigenen Spezies [90]. Dies legt den Schluss nahe, dass die Zucker-bindende Aktivität sich evolutionär unabhängig voneinander entwickelt haben muss [90]. Eine Gruppeneinteilung von *Haliotis spec*. zu den bisher bestehenden C-Typ Lektin Gruppen erscheint daher schwierig. Sinnvoller wäre es die Perlucine und verwandte Proteine (Abbildung 9) in eine eigene Gruppe der C-Typ Lektine, den Perlucinen, einzuordnen. Daraus würde sich ergeben, dass die Bezeichnungen in den Datenbanken für Perlucin-ähnliche Proteine annähernd zutreffend wären.

4.4 Posttranslationale Modifikation

Eine weitere Möglichkeit, das heterogene Erscheinungsbild des nativen Perlucins in der SDS-PAGE zu erklären, sind posttranslationale Modifikationen.

4.4.1 Glykosylierung

In der Aminosäuresequenz des nativen Perlucins wurde ein Konsensus-Motiv für *N*-Glykosylierung erkannt [3].

Die in dieser Arbeit gewonnenen MALDI-Tof-MS Daten weisen darauf hin, dass auch nicht-glykosyliertes Perlucin existiert, da in Proteinspot 4 das dazu gehörende Peptid identifiziert wurde (20 kDa, Abbildung 8 und Abbildung 5). Im Umkehrschluss heißt dies nicht, dass das glykosylierte Perlucin nicht existiert. Die Glykanstruktur der Glykoproteine von *Haliotis spec.* ist bisher nicht bekannt, so dass die molekularen Massen der dazugehörenden Glykopeptide nicht vorhergesagt werden kann und deshalb in der MALDI-Tof MS nicht gefunden werden konnte. In einer statistischen Studie zeigte sich, dass bei den meisten Proteinen, die ein *N*-Glykosylierungsmotiv ASN-X-Thr/Ser-Y haben und nicht-glykosyliert sind, sich das Motiv eher am C-Terminus des Proteins befindet und sich anstelle des X oder Y ein Prolin nachweisen lässt [155]. Perlucin hat weder das Glykosylierungsmotiv am C-Terminus noch hat es ein Prolin innerhalb des Motivs.

4.4.2 Phoshorylierung

Eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation ist die Phosphorylierung. Bei Orchestin, einem Protein aus der löslichen Matrix der Calciumlagerstrukturen von

Crustacaeen, beeinflusst die Phosphorylierung des Proteins die Calciumbindung [156]. Das native Perlucin zeigt in der 2D Elektrophorese ein sehr heterogenes Bild entlang des pH-Gradienten (Abbildung 8). Dieses heterogene Bild der weiten Verteilung entlang des pH-Gradienten könnte durch Phosphorylierung erklärt werden. Die durch NetPhos [144] vorhergesagten Serin-Phosphorylierungen unterstützen diese Annahme. Für Perlucin-R8 ergeben sich nach der Vorhersage sechs potentielle Phosphorylierungsstellen in der *Repeat*-Region. Da Perlucin ein sekretiertes Protein ist und eine potentielle *N*-Glykosylierungsstelle hat, müsste Perlucin im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat phosphoryliert werden. Beispiele für Proteinkinasen, die nicht im Zelllysat lokalisiert sind, wurden in Diatomeen und im Menschen gefunden. In Diatomeen wurde eine Proteinkinase im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, die mit der Phosphorylierung von sekretorischen Proteinen, welche in der Biomineralisation der SiO_2–Zellwände eine Rolle spielen, in Zusammenhang gebracht werden kann [157]. Aus *Homo sapiens* ist eine Proteinkinase aus dem Golgi-Apparat bekannt [158], die eine Rolle in der Phosphorylierung von biomineralisierenden Proteinen von Knochen spielt. In der Gegenwart von Caseinkinase-Inhibitoren wird die Dentin Mineralisation unterbunden [159]. Daraus wird geschlossen, dass die posttranslationale Phosphorylierung von Nicht-Collagen-Proteinen zumindest für die Mineralisation von Calciumphosphat essentiell ist [160]. Daher liegt es nahe, dass die potentielle Phosphorylierung von Perlucin auch wichtig in der Mineralisation von Perlmutt bei *H. laevigata* ist. Diese Vermutung müsste allerdings in weiterführenden Experimenten verifiziert wrden.

4.5 $CaCO_3$ -Präzipitation

Eine wichtige Funktion von Perlucin ist die Beschleunigung der $CaCO_3$-Präzipitation [1, 2, 72, 86]. Diese für die Biomineralisation wichtige Funktion, scheint durch die in dieser Arbeit neu identifizierten Spleißvarianten moduliert zu werden (Abbildung 19). Dabei führt *H. laevigata* Perlucin-R8 zu der deutlichsten und schnellsten Präzipitation von $CaCO_3$ (Abbildung 19). Perlucin-R8 wirkt zudem konzentrationsabhängig auf die Präzipitation von $CaCO_3$ (Abbildung 20). In der Studie von Weiss *et al*. [2] wirkt natives Perlucin, das natürlicherweise heterogen ist und in der SDS-PAGE Banden bei 17 kDa, 20 kDa und bei 26 kDa aufweist, beschleunigend auf die Präzipitation von $CaCO_3$ [2]. Dieses Bandenmuster in der SDS-PAGE könnte den neuen Spleißvarianten Perlucin-R0, Perlucin-R5 und Perlucin-R8, entsprechen. Perlucin 5 von *H. discus discus* (ohne *Repeats*) fusioniert mit MBP beschleunigt die Präzipitation von $CaCO_3$, in der gleichen Weise wie Perlucin-R0 aus dieser

Arbeit [72]. Im Gegensatz dazu zeigt Perlucin (mit zwei *Repeats*) fusioniert mit GFP keine beschleunigende Wirkung auf die Präzipitation von $CaCO_3$ im Vergleich mit dem Kontrollprotein Concanavalin A [86]. Außerdem konnte in der Studie von Weber *et al.* [86] gezeigt werden, dass eine Präzipitation verhindert wird, wenn Perlucin (mit zwei *Repeats*) fusioniert mit GFP in einer $CaCl_2$-Lösung vorlag. Die Perlucin-Spleißvarianten sind sogar in der Lage, die stark stabilisierende Wirkung des Proteins MBP in der Fusion des bakteriell exprimierten MBP-Perlucin zu unterdrücken. Im Gegensatz zu Perlucin scheinen andere Proteine eine stabilisierende Wirkung auf eine übersättigende $CaCO_3$-Lösung zu haben, wie hier für MBP und BSA gezeigt wurde (Abbildung 19). Diese Stabilisierung einer übersättigten $CaCO_3$-Lösung durch BSA zeigt auch Heinemann *et al.* [136] auf. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die Gesamtproteinfraktion aus der organischen Matrix inhibierend auf Präzipitation von $CaCO_3$ wirkt. Heinemann *et al.* [136] weisen dieses mit der Gesamtproteinfraktion aus der Schale von *H. laevigata* nach, Wheeler *et al.* [137, 161] mit der aus der Schale der Auster *Crassostrea virginica*.

Elhadj *et al.* [162] zeigen, dass Asparaginsäure-reiche Peptide in Abhängigkeit ihrer Konzentration, sich sowohl inhibierend als auch beschleunigend auf die Präzipitation von $CaCO_3$ auswirken. Geringe Konzentrationen dieser Asparaginsäure-reichen Peptide führten zu einem beschleunigenden, hohe Konzentrationen führten zu einem inhibierenden Effekt auf die $CaCO_3$-Präzipitation [162]. Mit steigender Konzentration dieser Peptide erhöht sich das Maß der negativen Nettoladung und der Hydrophilie. Den stabilisierenden Effekt auf die übersättigte $CaCO_3$-Lösung führen Elhadj *et al.* [163] darauf zurück, dass sich die sauren Peptide an die Kristallstufen vom $CaCO_3$ lagern und auf diese Weise das Wachstum inhibieren [163]. Der stabilisierende Effekt von MBP oder BSA auf die übersättigende $CaCO_3$-Lösung könnte auf dem gleichen Mechanismus beruhen. Sie können als ein Hinweis darauf gewertet werden, dass sich hohe Peptid- bzw. Protein-Konzentrationen generell inhibierend auf die Präzipitation von $CaCO_3$ auswirken können.

Es könnte nun die These aufgestellt werden, dass die Balance zwischen Kristallisation-inhibierenden und Kristallisation-beschleunigenden Matrix-Proteinen, wie Perlucin, das Wachstum von Perlmutt bestimmt und wesentlich beeinflusst. Aus der Beobachtung, dass die hier gefunden Spleißvarianten von Perlucin die Beschleunigung der Kristallisation von $CaCO_3$ in unterschiedlichen Raten beeinflussen, kann gefolgert werden, dass die *Repeats* eine große Rolle in der Feinabstimmung bei der Bildung von Perlmutt spielen könnten.

4.6 Aggregation

Es ist besonders interessant, dass sich die Anzahl der *Repeats*, auf die Bildung von großen Protein-Aggregaten von bis fast 1 µm auswirkt (Tabelle 6). So dass daraus gefolgert werden kann, dass die Bildung dieser großen Protein-Aggregate als Nukleationskeim in der Schale dienen könnten.

Blank *et al.* [1] zeigen in einer SDS-PAGE aus einer heterogenen Perlucin-Probe, dass es neben den Banden bei 17 kDa, 20 kDa und 26 kDa zusätzliche eine Bande bei 34 kDa gibt. Sie schlossen auf Dimerisierung. Das elektrophoretische Laufverhalten der Bande bei 34 kDa stimmt mit dem überein, das in der vorliegenden Arbeit bei der Dimerisierung von rekombinanten Perlcuin-R0 detektiert wurde (Abbildung 15). Rekombinantes Perlucin-R0 oligomerisiert zu Dimeren, die in Gegenwart von SDS und DTT stabil sind. Darüber hinaus treten Banden auf, die für eine Trimerisierung des Proteins sprechen, die ebenfalls durch Zugabe von DTT nicht in die monomeren Bestandteile aufgelöst werden können. Eine Möglichkeit, die Stabilität dieser Multimere unter reduzierenden SDS-PAGE Bedingungen zu erklären, sind kovalente Bindungen zwischen Tyrosin-Resten (Dityrosinbrücken), die durch Cu^{2+} induziert werden könnten [164]. Eine andere mögliche Erklärung wäre die Bindung von Cystein und Methionin, die sehr stabil sein kann [165].

Wenn die Perlucin Spleißvarianten in eukaryontischen COS-7 Zellen ko-exprimiert werden (Abbildung 16), zeigt sich eine besondere Eigenschaft von Perlucin-R5. Perlucin-R5 ist in der Lage sowohl Dimere als auch Heteromere mit Perlucin-R8 und Perlucin-R0 zu bilden. Diese Di- und Heteromere verbleiben innerhalb der Zelle, sie werden nicht sezerniert. Im Gegensatz zu den Perlucin-R0 Multimeren sind die Perlucin-R5-Multimere Reduktionsmittel-empfindlich, d.h. sie sind wahrscheinlich über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Abbildung 16). Ein Beispiel für die Bindung über Disulfidbrücken ist Koagulationfaktor IX/X-Bindendes Protein, welches Heteromere über die CTLD bildet [166]. Andere C-Typ Lektine dimerisieren über ihre C-terminalen Erweiterungen wie z.B. das Mannose-binding Protein A [93] und das Humane Lungen Surfactantprotein D [152] über den collagenartigen C-Terminus oder Tetranektine über die N-terminale Verlängerung [153]. Die C-terminalen *Repeats* von Perlucin sind zwar keine collagenartigen Strukturen, aber sie könnten in ähnlicher Weise wie diese zu einer Oligomerisierung von Perlucin führen.

Werden die Aminosäuresequenzen von Perlucin-R5 und Perlucin-R8 in *Coiled-coils* Regionen Vorhersage-Programme eingegeben, so ergibt sich für Perlucin-R5 und Perlucin-R8 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,7 (mit COILS [130]), dass die Proteine innerhalb der

Repeat-Region *Coiled-coils* bilden und dass diese *Coiled-coils* wahrscheinlich Tetramere oder Trimere bilden (mit Logicoil [132]). Bei Perlucin-R5 sind zwei der Peptide vorhanden, die diese *Coiled-coils* bilden könnten, so dass diese Region bei Perlucin-R5 länger sein würde, als bei Perlucin-R8. Diese längere *Coiled-coil*-Region bei Perlucin-R5 könnte die Bildung von Heteromeren (siehe Abbildung 16) und eine daraus veränderte Struktur zur Folge haben. Ein Beispiel für ein C-Typ Lektin, das Heteromere bildet, ist das Collectin K1 (CL-K1) aus der Niere von *H. sapiens*, es bildet über collagenähnliche Region Heteromere mit dem Collectin L1 (CL-L1) aus der Leber [167].

Diese Oligomerisierung über die C-terminalen *Repeats* von Perlucin könnte zu den beobachteten großen Aggregaten führen (Tabelle 6), die mit Anzahl der *Repeats* größer werden (bis zu 1 µm bei Perlucin-R8) (Tabelle 1). Evans [68] diskutierte, dass das Ende der hier gefunden *Repeat*-Region eine intrinsisch unstrukturierte Region sein könnte. Die in dieser Arbeit beschrieben Ergebnisse der Protein-Motiv-Vorhersage (siehe 3.2) spiegelt dieses wider. Daraus könnte man schlussfolgern, dass Perlucin-R5 und Perlucin-R8 innerhalb der *Repeat*-Region *Coiled-coils* bilden und am C-Terminus intrinsisch unstrukturiert sind und über diese Strukturen wahrscheinlich Trimere und Tetramere bilden können.

Intrinsisch unstrukturierte Regionen sind Proteinregionen, die nicht vollständig gefaltet sind und denen eine bestimmte 3-dimensionale Struktur fehlt [168]. Die intrinsisch unstrukturierten Regionen haben oft eine Tendenz zu bestimmten Aminosäuresequenzen mit vielen kleinen hydrophilen Aminosäuren und sind Prolin-reicher als Regionen mit einer globulären Struktur [169]. Dies könnte die großen Proteinaggregate erklären, die hier beobachtet wurden. Diese Funktion, einer intrinsisch unstrukturierten Region, wurde auch für das Protein r-n16.3 der Perlenauster beschrieben. Dieses Protein oligomerisiert in einem weitem pH-Bereich und die Radii der Oligomere vergrößern sich mit steigender Ca^{2+} Konzentration [71]. Die Abalone Perlmutt Proteine AP7 und AP24 bilden komplexe Dimere über hydrophobe Interaktionen [69]. Parham *et al.* [170] zeigten, dass die N-terminalen *Repeats* des Hefe Proteins Sup35p in gleicher Weise Protein-Aggregate stabilisiert wie das humane Prion Protein PrP.

Die großen Aggregate bzw. das Oligomerisationsverhalten von Perlucin sind eine mögliche Erklärung dafür, dass die Aufreinigung des Proteins aus eukaryontischen Zellen nicht in messbaren Konzentrationen möglich war (siehe 3.6). Obwohl das Protein in der Immunfluoreszenz deutlich im endoplasmatischen Retikulum sichtbar war, wird es entweder nur in geringen Mengen sezerniert, die nicht in der SDS-PAGE darstellbar sind, wie bei Perlucin-R0, oder wie im Falle von Perlucin-R5 und R8 fast gar nicht sezerniert worden sind.

In den Zellkulturüberständen von stabil transfizierten Cho LecI Zellen konnte über Immundetektion die Expression der rekombinanten Proteine nachgewiesen werden. Die Konzentrationen waren jedoch so gering, dass die Proteine nicht über den C-terminalen Strep-Tag in verwertbaren Quantitäten aufzureinigen waren. Vermutlich verbleibt das rekombinante Perlucin zum größten Teil in der Zelle. Eine weitere Möglichkeit, die die Sekretion der Proteine verhindern könnte, wäre die Bildung großer Aggregate wie sie MBP-Perlucin-R5 und MBP-Perlucin-R8 von bis zu fast 1 µm bilden können (Tabelle 6). Zudem bildet Perlucin-R5 Oligomere und Heteromere mit Perlucin-R0 und R8, die nur im Zelllysat nachzuweisen sind und wahrscheinlich nicht sezerniert werden (Abbildung 16). Auf die Schwierigkeit Perlmuttproteine in ausreichenden Mengen rekombinant zu erstellen, wurde bereits in einem Übersichtsartikel von Evans [171] hingewiesen.

In Laufe dieses Projektes wurde versucht, Perlucin mit verschiedenen Fusionspartnern wie SUMO, GST, EGFP, MBP, und ohne großen Fusions-Tag in Bakterien zu exprimieren. Dies führte jedoch nur bei MBP als Fusionspartner zu hochreinen und löslichen Protein (Abbildung 17). Mit den anderen Fusionspartnern war es nicht möglich Perlucin zu exprimieren. Ein Versuchsansatz, die Spleißvarianten von dem N-terminalen MBP über die Vektor-spezifische TEV-Protease-Schnittstelle (Tabacco Etch Virus) zu trennen, um große Mengen freies Protein für die Folgeversuche zu erhalten, funktionierte zwar in der nachweisbaren Trennung, aber das freie Perlucin wurde auch in Ansätzen mit speziellen *low-bind* Gefäßen anscheinend über starke unspezifische Wechselwirkung mit den Gefäßwänden verloren.

Es wird diskutiert, dass Perlucin als eine Verbindung zwischen den Aragonit-Plättchen und Chitin [2] fungieren könnte. Erste Bindungsversuche mit Chitin und rekombinanten Perlucin zeigten, dass Perlucin zwar in Chitin-Präzipitationen nachweisbar war, die Anbindung aber sehr wahrscheinlich unspezifisch war. Eine Erklärung für diese unspezifische Anbindung ist, dass sich Perlucin auch in diesen Ansätzen ein großer Teil des Proteins von der Oberfläche der Gefäße durch Abkochen in SDS-Probenpuffer gelöst werden konnte. Perlucin wurde als eines der Proteine identifiziert, das sowohl in der löslichen Matrix als auch in der unlöslichen Matrix in der Schale von Perlmutt vorhanden ist und wurde als ein mit Chitin assoziiertes Protein identifiziert [87]. Im Gegensatz zu dem Perlmuttprotein Pif 97 aus der Auster *Pinctada fucata* [48] hat Perlucin keine nachgewiesene Chitinbindungsdomäne. Wenn eine unspezifische Bindung von Perlucin an verschiedene Gefäßoberflächen nicht ausgeschlossen oder eine selektive Bindung im Vergleich mit z.B. anderen polymeren Zuckerstrukturen gezeigt werden kann, so ist die spezifische Bindung von Perlucin an Chitin wahrscheinlich sehr schwierig nachweisbar. Es könnte aber auch sein, dass gerade das sehr klebrige,

unspezifische Bindungsverhalten von Perlucin, wie es in dieser Arbeit beobachtet wurde, eine der Perlucin-Eigenschaften vermittelt, die eine Verbindung von Aragonit-Plättchen zum Chitin hergestellt. Dieses müsste mit dem nativen Protein Spleißvarianten aus der Schale von *H. laevigata* nachgewiesen werden.

4.7 Kristallbildung

Aus der Perlmuttschicht von *H. laevigata* sind bisher die Kristallisation von $CaCO_3$-hemmende Proteine wie Perlwapin [74], Perlinhibin [73] und das Kristallwachstum induzierende Proteine wie Perlucin [1-3, 72, 86] und Perlustrin [2, 78] bekannt. Durch weitere Sekretom- oder Proteom-Studien wird sich die Erkenntnis der an diesen Prozessen beteiligten Proteine in der Zukunft wahrscheinlich noch erhöhen. Die Regulation der Sekretion der Proteine ist ein genetisch gesteuertes Zusammenspiel vieler Proteine, die zusammen mit der mineralischen Phase und anderen organischen Komponenten der organischen Matrix zur Bildung der Schale führt.

Die Expression der Spleißvarianten kann dabei einerseits zur Feinabstimmung des Kristallwachstums von $CaCO_3$ dienen, andererseits könnten Perlucin-R5 und Perlucin-R8 durch ihr Aggregationsverhalten innerhalb des Chitingerüsts als Nukleationskeime dienen. Die Aragonitkristalle wachsen durch Mineralbrücken in die nächste Chitinwabe, Richtung Mantelepithel, bis sie die nächste Chitinwabe berühren; im Anschluss startet das vertikale Wachstum [172].

Wenn Perlucin in großen Aggregaten in den Chitinwaben vorliegen würde, könnten die Spleißvarianten von Perlucin dem in den Chitinwaben wahrscheinlich vorliegenden amorphen Calciumcarbonat als (ACC) als Nukleationskeim dienen und das weitere Wachstum des $CaCO_3$ modifizieren. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, führt das Wachstum der $CaCO_3$-Minerale in Anwesenheit der Perlucin Spleißvarianten im Rasterelektronenmikroskop zu gleichmäßigen Mineralen (Abbildung 21). Diese $CaCO_3$-Minerale scheinen entlang einer Baumstruktur zu wachsen, an der sich dann Schicht für Schicht das Mineral weiter formiert. Die Perlucin Spleißvarianten könnten durch Bildung großer Aggregate beim Wachstum der Kristalle als Nukleationskeim dienen. Dies konnte auch Weber *et al*. [86] zeigen, sie bildeten Perlucin fusioniert mit GFP (Green Fluoreszenz Protein) innerhalb von $CaCO_3$-Kristallen ab. Das GFP-Perlucin ist innerhalb der $CaCO_3$-Kristalle entweder radial angeordnet, oder schichtartig übereinander liegend [86].

Tabelle 7 fasst die Ergebnisse und Eigenschaften der Perlucin Spleißvarianten zusammen.

Deutlich wird, dass Perlucin-R5 eine gesonderte Rolle spielt. Perlucin-R5 hat im Unterschied zu Perlucin-R8 drei *Repeats* weniger und zwei *Repeats* mit einem Methionin anstelle eines Arginins. Genau dieses Peptid könnte potentiell für die Bildung von *Coiled-coils* und der folgenden Oligomerisierung verantwortlich sein. Außerdem könnten strukturelle Eigenheiten von Perlucin-R5 sich auf die Präzipitation von $CaCO_3$ auswirken. Der Einfluss der Perlucin Spleißvarianten verläuft nicht in der Reihenfolge von Perlucin-R0 > Perlucin-R5 > Perlucin R8, sondern in Anwesenheit von Perlucin-R5 sinkt der pH-Wert zweistufig, in den ersten 100 Sekunden und in den letzten 500 Sekunden sehr stark ab.

Daraus kann gefolgert werden, dass nicht nur das Vorhandensein und die Anzahl der *Repeats*, sondern auch die Zusammensetzung der *Repeat*-Peptide einen modulierenden Einfluss auf die Mineralisation von $CaCO_3$ haben.

		Perlucin-R0	Perlucin-R5	Perlucin-R8
Repeat		–	+	+
durch MALDI-MS bestätigt		+	+	+
pot. Phosphorylierungsstellen		1	4	7
eukaryontisch sekretiert		(+)	–	–
Dimere	+ DTT	+	–	–
	– DTT	+	+	–
Heteromere	+ DTT	–	–	–
	– DTT	–	+	–
Doppelbanden	+ DTT	–	+	(+)
	– DTT	–	+	(+)
pot. *Coiled-coils* bildend		–	+ (2)	+ (1)
pot. intrinsisch unstrukturierte Regionen		–	+	+
$CaCO_3$ Präzipitation beschleunigend		++	+	+++
Aggregate > 100 nm		–	+	+

Tabelle 7: Darstellung der unterschiedlichen Eigenschaften der Perlucin Spleißvarianten aus dieser Arbeit.

4.8 Ausblick

Auf Basis der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Charakterisierung der Perlucin Spleißvarianten werden Projekte vorgeschlagen, die zeitnah weitere wichtige Ergebnisse zum Verständnis dieser Proteine liefern könnten.

In dieser Arbeit wurde deutlich gezeigt, dass die identifizierten Perlucin Spleißvarianten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Präzipitation von $CaCO_3$ haben.

Dieser Einfluss soll weiter untersucht werden. Dazu müssten die Perlucin Spleißvarianten in unterschiedlichen Kombinationen und in Abhängigkeit von der Konzentration der Einzelproteine auf einen additiven Effekt auf die Präzipitation von $CaCO_3$ untersucht werden. Zudem wäre es interessant den Effekt der Spleißvarianten auf die Präzipitation von $CaCO_3$ in Anwesenheit von z.B. Mg^{2+} oder in Meerwasser zu beobachten.

Dabei ist auch der Einfluss der *Repeats* auf die $CaCO_3$-Präzipitation von großer Bedeutung. Dazu werden MBP-Fusionskonstrukte mit zwei, vier, fünf, acht Wiederholungen der *Repeats* erstellt und der Einfluss der *Repeat*-Peptide auf die Präzipitation von $CaCO_3$ untersucht.

Diese Repeat-MBP-Konstrukte werden auch genutzt werden, um eine mögliche Oligomerisierung dieser Repeats zu verifizieren.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bilden die Perlucin Spleißvarianten Oligomere die sich abhängig von der jeweiligen länge der Repeats durch verschiedene Mechanismen zu bilden scheinen. Dabei wäre es interessant die Struktur der Perlucin Spleißvarianten einerseits durch weitere Untersuchungsverfahren, wie z.B. durch NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance) oder AFM (Atomic Force Microscope) dazustellen und andererseits die Struktur der Spleißvarianten durch Modellierung zu ermitteln. Diese Verfahren könnten dazu dienen die Oligomerisation als dynamischen Prozess auch in Gegenwart von Ca^{2+} oder verschiedener Glykane darzustellen.

Perlucin kann, wie in dieser Arbeit gezeigt, sehr effektiv und unspezifisch an Oberflächen binden. Dieses unspezifische Bindungsverhalten von Perlucin könnte als eine Art Klebstoff fungieren um andere Moleküle zu binden. Dafür müsste das Bindungsverhalten zunächst weiter aufgeklärt werden. Es wird ein Experiment entwickelt bei dem, an eine Oberfläche verschiedene Moleküle (Glykane, Proteine, hydrophobe und hydrophile Oberflächen) vorgegeben werden, so dass das Bindungsverhalten der Perlucin Spleißvarianten und der Repeats weiter aufgeklärt werden kann.

Eigene Publikationen

Dodenhof T, Dietz F, Franken S, Grunwald I, Kelm S: **Splice variants of Perlucin from *Haliotis laevigata* modulate the crystallization of $CaCO_3$**. PLoS ONE 9: e97126. doi:10.1371/journal.pone.0097126.s001.

Musat N, Werner U, Knittel K, Kolb S, Dodenhof T, van Beusekom J, de Beer D, Dubilier N, Amann R: **Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea**. *Systematic and Applied Microbiology* 2006, **29**(4):333-348.

5. Literatur

1. Blank S, Arnoldi M, Khoshnavaz S, Treccani L, Kuntz M, Mann K, Grathwohl G, Fritz M: **The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals**. *Journal of Microscopy* 2003, **212**(3):280-291.
2. Weiss IM, Kaufmann S, Mann K, Fritz M: **Purification and Characterization of Perlucin and Perlustrin, two new proteins from the shell of the Mollusc *Haliotis laevigata***. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, **267**(1):17-21.
3. Mann K, Weiss IM, André S, Gabius HJ, Fritz M: **The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein perlucin. Detection of a functional C-type lectin domain with galactose/mannose specificity**. *European journal of Biochemistry / FEBS* 2000, **267**(16):5257-5264.
4. Skinner HCW: **Biominerals**. *Mineralogical Magazine* 2005, **69**(5):621-641.
5. Knoll A: **Biomineralization and evolutionary history**. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 2003, **54**(1):329-356.
6. Lowenstam HA, Margulis L: **Evolutionary prerequisites for early phanerozoic calcareous skeletons**. *Biosystems* 1980, **12**(1–2):27–41.
7. Marin F, Corstjens P, de Gaulejac B, de Vrind-De Jong E, Westbroek P: **Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of Mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, pteriomorphia).** *The Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(27):20667-20675.
8. Weiner S, Dove P: **An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect**. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 2003, **54**(1):1-29.
9. Simkiss K, Wilbur KM: **Biomineralization cell biology and mineral deposition**. San Diego, Californien: Academic Press Inc.; 1989.
10. Weiner S, Traub W, Parker SB: **Macromoleculesin mollusc shells and their functions in biomineralization [and discussion]**. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 1984, **304**(1121):425-434.
11. Mann S: **Mineralization in biological systems**. *Structure and Bonding* 1983, **54**:125-174.
12. Lowenstam HA: **Minerals formed by organisms**. *Science* 1981, **211**:1126–1131.
13. Frankel RB, Bazylinski DA: **Biologically Induced mineralization by bacteria**. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 2003, **54**:95-114.
14. Mann S: **High resolution structural and analytical studies of biominerals**. *Life Chemistry Reports* 1987, **4**:219-272.
15. Sekkal W, Zaoui A: **Nanoscale analysis of the morphology and surface stability of calcium carbonate polymorphs**. *Scientific Reports* 2013, **3**.
16. Morse JW, Arvidson RS, Lüttge A: **Calcium carbonate formation and dissolution**. *Chemical Reviews* 2007, **107**(2):342–381.
17. Hone PW, Fleming AE: **Abalone**. In: *The new rural industries – A handbook for farmers and investors, Rural Industries and Development Corporation.* Edited by Hyde K. Canberra; 1998: 85-92.
18. Linder G: **Muscheln und Schnecken der Weltmeere: Aussehen, Vorkommen, Systematik**. München: BLV Buchverlag GmbH & Co.; 1999.
19. Geiger DL, Groves LT: **Review of fossil Abalone (Gastropoda: Vetigastropoda: *Haliotidae*) with comparison to recent species**. *Journal of Paleontology* 1999, **73**(5):872-885
20. Freeman KA: **Aquaculture and related biological attributes of abalone species in Australia**. *Fisheries Research Report* 2001, **128**.
21. Fleury C, Marin F, Marie B, Luquet G, Thomas J, Josse C, Serpentini A, Lebel JM: **Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and microstructural study**. *Tissue and Cell* 2008, **40**(3):207-218.

22. Suzuki M, Nagasawa H: **Mollusk shell structure and their formation**. *Canadian Journal of Zoology* 2013, **91**(6):349-366.
23. Marin F, Luquet G, Marie B, Medakovic D: **Molluscan shell proteins: Primary structure, origin, and evolution**. In: *Current Topics in Developmental Biology Volume 80.* vol. 80; 2008: 209-276.
24. Crenshaw MA: **The inorganic composition of mollscan extrapallial fluid**. *Biological Bulletin* 1972, **143**(3):506-512.
25. Heinemann F, Launspach M, Gries K, Fritz M: **Gastropod nacre: Structure, properties and growth - Biological, chemical and physical basics**. *Biophysical Chemistry* 2011, **153**(2-3):126–153.
26. Jackson AP, Vincent JFV, Turner RM: **The mechanical design of nacre** *Proceedings of Royal Society London* 1988, **234**(1277):415-440.
27. Katti KS, Katti DR, Mohanty B: **Biomimetic lessons learnt from nacre**. In: *Biomimetics learning from Nature.* Edited by Mukherjee A. Intech, India; 2010.
28. Zaremba CM, Belcher AM, Fritz M, Li Y, Mann S, Hansma PK, Morse DE, Speck JS, Stucky GD: **Critical transitions in the biofabrication of Abalone shells and flat pearls**. *Chemistry of Materials* 1996, **8**(3):679–690.
29. Weiner S, Traub W: **X-ray diffraction study if the insoluble matrix of mollusk shells**. *FEBS Letters* 1980, **111**(2):311-316.
30. Peters W: **Occurrence of chitin in mollusca.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 1972, **41**:341-349.
31. Weiss IM, Schönitzer V: **The distribution of chitin in larval shells of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis***. *Journal of Structural Biology* 2006, **153**:264-277.
32. Suzuki M, Sakuda S, Nagasawa H: **Identification of chitin in the prismatic layer of the shell and a chitin synthase gene from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2007, **71**:1735-1744.
33. Nakahara H: **Nacre formation in bivalve and gastropod molluscs**. In: *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems.* Edited by Suga S, Nakahara H. Tokyo: Springer-Verlag; 1991.
34. Sun J, and, Bhushan B: **Hierarchical structure and mechanical properties of nacre: a review**. *RSC Advanced* 2012, **2**:7617-7632.
35. Weiner S: **Aspartic acid-rich proteins: Major components of the soluble organic matrix of mollusk shells**. *Calcified Tissue International* 1979, **29**(1):163-167.
36. Weiner S, Hood L: **Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation**. *Science* 1975, **190**(4218):987-989.
37. Weiner S, Traub W, Lowenstam HA: **Organic matrix in calcified exoskeletons**. In: *Biomineralization and biological metal accumulation.* Edited by Westbroek P, de Jong EW: Reidel Publishing Company; 1983: 205-240.
38. Levi-Kalisman Y, Falini G, Addadi L, Weiner S: **Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM.** Journal of Structural Biology 2001, **135**(1):8-17.
39. Belcher AM, Wu XH, Christensen RJ, Hansma PK, Stucky GD, Morse DE: **Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins**. *Nature* 1996, **381**(6577):56-58.
40. Fritz M, Belcher A, Radmacher M, Walters D, Hansma P, Stucky G, Morse D, Mann S: **Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates**. *Nature* 1994, **371**(6492):49-51.
41. Morse DE, Cariolou MA, Stucky GD, Zaremba CM, Hansma PK: **Genetic coding in biomineralization of microlaminate composites**. *Materials Research Society Symposium Proceedings* 1993, **292**:59-67.
42. Greenfield EM, Wilson DC, Crenshaw MA: **Ionotropic nucleation of calcium carbonate by molluscan matrix**. American Zoologist 1984, **24**(4):925-932.
43. Erben KH: **on the formation and growth of nacre**. *Biomineralization* 1972:15-46.
44. Weiss IM, Tuross N, Addadi L, Weiner S: **Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite**. *The Journal of experimental Zoology* 2002, **293**(5):478-491.

45. Addadi L, Joester D, Nudelman F, Weiner S: **Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes**. *Chemistry - A European Journal* 2006, **12**(4):980-987.
46. Marxen JC, Becker W, Finke D, Hasse B, Epple M: **Early mineralisation in *Biomphalaria glabrata*: Microscopic and structural results**. *Journal of Molluscan Studies* 2003, **69**(2):113-121.
47. Weiss IM: **Jewels in the pearl**. *ChemBioChem* 2010, **11**(3):297-300.
48. Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, Yamamoto Y, Nishimura T, Kato T, Nagasawa H: **An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation**. *Science* 2009, **325**(5946):1388-1390.
49. Fan W, Hu Y, Li C, Xie L, Zhang R: **Cloning, characterization, and expression analysis of calreticulin from pearl Oyster *Pinctada fucata***. *Tsinghua Science & Technology* 2008, **13**(4):466-473.
50. Fang D, Pan C, Lin H, Lin Y, Zhang G, Wang H, He M, Xie L, Zhang R: **Novel basic protein, PfN23, functions as key macromolecule during nacre formation**. *Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**(19):15776-15785.
51. Kong Y, Jing G, Yan Z, Li C, Gong N, Zhu F, Li D, Zhang Y, Zheng G, Wang H *et al*: **Cloning and characterization of Prisilkin-39, a novel matrix protein serving a dual role in the prismatic layer formation from the oyster *Pinctada fucata***. *The Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**(16):10841-10854.
52. Li S: **Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*)**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2004, **138**(3):235-243.
53. Li S, Xie L, Ma Z, Zhang R: **cDNA cloning and characterization of a novel Calmodulin-like protein from pearl oyster *Pinctada fucata***. *FEBS Journal* 2005, **272**(19):4899-4910.
54. Liu HL, Liu SF, Ge YJ, Liu J, Wang XY, Xie LP, Zhang RQ, Wang Z: **Identification and characterization of a biomineralization related gene PFMG1 highly expressed in the mantle of *Pinctada fucata***. *Biochemistry* 2007, **46**(3):844-851.
55. Ma C, Zhang C, Nie Y, Xie L, Zhang R: **Extraction and purification of matrix protein from the nacre of pearl Oyster**. *Tsinghua Science & Technology* 2005, **10**(4):499-503.
56. Ma Z, Huang J, Sun J, Wang G, Li C, Xie L, Zhang R: **A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl Oyster, *Pinctada fucata***. *Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**(32):23253-23263.
57. Marin F, Amons R, Guichard N, Stigter M, Hecker A, Luquet G, Layrolle P, Alcaraz G, Riondet C, Westbroek P: **Caspartin and Calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the mediterranean fan Mussel *Pinna nobilis***. *Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**(40):33895-33908.
58. Marxen JC, Nimtz M, Becker W, Mann K: **The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 2003, **1650**(1-2):92-98.
59. Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, Nakano S, Morita T, Matsushiro A: **A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996, **93**(18):9657-9660.
60. Miyamoto H, Miyoshi F, Kohno J: **The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata***. *Zoological Science* 2005, **22**(3):311-315.
61. Miyashita T, Takagi R, Okushima M, Nakano S, Miyamoto H, Nishikawa E, Matsushiro A: **Complementary DNA cloning and characterization of Pearlin, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls**. *Marine Biotechnology (New York, NY)* 2000, **2**(5):409-418.

62. Miyazaki Y, Nishida T, Aoki H, Samata T: **Expression of genes responsible for biomineralization of *Pinctada fucata* during development**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2010, **155**(3):241-248.
63. Samata T, Hayashi N, Kono M, Hasegawa K, Horita C, Akera S: **A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata***. *FEBS Letters* 1999, **462**(1-2):225-229.
64. Samata T, Ikeda D, Kajikawa A, Sato H, Nogawa C, Yamada D, Yamazaki R, Akiyama T: **A novel phosphorylated glycoprotein in the shell matrix of the oyster *Crassostrea nippona***. *FEBS Journal* 2008, **275**(11):2977-2989.
65. Suzuki M, Murayama E, Inoue H, Ozaki N, Tohse H, Kogure T, Nagasawa H: **Characterization of Prismalin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata)***. *The Biochemical Journal* 2004, **382**(Pt 1):205-213.
66. Takagi R, Miyashita T: **Prismin: A new matrix protein family in the Japanese pearl Oyster (*Pinctada fucata*) involved in prismatic layer formation**. *Zoological Science* 2010, **27**(5):416-426.
67. Tsukamoto D, Sarashina I, Endo K: **Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, **320**(4):1175-1180.
68. Evans JS: **Aragonite-associated biomineralization proteins are disordered and contain interactive motifs**. *Bioinformatics* 2012, **28**(24):3182–3185.
69. Amos F, Ponce C, Evans J: **Formation of framework nacre polypeptide supramolecular assemblies that nucleate polymorphs**. *Biomacromolecules* 2011, **12**(5):1883-1890.
70. Marie B, Marie A, Jackson D, Dubost L, Degnan B, Milet C, Marin F: **Proteomic analysis of the organic matrix of the abalone Haliotis asinina calcified shell**. *Proteome Science* 2010, **8**:54.
71. Ponce C, Evans J: **Polymorph crystal selection by n16, an intrinsically disordered nacre framework protein**. *Crystal Growth & Design* 2011, **11**(10):4690-4696.
72. Wang N, Lee Y, Lee J: **Recombinant perlucin nucleates the growth of calcium carbonate crystals: Molecular cloning and characterization of perlucin from disk abalone, *Haliotis discus discus***. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2008, **149**(2):354-361.
73. Mann K, Siedler F, Treccani L, Heinemann F, Fritz M: **Perlinhibin, a cysteine-, histidine-, and arginine-rich miniprotein from Abalone (*Haliotis laevigata)* nacre, Inhibits in vitro calcium carbonate crystallization**. *Biophysical Journal* 2007, **93**(4):1246-1254.
74. Treccani L, Mann K, Heinemann F, Fritz M: **Perlwapin, an Abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals**. *Biophysical Journal* 2006, **91**(7):2601-2608.
75. Michenfelder M, Fu G, Lawrence C, Weaver JC, Wustman BA, Taranto L, Evans JS, Morse DE: **Characterization of two molluscan crystal-modulating biomineralization proteins and identification of putative mineral binding domains**. *Biopolymers* 2003, **70**(4):522-533.
76. Wojtas M, Dobryszycki P, Ożyhar A: **Intrinsically disordered proteins in biomineralization**. In: *Advanced Topics in Biomineralization.* Edited by Seto J; 2012.
77. Dunker AK, Brown AK, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradovic Z: **Intrinsic disorder and protein function**. *Biochemistry* 2002, **41**(21):6573-6582.
78. Weiss IM, Göhring W, Fritz M, Mann K: **Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (Abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, **285**(2):244-249.
79. Shen X, Belcher A, Hansma P, Stucky G, Morse D: **Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of**

Haliotis rufescens. Journal of Biological Chemistry 1997, **272**(51):32472-32481.
80. Smith BL, Schäffer TE, Viani M, Thompson JB, Frederick NA, Kindt j, Belcher A, Stucky GD, Morse DE, Hansma PK: **Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites**. *Nature* 1999, **399**: 761-763.
81. Kim IW, Morse DE, Evans JS: **Molecular characterization of the 30-AA N-terminal mineral interaction domain of the biomineralization protein AP7**. *Langmuir* 2004, **20**(26):11664-11673.
82. Wustman B, Morse D, Evans J: **Structural characterization of the N-terminal mineral modification domains from the molluscan crystal-modulating biomineralization proteins, AP7 and AP24**. *Biopolymers* 2004, **74**(5):363-376.
83. Amos F, Ndao M, Ponce C, Evans J: **A C-RING-like domain participates in protein self-assembly and mineral nucleation**. *Biochemistry* 2011, **50**(41):8880-8887.
84. Amos FF, Evans JS: **AP7, a partially disordered pseudo C-RING protein, Is capable of forming stabilized aragonite in vitro**. *Biochemistry* 2009, **48**(6):1332–1339.
85. Fu G, Valiyaveettil S, Wopenka B, Morse DE: **$CaCO_3$ biomineralization: Acidic 8-kDa proteins isolated from aragonitic Abalone shell nacre can specifically modify calcite crystal morphology**. *Biomacromolecules* 2005, **6**(3):1289-1298.
86. Weber E, Guth C, Weiss IM: **GFP facilitates native purification of recombinant Perlucin derivatives and delays the precipitation of calcium carbonate**. *PloS one* 2012, **7**(10):e46653.
87. Rademaker H, Launspach M: **Detection of interaction between biomineralising proteins and calcium carbonate microcrystals**. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2011, **2**:222-227.
88. Blohm D, Zeng J, Fritz M, Grathwohl G: **(WO/2007/125127) Gentechnisch hergestelltes Perlucin und seine Verwendung zur Herstellung von Biomaterialien**; 2007.
89. Gabius HJ: **Animal lectins**. *European Journal of Biochemistry* 1997, **43**(3):543–576.
90. Dodd RB, Drickamer K: **Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity**. *Glycobiology* 2001, **11**:71R-79R.
91. Cummings RD, McEver RP: **C-type lectins**. In: *Essentials of Glycobiology.* Edited by Varki A, Cummings RD, Esko JD, 2nd edn. Cold Spring Habour (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
92. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K: **The C-type lectin superfamily in the immune system**. *Immunological Reviews* 1998, **163**(1):19-34.
93. Weis WI, Drickamer K: **Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein.** *Structure* 1994 **2**(12):1227-1240.
94. Zelensky AN, Gready JE: **Comparative analysis of structural properties of the C-type-lectin-like domain (CTLD)**. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2003, **52,**(3):466–477.
95. Drickamer K, and Dodd RB: **C-type lectin-like domains in *Caenorhabditis elegans*: predictions from the complete genome sequence**. *Glycobiology* 1999, **9**(12):1357–1369.
96. Zelensky A, Gready J: **The C-type lectin-like domain superfamily**. *FEBS Journal* 2005, **272**(24):6179-6217.
97. Bouchet P: ***Haliotis laevigata* Donovan, 1808. Accessed through: World register of marine species at** http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=445335. 2013.
98. Bouchet P: ***Haliotis varia* Linnaeus, 1758. Accessed through: World register of marine species at** http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=207654. 2013.
99. Thakar K, Niedenthal R, Okaz E, Franken S, Jakobs A, Gupta S, Kelm S, Dietz F: **SUMOylation of the hepatoma-derived growth factor negatively influences its binding to chromatin**. *FEBS Journal* 2008, **275**(7):1411-1426.
100. Koliwer-Brandl H, Gbem TT, Waespy M, Reichert O, Mandel P, Drebitz E, Dietz F,

Kelm S: **Biochemical characterization of trans-sialidase TS1 variants from *Trypanosoma congolense***. *BMC Biochemistry* 2011, **12**(39).
101. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**. *Analytical Biochemistry* 1987, **162**(1):156-159.
102. Frohman MA, Dush MK, Martin GR: **Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**(23):8998-9002.
103. Scotto-Lavino E, Du G, Frohman M: **5[prime] end cDNA amplification using classic RACE**. *Nature Protocols* 2007, **1**(6):2555-2562.
104. Winship PR: **An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide**. *Nucleic acids research* 1989, **17**:1266.
105. Becker A: **Charakterisierung phylogenetisch informativer MADS-Box-Gene aus der Gymnosperme *Gnetum gnemon L.***: Köln; 2000.
106. Delproposto J, Majmudar C, Smith J, Brown W: **Mocr: A novel fusion tag for enhancing solubility that is compatible with structural biology applications**. *Protein Expression and Purification* 2009, **63**(1):40-49.
107. Kapust RB, Waugh DS: ***Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused**. *Protein Science : a Publication of the Protein Society* 1999, **8**(8):1668-1674.
108. LaVallie E: **Gene fusion expression systems in *Escherichia coli***. *Current Opinion in Biotechnology* 1995, **6**(5):501-506.
109. Maina C, Riggs P, Grandea A, Slatko B, Moran L, Tagliamonte J, McReynolds L, Chu D: **An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein**. *Gene* 1988, **74**(2):365-373.
110. Nallamsetty S, Waugh D: **Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners**. *Protein Expression and Purification* 2006, **45**(1):175-182.
111. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW: **Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes**. *Methods* in *Enzymology* 1990, **185**:60–89.
112. Brissault B, Kichler A, Guis C, Leborgne C, Danos O, Cheradame H: **Synthesis of linear Polyethylenimine derivatives for DNA transfection**. *Bioconjugate Chemistry* 2003, **3**:581–587.
113. Blochlinger K, Diggelmann H: **Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells**. *Molecular and Cell Biology* 1984 December; 4(12): 2929–2931. , **4**(12):2929–2931.
114. Millero FJ, Feistel R, Wright DG, McDougall TJ: **The composition of Standard Seawater and the definition of the Reference-Composition Salinity Scale**. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 2008, **55**(1):50-72.
115. Goldman JC, McCarthy JJ: **Steady-state growth and ammonium uptake of a fast-growing marine diatom**. *Limnology & Oceanography* 1978, **23**:695-703.
116. Wilbur KM, Bernahrdt AM: **Effects of amino acids, magnesium, and molluscan extrapallial fluid on the chrystallization of cslcium carbonate: In vitro experiments.** *Biological Bulletin* 1984, **166**:251-259.
117. Laemmli UK: **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**. *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.
118. Merril C, Goldman D, Sedman S, Ebert M: **Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins**. *Science* 1981, **211** (4489):1437-1438
119. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1979, **76**(9):4350-4354.
120. Görg A, Postel W, S. G: **The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.** *Electrophoresis* 1988, **9**(9):531-546.
121. Bremer S, Klein K, Sedlmaier A, Abouzied M, Gieselmann V, S. F: **Hepatoma-**

derived growth factor and nucleolin exist in the same ribonucleoprotein complex. *BMC Biochemistry* 2013.
122. Notredame C, Higgins DG, Heringa J: **T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment**. *Journal of Molecular Biology* 2000, **302**(1):205–217.
123. Poirot O, O'Toole E, Notredame C: **Tcoffee@igs: a web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments**. *Nucleic Acids Research* 2003, **31**:3503–3506.
124. **Geneious 5.4 Available from** http://www.geneious.com [http://www.geneious.com/default,1103,citations.sm]
125. Wernersson R, Pedersen AG: **RevTrans - Constructing alignments of coding DNA from aligned amino acid sequences.** *Nucleic Acids Research* 2003, **31**(13):3537-3539.
126. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum-likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**. *Molecular Biology and Evolution* 2011 **28**(10):2731.
127. Hasegawa M, Kishino H, Yano T-a: **Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA**. *Journal of Molecular Evolution* 1985, **22**(2):160-174.
128. Whelan S, Goldman N: **A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach.** *Molecular Biology and Evolution* 2001, **18**(5):691-699.
129. Huelsenbeck JP, Ronquist F: **MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees**. *Bioinformatics* 2001 **17**(8):754-755.
130. Lupas A, van Dyke M, Stock J: **Predicting coiled coils from protein sequences.** *Science* 1991, **252**(5009):1162-1164.
131. McDonnell AV, Jiang T, Keating AE, Berger B: **Paircoil2: Improved prediction of coiled coils from sequence**. *Bioinformatics* 2005, **22**(3):356-358.
132. Vincent TL, Green PJ, Woolfson DN: **LOGICOIL - multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state**. *Bioinformatics* 2013, **29**(1):69-76.
133. Ishida T, Kinoshita KP: **PrDOS: Prediction of disordered protein regions from amino acid sequence.** *Nucleic acids research* 2007, **35**.
134. Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB: **Protein disorder prediction: implications for structural proteomics**. *Structure* 2003, **11**(11):1453-1459.
135. Dosztányi Z, Mészáros B, Simon I: **ANCHOR: Web server for predicting protein binding regions in disordered proteins**. *Bioinformatics* 2009, **25**(20):2745-2746.
136. Heinemann F, Gummich M, Radmacher M, Fritz M: **Modification of $CaCO_3$ precipitation rates by water-soluble nacre proteins**. *Materials Science and Engineering: C* 2010, **31**(2):99–105.
137. Wheeler AP, George J, Evans CA: **Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of Oyster shell**. *Science* 1981, **212**(4501):1397-1398.
138. Pecora R: **Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids**. *Journal of Nanoparticle research* 2000, **2**(2):123-131.
139. Aberle LB, Kleemeier M, Hennemann O-D, Burchard W: **Selection of single scattering from multiple scattering systems by 3D cross correlation. 2. concentrated polymer solutions**. *Macromolecules* 2002, **35**(5):1877–1886.
140. Fu G, Qiu SR, Orme CA, Morse DE, DeYoreo JJ: **Acceleration of calcite kinetics by Abalone nacre proteins**. *Advanced Materials* 2005, **17**(22):2678-2683.
141. Wilkins D, Grimshaw S, Receveur V, Dobson C, Jones J, Smith L: **Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques**. *Biochemistry* 1999, **38**(50):16424-16431.
142. Zheden V, Klepal W, von Byern J, Adolf FR, Thiel K, Kowalik T, Grunwald I: **Biochemical analyses of the cement float of the goose barnacle *Dosima***

fascicularis. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research 2014 30(8): 949-963.

143. Drickamer K: **C-type lectin-like domains**. *Current Opinion in Structural Biology* 1999, **9**(5):585-590.
144. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S: **Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites**. *Journal of Molecular Biology* 1999, **294**(5):1351-1362.
145. Petersen T, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H: **SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions**. *Nature Methods* 2011, **8**(10):785-786.
146. Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ *et al*: **CDD: Conserved domains and protein three-dimensional structure**. *Nucleic Acids Research* 2013, **41**(D1):D348-D352.
147. Boratyn GM, Schaffer AA, Agarwala R, Altschul SF, Lipman DJ, Madden TL: **Domain enhanced lookup time accelerated BLAST**. *Biology Direct* 2012, **7**(12).
148. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic Acids Research* 1997, **25**(17):3389-3402.
149. Tegethoff FW, Rohleder J: **Calciumcarbonat**: Birkhäuser; 2001.
150. Jackson D, McDougall C, Green K, Simpson F, Worheide G, Degnan B: **A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell**. *BMC Biology* 2006, **4**:40.
151. Jackson D, Worheide G, Degnan B: **Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions**. *BMC Evolutionary Biology* 2007, **7**(1):160.
152. Håkansson K, Lim NK, Hoppe H-J, Reid KB: **Crystal structure of the trimeric α-helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D**. *Structure* 1999, **7**(3):255-264.
153. Nielsen BB, Kastrup JS, Rasmussen H, Holtet TL, Graversen JH, Etzerodt M, Thøgersen HC, Larsen IK: **Crystal structure of tetranectin, a trimeric plasminogen-binding protein with an α-helical coiled coil**. *FEBS Letters* 1997, **412**(2):388–396.
154. Zelensky AN, Gready JE: **C-type lectin-like domains in *Fugu rubripes***. *BMC Genomics* 2004, **5**(51).
155. Gavel Y, von Heijne G: **Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering**. *Protein Engineering, Design and Selection (PEDS)* 1990, **3**(5):433-442.
156. Hecker A, Testenière O, Marin F, Luquet G: **Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of Orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures**. *FEBS Letters* 2003, **535**(1-3):49–54.
157. Sheppard V, Poulsen N, Kröger N: **Characterization of an endoplasmic reticulum-associated silaffin kinase from the diatom *Thalassiosira pseudonana***. *The Journal of Biological Chemistry* 2010, **285**:1166-1176.
158. Tagliabracci VS, Engel JL, Wen J, Wiley SE, Worby CA, Kinch LN, Xiao J, Grishin NV, Dixon JE: **Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization**. *Science* 2012, **336**(6085):1150-1153
159. Torres-Quintana MA, Lécolle S, Goldberg M: **Effects of inositol hexasulphate, a casein kinase inhibitor, on dentine phosphorylated proteins in organ culture of mouse tooth germs**. *Archives of Oral Biology* 1998, **43**(8):597-610.
160. He G, Ramachandran A, Dahl T, George S, Schultz D, Cookson D, Veis A, George A: **Phosphorylation of Phosphophoryn is crucial for its function as a mediator of biomineralization**. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**:33109-33114.
161. Wheeler AP, Rusenko KW, Swift DM, Sikes CS: **Regulation of in vitro and in vivo $CaCO_3$ crystallization by fractions of oyster shell organic matrix**. *Marine Biology* 1988, **98**(1):71-80.
162. Elhadj S, De Yoreo JJ, Hoyer JR, Dove PM: **Role of molecular charge and**

hydrophilicity in regulating the kinetics of crystal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(51):19237-19242.

163. Elhadj S, Salter EA, Wierzbicki A, De Yoreo JJ, Han N, Dove PM: **Peptide controls on calcite mineralization: Polyaspartate chain length affects growth kinetics and acts as a stereochemical switch on morphology**. *Chrystal Growth & Design* 2006, **6**(1):197–201.
164. Atwood CS, Perry G, Zeng H, Kato Y, Jones WD, Ling K-Q, Huang X, Moir RD, Wang D, Sayre LM *et al*: **Copper mediates dityrosine cross-linking of alzheimer's Amyloid-β**. *Biochemistry* 2004, **43**(2):560–568.
165. Stasser JP, Eisses JF, Barry AN, Kaplan JH, Blackburn NJ: **Cysteine-to-serine mutants of the human copper chaperone for superoxide dismutase reveal a copper cluster at a domain III dimer interface**. *Biochemistry* 2005, **44**(9):3143–3152.
166. Mizuno H, Fujimoto Z, Koizumi M, Kano H, Atoda H, Morita T: **Structure of coagulation factors IX/X-binding protein, a heterodimer of C-type lectin domains**. *Nature Structural & Molecular Biology* 1997, **4**:438–441.
167. Henriksen ML, Brandt J, Andrieu JP, Nielsen C, Jensen PH, Holmskov U, Jorgensen TJ, Palarasah Y, Thielens NM, Hansen S: **Heteromeric complexes of native collectin kidney 1 and collectin liver 1 are found in the circulation with MASPs and activate the complement system**. *Journal of Immunology* 2013, **191**(12):6117-6127.
168. Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL: **Function and structure of inherently disordered proteins**. *Current Opinion in Structural Biology* 2008, **18**(6):756–764.
169. Dyson HJ, Wright PE: **Intrinsically unstructured proteins and their functions**. *Naure Reviews Molecular Cell Biology* 2005, **6**:197-208
170. Parham SN, Resende CG, Tuite MF: **Oligopeptide repeats in the yeast protein Sup35p stabilize intermolecular prion interactions**. *The EMBO Journal* 2001, **20**(9):2111–2119.
171. Evans J: **"Tuning in" to mollusk shell nacre- and prismatic-associated protein terminal sequences. Implications for biomineralization and the construction of high performance inorganic and organic composites**. *Chemical Reviews* 2008, **108**(11):4455-4462.
172. Schäffer TE, Ionescu-Zanetti C, Proksch R, Fritz M, Walters DA, Almqvist N, Zaremba CM, Belcher AM, Smith BL, Stucky GD *et al*: **Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges?** *Chemistry of Materials* 1997, **9**(8):1731–1740.
173. Steckbeck S, Schneider J, Wittig L, Rischka K, Grunwald I, Colombi Ciacchiac L: **Identification of materials binding peptide sequences guided by a MALDI ToF-MS depletion assay** *Analytical Methods* 2013.
174. Drickamer K: **Ca^{2+}-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins**. *Current Opinion in Structural Biology* 1993, **3**(3):393-400.
175. Drickamer K, Fadden AJ: **Genomic analysis of C-type lectins.** *Biochemical Society Symposia* 2002, **69**:59-72.

Anhang

A I cDNA Sequenzen der neuen Perlucin Spleißvarianten

cDNA Perlucin-R0

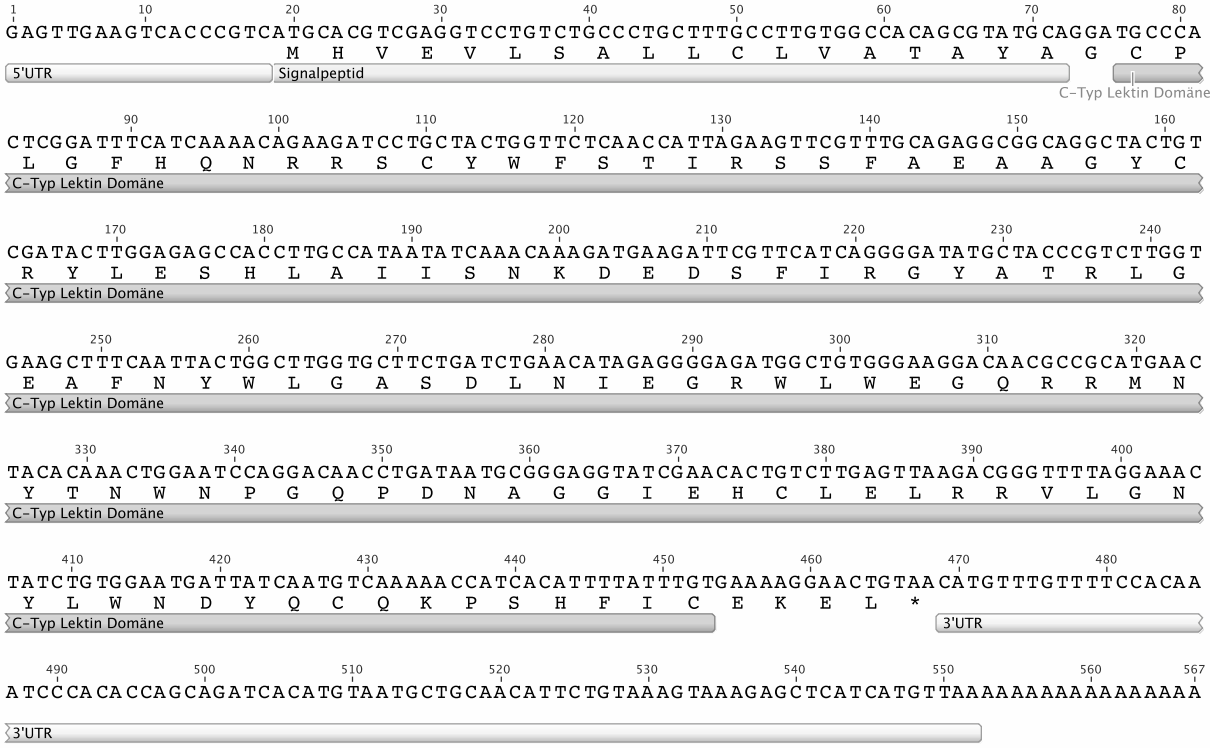


Abbildung 22: cDNA-Sequenz von Perlucin-R0.
Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die Aminosäure-Sequenz angeben. Das Stopcodon ist als Asterix * markiert.

cDNA Perlucin-R02

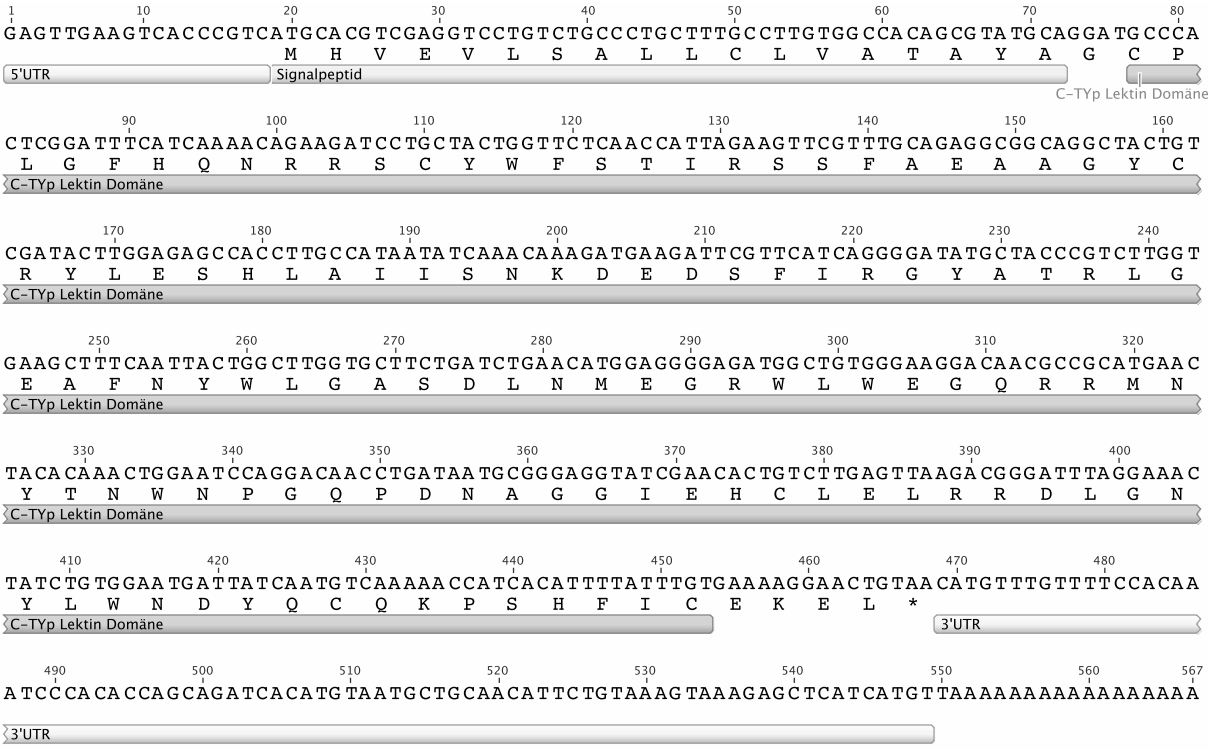


Abbildung 23: cDNA Perlucin-R02.
Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die Aminosäure-Sequenz angeben. Das Stopcodon ist als Asterix * markiert.

cDNA Perlucin-R5

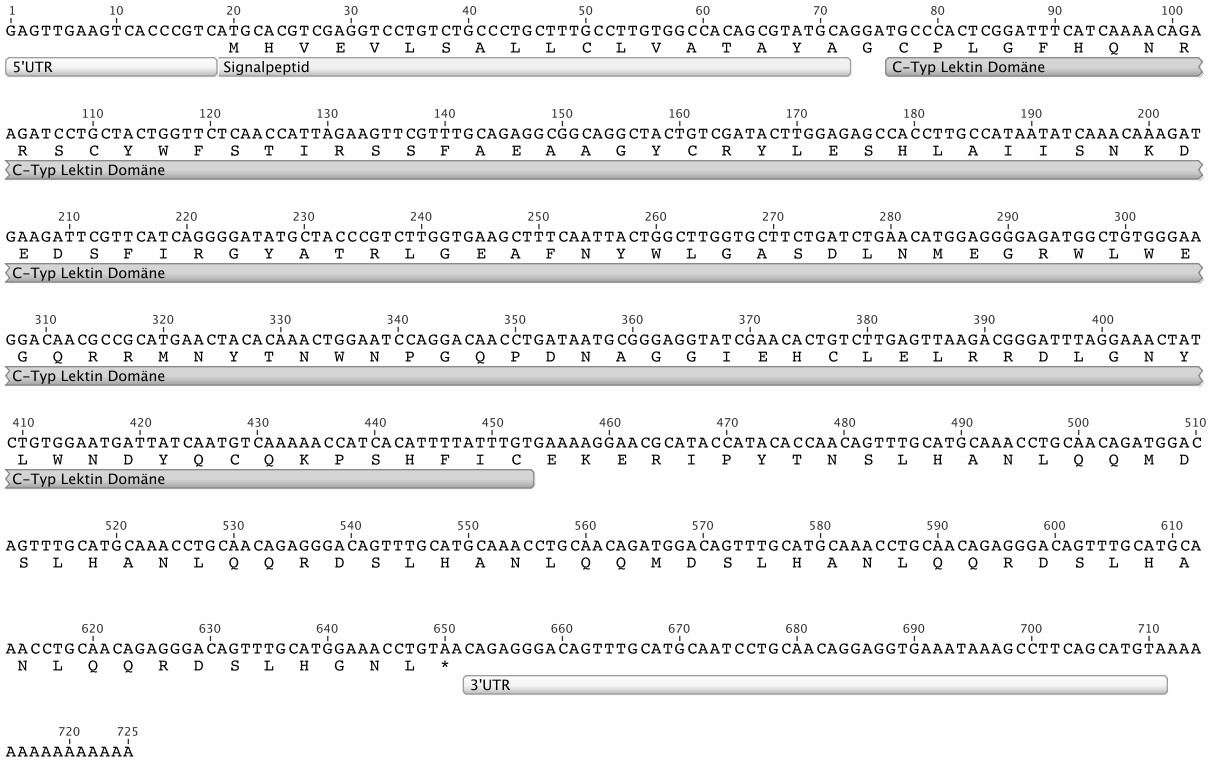


Abbildung 24: cDNA Perlucin-R5
Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die Aminosäure-Sequenz angeben. Das Stopcodon ist als Asterix * markiert.

cDNA Perlucin-R8

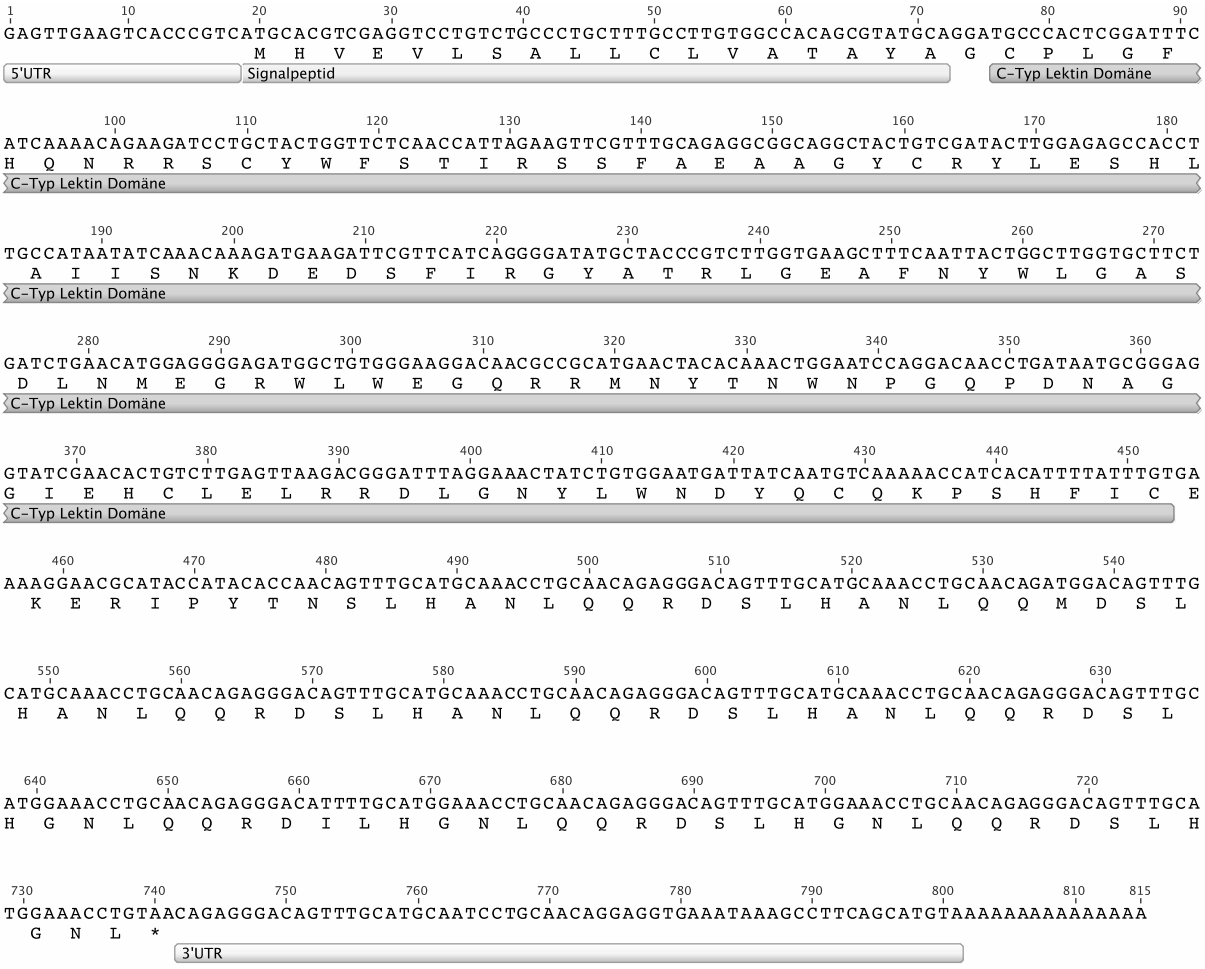


Abbildung 25: cDNA Perlucin-R8
Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die Aminosäure-Sequenz angeben. Das Stopcodon ist als Asterix * markiert.

cDNA Perlucin-R2

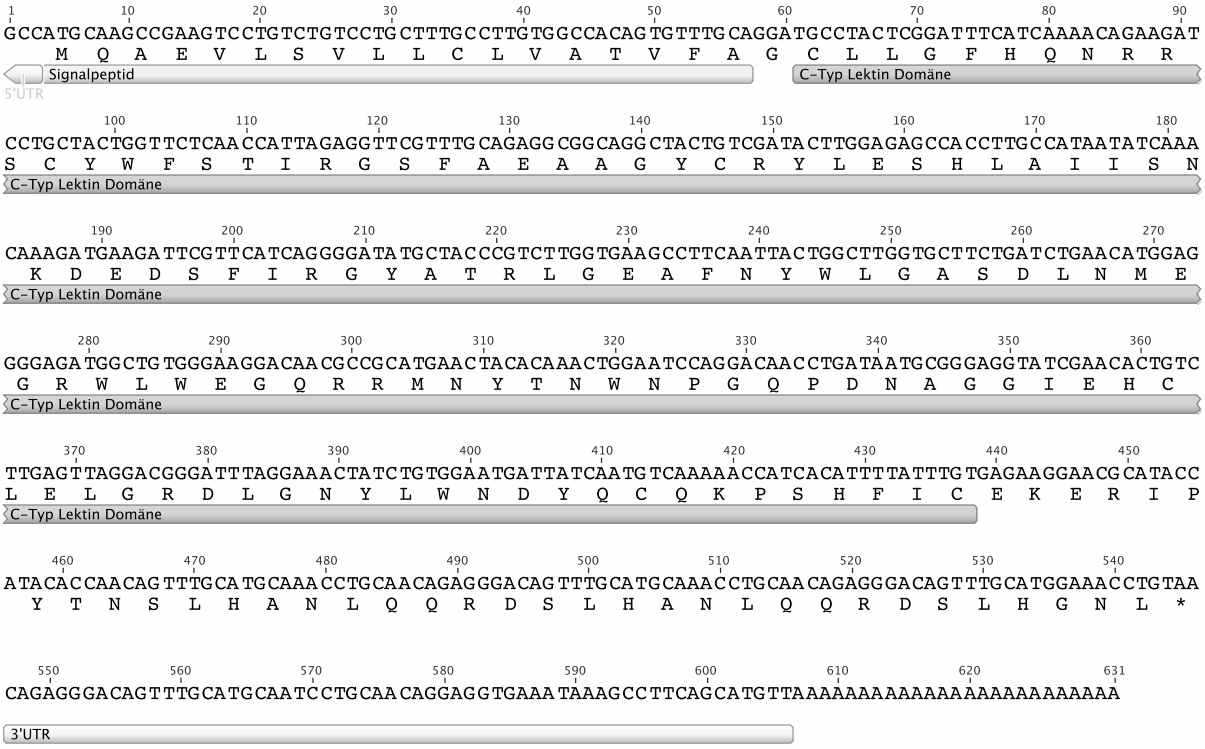


Abbildung 26: cDNA Perlucin-R2
Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die Aminosäure-Sequenz angeben. Das Stopcodon ist als Asterix * markiert.

cDNA Perlucin-R3

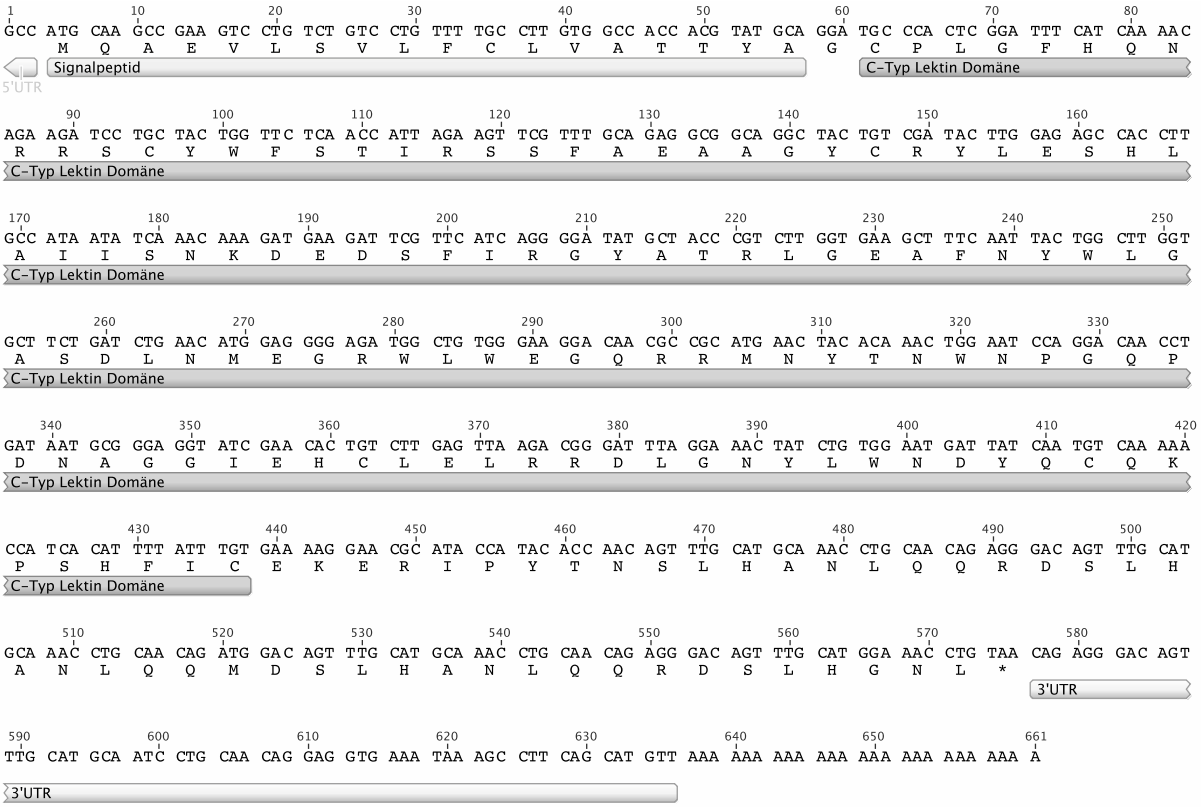


Abbildung 27: cDNA Perlucin-R3
Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die Aminosäure-Sequenz angeben. Das Stopcodon ist als Asterix * markiert.

cDNA Perlucin-R6

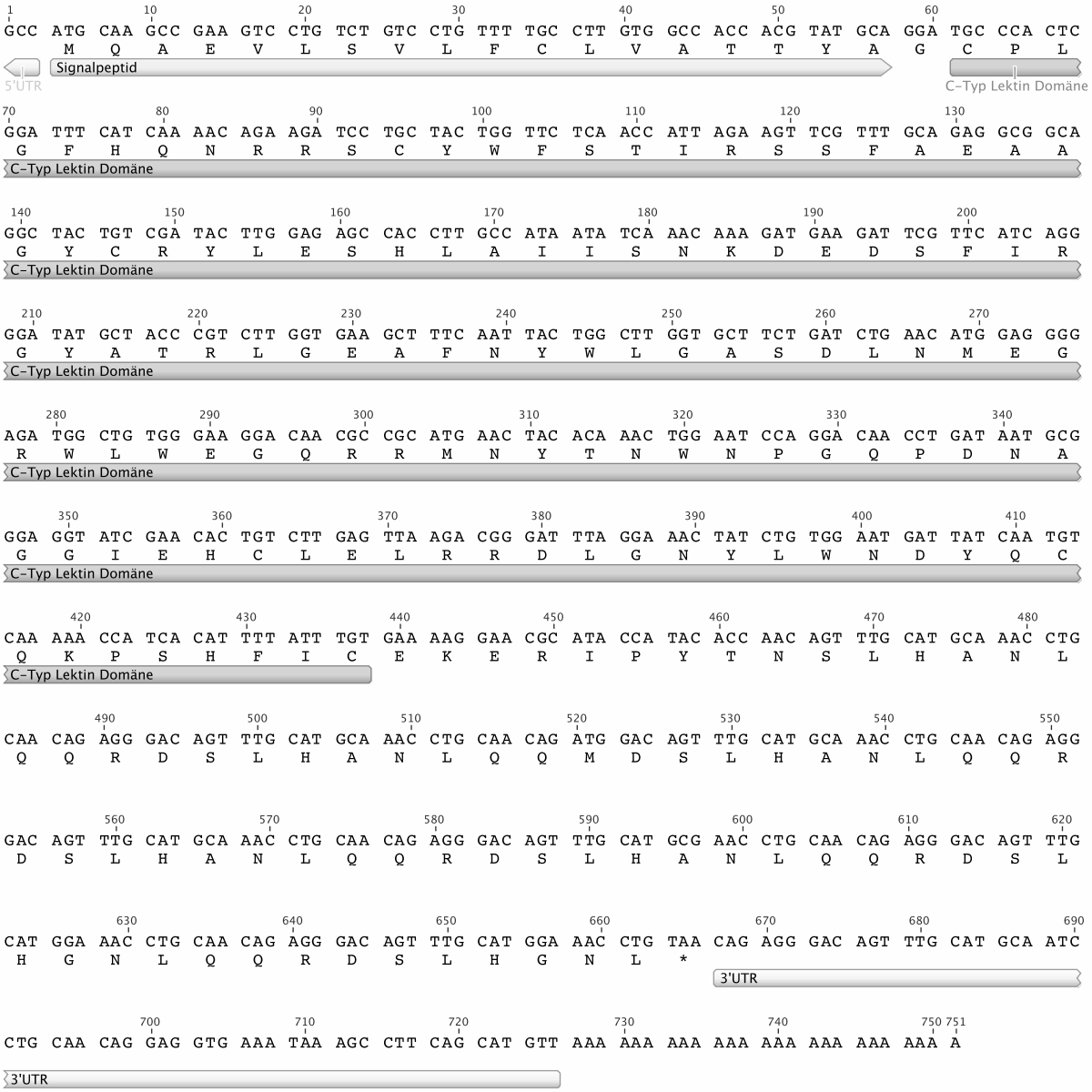


Abbildung 28: cDNA Perlucin-R6
Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die Aminosäure-Sequenz angeben. Das Stopcodon ist als Asterix * markiert.

.

cDNA H. varia potentielles Perlucin

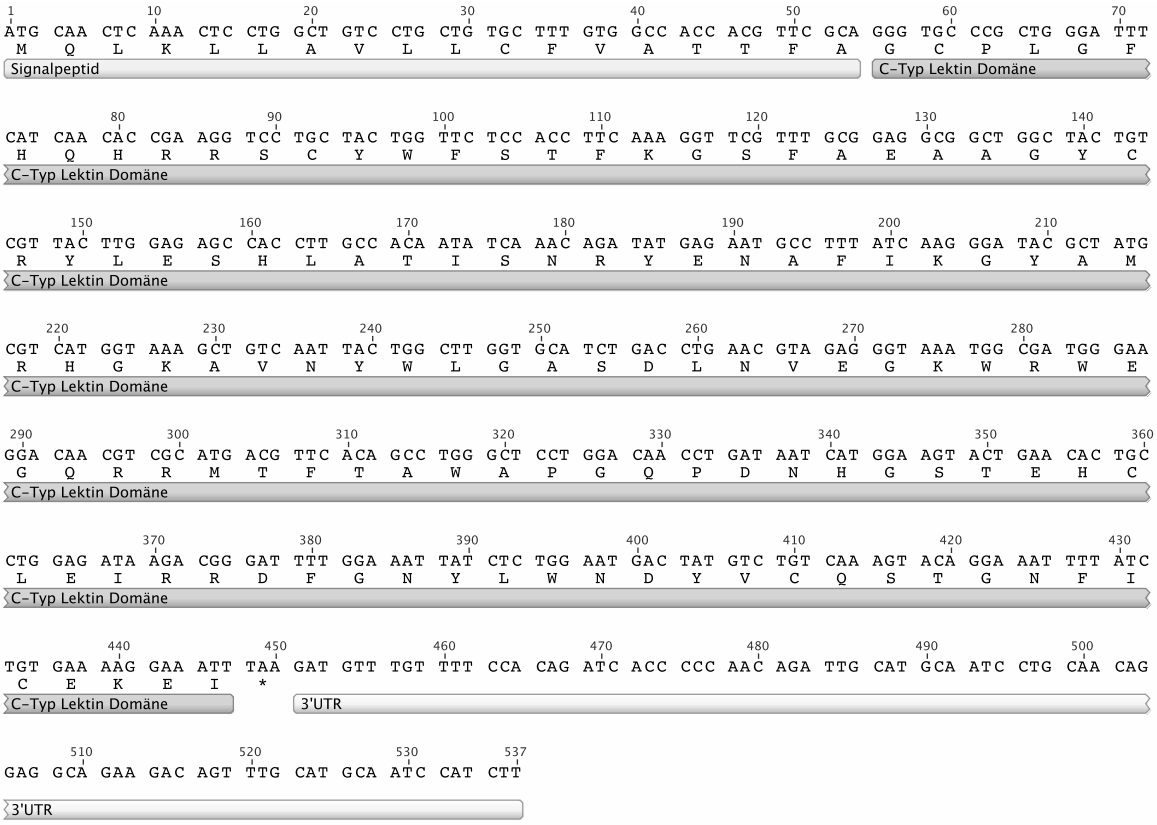


Abbildung 29: cDNA des potentiellen Perlucins von *H. varia.*
Unter der einzelsträngigen cDNA-Sequenz ist die Aminosäure-Sequenz angeben. Das Stopcodon ist als Asterix * markiert.

A II Alignments

Aminosäure-Alignment der identifizierten Spleißvarianten von Perlucin

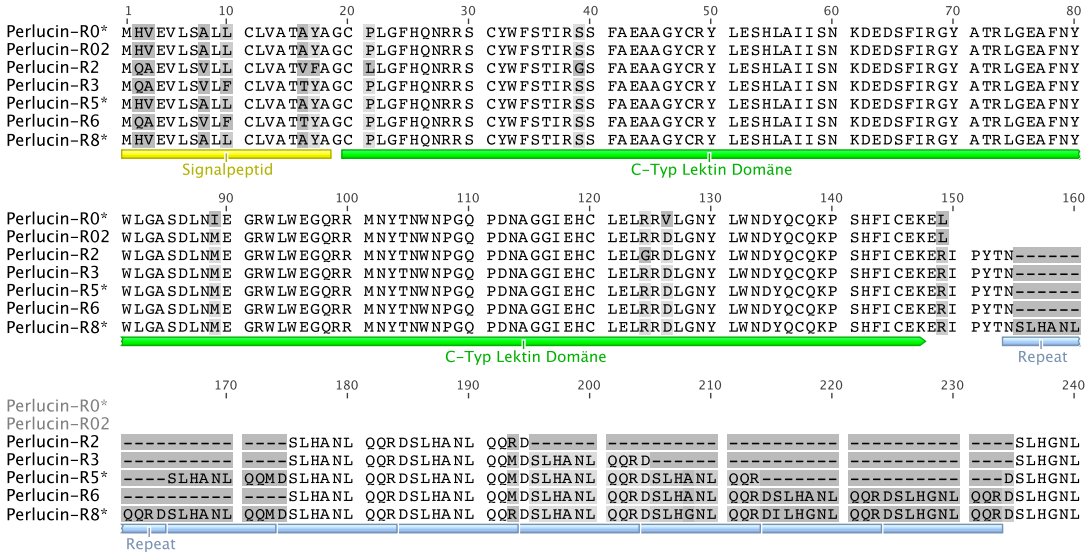
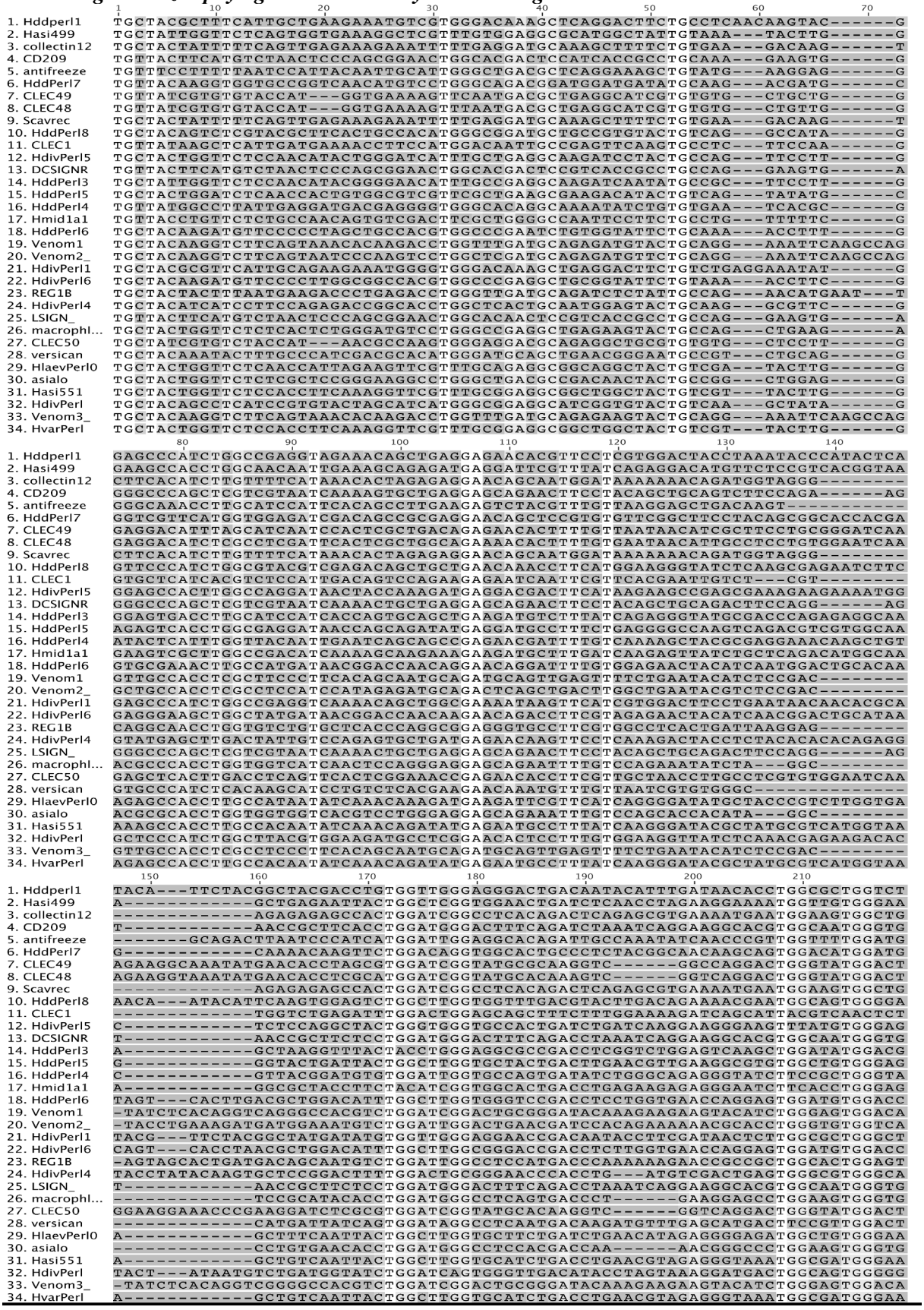


Abbildung 30: Aminosäure-Alignment der identifizierten neuen Perlucin Spleißvarianten von *H. laevigata*.
Mit einem Asterix * markiert sind die Spleißvarianten, die in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden. Alle Spleißvarianten haben jeweils ein 18 Aminosäure langes Signalpeptid am N-Terminus (lila) an dem sich die CTLD anschließt (grün). Die Benennung der Varianten erfolgte nach dem Vorhandensein und der Anzahl der Wiederholungen eines 10 Aminosäure langen *Repeats* (R) am C-Terminus (grau). Unterschiede und Lücken (*Gaps*) im Alignment sind mit grau unterlegt.

cDNA-Alignment zur phylogenetischen Analyse Abbildung 9



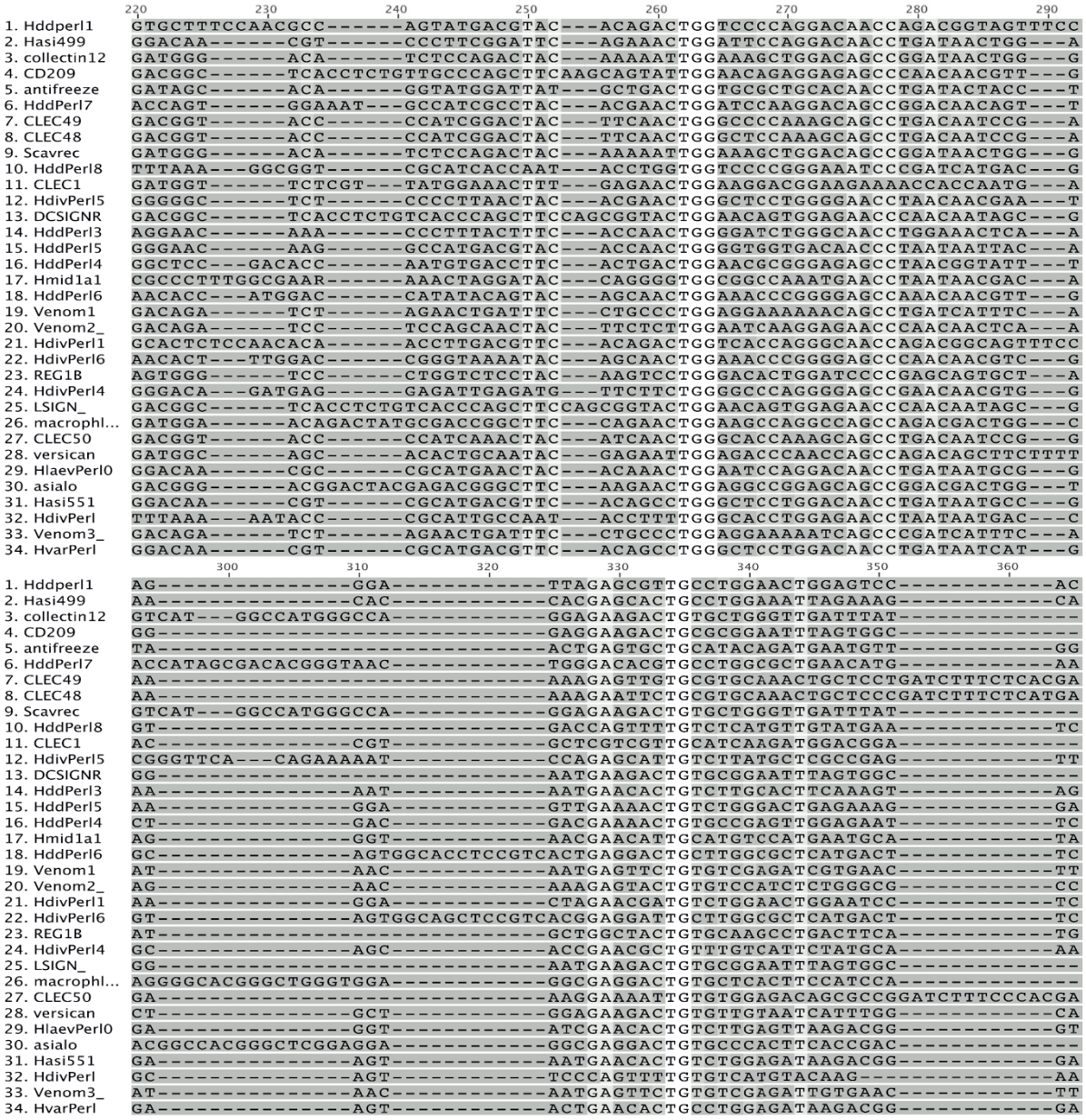

220 230 240 250 260 270 280 290
1. Hddperl1 GTGCTTTCCAACGCC------AGTATGACGTAC---ACAGACTGGTCCCCAGGACAACCAGACGGTAGTTTCC
2. Hasi499 GGACAA------CGT------CCCTTCGGATTC---AGAAACTGGATTCCAGGACAACCTGATAACTGG---A
3. collectin12 GATGGG------ACA------TCTCCAGACTAC---AAAAATTGGAAAGCTGGACAGCCGGATAACTGG---G
4. CD209 GACGGC------TCACCTCTGTTGCCCAGCTTCAAGCAGTATTGGAACAGAGGAGAGCCCAACAACGTT---G
5. antifreeze GATAGC------ACA------GGTATGGATTAT---GCTGACTGGTGCGCTGCACAACCTGATACTACC---T
6. HddPerl7 ACCAGT------GGAAAT---GCCATCGCCTAC---ACGAACTGGATCCAAGGACAGCCGGACAACAGT---T
7. CLEC49 GACGGT------ACC------CCATCGGACTAC---TTCAACTGGGCCCCAAAGCAGCCTGACAATCCG---A
8. CLEC48 GACGGT------ACC------CCATCGGACTAC---TTCAACTGGGCTCCAAAGCAGCCTGACAATCCG---A
9. Scavrec GATGGG------ACA------TCTCCAGACTAC---AAAAATTGGAAAGCTGGACAGCCGGATAACTGG---G
10. HddPerl8 TTTAAA---GGCGGT------CGCATCACCAAT---ACCTGGTGGTCCCCGGGAAATCCCGATCATGAC---G
11. CLEC1 GATGGT------TCTCGT---TATGGAAACTTT---GAGAACTGGAAGGACGGAAGAAAACCACCAATG---A
12. HdivPerl5 GGGGGC------TCT------CCCCTTAACTAC---ACGAACTGGGCTCCTGGGGAACCTAACAACGAA---T
13. DCSIGNR GACGGC------TCACCTCTGTCACCCAGCTTCCAGCGGTACTGGAACAGTGGAGAACCCAACAATAGC---G
14. HddPerl3 AGGAAC------AAA------CCCTTTACTTTC---ACCAACTGGGGATCTGGGCAACCTGGAAACTCA---A
15. HddPerl5 GGGAAC------AAG------GCCATGACGTAC---ACCAACTGGGGTGGTGACAACCCTAATAATTAC---A
16. HddPerl4 GGCTCC---GACACC------AATGTGACCTTC---ACTGACTGGAACGCGGGAGAGCCTAACGGTATT---T
17. Hmid1a1 CGCCCTTTGGCGAAR------AAACTAGGATAC---CAGGGGTGGCGGCCAAATGAACCTAATAACGAC---A
18. HddPerl6 AACACC---ATGGAC------CATATACAGTAC---AGCAACTGGAAACCCGGGGAGCCAAACAACGTT---G
19. Venom1 GACAGA------TCT------AGAACTGATTTC---CTGCCCTGGAGGAAAAAACAGCCTGATCATTTC---A
20. Venom2_ GACAGA------TCC------TCCAGCAACTAC---TTCTCTTGGAATCAAGGAGAACCCAACAACTCA---A
21. HdivPerl1 GCACTCTCCAACACA------ACCTTGACGTTC---ACAGACTGGTCACCAGGGCAACCAGACGGCAGTTTCC
22. HdivPerl6 AACACT---TTGGAC------CGGGTAAAATAC---AGCAACTGGAAACCCGGGGAGCCCAACAACGTC---G
23. REG1B AGTGGG------TCC------CTGGTCTCCTAC---AAGTCCTGGGACACTGGATCCCCGAGCAGTGCT---A
24. HdivPerl4 GGGACA---GATGAG------GAGATTGAGATG---TTCTTCTGGGGCCCAGGGGAGCCGAACAACGTG---G
25. LSIGN_ GACGGC------TCACCTCTGTCACCCAGCTTCAGCGGTACTGGAACAGTGGAGAACCCAACAATAGC---G
26. macrophl... GATGGA------ACAGACTATGCGACCGGCTTC---CAGAACTGGAAGCCAGGCCAGCCAGACGACTGG---C
27. CLEC50 GACGGT------ACC------CCATCAAACTAC---ATCAACTGGGCACCAAAGCAGCCTGACAATCCG---G
28. versican GATGGC------AGC------ACACTGCAATAC---GAGAATTGGAGACCCAACCAGCCAGACAGCTTCTTTT
29. HlaevPerl0 GGACAA------CGC------CGCATGAACTAC---ACAAACTGGAATCCAGGACAACCTGATAATGCG---G
30. asialo GACGGG------ACGGACTACGAGACGGGCTTC---AAGAACTGGAGGCCGGAGCAGCCGGACGACTGG---T
31. Hasi551 GGACAA------CGT------CGCATGACGTTC---ACAGCCTGGGCTCCTGGACAACCTGATAATGCC---G
32. HdivPerl TTTAAA---AATACC------CGCATTGCCAAT---ACCTTTTGGGCACCTGGAGAACCTAATAATGAC---C
33. Venom3_ GACAGA------TCT------AGAACTGATTTC---CTGCCCTGGAGGAAAAATCAGCCCGATCATTTC---A
34. HvarPerl GGACAA------CGT------CGCATGACGTTC---ACAGCCTGGGCTCCTGGACAACCTGATAATCAT---G
300 310 320 330 340 350 360
1. Hddperl1 AG----------------GGA----------TTAGAGCGTTGCCTGGAACTGGAGTCC----------AC
2. Hasi499 AA----------------CAC----------CACGAGCACTGCCTGGAAATTAGAAAG----------CA
3. collectin12 GTCAT---GGCCATGGGCCA----------GGAGAAGACTGTGCTGGGTTGATTTAT----------
4. CD209 GG----------GAGGAAGACTGCGCGGAATTTAGTGGC----------
5. antifreeze TA----------ACTGAGTGCTGCATACAGATGAATGTT----------GG
6. HddPerl7 ACCATAGCGACACGGGTAAC----------TGGGACACGTGCCTGGCGCTGAACATG----------AA
7. CLEC49 AA----------AAAGAGTTGTGCGTGCAAACTGCTCCTGATCTTTCTCACGA
8. CLEC48 AA----------AAAGAATTCTGCGTGCAAACTGCTCCCGATCTTTCTCATGA
9. Scavrec GTCAT---GGCCATGGGCCA----------GGAGAAGACTGTGCTGGGTTGATTTAT----------
10. HddPerl8 GT----------GACCAGTTTTGTCTCATGTTGTATGAA----------TC
11. CLEC1 AC----------CGT----------GCTCGTCGTTGCATCAAGATGGACGGA----------
12. HdivPerl5 CGGGTTCA---CAGAAAAAT----------CCAGAGCATTGTCTTATGCTCGCCGAG----------TT
13. DCSIGNR GG----------AATGAAGACTGTGCGGAATTTAGTGGC----------
14. HddPerl3 AA----------AAT----------AATGAACACTGTCTTGCACTTCAAAGT----------AG
15. HddPerl5 AA----------GGA----------GTTGAAAACTGTCTGGGACTGAGAAAG----------GA
16. HddPerl4 CT----------GAC----------GACGAAAACTGTGCCGAGTTGGAGAAT----------TC
17. Hmid1a1 AG----------GGT----------AACGAACATTGCATGTCCATGAATGCA----------TA
18. HddPerl6 GC----------AGTGGCACCTCCGTCACTGAGGACTGCTTGGCGCTCATGACT----------TC
19. Venom1 AT----------AAC----------AATGAGTTCTGTGTCGAGATCGTGAAC----------TT
20. Venom2_ AG----------AAC----------AAAGAGTACTGTGTCCATCTCTGGGCG----------CC
21. HdivPerl1 AA----------GGA----------CTAGAACGATGTCTGGAACTGGAATCC----------TC
22. HdivPerl6 GT----------AGTGGCAGCTCCGTCACGGAGGATTGCTTGGCGCTCATGACT----------TC
23. REG1B AT----------GCTGGCTACTGTGCAAGCCTGACTTCA----------TG
24. HdivPerl4 GC----------AGC----------ACCGAACGCTGTTTGTCATTCTATGCA----------AA
25. LSIGN_ GG----------AATGAAGACTGTGCGGAATTTAGTGGC----------
26. macrophl... AGGGGCACGGGCTGGGTGGA----------GGCGAGGACTGTGCTCACTTCCATCCA----------
27. CLEC50 GA----------AAGGAAAATTGTGTGGAGACAGCGCCGGATCTTTCCCACGA
28. versican CT----------GCT----------GGAGAAGACTGTGTTGTAATCATTTGG----------CA
29. HlaevPerl0 GA----------GGT----------ATCGAACACTGTCTTGAGTTAAGACGG----------GT
30. asialo ACGGCCACGGGCTCGGAGGA----------GGCGAGGACTGTGCCCACTTCACCGAC----------
31. Hasi551 GA----------AGT----------AATGAACACTGTCTGGAGATAAGACGG----------GA
32. HdivPerl GC----------AGT----------TCCCAGTTTTGTGTCATGTACAAG----------AA
33. Venom3_ AT----------AAC----------AATGAGTTCTGTGTCGAGATTGTGAAC----------TT
34. HvarPerl GA----------AGT----------ACTGAACACTGCCTGGAGATAAGACGG----------GA
370 380 390 400 410 420 430 435
1. Hddperl1 G----------TATAAATTGAAATGGAACGACGACGACTGCTACGATCAC---GATATGTTCATCTGT
2. Hasi499 TTTCCATCACTATCCTCAATATCTCTGGAATGATTTCAAATGTCATGCTCCA---TCACATTTTATTTGT
3. collectin12 ----------GCTGGGCAGTGGAACGATTTCCAATGTGAAGACGTC---AATAACTTCATTTGC
4. CD209 ----------AATGGCTGGAACGACGACAAATGTAATCTTGCC---AAATTCTGGATCTGC
5. antifreeze AATT----------GGAAAATGCTGGAATGACACACCTTGTACGCATCTT---CATTCATCAATCTGC
6. HddPerl7 C----------AAACAGGCGGGATGGAGCGACGAGCAGTGTGAACAGACG---AACTACATGTTGTGT
7. CLEC49 TAAG----------TGGTATGAGAACTGGAACAATTTGGAGTGTAATGAAGTGATGCGGGCTTATATTTGC
8. CLEC48 TAAA----------TGGTATGAAAACTGGAACAATTTGGAGTGTAATGAAGTGATGCGGGCTTATATTTGC
9. Scavrec ----------GCTGGGCAGTGGAACGATTTCCAATGTGAAGACGTC---AATAACTTCATTTGC
10. HddPerl8 A----------CAAGCGTTCAAGTGGGATGATGCTGCCTGCAGCTACGGA---CATTACTTCCTGTGC
11. CLEC1 ----------AACGGAGAATGGTTCCAATCCTGCTGCAAGAAGAAG---ACTTTCACCATTTGC
12. HdivPerl5 C----------TTTCGCTATGAGTGGAATGACCGTCAATGTAGTTCAGGG---CACAAGTTCATCTGT
13. DCSIGNR ----------AGTGGCTGGAACGACAATCGATGTGACGTTGAC---AATTACTGGATCTGC
14. HddPerl3 T----------GATGGATATCGTTGGCATGATTACAACTGTGATTTTATC---GCCAATTTCATATGT
15. HddPerl5 G----------AATAACTACCAGTGGAATGATTTTCAGTGTCATCACCGC---TTAAACTTTATCTGT
16. HddPerl4 T----------GTTGATTATCTGTGGAATGATGACGAATGTACGAAACAG---CAACATTTCATGTGT
17. Hmid1a1 C----------CTTAAGTACAGGTGGAATGATGTCCCCTGTGATCGCAAG---TACAGGTTCATTTGT
18. HddPerl6 AGAT----------AACTACCAGTGGAACGACGCTCCCTGCACAGACCGA---ATGTTCTTCCTCTGT
19. Venom1 TACA----------GGGTATCTCCAGTGGAATGATGACAACTGTGCAGCCTTG---CGTCCTTTTCTGTGC
20. Venom2_ GACA----------GGATATCTCAAATGGAATGATGCACCCTGCGAAACTTTG---CATCCCTTCATCTGC
21. HdivPerl1 G----------TACAACTTGAAATGGAACGACGACGATTGCTCCGATCAC---AACATGTTCATTTGC
22. HdivPerl6 AGAT----------AACTATGAGTGGAACGACGCACCATGCACAGATAGA---ATGTACTTCCTTTGT
23. REG1B CTCA----------GGATTCAAGAAATGGAAGGATGAATCTTGTGAGAAGAAG---TTCTCCTTTGTTTGC
24. HdivPerl4 CGCT----------AATTTCACGTGGGACGACGAGCACTGCACGTACCCC---GGTTACCCATTGTGT
25. LSIGN_ ----------AGTGGCTGGAACGACAATCGATGTGACGTTGAC---AATTACTGGATCTGC
26. macrophl... ----------GACGGCAGGTGGAATGACGACGTCTGCCAGAGGCCC---TACCACTGGGTCTGC
27. CLEC50 TAAG----------TGGTATGAGAACTGGAATAACGAGGCGTGCAGCACCGAGATGAGAGCTTATATCTGC
28. versican TGAG----------AATGGCCAGTGGAATGATGTTCCCTGCAATTACCAT---CTCACCTATACGTGC
29. HlaevPerl0 TTTA----------GGAAACTATCTGTGGAATGATTATCAATGTCAAAAACCA---TCACATTTTATTTGT
30. asialo ----------GACGGCCGCTGGAACGACGACGTCTGCCAGAGGCCC---TACCGCTGGGTCTGC
31. Hasi551 TTTT----------GGAAATTATCTCTGGAATGACTTTGTCTGTCAAAGTCCA---TCAAACTTTATTTGT
32. HdivPerl A----------GGATCGTACATGTGGGATGACAATGAATGTCAGGACACC---GAGTATTTCTTGTGT
33. Venom3_ TACA----------GGGTACCTCCAGTGGAATGATGACAACTGCGCAGCCTTG---CGTCCTTTTCTGTGC
34. HvarPerl TTTT----------GGAAATTATCTCTGGAATGACTATGTCTGTCAAAGTACA---GGAAATTTTATCTGT

Abbildung 31, auf den vorherigen Seiten: cDNA-Alignment zur phylogenetischen Analyse (Abbildung 9).
Die CTLD von Perlucinen der *Haliotidae* und von C-Typ Lektinen von Vertebraten und Invertebraten wurden zur phylogenetischen Analyse herangezogen (siehe Material und Methoden 2.34).
Unterschiede und Lücken (Gaps) im Alignment sind mit grau unterlegt.

Aminosäuren-Alignment zur phylogenetischen Analyse Abbildung 10

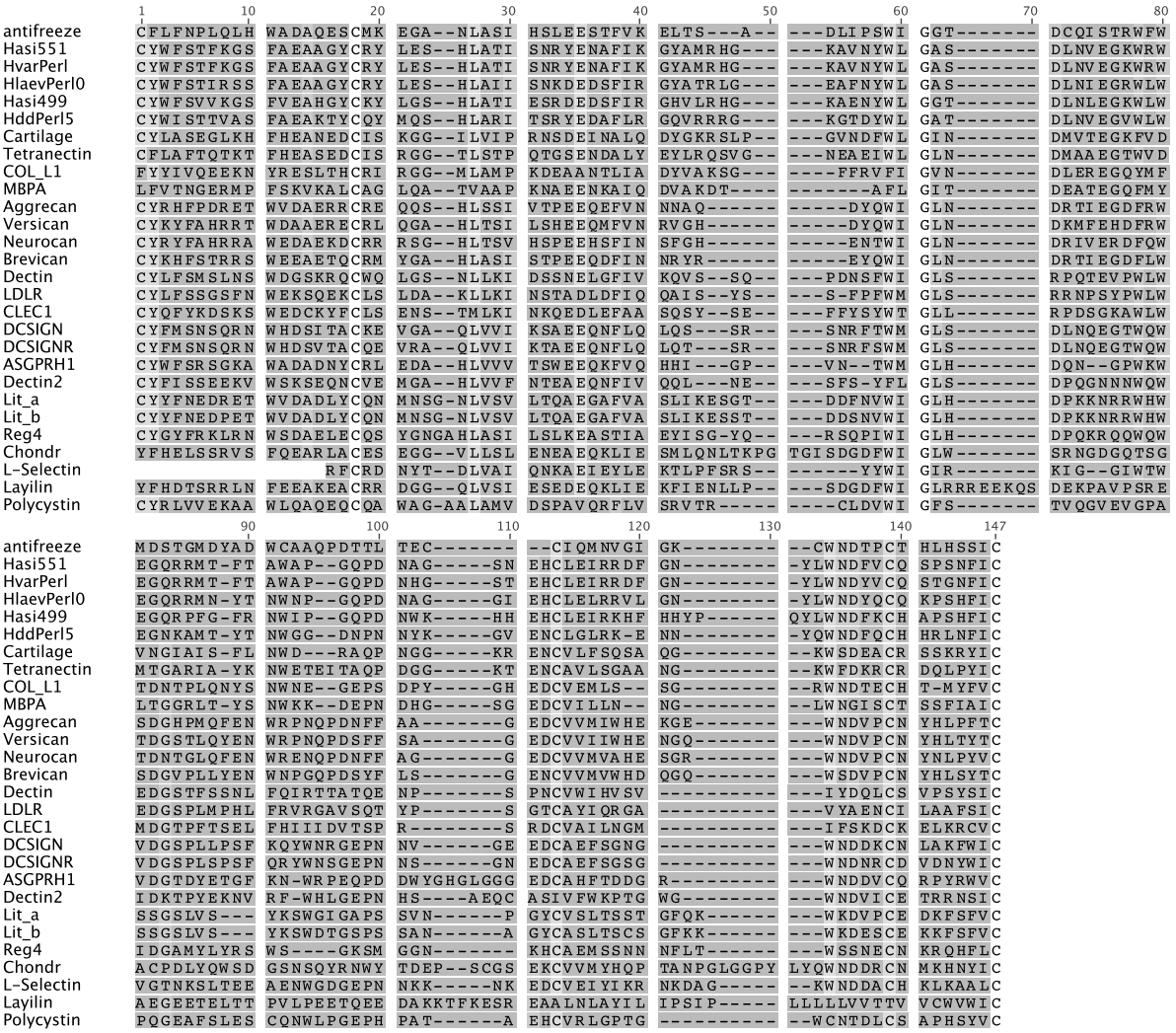


Abbildung 32: Aminosäurealignment zur phylogenetischen Analyse Abbildung 10. Aminosäure-Alignment der CTLD der Perlucine von *Haliotis spec.* mit der CTLD von Beispielproteinen der C-Typ Lektin Gruppen nach Drickamer und Zelensky [96, 174, 175] (siehe Abbildung 9). Cartilage = Cartilage-derived C-type lectin (*Homo sapiens*); Tetratnectin = plasminogen-binding protein (*H. sapiens*); COL_L1 = Collectin Liver 1 (*H. sapiens*); Aggrecan (*H. sapiens*); Brevican (*H. sapiens*); Versican (*H. sapiens*); Neurocan (*H. sapiens*); Lit_a = Lithostathine alpha (*H. sapiens*); Lit_b = Lithostatin beta (H. *sapiens*); Reg4 = regenerating islet-derived protein 4 (*H. sapiens*); DCSIGN = CD209 antigen isoform 6 (*H. sapiens*); ASGPRH1 = Asialoglyco protein receptor (*H. sapiens*); Dectin 2 = Dendritic cell-associated C-type lectin 2 (*H. sapiens*); Dectin = Dendritic cell-associated C-type lectin 1 (*H. sapiens*); LDLR = oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (*H. sapiens*); CLEC1 = C-type lectin domain family 1 member A (*H. sapiens*); Chondr = chondrolectin isoform a (*H. sapiens*); Layilin (*H. sapiens*); L selectin (*H sapiens*); Polycystin = Polycystic kidney disease-associated (*H. sapiens*); MBL1 = Mannose Binding Protein A (*Mus Musculus*); HddPerl5* = putative Perlucin 5 (*Haliotis discus discus*) ; Hmid1a1 = putative Perlucin (*Haliotis midae*); Hasi551 (*Haliotis asinina*); Hasi499 (*H. asinina*); HlaevPerl0* = Perlucin R0 (*Haliotis laevigata*); HvarPerl = putative Perlucin (*Haliotis varia)*.

A III Accession Nummern (GenBank)

Name		Accessionnumber	Species
Venom1	Venom gland 1	(AF354270)	*Bungarus fasciatus*
Venom2	Venom gland 2	(AF354271)	*Bungarus fasciatus*
Venom3	Venom gland 3	(AF354272)	*Bungarus fasciatus*
CLEC1		(NM_072099.5)	*Caenorhabditis elegans*
CLEC48		(NM_075146.1)	*Caenorhabditis elegans*
CLEC49		(NM_075428.3)	*Caenorhabditis elegans*
CLEC50		(NM_075429)	*Caenorhabditis elegans*
antifreeze	type II antifreeze	(S65819.1)	*Clupea harengus*
Hasi499		(GT275204.1)	*Haliotis asinina*
Hasi551		(GT272273.1)	*Haliotis asinina*
Hddperl1		(EF103332)	*Haliotis discus discus*
HddPerl3		(EF103334)	*Haliotis discus discus*
HddPerl4		(EF103335)	*Haliotis discus discus*
HddPerl5		(EF103336)	*Haliotis discus discus*
HddPerl6		(EF103337)	*Haliotis discus discus*
HddPerl7		(EF103338)	*Haliotis discus discus*
HddPerl8		(EF103339)	*Haliotis discus discus*
HdivPerl		(GU446716)	*Haliotis diversicolor*
HdivPerl1		(JN314429)	*Haliotis diversicolor*
HdivPerl4		(JN314433)	*Haliotis diversicolor*
HdivPerl5		(JN314431)	*Haliotis diversicolor*
HdivPerl6		(JN314432)	*Haliotis diversicolor*
HlaevPerl0		(FN674442)	*Haliotis laevigata*
Hmid1a1		(EU135915)	*Haliotis midae*
HvarPerl		(diese Arbeit)	*Haliotis varia*
asialo	asialoglycoprotein receptor H1, AGPR H1	(NM_001197216.)	*Homo sapiens*
CD209	DC-SIGN	(NM_001144899.1)	*Homo sapiens*
collectin12	collectin sub-family member 12	(NM_130386)	*Homo sapiens*
DCSIGNR	sDC-SIGN1A type III	(AF245219.)	*Homo sapiens*
LSIGN	CD209L	(AY343913.1)	*Homo sapiens*
macrophlec2	macrophage lectin 2	(D50532.1)	*Homo sapiens*
REG1B	regenerating islet-derived 1 beta	(NM_006507.3)	*Homo sapiens*
Scavrec	Scavenger receptor	(AB038518.1)	*Homo sapiens*
versican	chondroitin sulfate proteoglycan 2	(AB209491.1)	*Homo sapiens*
Cartilage		(sp|O75596.1|)	*Homo sapiens*
Tetratnectin		(pdb|1HTN|A)	*Homo sapiens*
COL_L1	Collectin Liver 1	(ref|XP_005250813.1)	*Homo sapiens*
Aggrecan		(ref|NP_001126.3|)	*Homo sapiens*
Brevican		(gb|AAH09117.1|)	*Homo sapiens*
Versican		(ref|NP_004376.2|)	*Homo sapiens*
Neurocan		(gb|AAC80576.1|)	*Homo sapiens*

Lit_a	Lithostatin a	(gb|AAA60546.1)	*Homo sapiens*
Lit_b	Lithostatin b	(ref|NP_006498.1|)	*Homo sapiens*
Reg4	regenerating islet-derived protein 4	(ref|NP_114433.1|)	*Homo sapiens*
DCSIGN	CD209 antigen isoform 6	(ref|NP_001138366.1|)	*Homo sapiens*
DCSIGNR		(gb|AAG13848.2|)	*Homo sapiens*
ASGPRH1	Asialoglyco protein receptor	(ref|NP_001662.1|)	*Homo sapiens*
Dectin2	Dendritic cell-associated C-type lectin 2	(ref|NP_001007034.1|)	*Homo sapiens*
Dectin	Dendritic cell-associated C-type lectin-1	(ref|NP_072092.2|)	*Homo sapiens*
LDLR	oxidized low-density lipoprotein receptor 1	(ref|NP_002534.1)	*Homo sapiens*
CLEC1	C-type lectin domain family 1, member A,	(gb|EAW96142.1|)	*Homo sapiens*
Chondr	chondrolectin isoform a precursor	(ref|NP_079220.2|)	*Homo sapiens*
Layilin		(gb|AAH25407.1|)	*Homo sapiens*
L selectin		(gb|EAW90857.1|)	*Homo sapiens*
Polycystin	Polycystic kidney disease-associated	(gb|AAB59488.1|)	*Homo sapiens*
MBP A	Mannose Binding Protein	(P39039)	*Mus Musculus*

A IV Vektorkarten

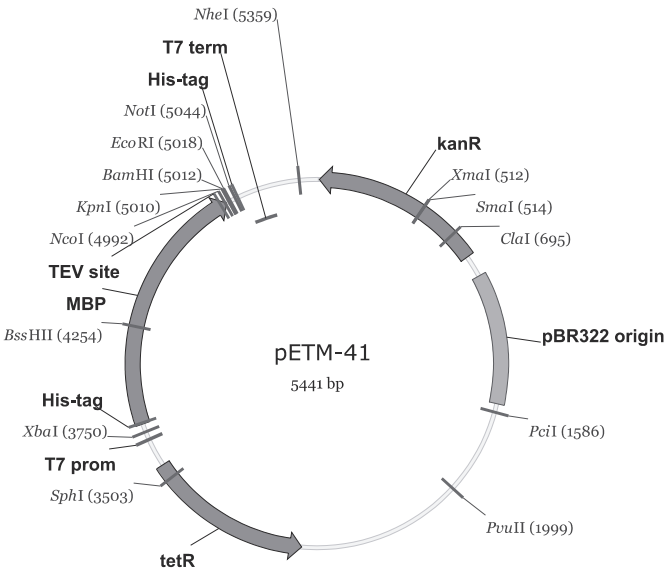


Abbildung 33: Vektorkarte von pETM-41 (EMBL).

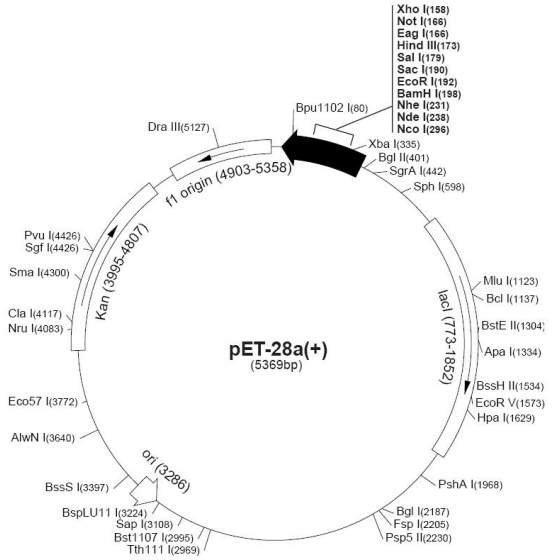


Abbildung 34: Vektorkarte von pET28a(+). Genutzt wurde der Vektor pET28b(+) der 5368 Basenpaare hat und an der Stelle 198 eine Base entfernt wurde.

A V IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide

M	A oder C	N	A, T, C, G
R	A oder G	B	nicht A
W	A oder T	D	nicht C
S	C oder G	H	nicht G
Y	C oder T	V	nicht T
K	G oder T		

A VI Danksagung

Einen besonderen Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sørge Kelm für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Betreuung und die Unterstützung.
Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Ingrid M. Weiss für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.
Für die ausgezeichnete Betreuung im Labor und Korrekturlesen danke ich Herrn Dr. rer. nat. Frank Dietz.
Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Francken für die MALDI-MS Analysen.
Dr. Jim Rookes von der Deakin University in Geelong, Australia for labspace and help!
Herrn Dr. rer. nat. Ingo Grunwald vom Fraunhofer Bremen IFAM (Klebstoffe und Polymerchemie AG BioInspirierte Materialien) für die fruchtbaren Diskussionen und die Unterstützung. Herrn Dr. rer. nat. Malte Kleemeier vom Fraunhofer Bremen (IFAM) für die Einweisung in das Messen der Dynamischen Lichtstreuung.
Der Arbeitsgruppe Glykobiochemie vor allem Petra, Nazila, Sabine und meinen Mitdoktorandinnen Hendrik, Mario, Thaddeus, Ketan, Jessica, Veronika und vielen anderen für das wirklich tolle Arbeitsklima.
Ganz besonderen Dank gilt Margot für das unermüdliche und gründliche Korrekturlesen. Uli und Thomas für das Korrekturlesen und Mut machen.
Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung.
Natürlich, meinen Kindern Nieves und Enno, weil sie da sind.
Und Max, weil du hoffentlich immer bei mir bist, für deine Geduld und überhaupt für alles.

A VII Erklärung

Tanja Dodenhof
Lahnstraße 6
28199 Bremen

Bremen, den 14. März 2014

Ich erkläre, dass ich die Doktorarbeit mit dem Titel:
„Identifikation und Charakterisierung von Perlucin Spleißvarianten der marinen Abalone *Haliotis laevigata*."
selbstständig verfasst und geschrieben habe und außer den angegeben Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.
Ich erkläre des Weiteren, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits einem anderem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
Ebenfalls erkläre ich hiermit, dass es sich bei den von mir abgegebenen Arbeiten um drei identische Exemplare handelt.

(Tanja Dodenhof)