Lösliche Calcium-bindende Proteine (SCBP) bei Evertebraten: Sequenzierung und Expression von SCBP-Isoformen der Muskulatur des Anneliden *Lumbricus terrestris* und Vorkommen ähnlicher Proteine bei Dipteren und Nematoden

> Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> > vorgelegt von Ernst Kiehl aus Düsseldorf

> > > Düsseldorf 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J. D`Haese

Korreferent: Prof. Dr. H. Greven

Tag der mündlichen Prüfung:22.5.2003

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1	
Sonderrolle des Ca ⁺⁺ in der belebten Natur		
Ca ⁺⁺ -bindende Proteindomänen		
Das am häufigsten gefundene Motiv der koordinativen Ca++-		
Bindung: Die EF-Hand-Domäne	3	
Auslösung der Muskelkontraktion durch Ca ⁺⁺ als sekun-		
därer Botenstoff	7	
Verarbeitung eines Ca ⁺⁺ -Signals durch Calmodulin		
Auslösung der Muskelkontraktion durch Ca++- und Ca++-bin-		
dende Proteine	10	
Untersuchung der Aktivierung der Muskelkontraktion durch		
Ca ⁺⁺ mit Hilfe des Ca ⁺⁺ -bindenden Proteins Aequorin	11	
Löschung des Ca ⁺⁺ -Signals nach der Kontraktion	12	
Anpassungen zur schnellen Löschung des Ca ⁺⁺ -Signals bei		
schnell kontrahierenden Muskeln	13	
Auslösung der Kontraktion bei asynchronen Muskeln	17	
Ziel der Arbeit	19	
Material und Methoden	20	
Liste der Lösungen		
Beschaffung, Zucht und Präparation von Tieren zur Isolation		
von SCBP	22	
Präparation vom Drosophila melanogaster und Calliphora ery-		
throcephala	22	
Präparation der Hautmuskelschläuche von Lumbricus terres-		
tris und Ascaris suum	23	
Zucht von Caenorhabditis elegans	24	
SCBP-Standardpräparation	26	
Chromatographische Methoden	27	
Molekularbiologische Methoden	28	
Reinigung der Antikörper	28	
Suche nach SCBP-spezifischen Klonen in einer muskelspezi-		
fischen Genbibliothek	29	
	Einleitung Sonderrolle des Ca ⁺⁺ in der belebten Natur Ca ⁺⁺ -bindende Proteindomänen Das am häufigsten gefundene Motiv der koordinativen Ca ⁺⁺ - Bindung: Die EF-Hand-Domäne Auslösung der Muskelkontraktion durch Ca ⁺⁺ als sekun- därer Botenstoff Verarbeitung eines Ca ⁺⁺ -Signals durch Calmodulin Auslösung der Muskelkontraktion durch Ca ⁺⁺ - und Ca ⁺⁺ -bin- dende Proteine Untersuchung der Aktivierung der Muskelkontraktion durch Ca ⁺⁺ mit Hilfe des Ca ⁺⁺ -bindenden Proteins Aequorin Löschung des Ca ⁺⁺ -Signals nach der Kontraktion Anpassungen zur schnellen Löschung des Ca ⁺⁺ -Signals bei schnell kontrahierenden Muskeln Auslösung der Kontraktion bei asynchronen Muskeln Ziel der Arbeit Material und Methoden Liste der Lösungen Beschaffung, Zucht und Präparation von Tieren zur Isolation von SCBP Präparation vom <i>Drosophila melanogaster</i> und <i>Calliphora ery-</i> <i>throcephala</i> Präparation der Hautmuskelschläuche von <i>Lumbricus terres-</i> <i>tris</i> und <i>Ascaris suum</i> Zucht von <i>Caenorhabditis elegans</i> SCBP-Standardpräparation Chromatographische Methoden Reinigung der Antikörper Suche nach SCBP-spezifischen Klonen in einer muskelspezi- fischen Genbibliothek	

2.5.2.1.	Bakterienkultur	30
2.5.2.2.	Durchsuchen der Genbibliothek mit Antikörpern	31
2.5.2.3.	Screening der muskelspezifischen Genbank mit einer DNA-	
	Sonde	32
2.5.2.4.	in-vivo-Excision des pBluescript-Phagemids	33
2.5.3.	Extraktion von DNA	34
2.5.3.1.	DNA-Präparation aus dem Hautmuskelschlauch des Regen-	
	wurms	34
2.5.3.2.	Präparation und Schneiden mit Restriktionsenzymen von Plas-	
	mid-DNA	34
2.5.4.	Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Thermocycle-Sequen-	
	zierung	35
2.5.5.	Klonierung von PCR-Produkten mit dem Vektor pCR T7/NT-	
	ТОРО	38
2.5.6.	Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen	40
2.5.6.1	Rekombinante Proteine aus E.coli XL1 Blue mit dem Blue-	
	script-Vektor	40
2.5.6.2.	Rekombinante Proteine aus E.coli BL21(DE3)pLysS mit dem	
	Vektor pCR T7/NT-TOPO	40
2.6.	Quantitative Methoden	42
2.6.1.	Proteinbestimmungen	42
2.6.2.	Bestimmung der Ca-Konzentration durch Atomabsorptionspek-	
	troskopie	42
2.6.3.	DNA-Bestimmung durch UV-Absorption	43
2.7.	Elektrophoretische Methoden	43
2.7.1.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	43
2.7.2.	Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE	43
2.7.3.	Nachweis spezifischer Proteine durch Blot-Verfahren	44
2.7.4.	Auftrennung von Proteinen in der Harnstoff-Gelelektrophorese	45
2.8.	Dokumentation	45

3.	Ergebnisse	47	
3.1.	SCBP bei Nematoden		
3.1.1.	Kreuzreaktion von anti-Regenwurm-SCBP-Antikörpern mit		
	Nematodenproteinen	47	
3.1.2.	Versuch der Präparation von SCBP aus Hautmuskelschläu-		
	chen von A. suum	49	
3.1.3.	Versuch der Präparation von SCBP aus C.elegans	51	
3.1.4. Suche nach potentiellen SCBP-Genen in der C. elegan			
	Genbibliothek	53	
3.2.	Nachweis von SCBP in den Fliegen Drosophila melanogaster		
	und Calliphora erythrocephala	55	
3.2.1.	Isolierung von SCBP aus Drosophila melanogaster	55	
3.2.2.	. Nachweis der Ca ⁺⁺ -Bindung des 24k-Proteins durch Bindung		
	von ⁴⁵ Ca und Demonstration einer calciumabhängigen elektro-		
	phoretischen Mobilität	58	
3.2.3.	Unterschiede des 24k-Protein zu Calmodulin	59	
3.2.4.	Lokalisation des SCBP	60	
3.2.5.	Immunologische Reaktionen von SCBP aus Drosophila mela-		
	nogaster	64	
3.3.	Die SCBPs des Regenwurms	66	
3.4.	Suche nach den cDNA-Sequenzen der SCBPs des Regen-		
	wurms	69	
3.4.1.	Die Klone 4.1, 8.1 und 15.1	69	
3.4.2.	Die Sequenz der Klone 4.1 und 8.1	71	
3.4.3.	Die Sequenz des Klons 15.1	72	
3.4.4.	Zuordnung der cDNA-Klone zu den aus dem Regenwurm		
	isolierten SCBP-Isoformen	73	
3.5.	Die genomischen Sequenzen von SCBP ₂ und SCBP ₃	77	
3.5.1.	Präparation von genomischer DNA aus dem Hautmuskel-		
	schlauch des Regenwurms	77	
3.5.2.	Amplifizierung und Klonierung der genomischen DNA von		
	SCBP ₂ und SCBP ₃	77	
3.5.3.	Sequenzen der genomischen Formen des SCBP ₂	79	
3.5.4.	Sequenz der genomischen Form des SCBP ₃	84	

3.5.5.	Vergleich der Intronsequenzen		
3.6.	Expression rekombinanten SCBPs		
3.6.1.	Expression von rekombinannten SCBP3 mit Hilfe des pBlue-		
	script-Systems	89	
3.6.2.	Expression von SCBP ₂ und SCBP ₃ im Vektor pCR T7/NT-		
	TOPO und Nachweis der Ca ⁺⁺ -Bindung der rekombinanten		
	Proteine	91	
3.7.	Räumliche Struktur von SCBP ₂ und SCBP ₃	97	
4.	Diskussion	100	
4.1.	Gibt es SCBP bei Nematoden?	100	
4.2.	SCBP bei Drosophila und Calliphora	101	
4.3.	Die drei SCBPs des Regenwurms	105	
4.4.	Sequenz und Struktur von SCBP ₂ und SCBP ₃	106	
4.5.	Vergleich der Regenwurm-SCBPs mit anderen SCBPs	110	
4.6.	Die genomische Struktur der Regenwurm-SCBP	117	
4.7.	Die rekombinanten SCBPs des Regenwurms	121	
5.	Zusammenfassung	124	
6.	Abkürzungen	125	
7.	Literatur	128	
8.	Danksagungen	137	
9.	Erklärung	138	

1. Einleitung

1.1. Sonderrolle des Ca⁺⁺ in der belebten Natur

Das Vorkommen von Ca⁺⁺ ist in bestimmten festen Strukturen wie Knochen oder Schalen am augenfälligsten. Ein weiterer interessanter Teil des Gesamt-Ca⁺⁺ eines Organismus liegt gelöst vor. In extrazellulären Flüssigkeiten hat dessen Konzentration die Größenordnung von etwa 1mM. Bei dieser Konzentration ist es relativ leicht, durch Erhöhung der Phosphat- (Knochen) oder Carbonat-Konzentration (Schalen von Mollusken) Ca⁺⁺ als anorganisches Salz zu präzipitieren und auf diese Weise die genannten Strukturen aufzubauen (Frausto da Silva und Williams 1991).

Intrazellulär könnte eine ähnlich hohe Ca⁺⁺-Konzentration leicht zu einer unkontrollierten Ca⁺⁺-Präzipitation führen (Kleinig und Meier 1999). Dies wird verhindert, indem Ca⁺⁺-Pumpen die cytoplasmatische Ca⁺⁺-Konzentration auf etwa 10⁻⁷M reduzieren. Die "überschüssigen" Ca⁺⁺-Ionen werden entweder aus der Zelle heraus transportiert oder in bestimmten intrazellulären Reservoiren gelagert. In diesen Reservoiren kann die Ca⁺⁺-Konzentration wiederum Werte von etwa 1mM erreichen. Durch verschiedene Ca⁺⁺-Ionen bindende Proteine wie Calsequestrin oder Calreticulin (s.u.) wird einerseits die unkontrollierte Präzipitation verhindert, andererseits wird die Konzentration freier Ca⁺⁺-Ionen klein gehalten, so daß der Import weiterer Ionen erleichtert wird.

Eine Folge der geringen intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration ist, daß schon der Einstrom geringer Ca⁺⁺-Mengen die Ca⁺⁺-Konzentration in der Zelle merklich erhöht. Dies kann wiederum von der Zelle als ein Signal ausgewertet werden. Ca⁺⁺ ist das einzige anorganische Ion, das von Zellen als sekundärer Botenstoff genutzt wird.

1.2. Ca⁺⁺-bindende Proteindomänen

Strömt Ca⁺⁺ in das Cytoplasma, kann dies nur dann als Signal verarbeitet werden, wenn die Erhöhung der Ca⁺⁺-Konzentration durch Bindung an entsprechend spezialisierte Proteine registriert wird. Bei der Untersuchung dieser Proteine wurden Domänen identifiziert, die in unterschiedlichem Maße auf die Bindung von Ca⁺⁺-Ionen spe-

zialisiert sind. Diese Domänen können Ca⁺⁺-Ionen mit verschiedenen Affinitäten, Kapazitäten und Selektivitäten binden.

Ca⁺⁺-Ionen können elektrostatisch an ein Protein durch Anlagerung an stark saure Bereiche binden. Ein derartiges Protein ist Calsequestrin. Calsequestrin ist im sarkoplasmatischen Retikulum der Skelett- und Herzmuskulatur von Säugern das Protein, das große Mengen von Ca⁺⁺-Ionen bindet und lagert. Es ist im Kaninchenherzmuskel 391 Aminosäuren lang, wobei 60% der 63 C-terminalen Aminosäuren Asparaginsäure oder Glutaminsäure sind (Scott et al. 1988). Calsequestrin bindet 20 - 40 Ca⁺⁺-Ionen pro Proteinmolekül mit niedriger Affinität. Die Selektivität einer solchen Domäne ist aber gering, es werden auch andere Kationen gebunden.

Eine ähnliche, stark saure Sequenz, die Ca⁺⁺ ebenfalls mit niedriger Affinität und hoher Kapazität bindet, ist bei Calreticulin vorhanden. Calreticulin wurde zwar zuerst im quergestreiften Skelettmuskel gefunden (Oswald und MacLennan 1974), ist aber kein spezifisches Muskelprotein. Es wurde vielmehr im endoplasmatischen Retikulum fast aller untersuchten Gewebe - bis hin zu Pflanzen - gefunden (Michalak 1996). Neben dem schon beschriebenen Ca⁺⁺-bindenden Motiv besitzt Calreticulin eine weitere Domäne, die zwar nur ein Ca⁺⁺-lon binden kann, dieses dafür aber mit hoher Affinität. Charakteristisch für diese Domäne ist die Aminosäurefolge KPEDWE (Baksh und Michalak 1991; Furuyama und Dzelzkalns 1999).

Im Gegensatz dazu ist die Bindung von Ca⁺⁺-Ionen bei zwei Proteingruppen bekannt: den Annexinen und den EF-Hand-Proteinen.

Annexine sind eine Gruppe von bisher 11 bekannten Proteinen, die sowohl Ca⁺⁺ als auch Phospholipide binden. Sie werden bei Tieren und Pflanzen meist intrazellulär gefunden. Die Aufgabe der Annexine in der Zelle ist wahrscheinlich die Regulation des intrazellulären Transports von Vesikeln, wie z.B. Exocytose und Endosomen-Fusion. Diese Vorstellung wird auch durch die Fähigkeit dieser Proteine, sowohl an Elemente des Cytoskeletts als auch an Membranen zu binden, unterstützt (Burgoyne 1996, Schwaller 2001).

Annexine binden Ca^{++} mit sechs oder sieben koordinativen Bindungen. Die Ca^{++} bindende Aminosäuresequenz ist G-X-G-T-X₃₉-D (oder E). "X" steht hier für eine beliebige Aminosäure, "X₃₉" für 39 verschiedenen Aminosäuren. Die Länge des Motivs beträgt also insgesamt 44 Aminosäuren. Dabei stellen zur koordinativen Ca^{++} - Bindung drei Sauerstoffatome des Peptidrückgrates je ein Elektronenpaar zur Verfügung, die letzte "bidentate" Aminosäure (Glutaminsäure oder Asparaginsäure) zwei Elektronenpaare. Hinzu kommen noch ein oder zwei Wassermoleküle (Burger 1996; Huber et al. 1992; Cartailler et al. 2000).

Die größte derzeit bekannte Gruppe der Ca⁺⁺-bindenden Proteine sind die im Folgenden ausführlich beschriebenen EF-Hand-Proteine. Es ist damit zu rechnen, daß neben den hier beschriebenen Ca⁺⁺-bindenden Motiven noch weitere identifiziert werden: Z.B. muß die Ca⁺⁺-ATPase der Plasmamembran sicherlich spezifisch mit Ca⁺⁺ interagieren, bei ihr wurde aber keines der bekannten Ca⁺⁺-bindenden Motive gefunden (Guerini und Carafoli 1996).

1.3. Das am häufigsten gefundene Motiv der koordinativen Ca⁺⁺-Bindung: Die EF-Hand-Domäne

Die Mehrzahl der bekannten Ca⁺⁺-bindenden Proteine gehört zur Gruppe der EF-Hand-Proteine. Die Ca⁺⁺-bindende EF-Hand-Domäne ist ein Helix-Loop-Helix-Motiv. Das Protein Parvalbumin hat sechs mit Buchstaben gekennzeichnete Helices (A-F), die drei Helix-Loop-Helix-Motive bilden. Die Struktur der C-terminalen Domäne mit den Helices E und F wurde als erste aufgeklärt und damit namensgebend (Kretsinger und Nockolds 1973).

Die normale, meist als "kanonisch" bezeichnete EF-Hand besteht aus 29 Aminosäuren: Die ersten neun Aminosäuren bilden die erste Helix, der Loop wird von neun Aminosäuren gebildet, die restlichen elf Aminosäuren bilden die zweite Helix. Räumlich stehen die beiden Helices senkrecht aufeinander und werden durch den Loop verbunden (Abb.1) (Kawasaki et al. 1998).



Abb.1: Räumliche Struktur der EF-Hand

In der Abbildung ist die zweite EF-Hand des Proteins Calbindin D9k aus zwei verschiedenen Blickwinkeln dargestellt. Die beiden Helices stehen senkrecht aufeinander und werden durch den Loop verbunden. Der grüne Kreis gibt die Lage des gebundenen Ca⁺⁺-Ions an. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Rasmol und der Datei 1CLB aus PBDLite (Skelton et al. 1995) erstellt.

Das Ca⁺⁺-Ion wird von den Aminosäuren des Loops sowie den ersten drei Aminosäuren der zweiten Helix gebunden. Von diesen 12 Aminosäuren sind lediglich 6 an der Bindung des Ca⁺⁺ direkt beteiligt. Die Positionen dieser Aminosäuren werden meist mit X, Y, Z, -Y, -X und -Z bezeichnet. Die Positionen X, Y und Z werden in der Regel von Asparaginsäure (seltener Asparagin) eingenommen, die Aminosäure der Position -Y ist beliebig, -X wird von einer sauren oder hydrophilen Aminosäure besetzt und an der Position -Z ist meist Glutaminsäure zu finden (Abb.2).

Ca⁺⁺-Ionen werden von der EF-Hand durch sieben koordinative Bindungen über Sauerstoffatome gebunden: Die Aminosäuren an den Positionen X, Y, Z stellen die benötigten Sauerstoffatome durch ihre Seitenketten zur Verfügung, das Sauerstoffatom der Position -Y liegt in der Peptidbindung. Die Aminosäure an der Position -X ist nicht unmittelbar an der Ca⁺⁺-Bindung beteiligt. Sie bindet vielmehr ein Wassermolekül, dessen Sauerstoffatom dann an Ca⁺⁺ bindet. An der letzten Position muß die Aminosäure zwei Sauerstoffatome zur Bindung bereit stellen. Zur effektiven Ca⁺⁺-Bindung muß deshalb an dieser Position eine der sauren Aminosäuren stehen. Die räumliche Anordnung dieser sieben Bindungen ist eine pentagonale Bipyramide (Abb.2) (Nelson und Chazin 1998, Andersson et al. 1997).



С 1 2 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 3 4 5 10 11 12 * D * D {G} * n + * * (E) n * n n * (E) D n n n n * (n)

Ζ

- Y

- 7.

- E = Glutaminsäure
- D = Asparaginsäure
- {G} = an dieser Stelle ist meist Glycin
- n = hydrophobe Aminosäure (A,I,L,M,F,P,W,V)
- + = saure oder hydrophile Aminosäure (D,E;N,C,Q,Y,S,T)

Х

Y

* = beliebige Aminosäure

Die Stellen X,Y,Z,-Y,-X,-Z sind an der Ca⁺⁺-Koordination beteiligt

Abb.2: Die Ca⁺⁺--Bindung der EF-Hand

A: Aminosäuresequenz der "kanonischen" EF-Hand. Die beiden Helices sind hier in eine Ebene projiziert und erscheinen daher parallel. Die Zahlen geben die laufende Nummer der Aminosäuren der EF-Hand an, der grüne Kreis symbolisiert das Ca⁺⁺-Ion, die Striche die koordinativen Bindungen. An Position 15 ist meist Glycin zu finden, da der Loop hier einen scharfen Knick macht.

B: Gezeigt ist die zweite EF-Hand des Calbindin D9k. Die koordinative Ca⁺⁺-Bindung ist eine pentagonale Bipyramide. In diesem realen Fall ist die Position Y durch Asparagin ("N") besetzt. "Wasser" bedeutet, daß das Serin an Position 18 ein Wassermolekül bindet, das das Sauerstoffatom zur Bindung zur Verfügung stellt. Verändert aus Andersson et al.1997.

C: In linearer Darstellung ist die Sequenz der gesamten kanonische EF-Hand wiedergegeben. Ein eingeklammerter Buchstabe bedeutet, daß diese Position meist mit dieser Aminosäure besetzt ist.

Neben der hier gezeigten kanonischen EF-Hand gibt es noch Varianten, die sich dadurch auszeichnen, daß ein oder zwei zusätzliche Aminosäuren eingefügt werden (Kawasaki et al. 1998). Die zusätzlichen Aminosäuren sind an verschiedenen Stellen des Ca⁺⁺-bindenden Loops inseriert. Dies ist jeweils in der ersten EF-Hand der S100-Proteine, zu denen auch das Calbindin D9k gehört, der essentiellen leichten Myosinkette bei Mollusken und des BM40 zu finden. BM40 ist ein sekretiertes, saures, Cystein-reiches Protein unbekannter Funktion, das aus verschiedenen Geweben wie z.B. Knochen und Tumoren isoliert wurde.



Abb.3: Zwei EF-Hände

Calbindin D9K besteht lediglich aus 2 EF-Händen. Diese interagieren mit einem kurzen ß-Faltblattbereich der Ca⁺⁺-bindenden Loops miteinander. In der Abbildung sind diese Bereiche durch die Pfeilstrukturen wiedergegeben. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Rasmol und der Datei 1CLB aus PBDLite (Skelton et al. 1995) erstellt.

EF-Hände werden meist paarweise gefunden. Zwei benachbarte EF-Hände interagieren miteinander über einen sehr kurzen, als ß-Faltblatt ausgebildeten Bereich in dem Loop (Abb.3) (Celio et al. 1996).

Funktionell lassen sich Ca⁺⁺-spezifische und Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-bindende EF-Hände unterscheiden. Ca⁺⁺-spezifische Domänen binden Ca⁺⁺ mit einer relativ geringen Affinität und Mg⁺⁺ nur bei extrem hohen Konzentrationen (Dissoziationskonstanten K_{Ca} = 10^{-5} - 10^{-7} M, $K_{Mg} = 10^{-1} - 10^{-2}$ M). In der ruhenden Zelle liegen diese Bindungsstellen deshalb Ca⁺⁺-frei vor. Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-bindende Domänen binden Ca⁺⁺ dagegen mit hoher Affinität und Mg⁺⁺ mit moderater Affinität (Dissoziationskonstanten K_{Ca} = $10^{-7} - 10^{-9}$ M, $K_{Mg} = 10^{-3} - 10^{-5}$ M). In der ruhenden Zelle sind diese Bindungsstellen deshalb mit Mg⁺⁺ gesättigt, erst wenn Ca⁺⁺ in das Cytoplasma einströmt, verdrängt dieses das Mg⁺⁺.

Die EF-Hand-Proteine sind typisch für eukaryontische Organismen. Die einzige bekannte Ausnahme ist das Calerythrin. Es wurde bei dem Actinomyceten *Saccharopolyspora erythraea* gefunden, wobei angenommen wird, daß es durch Gentransfer von einem Eukaryonten erworben wurde.

1.4. Auslösung der Muskelkontraktion durch Ca⁺⁺ als sekundärer Botenstoff

In ruhenden Muskeln wird die Ca⁺⁺-Konzentration im Cytoplasma auf einem sehr niedrigen Wert von etwa 0,1µM gehalten. Durch eine vorübergehende Erhöhung der Ca⁺⁺-Konzentration auf etwa 1µM wird die Muskelkontraktion ausgelöst. Die Umsetzung dieses allgemein gültigen Prinzips wird von verschiedenen Muskeln allerdings recht unterschiedlich umgesetzt.

Bei der glatten Vertebratenmuskulatur und beim Herzmuskel findet der Ca⁺⁺-Einstrom zu einem nicht unerheblichen Teil über die Zellmembran vom Zelläußeren in die Zelle statt. In der quergestreiften Skelettmuskulatur der Vertebraten wird das Ca⁺⁺ aus Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums freigesetzt. Dafür wurden spezielle Membranstrukturen entwickelt, um eine Muskelkontraktion als Reaktion auf einen Nervenimpuls auszulösen: Der Transversaltubulus, eine Einstülpung der Zellmembran der Muskelzelle, leitet den Nervenimpuls in das Innere der Muskelzelle zu Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums. Dies wird von spannungssensitiven Dihydropyridinrezeptoren in der Transversaltubulusmembran registriert, die daraufhin eine Konformationsänderung durchführen. In den Membranen der Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums sind "Ryanodinrezeptoren", die in engem Kontakt mit den Dihydropyridinrezeptoren der Transversaltubulusmembran stehen. Die genannten Konformationsänderungen der Dihydropyridinrezeptoren veranlassen die Ryanodin-Rezeptoren in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums Ca⁺⁺-Kanäle zu öffnen, so daß Ca⁺⁺ in das Cytoplasma ausströmen kann. Die genannten Rezeptoren erhielten ihre Namen, weil sie mit den entsprechenden Reagenzien interagieren. Bei Evertebraten sind die Membranstrukturen anders organisiert (Rüegg 1988, Flucher und Franzini-Armstrong 1996).

Das in das Cytoplasma der Muskelzelle eingeströmte Ca⁺⁺ bewirkt nicht unmittelbar die Muskelkontraktion, sondern es wird je nach Muskel von verschiedenen EF-Hand-Proteinen (z.B. Troponin C, Calmodulin), gebunden, die die Kontraktion dann erst auslösen.

1.5. Verarbeitung eines Ca⁺⁺-Signals durch Calmodulin

Calmodulin ist ein in Eukaryonten weit verbreitetes Protein, das bei der Verarbeitung von Ca⁺⁺-Signalen bei sehr verschiedenen Prozessen mitwirkt. Dabei interagiert es in Gegenwart von Ca⁺⁺ mit verschiedenen Zielproteinen. Calmodulin ist hoch konserviert. So stimmen z. B. die Calmodulin-Sequenzen der bisher untersuchten Säuger, Insekten und Pflanzen zu etwa 90% überein. (Rogers und Strehler 1996). Es ist aus 148 Aminosäuren aufgebaut. Da es wie viele andere Ca⁺⁺-bindende Proteine sehr viele saure Aminosäuren hat, liegt sein isoelektrischer Punkt zwischen 3,9 und 4,3. In der Gegenwart von Ca⁺⁺ ist Calmodulin hitzestabil. Die vier EF-Hand-Motive liegen in zwei von einer langen Interhelix getrennten Domänen. Dadurch erhält das Protein eine hantelförmige Struktur (Abb. 4).



Abb.4: Calmodulin

In der oberen Hälfte der Abbildung ist Ca⁺⁺-freies Calmodulin abgebildet. Das EF-Hand-Paar der ersten Domäne ist in Gelbtönen, das der zweiten Domäne in Grüntönen eingefärbt. Hervorgehoben sind einige Reste hydrophober Aminosäuren der ersten und der drittem EF-Hand. Die die Domänen verbindende Interhelix ist grau gefärbt.

Die die Domänen verbindende Interhelix ist grau gefärbt. Im unteren Teil ist die Interhelix nach Ca⁺⁺-Bindung geknickt und Calmodulin umgreift das Zielpeptid (braun). Es ist zu erkennen, daß die hervorgehobenen hydrophoben Aminosäuren der ersten und dritten EF-Hand miteinander interagieren können und so die Bindung des Zielpeptids stabilisieren. In den vier Loops sind Ca⁺⁺-Ionen als Kugeln mit roten Fortsätzen eingezeichnet. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Deep View und den Dateien 1CLL (Chattopadhyaya et al. 1992), und 1CDL (Meador et al. 1992); erstellt.

Alle vier EF-Hände können Ca⁺⁺ binden. Bei Ca⁺⁺-Bindung ändert Calmodulin die Konformation: Die Interhelix entwindet sich, dadurch kann das Zielpeptid umgriffen werden. Diese Struktur wird dann durch die Interaktion hydrophober Bereiche, die ebenfalls bei Ca⁺⁺-Bindung von den beiden Domänen mit den EF-Handmotiven exponiert werden, stabilisiert (Abb. 4, Chattopadhyaya et al. 1992; Meador et al. 1992; Rogers und Strehler 1996).

1.6. Auslösung der Muskelkontraktion durch Ca⁺⁺ und Ca⁺⁺bindende Proteine

Im glatten Muskel aktiviert Ca⁺⁺-gesättigtes Calmodulin die Myosin leichte Ketten-Kinase, die ihrerseits die regulatorische leichte Kette des Myosins phosphoryliert. Diese Aktivierung ermöglicht die Interaktion von Myosin und Aktin und damit die Kontraktion. Bei einigen unkonventionellen Myosinen dient Calmodulin sogar als leichte Kette (Cheney und Mooseker 1992; Rodriguez und Cheney 2000). Im quergestreiften Muskel löst das Ca⁺⁺-Signal über das Troponin C eine Kontraktion aus. Troponin C ist ähnlich wie Calmodulin aufgebaut: Es ist zwar mit 160 Aminosäuren etwas größer, aber auch hier sind insgesamt vier EF-Hände vorhanden, von denen je zwei in einer von zwei Domänen liegen, die von einer Interhelix getrennt sind. Bei Ca⁺⁺-Bindung erfolgt ebenfalls eine Konformationsänderung (Abb. 5). Diese Konformationsänderung ermöglicht unter Mitwirkung des Troponin/Tropomyosin-Komplexes schließlich die Muskelkontraktion.

Es wurden zwei Isoformen von Troponin C gefunden. Die eine Isoform wird im schnell kontrahierenden Skelettmuskel exprimiert. Sie hat vier Ca⁺⁺-bindende EF-Hände. Bei der Isoform des langsam kontrahierenden Skelettmuskels und des Herzmuskels ist eine der beiden N-terminalen EF-Hände inaktiv. Beide Isoformen haben in der C-terminalen Domäne EF-Hände des Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-bindenden Typs, so daß sie auch im Ruhezustand des Muskels mit Mg⁺⁺ gesättigt sind. Es wird vermutet, daß dies die konstitutive Bindung des Troponin C an den Troponin-Komplex ermöglicht und so für eine besonders schnelle Verarbeitung des Ca⁺⁺-Signals sorgt. Für die Auslösung der Muskelkontraktion ist nur die Bindung von Ca⁺⁺ an die ein bis zwei aktiven EF-Hände des N-Terminus notwendig, die Ca⁺⁺ spezifisch binden. Haben diese Ca⁺⁺ gebunden, wird die Hemmung der Aktin-Myosin-Interaktion durch den Troponin/Tropomyosin-Komplex aufgehoben und die Kontraktion ermöglicht.

Bei verschiedenen Evertebraten wird die Kontraktion zusätzlich durch Myosin reguliert (D'Haese 1980)



Abb.5: Troponin C

Im oberen Teil der Abbildung ist Ca⁺⁺-freies Troponin C gezeigt. Das EF-Hand-Paar der ersten Domäne ist in Gelbtönen, das der zweiten Domäne in Grüntönen eingefärbt. Die die Domänen verbindende Interhelix ist grau gefärbt. Im unteren Teil ist das Protein nach Ca⁺⁺-Bindung abgebildet. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Deep View und den Dateien 1AJ4 (Sia et al. 1997) und 1NCX (Rao et al. unveröffentlicht, zitiert nach Angaben der PBDLite-Datenbank; Satyshur et al. 1994) erstellt.

1.7. Untersuchung der Aktivierung der Muskelkontraktion durch Ca⁺⁺ mit Hilfe des Ca⁺⁺-bindenden Proteins Aequorin

Die Erregung einer Muskelkontraktion verläuft ausgesprochen schnell, unter Umständen mehrere hundertmal in einer Sekunde, z.B. beträgt die Kontraktionsgeschwindigkeit des Schwimmblasenmuskels des Krötenfisches *Opsanus tau* 100 -200Hz (Hamoir et al. 1980).

Es war deshalb schwierig, die entsprechend schnellen Veränderungen der Ca⁺⁺-Konzentration im Zusammenhang mit der Kraftentwicklung zu messen. Dies wurde durch die Verwendung eines besonderen Ca⁺⁺-bindenden Proteins, dem Aequorin, ermöglicht. Aequorin ist ein aus Hydrozoen isoliertes lumineszierendes EF-Hand-Protein. Es besitzt wie die weiter unten beschriebenen SCBPs vier EF-Hand-Domänen, von denen lediglich drei Ca⁺⁺ binden können. Ca⁺⁺-freies Aequorin bindet Luciferin (genauer: "Coelenteracin") und Sauerstoff und ist in diesem Zustand stabil. Die auf die Bindung von drei Ca⁺⁺-Ionen erfolgende Konformationsänderung aktiviert die Luciferasefunktion des Aequorins, Luciferin wird oxidiert und Licht emittiert (Cox 1996a).

Da Aequorin schnell mit der gut meßbaren Lichtausstrahlung auf eine Änderung der Ca⁺⁺-Konzentration reagiert, konnte der Zusammenhang zwischen Muskelkontraktion und Änderung der Ca⁺⁺-Konzentration mit Hilfe dieses Proteins untersucht werden: Aequorin wurde in eine Muskelfaser injiziert und die Lichtemission in Zusammenhang mit der Kraftentwicklung des Muskels gemessen (Ashley und Ridgway 1970).

1.8. Löschung des Ca⁺⁺-Signals nach der Kontraktion

Nach der Kontraktion muß ein Muskel erschlaffen, um erneut kontrahieren zu können. Dazu muß das Ca⁺⁺ aus dem Cytoplasma der Muskelzelle entfernt und so das Ca⁺⁺-Signal gelöscht werden. Letztlich geschieht dies immer durch eine "Ca⁺⁺-ATPase", ein Membranprotein, das Ca⁺⁺ entweder über die Zellmembran aus der Zelle heraus transportiert oder durch die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums in dieses hinein. Im sarkoplasmatischen Retikulum stellt dieses Protein bis zu 90% des Membranproteins. Die Ca⁺⁺-ATPase besteht aus etwa 1200 Aminosäuren, die eine einzige Kette bilden. Die Kette hat zehn transmembrane helikale Abschnitte und auf der cytoplasmatischen Seite Domänen, die Ca⁺⁺ und ATP binden. An diese Domänen binden mit hoher Affinität zwei Ca⁺⁺-Ionen sowie ATP. Mit der ATP-Spaltung wird das Enzym phosphoryliert und vollzieht eine Konformationsänderung. bei der die Ca⁺⁺-Ionen in das Innere des sarkoplasmatischen Retikulums transportiert werden. Da dabei die Affinität zu Ca⁺⁺ sinkt, wird dieses abgegeben. Nach Dephosphorylierung nimmt das Protein wieder seine ursprüngliche Konformation ein (Guerini und Carafoli 1996). Im sarkoplasmatischen Retikulum wird Ca++ von dem schon erwähnten Calsequestrin gebunden.

1.9. Anpassungen zur schnellen Löschung des Ca⁺⁺-Signals bei schnell kontrahierenden Muskeln

Muskeln kontrahieren unterschiedlich schnell. Allgemein gilt, daß je langsamer eine Muskulatur kontrahiert, desto weniger schnell ermüdet sie. Sogenannte tonische Muskeln kontrahieren sehr langsam, sie reagieren auf Nervenreize nicht mit einer Zuckung, sondern in erster Linie mit der Steigerung der Muskelspannung. Sie kommt zum Beispiel in der Extraokularmuskulatur der Säuger vor.

Auf der anderen Seite reagieren phasische Muskeln auf einen Nervenreiz mit einer Zuckung. Aber auch diese lassen sich in unterschiedlich schnell kontrahierende Gruppen unterteilen: Typ I-Muskelfasern reagieren auf einen Nervenimpuls zwar mit einer Zuckung, tun dies aber sehr langsam. Sie dienen der Körperhaltung, sind stark durchblutet und haben viele Mitochondrien.

Typ IIa-Muskelfasern kontrahieren schnell, haben viele Mitochondrien und können ihren Energiebedarf oxydativ decken. Sie ermüden deshalb langsam und führen anstrengende, sich wiederholende Bewegungen durch, wie z.B. den Flügelschlag bei Vögeln.

Am schnellsten kontrahiert die Typ IIb-Muskulatur. Sie hat wenig Mitochondrien und deckt ihren Energiebedarf glykolytisch, wobei sie eine Sauerstoffschuld eingeht. Diese Muskeln ermüden am schnellsten.

In den Muskelfasern des zuletzt beschriebenen Typs wurde bei Vertebraten in hoher Konzentration (bis zu 5g/kg Muskel bzw. etwa 350µM (Gerday 1988)) ein kleines ("parvus") Ca⁺⁺-bindendes Protein mit albuminähnlicher Löslichkeit gefunden, das Parvalbumin (Henrotte 1952). Parvalbumine sind 107 bis 113 Aminosäuren lang. Ihre physikalischen Eigenschaften ähneln denen des Calmodulins: Ihr hoher Anteil an sauren Aminosäuren verleiht ihnen einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 5. Ebenso sind Parvalbumine in Gegenwart von Ca⁺⁺ hitzestabil. Bei bestimmten Arten können sie in verschiedenen Isoformen - beim Karpfen z.B. 5 - sogar in einem Muskel gefunden werden, andererseits hat das Kaninchen nur ein einziges Parvalbumin. Ob kleine Unterschiede in den Ca⁺⁺-Bindungseigenschaften zwischen den Isoformen eine biologische Bedeutung haben, ist unklar (Gerday 1982).

In der glatten Muskulatur wird Parvalbumin nicht, in der Herzmuskulatur meist nicht gefunden. Eine bekannte Ausnahme bilden extrem schnell schlagende Herzen wie

das einer Spitzmaus, das bis zu 1000 Schläge pro Minute erreicht (Le Peuch et al. 1978).

Im Gegensatz zu Calmodulin oder Troponin C ist Parvalbumin ein kompaktes Molekül, insbesondere hat es keine Interhelix (Abb.6).



Abb.6: Parvalbumin

Gezeigt wird die räumliche Struktur des Parvalbumins. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Rasmol und der Datei 1B8C (Cates et al. 1999) erstellt.

Ungewöhnlicherweise hat Parvalbumin mit drei eine ungerade Anzahl von EF-Hand-Domänen. Da vermutet wird, daß ursprünglich vier dieser Domänen vorhanden waren, von denen die erste durch eine Deletion verloren ging (Kawasaki et al. 1998), werden die vorhanden Domänen mit 2, 3 und 4 durchnumeriert. Nur die beiden Cterminalen Domänen binden Ca⁺⁺ mit hoher Affinität und gehören zu dem Ca⁺⁺/Mg⁺⁺bindenden Typ. Bei Ca⁺⁺-Bindung finden bei Parvalbumin keine großen Konformationsänderungen statt, es interagiert auch nicht mit anderen Proteinen (Williams et al. 1986).

Parvalbumin hat in der schnell kontrahierenden Muskulatur wahrscheinlich die Funktion eines "löslichen relaxierenden Faktors". Das entsprechende Modell geht davon aus, daß Ca⁺⁺ unmittelbar nach dem Eintritt ins Cytoplasma an Troponin C bindet. Erst nachdem Mg⁺⁺ von Parvalbumin abdiffundiert ist, kann dieses Ca⁺⁺ aufnehmen und es so Troponin C entziehen. Ca⁺⁺-beladenes Parvalbumin diffundiert zum sarkoplasmatischen Retikulum, an dem ihm von der Ca⁺⁺-ATPase das Ca⁺⁺ entzogen und ins Innere desselben transportiert wird. Durch die zwischenzeitliche Bindung des Ca⁺⁺ an Parvalbumin wird das Ca⁺⁺-Signal schneller gelöscht und die Muskelfaser dadurch schneller wieder kontraktionsbereit, als das die Ca⁺⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums alleine bewerkstelligen könnte.

Dieses Modell wird von experimentellen Daten unterstützt: Parvalbumin nimmt langsamer Ca⁺⁺ auf als Troponin C (Robertson et al. 1981), ist aber in der Lage, Troponin C Ca⁺⁺ zu entziehen und dadurch die Aktin-Myosin-Interaktion zu inhibieren. Das sarkoplasmatische Retikulum wiederum kann Parvalbumin Ca⁺⁺ entziehen (Gerday und Gillis 1976; Blum et al. 1977, Pechere et al. 1977). Sollte die Funktion des Parvalbumins durch das vorgestellte Modell richtig beschrieben werden, sollten schnell kontrahierende Muskelfasern ohne Parvalbumin verlängerte Relaxationszeiten, Muskeln mit erhöhter Parvalbuminkonzentration dagegen verkürzte Relaxationszeiten haben. Beide dieser Überlegungen werden durch experimentelle Daten unterstützt: Die Injektion von Parvalbumin cDNA in einen Muskel erhöhte dessen Relaxationsgeschwindigkeit (Müntener et al. 1995). Auf der anderen Seite zeigen Muskeln aus

geschwindigkeit (Müntener et al. 1995). Auf der anderen Seite zeigen Muskeln aus Mäusen ohne Parvalbumingen - sogenannte "Parvalbumin Knockout Mäuse" - einen verlangsamten Abfall der Ca⁺⁺-Konzentration nach einer Reizung und auch eine verlängerte Relaxationszeit. Diese Ergebnisse wurden mit Muskelpräparaten gewonnen. Die Knockout-Mäuse selber ließen sich unter den Haltungsbedingungen im Labor nicht von Wildtyptieren unterscheiden (Schwaller et al. 1999).

Über die Funktion des Parvalbumins in der schnell kontrahierenden Muskulatur gibt es also recht genaue Vorstellungen, die auch von experimentellen Ergebnissen gestützt werden. Weitgehend unbekannt hingegen ist sie in den anderen Geweben, in denen Parvalbumin ebenfalls gefunden wird. Zu diesen Geweben gehören u.a. Nerven, Hoden, Niere und Ovar.

Bei der Suche nach Parvalbumin in Evertebraten wurden anstelle dessen SCBPs oft auch als SCP abgekürzt - gefunden. (Gerday 1988). Diese Abkürzung steht entweder für "Soluble Calcium Binding Protein" oder "Sacoplasmatic Calcium Binding Protein". Diese Proteine sind mit etwa 170 - 190 Aminosäuren etwas größer als Parvalbumin, haben aber viele gemeinsame Eigenschaften mit diesem: Sie werden hauptsächlich in schnell kontrahierender Muskulatur gefunden. Ihr isoelektrischer

Einleitung

Punkt liegt wie bei Parvalbumin im sauren Bereich und sie sind in Gegenwart von Ca⁺⁺ hitzestabil. Ebenso wurden bei SCBPs keine Interaktionen mit anderen Proteinen beobachtet. Aus diesen Gründen nimmt man an, daß SCBPs bei Evertebraten dieselbe Funktion haben wie Parvalbumin bei den Vertebraten. Zuerst wurde SCBP bei Krebsen (Benzonana et al. 1974) gefunden, später auch in anderen Evertebraten wie im Seeringelwurm *Nereis diversicolor* (Cox und Stein 1981, Gerday et al. 1981), nicht näher bezeichneten Muscheln (Collins et al. 1983) und dem Lanzettfischchen *Branchiostoma lanceolatum* (Kohler et al. 1978). Zum erstenmal bei einem landlebenden Tier wurde SCBP im Regenwurm *Lumbricus terrestris* nachgewiesen (Huch et al. 1988).

Die Untersuchung der Sequenz und räumlichen Struktur der SCBP zeigte kompakte Proteine (Abb.7), die prinzipiell vier EF-Hände besitzen. Bei allen bisher gefundenen SCBPs ist aber eine dieser Domänen - entweder die zweite oder die vierte - so verändert, daß sie kein Ca⁺⁺ binden kann (Nelson und Chazin 1998). Ein charakteristisches Merkmal dieser Proteine sind die ungleichmäßigen Abstände der 4 EF-Hände voneinander: Zwischen erster und zweiter EF-Hand liegen 21 - 24 Aminosäuren, zwischen zweiter und dritter 12 - 16 und zwischen der dritten und vierten 4 - 7 Aminosäuren. Ob dieses Abstandsmuster eine biologische Bedeutung hat, ist nicht bekannt. Es wird außer bei den SCBPs noch bei Aequorin und Calerythrin gefunden (Cox 1996).



Abb.7: Das SCBP des Seeringelwurms Nereis diversicolor Gezeigt wird die räumliche Struktur des SCBPs von Nereis diversicolor. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Rasmol und der Datei 2SCP (Vijay-Kumar und Cook 1992) erstellt.

1.10. Auslösung der Kontraktion bei asynchronen Muskeln

In einem vorhergehenden Abschnitt wurden die Vorgänge kurz beschrieben, wie ein Nervenimpuls im Skelettmuskel eine Ca⁺⁺-Ausschüttung des sarkoplasmatischen Retikulums bewirkt, die wiederum die Muskelkontraktion auslöst. Anschließend muß das Ca⁺⁺-Signal wieder gelöscht werden, unter Umständen mit Hilfe von löslichen Ca⁺⁺-bindenden Proteinen. Ein neuer Nervenimpuls löst dann die nächste Kontraktion aus. In diesem System sind die Frequenzen der Nervensignale und der Muskel-kontraktionen synchron. Nach diesem weit verbreiteten Prinzip arbeitet auch die aus naheliegenden Gründen als synchron bezeichnete Muskulatur der Insekten. Die maximale Frequenz der Kontraktion liegt in der Regel bei etwa 100Hz (Flugmuskulatur der Mottenschildlaus *Trialeurodes vaporariorum*, Wootton und Newman 1979), obwohl Ausnahmen bis 500Hz bekannt sind (Tymbalmuskel der Zykade *Okanagana vanduzeei*, Josephson und Young 1985).

Bei einigen Insektengruppen (Dipteren, Coleopteren, Hymenopteren und Heteropteren) zeigte die sogenannte indirekte Flugmuskulatur ein abweichendes Verhalten. Diese Muskulatur wird als indirekt bezeichnet, weil sie nicht direkt an den Flügeln ansetzt, sondern an den Wänden des Thorax. Ihre den Thorax dehnenden und kontrahierenden Kontraktionen werden durch einen Gelenkmechanismus auf die Flügel übertragen und bringen diese so zum Schlagen.

Unter experimentellen Bedingungen - hier: der isometrischen Kontraktion - ist die maximale Kontraktionsfrequenz der indirekten Muskulatur, die durch elektrische Reizung ausgelöst werden kann, nur etwa 10Hz. In vivo beträgt die Flügelschlagfrequenz aber bis zu einigen 100Hz. Da hier die in vivo beobachtete Flügelschlagfrequenz deutlich höher ist als die durch Reizung erreichbare maximale Kontraktionsfrequenz, wird diese Muskulatur als asynchron bezeichnet.

Die asynchrone Muskulatur besteht, wie auch bei anderer Muskulatur üblich, aus zwei antagonistisch wirkenden Komponenten. Es gibt eine den Flügel senkende und einen den Flügel hebende Muskulatur, die wechselseitig einander entgegen wirken und sich wechselseitig dehnen. Die weitere Untersuchung dieser Muskulatur zeigte, daß eine plötzliche Streckung bei ihr eine Kontraktion auslöst. Sind die Bedingungen für eine Kontraktion der asynchronen Muskulatur gegeben - eine Erhöhung der Ca⁺⁺-

Konzentration im Sarkoplasma als Folge eines Nervenimpulses und eine einleitende plötzliche Streckung - lösen die antagonistischen Muskeln wechselseitig die Kontraktion aus. Die Frequenz der Kontraktionen - und damit die des Flügelschlages - hängt dann nur noch von der Resonanzfrequenz des Thorax ab (Rüegg 1988).

Dieses Muskelsystem ist also nicht auf eine schnelle Löschung des Ca⁺⁺-Signals angewiesen, um erneut kontrahieren zu können. Deshalb ist es auch möglich, daß diese schnell kontrahierende Muskulatur kein besonderes System zur schnellen Löschung des Ca⁺⁺-Signals benötigt.

Für die Auslösung der ersten plötzlichen Streckung ist die ebenfalls im Thorax vorhandene "normal" arbeitende synchrone Muskulatur verantwortlich, ohne daß die Aktivierung einem bestimmten Muskel zugeschrieben werden könnte (Heide 1971). Warum die plötzliche Streckung die Kontraktion der asynchronen Muskulatur auslöst, ist nicht genau bekannt. Es wird aber angenommen, daß durch die Streckung Aktin und Myosin in eine für die Interaktion bessere Position gebracht werden (Rüegg 1988).

Einleitung

1.11. Ziel der Arbeit

Aus der Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris* wurden drei Isoformen eines SCBPs isoliert (Huch et al. 1988). Die Unteruchung dieser Proteine soll in dieser Arbeit fortgesetzt werden. Die Zuordnung dieser Proteine zu den SCBPs erfolgte auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften, ihrer Lokalisation in der Muskulatur und ihrer Fähigkeit, Ca⁺⁺ zu binden. Die Sequenzierung ihrer cDNA soll jetzt Aufschluß über die Aminosäuresequenz und damit auch über die Struktur dieser Proteine geben und – wenn sie sich als EF-Hand-Proteine erweisen - einen Vergleich mit schon bekannten Proteinen dieses Typs ermöglichen. Die Untersuchung der genomischen Struktur der Regenwurm-SCBPs soll einen Einblick in die Verwandtschaft mit anderen EF-Hand-Proteinen geben.

Zu den bislang noch nicht auf ihren SCBP-Gehalt untersuchten Tieren gehören die ansonsten gut erforschten Arten *Drosophila melanogaster und Caenorhabditis elegans*. Die für diese Arten weit entwickelten genetischen Methoden könnten auch für die weitere Untersuchung der Funktion von SCBPs nützlich sein. Deshalb wurde versucht, aus ihnen SCBP zu isolieren. Schließlich wurde untersucht, ob die unterschiedliche Art der Reaktion auf ein Ca⁺⁺-Signal in der asynchronen und synchronen Muskulatur sich in einem unterschiedlichen Bedarf für einen löslichen relaxierenden Faktor wiederspiegelt.

2. Material und Methoden

2.1. Liste der Lösungen

Der leichteren Auffindbarkeit wegen werden in den Experimenten verwendete Lösungen und Puffer hier aufgelistet. Im Text sind diese durch KAPITÄLCHEN hervorgehoben. Lösungen, die nur aus einer in Wasser gelösten Komponente bestehen, z.B. 100mM NaCl, sind hier nicht extra aufgelistet.

Abdecklösung	1% w/v BSA: 2.7mM KCI: 8mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O: 1.5mM KH ₂ PO ₄ :
	137mM NaCl pH 7,4
AIX-Platten	1% w/v Trypton; 0,5% w/v Hefe-Extrakt; 0,5% w/v NaCl; pH 7,5;
	75μg/ml Ampicillin; 0,5mM IPTG; 30μg/ml X-Gal
Amp/Cam-Platten	1% w/v Trypton; 0,5% w/v Hefe-Extrakt; 0,5% w/v NaCl; pH 7,5;
	75μg/ml Ampicillin; 34μg/ml Chloramphenicol
Ampicillin-Platten	1% w/v Trypton; 0,5% w/v Hete-Extrakt; 0,5% w/v NaCl; pH 7,5;
Angereicherte Agereletten	/5µg/mi Ampicillin
Angereicherte Agarplatten	Extrakt: 5mg/l Cholesterin: 2mM CaCle: 2mM MaSO :: 25mM Phose
	phatpuffer pH 6
Angereichertes Medium	0.3% w/v NaCl: 0.25% w/v Pepton: 0.5% w/v Hefe-Extrakt: 2mM
3	CaCl ₂ ; 2mM MgSO ₄ ; 25mM Phosphatpuffer pH 6
AP-Puffer	100mM Tris· HCl pH 9,3; 100mM NaCl, 5mM MgCl ₂
AP-Substratlösung	0,0165% w/v BCIP; 0,033% w/v NBT in AP-Puffer
Bromphenolblau (0,1%w/v) in Glycerin	0,1%w/v Bromphenolblau in Glycerin
Denaturierungslösung	0,5M NaOH; 1,5M NaCl
DANN-Lysepuffer	50mM Tris· HCl pH 7,9; 100mM EDTA; 100mM NaCl; 1% Gardol
EGTA-Puffer	1mM EGTA; 50mM Tris· HCl pH 7,5; 1mM 2-Mercaptoethanol;
Elektrodenpuffer	25mM Tris: 192mM Glycin: 0.1%w/y SDS
Elutionspuffer	50mM Na ₂ HPO ₄ ; 300mM NaCl; 250mM Imidazol pH 8,0
Färbelösung	0.1% w/v Coomassie Brilliant Blau R250: 10% Methanol: 9% Essig-
	säure; 2% w/v Ammoniumsulfat
Fixierer	30% Ethanol;10% Essigsäure
Gardol-Puffer	10mM Tris· HCl pH 7,5; 500mM NaCl; 1mM EDTA; 0,1% Gardol
Gelfiltrationspuffer	50mM NH ₄ HCO ₃ pH 8,0; 1mM β-Mercaptoethanol; 5µM CaCl ₂
GET	50mM Glucose; 10mM EDTA; 25mM Tris· HCl pH 8,0
Harnstoff-Elektrodenpuffer	12,5mM Tris; 125mM Glycin
Harnstoff-Lösung	8M Harnstoff in Wasser
Harnstoff-Probenpuffer	2M Harnstoff;16,7% Glycerin; 0,003% w/v Bromphenolblau
Harnstoff-Probenpuffer (2x)	4M Harnstoff; 33,3% Glycerin; 0,006% w/v Bromphenolblau
Harnstoffgel	7,5%T/1,25%C Acrylamid; 2M Harnstoff; 12,5mM Tris; 125mM Gly-
	cin; Polymerisation katalysiert mit 0,05% w/v Ammoniumpersulfat und 0,15% TEMED
HIC-Puffer	50mM Tris• HCl pH 7,5; 0,1mM CaCl ₂ ; 1mM 2-Mercaptoethanol;
	0,5mM PMSF
IAC-Puffer	15mM Tris• HCl pH 7,8; 1mM ß-Mercaptoethanol; 5µM CaCl ₂
Inkubationspuffer	[0,1% w/v BSA; 1M NaCl; 0,05% Tween 20; 2,7mM KCl; 8mM Na₂HPO₄· 2H₂O; 1,5mM KH₂PO₄; pH 7,4

Ladungspuffer (6x)	40% w/v Saccharose; 10mM Tris∙ HCl pH 8,0; 1mM EDTA; 0,25mg/ml Bromphenolblau
LB-IPTG	1% w/v Trypton; 0,5% w/v Hefe-Extrakt; 0,5% w/v NaCl; pH 7,5; 75µg/ml Ampicillin; 0,5mM IPTG
LB-IPTG mit Cam	1% w/v Trypton; 0,5% w/v Hefe-Extrakt; 0,5% w/v NaCl; pH 7,5; 75μg/ml Ampicillin; 35μg/ml Chloramphenicol; 1mM IPTG
LB-Medium	1% w/v Trypton; 0,5%w/v Hefeextrakt; 0,5%w/v NaCl; pH 7,5
LB-Medium mit Mg und Maltose	1% w/v Trypton; 0,5% w/v Hefe-Extrakt; 0,5% w/v NaCl; 10mM MgSO4; 0,2% w/v Maltose; pH 7,5
LB-Mg-Agarplatte	1% w/v Trypton; 0,5% w/v Hefe-Extrakt; 0,5% w/v NaCl; 10mM MgSO4; 0,2% w/v Maltose; 1,5% w/v Agar
Lysepuffer	50mM Na ₂ HPO ₄ ; 300mM NaCl; 10mM Imidazol pH 8,0
NaCI-Puffer	0,5M NaCl; 50mM Tris∙ HCl pH 7,5; 0,1mM CaCl₂; 1mM β-Mercapto- ethanol; 0,5mM PMSF
NaJ-Lösung	Gesättigtes NaJ und gesättigtes Na ₂ SO ₃ in Wasser (eine Lösung)
NaOH/SDS	0,3M NaOH; 1% SDS
NEET	100mM NaCl; 1mM EDTA; 50% Ethanol; 10mM Tris· HCl pH 7,5
Neutralisationspuffer	0,5M Tris• HCl pH 8,0; 1,5M NaCl
Overlay-Puffer	60mM KCI; 5mM MgCl ₂ ; 10mM Imidazol· HCl pH 6,9
PBS	2,7mM KCI; 8mM Na₂HPO₄·2H₂O; 1,5mM KH₂PO₄; 137mM NaCl pH 7,4
Probenpuffer (1,25x)	62,5mM Tris· HCl pH 6,8; 2% w/v SDS; 340mM ß-Mercaptoethanol; 12,5% Glycerin; 0,00125% w/v Bromphenolblau
Probenpuffer (11x)	0,55M Tris· HCl pH 6,8; 17%w/v SDS; 3M ß-Mercaptoethanol
Ringerlösung	184mM KCI; 46mM NaCI; 30mM CaCl ₂ ; 10mM Tris-HCl pH 7,2
S-Basal	100mM NaCl; 50mM Phosphatpuffer pH 6,0; 5mg/l Cholesterin
Sammelgel	4% w/v T 2,6% C Acrylamid; 125mM Tris· HCl pH 6,8; 0,1% w/v SDS; Polymerisation katalysiert mit 0,1% w/v Ammoniumpersulfat und 0,1% TEMED
SCBP-Extraktionspuffer	25mM Tris· HCl pH 7,5; 1mM β-Mercaptoethanol; 5μM CaCl ₂
SM	100mM NaCl; 10mM Tris· HCl pH 7,5; 10mM MgSO ₄ ; 0,01%w/v Gelatine
SOC-Medium	0,5% w/v Hefeextrakt; 2% w/v Trypton; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl ₂ ; 10mM MgSO ₄ ; 20mM Glucose
SSC (2x)	0,3M NaCl; 30mM Na-Citrat pH 7,0
starker Elutionspuffer	50mM Na ₂ HPO ₄ ; 300mM NaCl; 500mM Imidazol pH 8,0
Superbroth	1,2% w/v Trypton; 2,4% w/v Hefeextrakt; 0,4% Glycerin; 17mM KH ₂ PO ₄ ; 72mM K ₂ HPO ₄
Supplementiertes S-Basal	100mM NaCl; 50mM Phosphatpuffer pH 6,0; 5mg/l Cholesterin; 3mM MgSO ₄ ; 3mM CaSO ₄ ; 25nM FeSO ₄ ; 50nM Na ₂ EDTA; 10nM MnCl ₂ ; 10nM ZnSO ₄ ; 1,2nM CuSO ₄ ; 10mM K-Citrat pH 6
ТВЕ	90mM Tris; 90mM Borsäure; 2mM EDTA; 1µg/ml Ethidiumbromid
Topagarose	1% w/v Trypton; 0,5% w/v Hefe-Extrakt; 0,5% w/v NaCl; 10mM MgSO ₄ ; 0,2% w/v Maltose; 0,6% w/v Agarose
Transferpuffer	25mM Tris; 192mM Glycin; 20% Methanol
Trenngel	15% w/v T 2,6% C Acrylamid; 375mM Tris· HCl pH 8,8; 0,1% w/v SDS; 10% Glycerin; Polymerisation katalysiert mit 0,1% w/v Ammo- niumpersulfat und 0,1% TEMED
Waschlösung	20mM KCl; 0,5mM MgCl ₂ ; 20mM ß-Mercaptoethanol; 0,1mg/ml Streptomycin; 10mM Imidazol pH 6,4
Waschpuffer	50mM Na ₂ HPO ₄ ; 300mM NaCl; 20mM Imidazol pH 8,0

2.2. Beschaffung, Zucht und Präparation von Tieren zur Isolation von SCBP

2.2.1. Präparation vom *Drosophila melanogaster* und *Calliphora erythrocephala*

Drosophila melanogaster und Calliphora erythrocephala stammen aus den Zuchten des Instituts für Genetik bzw. für Zoologie II der Universität Düsseldorf.

Für die Präparation von SCBP aus ganzen Tieren wurden alle vorhandenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*, die keinen Einfluß auf die Muskulatur haben, verwendet, für alle anderen Experimente Tiere des Wildtyps Oregon R.

Ganze Tiere wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver in SCBP-EXTRAKTIONSPUFFER aufgenommen und wie in der SCBP-Standard-Präparation beschrieben weiter verarbeitet.

Bei der Präparation von einzelnen Körperabschnitten wurden die mit Äther betäubten Tiere in Kopf, Torax und Abdomen zerteilt und die einzelnen Tagmata in SCBP-EXTRAKTIONSPUFFER auf Eis gesammelt. Bei Drosophila wurden die Tagmata von etwa 200 Tieren in 150 - 300µl Puffer gesammelt, bei Calliphora von etwa 15 Tieren in 1,5ml Puffer.

Die Präparation verschiedener Thorax-Muskeln wurde unter einer Stereolupe in 50% Ethanol in Wasser durchgeführt. In dieser Lösung denaturieren die Muskeln etwas und werden so fester. In RINGERLÖSUNG waren die Muskeln so weich, daß eine Präparation nicht möglich war. Die Präparation wurde mit Uhrmacherpinzetten und passend zurecht geschnittenen Rasierklingenstückchen durchgeführt. 10 - 20 Organe wurden in 1ml SCBP-Extraktionspuffer gesammelt.

Als Vertreter der asynchronen Muskulatur wurden die dorsale Längsmuskulatur (dlm) und die asynchrone Dorsoventralmuskulatur (dvm) präpariert. Vertreter der synchronen Muskulatur waren der Tergotrochantermuskel (tt) und die der ventralen Thoraxseite anliegende Beinmuskulatur. Der Tergotrochantermuskel ließ sich als einer der größeren synchronen Thoraxmuskeln noch am einfachsten präparieren. Die Bezeichnungen der Muskeln erfolgte nach Heide 1971 (Abb.8). Zusätzlich wurde das Thoracalganglion präpariert.



Abb.8: Synchrone und asynchrone Muskeln im Fliegen-Thorax Auf der linken Seite ist der Querschnitt durch den Thorax und auf der rechten Seite die rechte Thoraxhälfte eines Längsschnitts schematisch dargestellt. Markiert sind die asynchrone dorsale Längsmuskulatur (dlm) und die asynchrone Dorsoventralmuskulatur (dvm), sowie der synchrone Tergotrochantermuskel (tt), der auch farblich hervorgehoben ist. Im Längsschnitt sind noch zahlreiche andere der Körperwand anliegende synchrone Muskel eingezeichnet, die aber nicht präpariert wurden. (nach Heide 1971)

2.2.2. Präparation der Hautmuskelschläuche von *Lumbricus terrestris* und *Ascaris suum*

Ascaris suum wurde im Schlachthof Düsseldorf gesammelt und freundlicherweise von Frau Dipl.-Biol. E. Hanser zur Verfügung gestellt.

Die Würmer wurden längs aufgetrennt, Darm und Geschlechtssystem entfernt und die Hautmuskelschläuche in WASCHLÖSUNG in Eis gesammelt. Nach Präparation aller Würmer wurden die Hautmuskelschläuche mit eiskalter WASCHLÖSUNG mehrfach gewaschen um Reste von Pseudocoelflüssigkeit und Gewebetrümmer zu entfernen. Zuletzt wurden die Hautmuskelschläuche einzeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -84°C gebagert.

Lumbricus terrestris wurde als "Tauwurm" in Angelgeschäften gekauft. Zur Präparation des Hautmuskelschlauchs wurden die Würmer in Eis betäubt und der Länge nach aufgeschnitten. Die inneren Organe wurden entfernt, der Hautmuskelschlauch in WASCHLÖSUNG gewaschen und wie bei Ascaris beschrieben weiter verarbeitet.

2.2.3. Zucht von Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans des Stammes Bristol N2 wurden vom Institut für Genetik der Universität Düsseldorf freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Würmer wurden auf ANGEREICHERTEM AGAR gehalten, der mit Bakterien des Stammes *E.coli* OP50 dicht bewachsen war (in Anlehnung an Caldicott et al.1994).

Für die Flüssigkultur (Caldicott et al. 1994, in der hier beschriebenen Methode sind viele Veränderungen nach Angaben von Koelle und Herman 1994. http://www.med.yale.edu/mbb/koelle/protocols/protocol liquid culture.html eingearbeitet) von C.elegans werden relativ große Mengen an Futterbakterien benötigt. Für 2 Liter Flüssigkultur werden wenigstens 100ml Bakteriensuspension benötigt. Für diese Suspension wurden E.coli des Stammes HB101 in etwa 81 SUPERBROTH über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation œsammelt (Rotor JA14, 5000upm, 4°C, 15min), das Pellet in S-BASAL suspensiert (1ml S-BASAL je 1g Bakterien). Die Suspension wurde bei -20°C gelagert.

Zehn 7 -14 Tage alte, mit Würmern bewachsene Platten wurden mit 50 - 100ml S-BASAL abgewaschen. Die Würmer wurden auf 4 mit je 500ml SUPPLEMENTIERTEM S-BASAL gefüllte 1I Erlenmeyerkolben verteilt, in jedes Gefäß wurden 6ml Bakteriensuspension *E.coli* HB101 gegeben. Die Kulturen wurden 5 Tage bei 240upm bei 16°C - 18°C geschüttelt. Am dritten Tag der Inkubation wurden die Würmer jeden Erlenmeyerkolbens mit 12ml Bakteriensuspension gefüttert, am vierten Tag noch einmal mit je 6ml Suspension. Am fünften Tag erfolgte die Ernte der Würmer.

Die Würmer wurden abzentrifugiert (Rotor JA 10, 3min - gemessen von dem Moment an, an dem der Rotor seine Sollgeschwindigkeit erreicht hat- 3000upm, 4°C. Dies ist ein Kompromiß zwischen effektiver Sedimentation und gutem Überleben der Würmer.). Alle Pellets wurden vereinigt, mit eiskalter 100mM NaCl auf 500ml aufgefüllt und erneut abzentrifugiert (Rotor JA 10, 3min - gemessen wie eben beschrieben -2000upm, 4°C). Die Pellets wurden dann mit eiskaltem 100mM NaCl auf insgesamt 100ml aufgefüllt und 5 - 10min in Eis gekühlt. Anschließend wurden die Würmer resuspendiert und in 25 ml-Portionen auf JA-20-Zentrifugenröhrchen verteilt. In alle Röhrchen wurden je 25ml eiskalte 60% SACCHAROSE gegeben und gemischt. Sofort danach wurde zentrifugiert (JA 20, 5min, 3500upm, 4°C), da die Saccharose-Lösung den Würmern schadet. Nach der Zentrifugation schwimmen die Würmer in einer hellbraunen Schicht auf. Diese Schicht wurde gesammelt und vereinigt. Die Würmer wurden mit dem vierfachen Volumen eiskalter 100mM NaCl aufgefüllt und gemischt. Nach Zentrifugation (JA20, 3100upm, 3min, 4°C) wurden die Pellets vereinigt, erneut mit eiskalter 100mM NaCl gewaschen. Zuletzt wurden die Würmer in flüssigen Stickstoff eingetropft. Die erhaltenen Eiskügelchen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -84°C gelagert.

2.3. SCBP-Standardpräparation



Abb.9: Schema der SCBP-Präparation

Die Präparation von SCBP erfolgte wie bei Huch et al. (1988) beschrieben. Die Bezeichnungen der einzelnen Fraktionen können der Abbildung 9 entnommen werden. Zunächst wurden die Organe oder Tiere in flüssigem Stickstoff zerrieben. Das Pulver wurde in einem Glas-Teflon-Homogenisator mit 2,5ml SCBP-EXTRAKTIONSPUFFER je Gramm Pulver gemischt und nach Auftauen homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert (Rotor JA20, 13000upm, 30min, 4°C), der Überstand abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde mit demselben Volumen SCBP-Extraktionspuffer wie im ersten Schritt reextrahiert, die Überstände vereinigt. Im Rohextrakt wurde mit 1M Essigsäure der pH-Wert 5,5 eingestellt. Die ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert (JA20, 9500upm, 45min, 4°C). Nach Einstellen des pH-Wertes 8,0 mit 2M Tris wurde der Überstand mit Ammoniumsulfat fraktioniert, indem erst die bei 40% Sättigung unlöslichen Proteine entfernt und dann die restlichen Proteine bei 80% Sättigung gefällt wurden (Dawson et al. 1969). Die ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert (JA20; 13000upm; 30min; 4°C) und das 80% Pellet in GELFILTRATIONSPUFFER aufgenommen.

Das 80%-Pellet wurde anschließend in einem 65°C-70°C heißen Wasserbad erhitzt. Dabei wurde mit einem Thermometer die Temperatur in der Probe gemessen. Wenn die Temperatur 50°C erreichte, wurde die Probe noch weitere 5 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die hitzedenaturierten Proteine abzentrifugiert (JA20, 16000upm, 20min, 4°C). Die Proteine des Überstandes wurden mit Ammoniumsulfat (80% Sättigung) ausgefällt und gesammelt (JA20; 13000upm; 30min; 4°C). Das Pellet wurde in einem möglichst kleinen Volumen GELFILTRATI-ONSPUFFER aufgenommen. Partikuläre Verunreinigungen wurden gegebenenfalls in einer Ultrazentrifugation (VTI 70.1, 60000upm, 4°C, wenigstens 5 Stunden) entfernt ("100000g-Pellet" bzw. "100000g-Überstand")

Proben aus einzelnen Fliegenmuskeln wurden vor ihrer elektrophoretischen Untersuchung durch Ultrafiltration mit Centriconröhrchen (Millipore, Ausschlußgrenze 10000) eingeengt.

2.4. Chromatographische Methoden

Für die Gelfiltration wurde Ultrograd AcA 54 (Pharmacia-LKB) als Matrix verwendet. Die Dimensionen der Glassäulen variierten und sind bei den Darstellungen der einzelnen Ergebnisse vermerkt. Die Elution erfolgte mit GELFILTRATIONSPUFFER. Wurden die Proben nach der Gelfiltration mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie untersucht, wurde kein ß-Mercaptoethanol verwendet. SCBP-haltige Fraktionen der Gelfiltration wurden durch SDS-Elektrophorese identifiziert, vereinigt und eingeengt (Ultrafiltration mit Amiconapparatur oder Centriconröhrchen, beides mit einer Durchlaßgrenze von 10k, beides Millipore). Dabei wurden sie gleichzeitig in IAC-PUFFER umgepuffert (2x auf 1/10 des Ausgangsvolumen eingeund wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt). Die engt Ionenaustauscherchromatographie wurde mit DEAE-Cellulose DE 52 (Whatman) durchgeführt. Die Maße der Säule und die Fußraten sind wieder bei den Ergebnissen vermerkt. Zur Elution wurde ein linearer NaCl-Gradient von 0 bis maximal 300mM NaCl in IAC-PUFFER verwendet.

Die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mit Phenylsepharose (Pharmacia-LKB) in einer Säule mit den Maßen 2,5cmx13cm durchgeführt. Die Proben wurden in HIC-PUFFER aufgetragen und nacheinander mit NACL-PUFFER, EGTA-PUFFER, Wasser und HARNSTOFF-LÖSUNG eluiert (Walsh et al. 1984).

Bei allen Chromatographien wurde die Absorption des Eluats bei 280nm gemessen und aufgezeichnet.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Reinigung der Antikörper

Es wurden die von Huch (1991) beschriebenen polyklonalen anti-Regenwurm-SCBP₂- und anti-Regenwurm-SCBP₃- Antikörper benutzt. Diese liegen als IgG-Fraktion vor. Kontaminierende, gegen *E.coli*-Proteine gerichtete Antikörper wurden durch Adsorption an Nitrocellulose gebundener *E-coli*-Proteine entfernt (nach Rybicky et al 1990):

Wirtsbakterien ohne Plasmid (*E.coli* DH5αF') wurden über Nacht unter Schütteln (140upm) bei 37°C in LB-MEDIUM gezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (JA14, 5000upm, 15min, 4°C) und bei -20°C eingefroren. Etwa 3,5g Zellen wurden aufgetaut, in 10ml PBS aufgenommen, mit Lysozym versetzt (1mg/ml Endkonzentration) und bei 37°C 30min inkubiert. Die nun viskose Lösung wurde zum besseren Aufschluß noch einmal bei -20°C einfroren und aufgetaut, mit DNase I væsetzt (30µg/ml Endkonzentration) und für 2Stunden bei 37°C inkubiert. Proteine deser Suspension wurden an eine Nitrocellulosemembran (8cmx10cm, Protran BA 79,

Schleicher & Schuell) unter Schütteln bei Raumtemperatur (30min) gebunden. Eventuell noch vorhandene reaktive Stellen der Nitrocellulose wurden durch eine 30minütige Inkubation in ABDECKLÖSUNG unter Schütteln bei Raumtemperatur abgedeckt. Die Nitrocellulosemembran wurde zuletzt zweimal mit INKUBATIONSPUFFER 10min bei Raumtemperatur gewaschen.

MIt dieser Nitrocellulosemembran wurden die in INKUBATIONSPUFFER aufgenommen Antikörper (20µl Antikörperlösung + 100ml INKUBATIONSPUFFER + 100µl 20% w/v NaN₃) 30min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der Nitrocellulose kann die Antikörperlösung direkt verwendet oder bei 4°C mit NaN₈ (0,02% w/v) wenigstens 1 Jahr gelagert werden.

2.5.2. Suche nach SCBP-spezifischen Klonen in einer muskelspezifischen Genbibliothek

Mit Hilfe von Antikörpern und DNA-Sonden wurde versucht, aus einer muskelspezifischen Genbibliothek Klone spezifisch für SCBP zu finden. Diese Genbibliothek wurde von Dr. T.Giebing mit poly A⁺-RNA aus dem Hautmuskelschlauch von *Lumbricus terrestris* in dem Expressionsvektor λ ZAP erstellt (Giebing 1994). Der Titer dieser Genbibliothek beträgt durchschnittlich 5,6x10⁹pfu/ml, der Anteil nicht rekombinanter Phagen liegt unter 0,4%. Die Phagen liegen in einer mit Chloroform stabilisierten Suspension in SM vor.

Der Expressionsvektor λ -ZAP enthält neben den für die Vermehrung als λ -Phage notwendigen Informationen das linearisierte "Phagemid" (Plasmid mit Phagenorigin) pBluescript II SK⁻. In dessen lacZ-Gen wurde die zu klonierende cDNA inseriert. Im vorliegenden Fall wurden dazu die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Eco R1 und Xho 1 verwendet. Weitere vom Phagen f1 und dem Plasmid pUC abgeleitete Bestandteile des pBluescript II SK⁻können dazu genutzt werden, das Phagemid aus dem Vektor λ -ZAP in Gegenwart eines Helferphagens heraus zu schneiden, zu zikularisieren, in Partikel des linearen Phagens zu verpacken und letzlich in einem neuen Wirt als exprimierbares Phagemid zu propagieren. Weitere Details können der Abb.10 und der Literatur entnommen werden (Short et al. 1988).

λ-ΖΑΡ



pBluescript II

Abb.10:Vektor λ-ZAP

Die vom Phagen λ abgeleiteten Teile des Vektors λ -ZAP sind in der Zeichnung gelb gefärbt und entsprechend gekennzeichnet. In diesem Phagen ist das Phagemid pBluescript integriert. Letzteres hat u.a. ein lacZ-Gen, in welches die klonierte DNA inseriert wird und das alle notwendigen Informationen zur Expression enthält. Diese Stelle ist mit "m" gekennzeichnet. Sie enthält als multiple Klonierungsstelle neben den Erkennungssequenzen von verschiedenen Restriktionsenzymen auch die für Eco R1 und Xho1.

Die mit "I" und "T" gekennzeichneten Initiator- und Terminatorsequenzen des Phagen f1 werden von der entsprechenden Proteinmaschinerie eines filamentösen Helferphagen erkannt, mit dem Phagemid herausgeschnitten und zirkularisiert. In den zusammengefügten I +T-Region liegt auch der Replikationsursprung für den filamentösen Phagen. Wird das zirkularisierte Phagemid in ein neues Bakterium gebracht, wird dort der Replikationsursprung des Plasmids pUC (pUC ori) genutzt, für Selektionszwecke ist noch ein Resistenzgen gegen Ampicillin (amp) vorhanden.

2.5.2.1. Bakterienkultur

Bakterienkulturen wurden aus bei -20°C oder -84°C gelagerten Dauerkulturen angesetzt. 10µl Dauerkultur wurden mit 20ml Medium über Nacht unter Schütteln (140upm) bei 37°C inkubiert.

Für größere Kulturen - ab 100ml - wurde zunächst wie beschrieben eine Kultur von 20ml angelegt. Am nächsten Tag wurde mit dieser Kultur die auf 37°C temperierte größere Kultur angeimpft (mit einem 1/1000 - 1/100 Volumen der größeren Kultur). Die weiteren Kulturbedingungen waren wie bei den 20ml-Kulturen.

Bakterien, die als Wirte für Phagen verwendet werden sollen, können direkt nach ihrer Anzucht verwendet oder maximal 14 Tage bei 4°C gelagert werden.

Zur längeren Lagerung wurden 200µl Bakterienkultur mit 50µl Glycerin gemischt, 30 -60 Minuten in Eis inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Dauerkulturen können bei -20°C (oder besser bei -84°) gelagert werden (wenigstens 10 Jahre).
2.5.2.2. Durchsuchen der Genbibliothek mit Antikörpern

Die Suche nach SCBP-Genen in der muskelspezifischen Genbank lehnt sich an Mierendorf et al. (1987) an.

E.coli-Bakterien des Stammes XL1 Blue wurden über Nacht in LB-MEDIUM MIT MG⁺⁺ UND MALTOSE aufgezogen.

600µl Bakterienkultur wurden mit 10µl Phagensuspension (Titer auf 1000pfu/µl eingestellt) und 200µl SM gemischt und 20min bei 37°C inkubiert. Diese Probe wurde anschließend in 9ml auf 48°C temperierte Topagarose aufgenommen und auf eine 12cm x 12cm LB-MG-AGARplatte verteilt. Die Platte(n) wurde(n) so lange bei 42°C inkubiert, bis Phagenplaques deutlich sichtbar wurden (≈ 7 Stunden). Auf jede Platte wurde eine 11cm x 11cm große IPTG-Nitrocellulosemembran (Nitrocellulose mit 10mM IPTG in Wasser tränken und bei Zimmertemperatur trocknen) luftblasenfrei aufgelegt und weitere drei Stunden bei 37°C inkubert. Während die Nitrocellulosemembranen weiter für den immunologischen Nachweis der gesuchten Proteine prozessiert wurden, wurden die Agarplatten bei 4°C aufbewahrt.

Die Nitrocellulosemembranen wurden mit INKUBATIONSPUFFER (10min) gewaschen und reaktive Stellen der Nitrocellulose bei Zimmertemperatur mit ABDECKLÖSUNG unter Schütteln (30 - 60min) abgedeckt. Nach zweimaligem Waschen (je 10min) mit INKUBATIONSPUFFER wurde über Nacht mit der SCBP-spezifischen Antikörperlösung bei 4°C inkubiert (siehe 2.5.1.). Die Nitrocellulose wurde anschließend zweimal (je 10min) mit INKUBATIONSPUFFER gewaschen und 1 - 3 Stunden mit Phosphatase gekoppeltem Zweitantikörper (1/5000 konzentriert in INKUBATIONSPUFFER) inkubiert (4°C). Nach je zweimaligem Waschen mit INKUBATIONSPUFFER und mit AP-PUFFER (<u>a</u>lkalische <u>P</u>hosphatase - Puffer) wurden die Plaques, die mit dem anti-SCBP-Antikörper reagiert hatten, durch Inkubation in AP-SUBSTRATLÖSUNG sichtbar gemacht. Die Nitrocellulose wurde zuletzt gründlich mit Leitungswsser gewaschen und getrocknet.

Durch Vergleich der Nitrocellulosemembranen mit den dazugehörigen Agarplatten wurden die Bereiche identifiziert, in denen sich SCBP-haltige Plaques befinden. Diese Bereiche wurden mit einer abgeschnittenen 1ml Pipettenspitze ($\emptyset \approx 5$ mm) ausgestochen und in 1ml SM mit 50µl Chloroform überführt. Diese Lösung wurde wenigs-

tens 24 Stunden bei 4°C gelagert, damit die Phagen aus der Agarose diffundieren können.

Da die so erhaltene Phagensuspension immer noch eine Mischung aus verschiedenen Phagen darstellte, mußten die gewünschten Phagen durch weiteres Durchsuchen dieser Suspension isoliert werden. Dazu wurde die Phagensuspension mit SM verdünnt (1/500 Konzentration), 10µl davon mit 100µl SM und 200µl Bakterienkultur gemischt und 20min bei 37°C inkubiert. Das weitere Vorgehen ist ab der Zugabe der temperierten Topagarose wie bereits beschrieben.

In der Regel sind nach einem dritten Durchgang, in dem nur noch 5µl der 1/500 konzentrierten eluierten Phagen eingesetzt werden, die positiv reagierenden Plaques soweit voneinander auf der Agarplatte entfernt, daß einzelne Klone ausgestochen und in SM suspendiert werden können.

Diese reinen Phagen wurden in der "in-vivo excision" eingesetzt.

2.5.2.3. Screening der muskelspezifischen Genbank mit einer DNA-Sonde

In diesen Experimenten wurden verschiedene Kits verwendet. Dabei wurden die Anleitungen der Hersteller beachtet, die auf den Arbeiten von A.P. Feinberg und B. Vogelstein (1983), G. Gebeyehu et al. (1987), E.M. Southern (1975), E.W. Khandjian (1987) sowie J.C. Alwine et al. (1977) aufbauen.

Die DNA eines SCBP-spezifischen Klones (Klon 4.1) wurde mit dem Plasmid Midi-Kit (Qiagen) isoliert. Aus dieser DNA (14µg) wurde mit den Restriktionsenzymen Eco R1 und Xho1 die SCBP-spezifische Sequenz herausgeschnitten (siehe 2.5.3.2.). Diese wurde durch Agarose-Elektrophorese (siehe unten) von der Vektorsequenz abgetrennt und aus dem Gel ausgeschnitten. Aus diesem Gelstück wurde die DNA mit dem Geneclean-Kit (Dianova) eluiert und in Wasser aufgenommen. Diese DNA (\approx 4µg) wurde mit dem DIG DNA Labeling Kit (Boehringer) mit Digoxygenin markiert.

Zum Durchsuchen der Genbibliothek wurden Bakterien und Phagen wie beschrieben zusammen gebracht und bei 42°C bebrütet, bis Plaques sichtbar wurden. Dann wurden die Agarplatten für 30min bis 2 Stunden bei 4°C gekühlt. Ein Stück passend zurecht geschnittene Qiabrane-Nylon-Membrane (Qiagen) wurde luftblasenfrei 30sec

auf die Agarplatte gelegt, ein zweites Membranstück kann für einen zweiten Abklatsch verwendet werden (60sec auflegen). Die Agarplatten wurden danach bei 4°C gelagert.

Für die im Folgenden beschriebenen Reaktionen wurden die Membranen auf mit den angegebenen Lösungen getränkte bzw. trockene Filterpapiere gelegt. Die Phagen wurden 5 Minuten mit DENATURIERUNGSLÖSUNG lysiert, dann fünf Minuten getrocknet. Nach Neutralisation mit NEUTRALISATIONSPUFFER für fünf Minuten wurde zweimal 2min mit 2xSSC gewaschen. Nach Trocknen wurden die Membranen 45min bei 80°C gebacken.

Die Identifizierung der Klone, die SCBP-Gene enthalten, erfolgte durch eine DNA-DNA-Hybridisierung mit dem DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer) und der zuvor DIG-markierten DNA. SCBP-haltige Klone wurden wie beschrieben aus Agarplatten herausgestochen und weiter verarbeitet.

2.5.2.4. in-vivo-Excision des pBluescript-Phagemids

200µl Bakterienkultur (*E.coli* XL1 Blue in LB-MEDIUM MIT MG⁺⁺ UND MALTOSE) wurden mit 200µl λZap-Phagen eines ausgestochenen reinen Plaques mit SCBP-Gen (mindestens 10⁴ pfu/µl) sowie 1µl des Helferphagens R408 (10⁶ - 10⁷ pfu/µl) gemischt. Nach 15min Inkubation bei 37°C wurde die Mischung in 5ml auf 37°C temperiertes LB-MEDIUM MIT MG⁺⁺ UND MALTOSE aufgenommen und unter Schütteln bei 37°C 5 Stunden inkubiert. Die Bakterien wurden durch Erhitzen auf 70°C für 20min abgeötet, unlösliche Bestandteile in einer Tischzentrifuge (2min, 11000upm) abzentrifugiert. 200µl dieses Überstandes mit den in Phagenpartikeln verpackten Phagemiden wurden mit frischen 200µl Bakterienkultur (XL1 Blue) gemischt und 15min bei 37°C inkubiert. 10µl-Aliquots dieser Mischung wurden auf AIX-PLATTEN ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen farblosen Kolonien, die die Phagemide mit SCBP-Insert enthalten, wurden auf frische AIX-Platten übertragen. Dauerkulturen (2.5.2.1.) der Klone wurden aus über Nacht in LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin gewachsenen Kulturen angelegt.

2.5.3. Extraktion von DNA

2.5.3.1. DNA-Präparation aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms

Genomische Regenwurm-DNA wurde mit Hilfe der CsCI-Dichtegradienten-Zentrifugation präpariert (Schwochau 1979a + b; Birnie 1978).

Die Präparation des Hautmuskelschlauches wurde wie in 2.2.2. beschrieben durchgeführt. Der Hautmuskelschlauch wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Pulver wurde in DNA-LYSEPUFFER (1ml Puffer pro 1g Organ) aufgenommen, mit Proteinase K versetzt (Endkonzentration 50µg/ml) und 2 Stunden bei 53°C inkubiert. Mit festem CsCl wurde eine Ausgangsdichte von 1,6g/ml eingestellt, die Lösung wurde 42 Stunden in Quick Seal-Röhrchen in einem VTi65-Rotor bei 65000upm und 20°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Röhrchen oben und unten angestochen und die DNA-Fraktion, die daran zu erkennen ist, daß das Austropfen kurz unterbricht, um sich dann mit zähen, fadenziehenden Tropfen fortzusetzen, gesammelt und über Nacht gegen GARDOL-PUFFER dialysiert. Die DNA wurde aus der dialysierten Probe mit 2 Volumina Ethanol ausgefällt. Nach Zentrifugation (20min, 10000upm) wurde die DNA zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen.

2.5.3.2. Präparation und Schneiden mit Restriktionsenzymen von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde z.T. mit verschiedenen Kits - Midi-Prep (Macherey & Nagel), Midi Kit (Qiagen), Jetprep (Genomed) - nach Herstellerangaben präpariert. Meist wurde Plasmid-DNA jedoch mit Glasmilch (Carter und Milton 1993, Morelle 1989, Birnboim und Doly 1979) isoliert.

100g Silica-Pulver (Sigma) wurden in 200ml Wasser aufgeschwemmt und 150min bei Raumtemperatur sedimentieren gelassen. Der Bodensatz wurde verworfen, der trübe Überstand abzentrifugiert (JA14-Rotor, 10min, 6000upm, 4°C). Das Pellet wurde in 75ml Wasser resuspendiert und dann mit konzentrierter Salpetersäure eine Endkonzentration von 10,5M eingestellt. Nach Abkühlen wurden die Glaspartikel wie beschrieben abzentrifugiert. Das Pellet wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis im Überstand der pH-Wert des verwendeten Wassers erreicht wurde. Zuletzt wurde das Pellet in einem Pelletvolumen Wasser aufgeschwemmt, in 2ml Portionen aliquotiert und bei -84°C gelagert. Das in Verwendung befindliche Aliquot wurde bei 4°C gelagert.

Alle Zentrifugationsschritte zur Präparation von Plasmid-DNA wurden mit einer Tischzentrifuge Typ Eppendorf durchgeführt. Aus einer über Nacht gewachsenen 3ml Bakterienkultur wurden nach 5min Kühlen auf Eis die Zellen pelletiert (5min, 5000upm, 4°C). Das Pellet wurde in 100µl GET aufgenommen, RNase A (0,2µg/µl Endkonzentration) zugegeben und 30min in Eis inkubiert. Die Zellen mit 200µl Na-OH/SDS 10min auf Eis lysiert. Nach Neutralisation mit 150µl 7,5M Ammoniumacetat (30min auf Eis) wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (5min, 11000 upm). Der Überstand wurde mit 900µl NAJ-LösuNG und 4,5µl Glasmilch gemischt und wenigstens 1 Stunde auf Eis inkubiert.

Die Glaspartikel wurden abzentrifugiert (5min, 11000upm), der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit NEET gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Pellet in 60µl Wasser resuspendiert und die DNA durch eine dreiminütige Inkubation bei 50°C eluiert. Zuletzt wurden die Glaspartikel abzentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA abgenommen.

Sollten Plasmide aus mehr als 3ml Kulturvolumen präpariert werden, wurden alle Volumina entsprechend angepaßt.

2.5.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Thermocycle-Sequenzierung

Für die Polymerase Kettenreaktion wurden alle Komponenten - bis auf die Taq-Polymerase - gemischt und mit Mineralöl (Sigma) überschichtet. Das Endvolumen des wässrigen Reaktionsansatztes betrug 50µl. Die Polymerase wurde erst während der Denaturierung der DNA beim ersten Aufheizen der Probe zugegeben ("Hot-Start"). Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten betrug:

Matrizen-DNA:	2,0mg/l bis 40mg/l
Nucleotid-Konzentration je Nuc	cleotid 0,1mM
Primerkonzentration	16,0nM
10x Puffer (Qiagen)	1/10 Endvolumen
Taq-Polymerase (Qiagen)	10000u/l bis 100000u/l

Das Programm der PCR war bei Plasmiden mit cDNA-Insert wie folgt:

- 1. 5 Minuten Denaturieren bei 94°C
- 2. 30sec Inkubation bei der Hybridisierungstemperatur
- 3. 1min bei 72°C Elongieren
- 4. 30sec Denaturieren bei 94°C
- 5. 30 Wiederholungen der Schritte 2. 4.
- 6. 10 min bei 72°C
- 7. Lagerung der Probe bei 4°C

Bei genomischer DNA als Matrize wurden die Inkubation bei 72°C (Schritt 3) auf 4min, die letzte Inkubation (Schritt 6) auf 15min verlängert.

Die Hybridisierungstemperatur hängt von den verwendeten Primern ab. Sie liegt 5°C unter der Schmelztemperatur und kann der folgenden Tabelle entnommen werden. Es wurde immer die tiefste Hybridisierungstemperatur eines Primerpaares verwendet.

Primer	Sequenz	Hybridisierungs-	
		temperatur	
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA	46°C	
32asH	CGG CC <u>A AGC TT</u> A GAC GAG CGG GCC CCA GAA GT	67°C	
S3seB	CGC GG <u>G GAT CC</u> A TGG CTG ATG CGT TCA TTG AAA	63°C	
15seB	CGC GG <u>G GAT CC</u> A TGT CGG CCT TCT ACC TTC GT	66°C	
15asH	CGG CC <u>A AGC TT</u> A ACA AGG GAC CCC CAG AAC AAC C	66°C	
15hi	ATG TCG GCC TTC TAC CTT	46°C	
15rü	CTA AAC AAG TGG CCC CCA GAA	52°C	
81hi	ATG GCT GAT GCG TTC ATT GAA AGG	53°C	
81rü	TCA GAC GAG CGG GCC CCA GAA	58°C	
pRSET	CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG	52°C	

Primer wurden von den Firmen MWG-Biotech und Biometra bezogen.

Tabelle 1: Verwendete Primer

Die Schmelztemperaturen wurden nach

Tm = 81,5 + 16,6 * log(Na) + 0,41 * %GC - 625/N

berechnet (Breslauer 1986). Tm ist die Schmelztemperatur in °C, log(Na) ist der Logarithmus zur Basis 10 der Na⁺-Konzentration in Mol/I, %GC bedeutet GC-Gehalt des Primers in % und N ist die Anzahl der Nucleotide des Primers. Die Salzkonzentration, die die Hybridisierungstemperatur beeinflußt, wurde hier auf 0,1M geschätzt. Dies war nötig, weil die Firma Qiagen die Salzkonzentration ihres 10x Pufferkonzentrates nicht angibt.

Die Primer T7 und pRSET wurden komplementär zu Sequenzen der verwendeten Vektoren angefertigt. Die Bezeichnungen der anderen Primer erklären sich so: 15, 32 und 81 bedeutet, daß die Primer komplementär zu Sequenzen der Klone 15.1, 32 und 8.1 sind, S3 bedeutet komplementär zu SCBP₃. "se" bzw. "hi" kennzechnen, daß die Sequenz dem codogenen Strang entspricht, "as" bzw. "rü" bedeutet das entsprechende für den nicht-codogenen Strang. "B" bzw. "H" heißt, daß der Primer eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bam H1 bzw. Hind III enthält (in der Sequenz unterstrichen).

Der genannte Klon 32 hat dasselbe Plasmid wie der Klon 4.1, es ist lediglich in einem anderen Wirtsbakterium.

Plasmid-DNA wurde mit dem Thermocycle Sequencing Verfahren sequenziert. Diese Methode ist eine Kombination von PCR und Strang-Abbruch-Sequenzierung (Sanger 1977, Schmidt 1985). Die Detektion der Reaktionsprodukte wird dabei durch Fluorochrom-markierte Primer ermöglicht.

Je 0,5µg - 2,0µg Plasmid-DNA wurden mit je 0,6 - 1,2pMol Primer und 2µl eines der vier Nucleotid-spezifischen Reagentien des Thermosequenase Kits (Amersham) gemischt. Das Volumen wurde mit Wasser auf 8µl eingestellt, die Proben mit Mineralöl überschichtet. Das PCR-Programm für die Sequenzierung begann mit einem fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C. Darauf folgten 30 Zyklen, in denen sich eine einminütige Polymerisationsphase bei 62°C mit einer 30 Sekunden langen Denaturierung bei 94°C abwechselten. Die Reaktionsprodukte wurden bei-20°C im Dunklen bis zur Sequenzanalyse gelagert. Als Primer wurden die Fluorochrom-markierten Primer T7, T3 und universal M13 verwendet (MWG-Biotech). Die Reaktionsprodukte wurden in einem Polyacrylamidgel in dem LI-COR 4000 Sequenzer (Amersham) in der Abteilung für Parasitologie der Universität Düsseldorf analysiert.

Plasmide wurden auch von einem Sequenzierdienst (Genotyp) sequenziert.

2.5.5. Klonierung von PCR-Produkten mit dem Vektor pCR T7/NT-TOPO

Die Klonierung von PCR-Produkten wurde nach Angaben des Herstellers mit dem "pCR™T7/NT TOPO TA Cloning™ Kit" (Invitrogen) durchgeführt.

Bei der Integration von PCR-Produkten wird bei diesem Vektor ausgenutzt, daß die Taq-Polymerase unspezifisch ein überstehendes Adeninnucleotid an das PCR-Produkt anhängt. Der geschnittene Vektor hat deshalb einzelne überstehende Thymin-Nucleotide an seinen Enden. Diese minimale komplementäre Sequenz reicht deshalb aus, PCR-Produkte effektiv in den Vektor zu integrieren, weil an den Enden des Vektors zusätzlich eine Topoisomerase gebunden ist. Diese fügt das PCR-Produkt direkt kovalent in den Vektor ein (Shuman 1991, Shuman1994; Invitrogen-Broschüre).

Der Vektor pCR T7/NT-TOPO ist als Expressionsvektor mit folgenden Eigenschaften konstruiert: Er besitzt einen T7-Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle, ein Startcodon, von dem aus die Expression des Fusionsproteins beginnt, gefolgt von einem His-Tag, einer Sequenz, die für 6 aufeinander folgende Histidinreste codiert. Zusammen mit einer weiteren Domäne (Xpress) werden insgesammt 35 Aminosäuren vor das in dem Vektor exprimierte Protein gesetzt. Vervollständigt werden die Eigenschaften des Vektors durch die Erkennungsequenzen verschiedener Restriktionsenzyme und der Sequenz pRSET als Start für eine Sequenzierung (siehe Abb.4). Zu Selektionszwecken ist auf dem Plasmid ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen.



Abb.11:Der Vektor pCR T7/NT-TOPO

Der Vektor pCR T7/NT-TOPO besitzt einen T7-Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle ("RBS"), ein Startcodon ("ATG") und ein His-Tag ("6x His"). Die Xpress-Sequenz codiert für eine Aminosäuresequenz, die von einem Antikörper erkannt wird, so daß gegebenenfalls alle Fusionsproteine mit demselben Antikörper nachgewiesen werden können. Diese Aminosäuresequenz enthält gleichzeitig die Erkennungssequenz für Enterokinase, mit der der größte Teil der vor das integrierte Protein gesetzten Aminosäuren abgespalten werden kann. Gezeigt sind die Positionen der Erkennungsequenzen verschiedener Restriktionsenzyme (Nde1, Nhe1, BamH1, EcoR1, BstB1, HindIII) und der Sequenz pRSET.

Vom Insert codierte Proteine können nur exprimiert werden, wenn die Wirtszelle über die T7-Polymerase verfügt. In Bakterien - z.B. *E.coli* Top10 F' -, die keine T7-Polymerase haben, kann das Plasmid auch dann erhalten bleiben, wenn das Expressionsprodukt für die Zelle toxisch ist.

Zur Expression wird das Plasmid in einen Wirt gebracht, der über die T7-Polymerase verfügt. Dies ist z.B. der Stamm BL21(DE3) pLysS. Dieser Stamm hat eine durch IPTG induzierbare T7-Polymerase sowie das Plasmid pLysS, das eine geringe basal exprimierte T7-Polymerase neutralisieren kann. So soll sicher gestellt werden, daß toxische Expressionsprodukte nur nach Induktion exprimiert werden (Invitrogenbroschüre; Studier und Moffatt 1986; Rosenberg et al,1987; Grunberg-Manago M., 1999).

Zur Klonierung wurden 4µl PCR-Produkt mit 1µl 6x Salzlösung und 1µl Vektor aus dem genannten Kit gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50µl kompetente *E.coli* des Stamms TOP10F' (Invitrogen) mit 2µl des Klonierungsansatzes gemischt und 30min in Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von etwa 30sec in einem auf 42°C temperierten Wasserbad wurden die Bakterien in Eis gekühlt, dann mit 250µl SOC-MEDIUM versetzt und 30min bei 37°C unter Schütteln (200µpm) inkubiert. Zuletzt wurden 50µl Aliquots auf AMPICILLIN-PLATTEN ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf frische AMPICILLIN-PLATTEN transferiert oder in Flüssigkultur genommen und wie beschrieben zu Dauerkulturen verarbeitet. Zur Expression des klonierten PCR-Produktes wurde1µg Plasmid-DNA in den Bakterienstamm BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) (50µl) wie beschrieben transformiert. Nach Inkubation in SOC-MEDIUM wurden Aliquots auf AMP/CAM-PLATTEN ausplattiert. Nach Bebrüten wurden Dauerkulturen angelegt.

2.5.6. Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen

2.5.6.1 Rekombinante Proteine aus *E.coli* XL1 Blue mit dem Bluescript-Vektor

Die Bakterien wurden in LB-IPTG über Nacht angezogen und durch Zentrifugation (JA 10, 5000upm, 5min, 4°C) gesammelt. Das Pellet wurde in dem fünffachen Voumen SCBP-EXTRAKTIONSPUFFER aufgenommen, Lysozym zugegeben (1mg/ml Endkonzentration) und auf Eis 30min inkubiert. Die Lösung wurde zum Aufschluß der Zellen zweimal bei -20°C eingefroren und aufgetaut. Anschließend wurde DNA mit DNase I (30µg/ml Endkonzentration) 2Stunden bei 37°C abgebaut. Nach Zentrifugation (JA14, 14000upm, 60min, 4°C) wurde aus dem Überstand rekombinantes SCBP wie bei der SCBP-Standardpräparation beschrieben isoliert.

2.5.6.2. Rekombinante Proteine aus *E.coli* BL21(DE3)pLysS mit dem Vektor pCR T7/NT-TOPO

Ein His-Tag kann zur einfachen Aufreinigung eines rekombinanten Proteins genutzt werden, da es reversibel an die Nickel-Ionen von "NiNTA-Agarose" (Qiagen) binden kann. In diesem Säulenmaterial ist Nitrilotriessigsäure (engl.: <u>Nitrilotria</u>cetic acid, NTA) an Agarose gebunden. Sie stellt vier Koordinationsstellen, die ein Nickel-Ion komplexieren. Die fünfte und sechste Koordinationsstelle des Nickels werden von anderen Liganden gestellt: Entweder binden die Histidinreste des His-Tags an das Nickel (Abb. 12) oder ein anderer Ligand wie z.B Imidazol. Imidazol ähnelt Histidin - wie in Abb.12 gezeigt - und kann deshalb mit diesem um die Bindung an das Nickel Ion konkurrieren. Nach Angaben des Herstellers bindet 1ml NiNTA-Agarose etwa 5 - 10mg Protein mit einem His-Tag.



Abb.12:Bindung des His-Tags an das NiNTA-Säulenmaterial

In der Abbildung ist Ni-Nitrilotriessigsäure ("NiNTA") rot dargestellt, die Peptidkette mit dem His-Tag ist blau gezeichnet. Gezeigt werden nur die beiden Histidinreste, die an das Nickelion koordinativ gebunden haben. In der rechten oberen Ecke ist die Struktur von Imidazol gezeigt, um die Ähnlichkeit mit Histidin zu demonstrieren. Das bei der koordinativen Bindung von Nickel beteiligte Stickstoffatom ist wie bei Histidin grün markiert. (verändert nach Qiagen-Broschüre)

Die Expression rekombinanter Proteine wurden bei Bakterien des Stammes BL21(DE3)pLysS mit dem Vektor pCR T7/NT-TOPO durch Kultur über Nacht in 250 - 500ml LB-IPTG MIT CAM bei 37°C induziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (JA14; 5000upm; 15 min; 4°C) und in LYSEPUFFER aufgenommen (1g Bakterien in 3ml LYSEPUFFER). Durch Einfrieren/Auftauen und mit Hilfe von Lysozym und DNase 1 wurden die Bakterien wie in 2.5.6.1. beschrieben aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (10000g, 30min), der Überstand ("geklärtes Lysat", etwa 4ml), wurde mit 4,2ml in LYSEPUFFER äquilibrierter NiNTA-Agarose gemischt und 1 Stunde bei 4°C geschüttelt. Die Mischung wurde in eine Plastiksäule (ähnlich PD-10 Säulen von Amersham) gefüllt. Nachdem die Lösung mit ungebundenen Proteinen ausgelaufen war ("Durchfluß"), wurde das Säulenmaterial mit 4 Säulenvolumina WASCHPUFFER gewaschen ("Waschfraktion"). Gebundene Proteine wurden ebenfalls mit 4 Säulenvolumina ELUTIONSPUFFER eluiert ("Eluat"). Die Proteine des Eluats wurden bei Bedarf durch Ultrafiltration (Centriconröhrchen, Millipore) oder Ammoniumsulfatfällung bei 80% Sättigung konzentriert. Zur Regeneration wurde das Säulenmaterial nacheinander mit je zehn Säulenvolumina STARKEN ELUTIONSPUFFERs und LYSEPUFFER gewaschen. Die Säule wurde in LYSEPUFFER mit Natriumazid (Endkonzentration 0,02% w/v) bei 4°C gelagert.

2.6. Quantitative Methoden

2.6.1. Proteinbestimmungen

Die Proteinkonzentration von Proteinmischungen kann recht einfach durch UV-Absorptionsmessungen abgeschätzt werden. Dazu wird die Aborption einer Proteinlösung bei 260nm und 280nm bei 1cm Schichtdicke gemessen und der Proteingehalt nach

 $1,55 * A_{280} - 0,76 * A_{260} =$ Proteinkonzentration in mg/ml berechnet (Warburg und Christian 1941).

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde mit konzentriertem Reagenz (Biorad) durchgeführt. 800µl Probe bzw. mit Wasser auf 800µl aufgefüllte Probe wurden mit 200µl des Reagenz gemischt und die Absorption der entstehenden blauen Farbe bei 595nm gemessen. Durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden aus Rinderserumalbumin von 1µg/ml bis 15µg/ml wurde die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

2.6.2. Bestimmung der Ca⁺⁺- Konzentration durch Atomabsorptionspektroskopie

Die Ca⁺⁺- Konzentration wurde mit dem Atomabsorptionsspektrometer Analyst 100 (Perkin Elmer) im Institut für Geobotanik der Universität Düsseldorf bestimmt. Eine Kalibrierkurve wurde mit den Konzentrationen 0, 25, 75 und 225µM Ca⁺⁺ erstellt.

2.6.3. DNA-Bestimmung durch UV-Absorptionsmessung

Die Absorption einer DNA-Lösung wurde bei 260nm bei 1cm Schichtdicke gemessen und der DNA-Gehalt nach

50 * A_{260} = DNA-Konzentration in μ g/ml

berechnet (Beaven et al. 1955).

2.7. Elektrophoretische Methoden

2.7.1. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

DNA-haltige Proben wurde mit 1/6 Volumen 6FACH LADUNGSPUFFER versetzt und in 1% w/v Agarosegelen in TBE mit 1µg Ethidiumbromid aufgetrennt. Verwendet wurde eine Horizontalgel-Apparatur. Nach der Elektrophorese wurde der DNA/Ethidiumbromid-Komplex durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Als Größenstandards wurden DNA-Standard IV (Boehringer) oder die 100bp-plus Leiter (Peqlab) verwendet.

2.7.2. Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE

Proteine wurden in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli 1970) aufgetrennt. Salzhaltige Proben wurden zunächst gegen Wasser dialysiert. Dann wurden die Proben abhängig von der Proteinkonzentration entweder mit 1/10 Volumen 11xPROBENPUFFER und 1/10 Volumen 0,1%W/V BROMPHENOLBLAU IN GLYCERIN oder mit dem vierfachen Volumen 1,25xPROBENPUFFER gemischt und fünf Minuten auf etwa 100°C im Wasserbad erhitzt. In einigen Sonderfällen wurde den Proben noch CaCl₂ (5mM Endkonzentration) oder EGTA (10mM Endkonzentration) zugegeben.

SAMMELGEL und TRENNGEL wurden in dem vertikalen Midget-System (LKB) gegossenen. Für kathodisches und anodisches Bad wurde derselbe ELEKTRODENPUFFER verwendet. Bei der Elektrophorese wurde eine maximale Leistung von 15 Watt eingehalten. Zum Proteinnachweis nach der Elektrophorese wurden die Gele mindestens 30min in FIXIERER inkubiert und anschließen über Nacht in FÄRBELÖSUNG gefärbt. Zuletzt wurde das Gel in 10% Essigsäure inkubiert, bis der Hintergrund klar war (Heukeshoven und Dernick 1988).

2.7.3. Nachweis spezifischer Proteine durch Blot-Verfahren

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine des nicht fixierten Gels im "semi-dry" Verfahren (Towbin et al. 1979; Kyhse-Anderson 1984) auf Nitrocellulose transferiert. Vor dem Transfer mit dem Gerät der Firma Biometra wurde das Gel 10 - 15min in TRANSFERPUFFER äquilibriert.

Der Nachweis spezifischer Proteine mit Antikörpern wurde wie in 2.5.2.3 beschrieben durchgeführt. Neben den dort beschriebenen anti-Regenwurm-SCBP-Antikörpern wurde auch der anti DCABP23-Antikörper verwendet. Dieser Antikörper ist gegen ein SCBP-ähnliches Protein aus *Drosophila melanogaster* gerichtet und wurde freundlicherweise von Leonard E. Kelly zur Verfügung gestellt.

An Nitrocellulose gebundene Ca⁺⁺-bindende Proteine wurden mit der Methode von Maruyama et al. (1984) nachgewiesen:

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose dreimal 20min in OVERLAY-PUFFER gewaschen. Anschließend wurde die Nitrocellulose mit radioaktiven Ca⁺⁺ (7400Bq/ml ⁴⁵Ca⁺⁺ in OVERLAYPUFFER) inkubiert. Zuletzt wurde die Nitrocellulose kurz (1-5min) mit 50% Ethanol gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet. Der Proteinnachweis erfolgte durch Autoradiographie auf Röntgenfilm (Fuji).

Als Standards für die relative Molekularmasse von Proteinen wurden die Protein Test Mischungen 4 und 5 (Serva) sowie SDS-Proteinstandard M2789 (Sigma) verwendet.

2.7.4. Auftrennung von Proteinen in der Harnstoff-Gelelektrophorese

Die Harnstoffelektrophorese zum Nachweis einer Ca⁺⁺-abhängigen elektrophoretischen Mobilität (Walsh et al. 1984; McDonald und Walsh 1985) wurde ebenfalls in dem Midget-System (LKB) durchgegührt. Nach der Polymerisation wurde das HARNSTOFFGEL in der Elektrophoreseapperatur mit HARNSTOFF-PROBENPUFFER überschichtet. Die anschließende Vorelektrophorese bei 200V wurde durchgeführt, bis die Farbstofffront des Bromphenolblaus das untere Ende des Gels erreichte. Nach Wechsel des HARNSTOFF-ELEKTRODENPUFFERs wurden die eigentlichen Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Proteine wurden wie beschrieben nachgewiesent (Färbung mit Coomassie Brilliant Blau; Elektrotransfer).

Vor der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Ca⁺⁺ beladen, in dem sie mit 5mM CaCl₂ inkubiert wurden oder durch eine Inkubation in 10mM EGTA von Ca⁺⁺ befreit. Die Inkubationsdauer betrug immer 10 Minuten auf Eis. Nach der Inkubation wurde 1 Volumen 2x PROBENPUFFER zugegeben.

2.8. Dokumentation

Alle Gele wurden nach der Elektrophorese im Durchlicht auf panchromatischem Schwarzweißfilmmaterial (AGFA pan professional 50) photographiert. Bei mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gelen und bei mit UV-Licht beleuchteten mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen wurde ein Orange-Filter verwendet. Nitrocellulosemembranen wurden mit Auflicht ohne Filter photographiert. In den Ergebnissen wurden die Abbildungen der fluoreszierenden, Ethidiumbromid-gefärbten Gele als Negative dargestellt, da so auch schwache Banden besser sichtbar sind.

Sequenzvergleiche - sowohl von Aminosäuren als auch von Nucleinsäuren - wurden mit dem Programm Align (Scientific & Educational Software; Hirschberg 1975; Myers und Miller 1988; Needleman und Wunsch 1970) durchgeführt. Dendrogramme wurden mit dem Programm Clustalw (Thompson et al. 1994) erstellt.

Aus einer Aminosäuresequenz wurde der isoelektrischen Punkt mir "Winpep" (Hennig 1999) berechnet. Proteinsequenzen wurden allgemein in Swiss-Prot (http://www.expasy.ch/sprot) des Schweizer Instituts für Bioinformatik gesucht.

Sequenzen von *Caenorhabditis elegans* wurden von der Wormbase Web site bei den Cold Spring Harbor Laboratories (http://wormbase.org) bezogen, die Sequenzen von *Drosophila melanogaster* bei "Flybase" (http://flybase.bio.indiana.edu/).

Die verschiedenen Darstellungen der EF-Hand-Proteine in der Einleitung wurden mit den Programmen Rasmol und Deep View unter Verwendung der Dateien 1B8C (Parvalbumin, Cates et al. 1999), 1CLB (Calbindin D9k, Skelton et al. 1995), 1CLL (Calmodulin, Chattopadhyaya et al. 1992), 1CDL (Calmodulin mit Zielpeptid, Meador et al. 1992); 1AJ4 (Calcium-gesättigtes Troponin C, Sia et al. 1997), 1NCX (Troponin C, Rao et al. unveröffentlicht, zitiert nach Angaben der PBDLite-Datenbank; Satyshur et al. 1994) und 2SCP (SCBP von *Nereis diversicolor,* Vijay-Kumar und Cook 1992) aus "PBDLite" (http://bioinfo.weizmann.ac.il:8500/oca-bin/pdblite) sowie den von Swissmodel (Guex und Peitsch 1997; Peitsch 1996; Peitsch 1995) nach eingesandten Sequenzen erstellten Dateien angefertigt .

3. Ergebnisse

3.1. SCBP bei Nematoden

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* ist ein Modellorganismus für genetische und entwicklungsbiologische Fragestellungen. Es liegt deshalb nahe, SCBP auch bei diesem Tier zu suchen, um gegebenenfalls die Vorteile, die das Arbeiten mit einem genetisch gut untersuchten Organismus bietet, zu nutzen. *Ascaris suum* ist ein Verwandter von *C.elegans*, der aufgrund seiner Größe eine einfache Präparation verschiedener Körperteile ermöglicht. Sollte SCBP bei *C.elegans* im ganzen Tier nachweisbar sein, kann seine Lokalisation bei *A.suum* untersucht werden.

3.1.1. Kreuzreaktion von anti-Regenwurm-SCBP-Antikörpern mit Nematodenproteinen

Der anti-(Regenwurm) SCBP₃-Antikörper reagierte mit einem Protein mit der relativen Molekularmasse von 20000 in einem Hautmuskelschlauch-Homogenat aus *A.suum* bzw. aus ganzen *C.elegans*. Dies ist zwar eine für SCBP typische Größe, doch war dieses Protein nicht in einem Puffer mit geringer Ionenstärke in Gegenwart von Ca⁺⁺ löslich. Damit konnten die von dem Antikörper gefundenen Proteine keine SCBPs sein, die unter diesen Bedingungen typischerweise löslich sind. Der Antikörper kann also nicht zu einem Nachweis von SCBP verwendet werden (Abb. 13).

Dies bedeutet aber noch nicht, daß es in den untersuchten Nematoden kein SCBP gibt. Da SCBPs wenig konserviert sind, ist es möglich, daß der Antikörper ein vorhandenes SCBP nicht erkannt hat (siehe Reaktionen der verschiedenen Antikörper mit Regenwurm-SCBP und Drosophila-SCBP).



Abb.13:Reaktion des anti-Regenwurm-SCBP₃-Antikörpers mit Nematodenproteinen

Homogenate von *C. elegans* und von Hautmuskelschläuchen von *A. suum* sowie die entsprechenden Rohextrakte und Rohextraktpellets wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder auf Nitrocellulose transferiert und mit dem SCBP₃-Antikörper untersucht.

Von dem Antikörper markierte Proteine sind bei geringer Ionenstärke nicht löslich und daher im Rohextraktpellet zu finden.

C = C.elegans-Proben, A = A.suum-Proben, 1 = Gesamthomogenat, 2 = Rohextrakt, 3 = Rohextraktpellet; $a = Western Blot mit SCBP_3$ -Antikörper behandelt, bei den nicht mit "a"bezeichneten Proben handelt es sich um Coomassie Brilliant Blau gefärbte Gele nach SDS-PAGE, M = Molekularmassenstandards. Die Striche markieren die Positionen der Molekularmassenmarker, die Zahlen geben die zugehörige relative Molekularmasse an

3.1.2. Versuch der Präparation von SCBP aus Hautmuskelschläuchen von *A. suum*

Bei der Präparation von SCBP aus Hautmuskelschläuchen von *A. suum* wurde abweichend von der Standardpräparation das Erhitzen der Proteinproben unterlassen. Dies war nötig, weil beim Erhitzen der *A.suum*-Proben nicht nur denaturierte Proteine ausfielen, sondern die Probe schleimig und so viskos wurde, daß es nicht mehr möglich war, aus ihr hitzedenaturierte Proteine abzuzentrifugieren. Deshalb wurde der Rohextrakt des Hautmuskelschlauches (Abb. 14)



Abb.14: Vorbereitung des Rohextraktes des Hautmuskelschlauchs von A. suum zur Gel

filtration

Der Rohextrakt aus Hautmuskelschläuchen von *A.suum* wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert, einzelne Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt.

[M] Molekularmassenstandards; [1] Rohextrakt; [2] 40% Ammoniumsulfat-Pellet; [3] 40% Ammoniumsulfat-Überstand; [4] 80% Ammoniumsulfat-Pellet. Die Striche markieren die Positionen der Molekularmassenmarker, die Zahlen geben die zugehörige relative Molekularmasse an.



Abb.15: Elutionsprofil der Gelfiltration eines 80%-Pellets

In der oberen Hälfte wird das Elutionsprofil einer Gelfiltration gezeigt: Ein 80%-Pellet (41,3mg Protein) wurde in Gelfiltrationspuffer ohne ß-Mercaptoethanol auf einer 3 x 90cm Säule (\emptyset x h) über AcA54 mit einer Flußrate von 0,5ml*min⁻¹ aufgetrennt. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurde bei 280nm gemessen.

In dem unteren Teil wird die SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Gelfiltration gezeigt.

Die Zahlen über den Bahnen geben die Nummern der Fraktionen der Gelfiltration an. "M" sind Molekularmassenmarker, die Striche markieren die Positionen der Molekulamassenmarker, die Zahlen geben die zugehörige relative Molekularmasse an.

zunächst nur mit Ammoniumsulfat fraktioniert, wobei allerdings nur wenige Proteine des Rohextraktes entfernt wurden.

Worauf das Verhalten beim Erhitzen zurückzuführen ist, wurde nicht weiter untersucht. Möglicherweise wird es durch Kohlenhydrate aus der Cuticula und der Muskulatur selbst verursacht (Di Mito und Betschart 1998).

Die mit Ammoniumsulfat fraktionierten Proteine wurden in einer Gelfiltration aufgetrennt, die UV-Absorption der einzelnen Fraktionen bei 280nm gemessen. Schließlich wurden die Proteine von ausgewählten Fraktionen in der SDS-PAGE untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in Abb.15 gezeigt.

Kandidaten für ein SCBP sollten eine relative molekulare Masse von etwa 20000 haben. In diesem Bereich der relativen Molekularmasse werden Proteine in den Fraktionen 38 und 65 gefunden. Weder in der Atomabsorptionsspektroskopie noch in der Harnstoffelektrophorese, in der sich die Ca⁺⁺-Bindung eines Proteins durch eine stark Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität zeigt (Cox und Stein 1981, Garrigos et al 1991), konnte eine eindeutige Ca⁺⁺-Bindung für diese Proteine gezeigt werden. Diese Proteine sind demnach kein SCBP.

3.1.3. Versuch der Präparation von SCBP aus *C.elegans*

Caenorhabditis elegans ist zu klein, um daraus die Längsmuskulatur zu präparieren. Deshalb wurden die Tiere in Flüssigkultur herangezogen und versucht in einer Standard-SCBP-Extraktion - also mit Erhitzen der Probe - die gesuchten Proteine aus den ganzen Tieren zu isolieren. Die Fraktion der hitzestabilen Proteine wurde in einer Gelfiltration aufgetrennt. Ausgewählte Fraktionen der Gelfiltration wurden vereinigt und sowohl in der SDS-PAGE wie in der Harnstoff-PAGE auf Proteine untersucht, die eine Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität haben. Solche Proteine konnten nicht gefunden werden (Abb.16).



Abb.16: Versuch der Präparation von SCBP aus C. elegans

Im oberen Teil ist das Elutionsprofil der Gelfiltration gezeigt: Die hitztestabilen Proteine (1,7mg) der Präparation wurden über eine Säule der Maße 1,6cm x 67cm (\emptyset x h) mit dem Säulenmaterial AcA54 aufgetrennt. Die Flußrate betrug 0,2ml/min, die Fraktionsgröße 2,4ml. In dem Elutionsprofil sind einige ausgewählte Fraktionen markiert. Die Fraktionen, die ein 23k-Protein enthielten und vereinigt wurden, sind grau unterlegt.

Im unteren Teil sind verschiedene Fraktionen der Präparation elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt.

M, 1 - 12 zeigen die Ergebnisse von SDS-PAGE; 13 - 14 die von Harnstoff-PAGE. "c" bedeutet, daß zur Elektrophoreseprobe Ca⁺⁺ (5mM Endkonzentration) gegeben wurde, "e", daß zur Elektrophoreseprobe EGTA (10mM Endkonzentration) gegeben wurde. Dadurch wird den Proteinen Ca⁺⁺ entzogen. Eine Ca⁺⁺-abhängige Mobilität ist allerdings nicht zu erkennen.In den Fraktionen 53 und 61 der Gelfiltration ist zwar eindeutig Material, daß UV-Licht der Wellenlänge 280nm absorbiert, nach der Elektrophorese sind dies aber keine Proteine.

[M] Molekulargewichtsmarker; [1] Rohextrakt; [2] pH-5,5-Überstand; [3] 45%-Ammoniumsulfat-Überstand; [4] 90%-Ammoniumsulfat-Pellet; [5] 60°CÜberstand; [6] vereinigte Gelfiltrationsfraktionen 25-27; [7] vereinigte Gelfiltrationsfraktionen 28-30; [8] vereinigte Gelfiltrationsfraktionen 31-34; [9] vereinigte Gelfiltrationsfraktionen 35-37; [10] vereinigte Gelfiltrationsfraktionen 38-49; [11] Gelfiltrationsfraktion 53; [12] Gelfiltrationsfraktion 61; [13] vereinigte Gelfiltrationsfraktionen 38-49.

3.1.4. Suche nach potentiellen SCBP-Genen in der *C. elegans*-Genbibliothek

Da das Genom von *Caenorhabditis elegans* vollständig sequenziert worden ist, wurde versucht, mögliche SCBPs im Genom dieses Tieres zu finden. Im ersten Schritt wurden alle Aminosäuresequenzen gesucht, die Ähnlichkeit mit denen des SCBP₂ und SCBP₃ des Regenwurms haben (s.u.). Dabei wurden etwa 100 verschiedene Sequenzen gefunden. Zuerst wurden alle Sequenzen, die weniger als 120 oder mehr als 400 Aminosäuren hatten, eliminiert, weil sie aufgrund ihrer Größe kein SCBP sein können.

Sequenz	Beschreibung	Anzahl	Anzahl	Abstände
-		AS	EF-	1
			Hände	
F55C10.1	CE23771 calcineurin B like status:Predicted	369	4	5 - 8 - 12
K03A1.4	CE04712 calmodulin calcium-binding sites sta	264	4	7-9-9
C18E9.1	CE05293 calmodulin status:Predicted	258	4	14-6-5
F43C9.2	CE04565 EF hand calcium binding protein (ST:LOUI	237	4	7-9-7
Y39B6A.38	CE29875 status:Predicted	234	2-3	
B0563.7	CE02445 Calmodulin status:Predicted	229	4	7 - 4-9
K03E6.3	CE19523 calcium binding protein status:Predi	220	4	8 - 28 - 20
C13C12.1	CE08132 locus:cal-1 calmodulin like protein s	218	4	7-8-7
E02A10.3	CE27751	202	4	5 - 11 - 7
C44C1	CE24845 EF-hand calcium binding protein	191	3	7 -11
F10G8.5	CE09340 NCS-2 neuronal calcium sensor protein	190	3	7 - 18
T07G12.1	CE13387 calmodulin status:Predicted	182	4	7-6-7
M02B7.6	CE12330 calmodulin-like protein status:Predi	164	4	5-8-7
F54C1.7	CE11052 calcium binding protein	161	4	7 - 11 -4
F43C9.2	CE29319 EF-hand calcium binding protein stat	159	4	7-7-7
M04F3.4	CE12418 calcium binding protein status:Predi	157	4	8-1-7
C24H10.5	CE29674	156	4	7 - 3 -7
C24H10.5	CE04070 locus:uvt-2 EF hand calcium binding pro	150	4	7-4-6
T21H3.3	CE13902 calmodulin status:Predicted	149	4	7-7-7
F12A10.5	CE01908 Calmodulin status:Predicted	145	4	7-8-2

 Tabelle 2: EF-Hand-Proteine von Caenorhabditis elegans

In der Tabelle sind die Proteine aufgelistet, die 3-4 EF-Hände haben sowie die Abstände zwischen ihnen. Die Bezeichnungen der Sequenzen und die Beschreibung wurden wie von der Datenbank geliefert übernommen.

Die verbliebenen Aminosäuresequenzen wurden nach folgenden Kriterien durchsucht, ob sie mögliche SCBP-Kandidaten sind:

1. Es sollten 3 - 4 EF-Hände zu erkennen sein. Eigentlich haben SCBPs 4 EF-

Hände, aber eine davon hat in der Regel die Fähigkeit, Ca⁺⁺ zu binden, verloren.

Diese Domäne ist dann oft so stark abgewandelt, daß sie nicht mehr als ehemali-

ge EF-Hand zu identifizieren ist

 Die EF-Hände sollen die für SCBP charakteristischen Abstände von (EF1)-x₂₁₋₂₄-(EF2)-x₁₂₋₁₆-(EF3)-x₄₋₇-(EF4) haben. Für die Abstände wurden alle Aminosäuren gezählt, die nicht in der "kanonischen" EF-Hand liegen.
 Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Es wurde also kein Protein gefunden, das den Anforderungen an ein SCBP genügt. Offensichtlich benötigen zumindest die hier untersuchten Nematoden kein solches Protein für die Aktivität ihrer Muskulatur.

3.2. Nachweis von SCBP in den Fliegen *Drosophila melanogaster* und *Calliphora erythrocephala*

In einem ersten Schritt wurde versucht, ein Protein mit den Eigenschaften von SCBP aus ganzen Tieren zu isolieren. Zur Lokalisation wurden einzelne Tagmata und Organe auf ihren Gehalt an diesem Protein untersucht.

3.2.1. Isolierung von SCBP aus *Drosophila melanogaster*

Für die Präparation von SCBP aus Drosophila wurden ganze Fliegen nach der Standardpräparation aufgearbeitet. In dem 60°C-Überstand ist unter anderem ein Protein mit der relativen Molekularmasse 24k angereichert (Abb.17, Bahn 7). Wie später noch gezeigt werden wird, handelt es sich bei diesem Protein zumindest um eines der SCBPs aus Drosophila. Für viele weitere Versuche z.B. für die Demonstration der Ca⁺⁺-Bindung durch Harnstoff-PAGE ist diese Fraktion schon ausreichend rein.

Die Hauptbestandteile des kontraktilen Apparates der Muskeln, die Proteine Aktin und Myosin, fallen im Homogenat durch starke Banden mit den relativen Molekularmassen 40k bzw. 205k auf (Abb.17, Bahn 1). Da sie bei niedriger Ionenstärke nicht löslich sind, sind sie schon im Rohextrakt größtenteils entfernt (Abb.17, Bahn 2). In dem 40%-Ammoniumsulfat-Überstand (Abb.17, Bahn 6) sind weder Aktin noch Myosin anhand von Proteinbanden entsprechender relativer Molekularmasse nachweisbar.



Abb.17: SDS-PAGE verschiedener Schritte einer SCBP-Reinigung aus ganzen Droso-

phila

[M] Molekularmassenstandards, [1] Homogenat, [2] Rohextrakt, [3] pH 5,5-Überstand, [4] pH 5,5-Pellet, [5] 40% Ammoniumsulfat-Pellet, [6] 40% Ammoniumsulfat-Überstand, [7] 60°CÜberstand, [8] 60°CPellet, [9] vereinigte Fraktionen der Gelfiltration, markierter Bereich in Abb.18; [10] Durchfluß der Ionenaustauscherchromatographie (Fraktion "D" in Abb.19); [11] erster Peak der Ionenaustauscherchromatographie; [12] zweiter Peak der Ionenaustauscherchromatographie; [13] ungebundenens Material der hydrophoben Interaktionschromatographie

Der Pfeil markiert die Position des 24k-Proteins, die Zahlen geben die relative Molekularmasse der Standardproteine an, "My" bezeichnet die Position der schweren Myosinkette und "Ak" die des Aktins

Durch aufeinanderfolgende Gelfiltration (Abb. 18) und Ionenaustauscherchromatographie (Abb.19) wurde das 24k-Protein weiter aufgereinigt. Bei der Ionenaustauscherchromatographie mit DEAE-Cellulose bindet das 24k-

Protein bei niedrieger Ionenstärke an das Säulenmaterial. Es eluiert in zwei Fraktionen bei NaCI-Konzentrationen von 69mM NaCI bzw. 77mM NaCI



Abb.18:Elutionsprofil der Gelfiltration hitzestabiler Proteine

Ein 60°C/80% Pellet (47mg Gesamtprotein) wurde in Gelfiltrationspuffer 1 auf einer 1,6 x 85cm Säule über AcA54 mit einer Flußrate von 0,25ml*min⁻¹ aufgetrennt. Der Bereich, in dem das 24k-Protein eluiert, ist durch die Schattierung markiert (AcA-Fraktionen 41 - 45).



Abb. 19: Elutionsprofil einer Ionenaustauscherchromatographie

Die SCBP-haltigen Fraktionen der Gelfiltration (siehe Abb.18, insgesamt 5,82mg Protein) wurden in einer Ionenaustauscherchromatographie über DEAE-Cellulose aufgetrennt. Die Säulendimensionen waren 1,6x6cm, die Flußgeschwindigkeit war 0,17ml*min⁻¹. Die Probe wurde in IAC-Puffer auf die Säule aufgetragen und dann mit einem linearen NaCI-Gradienten von 0 bis 200mM NaCI in IAC-Puffer (200ml) eluiert. "D" markiert den ungebundenen "Durchfluß", der Peak 1 eluiert mit 69mM NaCI, Peak 2 mit 77mM NaCI.

(Abb. 19). Elektrophoretisch unterscheiden sich beide Fraktionen aber nicht, sie enthalten nahezu rein das 24k-Protein (Abb.17, Bahn 11 & 12). Aus 35g Fliegen wurden etwa 5mg des 24k-Proteins extrahiert, das entspricht einer Konzentration von 130mg dieses Proteins in 1kg Fliegen.

3.2.2. Nachweis der Ca⁺⁺-Bindung des 24k-Proteins durch Bindung von ⁴⁵Ca⁺⁺ und Demonstration einer Ca⁺⁺-abhängigen elektrophoretischen Mobilität



Abb. 20: Nachweis der Ca⁺⁺-Bindung des 24k-Proteins

[1] - [8] Elektrophorese in Harnstoff-Gelen: Das 24k-Protein (nach Gelchromatographie) wurde zunächst mit 1mM CaCl₂ inkubiert und dann mit verschiedenen Konzentrationen EGTA inkubiert. Unter den gezeigten Gelbahnen ist die EGTA-Endkonzentration in mM notiert. Bahnen 1-4 sind Coomassie Brilliant Blau gefärbte Gele. Aus Bahn 3 ist ein Teil des EGTAs in die eigentlich EGTA-freie Probe in Bahn 4 diffundiert und hat dabei die elektrophoretische Mobilität der Proteine bis etwa zur Mitte der Bahn geändert. Sowohl Ca⁺⁺-beladen [4] als auch Ca⁺⁺-frei [3] sind je zwei Banden zu sehen, die eine Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität haben. Die Bahnen [5] und [6] zeigen Ponceau S-gefärbte Nitrocellulosestreifen, auf die das 24k-Protein nach einer Auftrennung in einem Harnstoffgel mit und ohne EGTA transferiert wurde, die Bahnen [7] und [8] zeigen das Ergebnis der Autoradiographie, nachdem die Proben aus [5] und [6] mit ⁴⁵Ca⁺⁺ inkubiert wurden. Ca1 und Ca2 bezeichnen Proteinbanden, die Ca⁺⁺ gebunden haben, EG1 und EG2 die Ca⁺⁺⁻freien Formen der Proteine. Die Unterteilung in je zwei Banden ist nicht in allen Bahnen gut zu sehen, da Elektrophorese in Harnstoffgelen nicht so scharf trennt, wie die SDS-PAGE.

[M] - [EG2] SDS-PAGE: Die Proteine mit Ca⁺⁺-abhängiger elektrophoretischer Mobilität wurden aus den Gelen der Harnstoffelektrophorese ausgeschnitten und in einer SDS-PAGE erneut aufgetrennt. Sie comigrieren mit dem 24k-Protein der Gelfiltrationfraktion.

[M] Molekularmassemarker; [S] Gelfiltrationsfraktion mit dem 24k-Protein; [Ca1], [Ca2], [EG1], [EG2] die entsprechend aus dem Harnstoffgel ausgeschnittenen Proteinbanden. Die Zahlen geben die relative Molekularmasse der Molekularmassenstandards an, der Pfeil markiert die Position des 24k-Proteins.

Die Fähigkeit eines Proteins, Ca⁺⁺ zu binden, kann qualitativ durch die Bindung von ⁴⁵Ca⁺⁺ (Maruyama et al. 1984) oder durch eine Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität (Cox und Stein 1981, Garrigos et al. 1991) gezeigt werden. Dieser Effekt ist zwar auch in der SDS-PAGE sichtbar, bei der Elektrophorese in Harnstofgelen aber wesentlich deutlicher. Wurde das 24k-Protein auf einem Harnstoffgel mit und ohne Ca⁺⁺ aufgetrennt, so waren zwei Banden zu sehen, die eine Ca⁺⁺-abhängige e-lektrophoretische Mobilität hatten. Diese Banden zeigten auch in einem Overlay-Versuch eine Bindung von ⁴⁵Ca⁺⁺. Wurden die Proteine mit Ca⁺⁺-abhängiger e-lektrophoretischer Mobilität aus dem Harnstoffgel ausgeschnitten und in eine SDS-PAGE erneut aufgetrennt, comigrierten sie mit dem beschriebenen 24k-Protein (Abb.20).

3.2.3. Unterschiede des 24k-Protein zu Calmodulin

Die relative Molekularmasse des weit verbreiteten Ca⁺⁺-bindenden Proteins Calmodulin ist zwar mit knapp 17000 deutlich kleiner als die des 24k-Proteins, kann sich aber Ca⁺⁺-frei in der SDS-PAGE wie ein Protein mit der relativen Molekularmasse von 21000 verhalten (Burgess et al. 1980). Um sicherzustellen, daß das 24k-Protein nicht ein Calmodulin mit besonders geringer elektrophoretischer Mobilität ist, wurden die Bindungseigenschaften an Phenylsepharose untersucht.

Calmodulin führt bei Ca⁺⁺-Bindung eine Konformationsänderung durch, bei der hydrophobe Teile des Proteins exponiert werden. Aus diesem Grund bindet es in Gegenwart von Ca⁺⁺ an eine hydrophobe Matrix wie zum Beispiel Phenylsepharose (Gopalakrishna und Anderson 1982; Vogel et al. 1983). SCBPs hingegen binden unter diesen Bedingungen nicht an dieses Säulenmaterial.

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie band das 24k-Protein in Gegenwart von Ca⁺⁺ nicht an die Phenylsepharose (Abb.17 Bahn 13 und Abb. 21).

Mit den verschiedenen Elutionspuffern (NaCI-Puffer, EGTA-Puffer, Wasser und Harnstoff-Lösung) eluieren einige Proteine in sehr geringer Konzentration. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß das 24k-Protein mit einer geringen Menge von Calmodulin kontaminiert ist.





3.2.4. Lokalisation des SCBP

SCBPs kommen in hoher Konzentration nur in der Muskulatur vor (Cox 1996). Eine Lokalisation des 24k-Proteins in der Muskulatur wäre ein weiterer Hinweis darauf, daß es zu den SCBPs zu zählen ist. Bisher wurden nur ganze Fliegen zur Präparation eingesetzt, so daß das gefundene Protein zunächst keinem Gewebe zugeordnet werden konnte. Deshalb wurden die Rohextrakte bzw. 60°CÜberstände von Kopf, Thorax und Abdomen von Drosophila separat auf ihren Gehalt an 24k-Protein untersucht, um es zunächst grob lokalisieren zu können. Dabei zeigte sich, daß das 24k-Protein in nennenswerten Konzentrationen nur im Thorax von Drosophila zu finden ist. Dort ist es sogar eines der Hauptproteine, das schon im Homogenat eindeutig zu sehen ist (Abb. 22). Da im Thorax die Masse der Muskeln der Fliege lokalisiert ist, legt dies nahe, daß das 24k-Protein ein Muskelprotein ist.

Aus zwei verschiedenen Gründen ist es dennoch notwendig, das Ursprungsgewebe des 24k-Proteins noch genauer zu lokalisieren: Zum einen ist im Thorax von Drosophila ein relativ großes Ganglion, so daß nicht auszuschließen ist, daß das Protein aus Nervengewebe stammt, zum anderen enthält der Thorax wenigsten zwei verschiedene Muskeltypen, die asynchronen Flugmuskeln und die synchronen Steuerund Beinmuskeln.



Abb. 22: Lokalisation des Gewebes von Drosophila, aus dem das 24k-Protein stammt

[1]-[7]: SDS-PAGE von [1] Kopf-Rohextrakt; [2] Abdomen -Rohextrakt; [3] gereinigtes 24k-Protein aus Drosophila; [4] Thorax-60°CÜberstand; [5] Thorax-Rohextrakt; [6] Thorax-Homogenat; [7] Drosophila-Aktomyosin

[8]-[13]: Elektrophoresen in Harnstoffgelen von [8,9] Kopf-Rohextrakt; [10,11] Thorax-Rohextrakt; [12,13] Abdomen-Rohextrakt; die Proben 8, 10, 12 enthalten 1mM Ca⁺⁺, die Proben 9, 11, 13 enthalten 10mM EGTA.

Die Zahlen an den Pfeilspitzen geben die Positionen der Molekularmassestandards an, der Pfeil die Position des 24k-Proteins. Mit "MHC" ist die schwere Myosinkette markiert, mit "A" Aktin, "L" steht für die Isoformen der leichten Myosinketten: t Isoformen aus dem synchronen Muskel, f Isoformen aus dem asynchronen Muskel, nach Takano-Ohmura et al. (1983). Das 24k-Protein ist in hoher Konzentration nur im Thorax zu finden, ebenfalls nur dort ist ein Protein, das Ca⁺⁺-abhängig eine unterschiedliche Mobilität in Harnstoffgelen hat.

Da es nicht einfach ist, aus Drosophila-Thoraces einzelne synchrone Muskeln zu präparieren, wurde untersucht, ob in *Calliphora erythrocephala* ähnliche Verhältnisse vorliegen, wie in Drosophila. Aus diesem größeren Organismus ist es wesentlich leichter, etwas größere Mengen an Muskeln zu präparieren, die weitergehende Untersuchungen ermöglichen.

Elektrophoretische Untersuchungen verschiedener Extrakte aus Calliphora zeigten ähnliche Ergebnisse wie bei Drosophila (Abb. 23): Im Thorax und dem synchronen Tergotrochantermuskel ist in hoher Konzentration ein Protein vorhanden, das in der SDS-PAGE mit dem 24k-Protein aus Drosophila comigriert und in Harnstoffgelen eine eindeutig Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität hat.

Daraufhin wurden sowohl von Calliphora als auch von Drosophila Thoraces, Tergotrochantermuskeln, Thoracalganglien und Flugmuskulatur präpariert. Die Calliphora-Proben wurden nach der beschriebenen Prozedur bis zum 60°CÜberstand aufgearbeitet, von den Drosophila-Proben wurden lediglich Rohextrakte hergestellt. Die elektrophoretische Untersuchung dieser Extrakte zeigte, daß das 24k-Protein sowohl bei Drosophila als auch bei Calliphora nur in Extrakten vorkommt, die direkt aus synchronen Muskeln gemacht wurden oder



Abb. 23: Ein 24k-Protein in Calliphora erythrocephala

[1 - 6] SDS-Page verschiedener Proben, es handelt sich dabei, wenn nichts anderes vermerkt, um Proben aus Calliphora: [1] Thorax-Rohextrakt; [2] Tergotrochantermuskel-Homogenat; [3] Steuermuskel-Rohextrakt; [4] gereinigtes Drosophila 24k-Protein; [5] obere und [6] untere Bande der Proteine mit Ca⁺⁺-abhängiger elektrophoretischer Mobilität, aus Harnstoffgel (siehe Bahn 7 – 8) ausgeschnitten und erneut elektrophoretisch aufgetrennt

[7 - 10] Harnstoff-Elektrophorese: [7,8] Tergotrochantermuskel-Homogenat; [9,10] Thorax-Rohextrakt; [7,9] mit 1mM Ca⁺⁺; [8,10] mit 10mM EGTA

Die Zahlen und Pfeilspitzen geben die Positionen der Standards für die relative Molukularmasse an, der Pfeil die Position des 24k-Proteins.



Abb. 24:Elektrophoretische Auftrennung der Proteinextrakte aus verschiedenen Organen des Thorax

Das 24k-Protein ist eindeutig im Thorax von Fliegen nachweisbar, in den Organen des Thorax wiederum ist es nur in der synchronen Muskulatur zu finden.
[1] Homogenat; [2] Rohextrakt; [3] 60°C-Überstand des entsprechenden Organs bzw. Organismus; [*] Rohextrakt aus *Drosophila* Beinmuskulatur
Die Zahlen und Pfeilspitzen geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an, der Pfeil die Position des 24k-Proteins.

aus Körperteilen, die synchrone Muskeln enthalten. Dieses Protein erwies sich

in den Extrakten aus Calliphora als säure- und hitzestabil (Abb. 24).

Die Ca⁺⁺-Bindung dieses Proteins konnte durch eine Ca⁺⁺- abhängige elektrophoretische Mobilität in der Harnstoffelektrophorese gezeigt werden (Abb. 23, Bahn 5 – 10).

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, daß das aus Drosophila extrahierte 24k-Protein viele Eigenschaften mit den SCBPs aus anderen Organismen teilt: Es bindet Ca⁺⁺, ist in Gegenwart von Ca⁺⁺ bei geringer Ionenstärke aus Gewebe extrahierbar, säureund hitzestabil, hat eine höhere relative Molekularmasse als Calmodulin und bindet nicht wie dieses unter entsprechenden Bedingungen an Phenylsepharose. Es ist eindeutig in der synchronen Muskulatur von Fliegen lokalisiert und stellt dort eines der Hauptproteine. Aus diesen Gründen kann es als SCBP angesehen werden. Das Auftreten von zwei Banden bei der Elektrophorese in Harnstoffgelen und das Eluieren in zwei Fraktionen bei der Ionenaustauscherchromatographie legen nahe, daß es zwei Formen des Proteins gibt.

3.2.5. Immunologische Reaktionen von SCBP aus *Drosophila melanogaster*

Untersucht wurden die Reaktionen des Drosophila-SCBPs mit Antikörpern, die gegen *Lumbricus terrestris* - SCBP und gegen DCABP23 gerichtet waren. Im Regenwurm wurden drei SCBPs gefunden, gegen zwei von ihnen - SCBP₂ und SCBP₃ wurden polyklonale Antikörper hergestellt (Huch 1991). DCABP23 ist ein aus *Drosophila melanogaster* isoliertes Protein, das nahezu identische Eigenschaften hat wie das hier gezeigte Drosophila-SCBP (Kelly 1990).

Ein Antikörper, der gegen das SCBP₂ des Regenwurms gerichtet ist, reagiert mit dem SCBP aus Fliegen nicht. Der anti-DCABP23-Antikörper reagiert sehr stark mit den SCBPs sowohl von Drosophila als auch von Calliphora, aber nicht mit SCBP aus dem Regenwurm (Abb. 25).

Mit dem anti-DCABP23-Antikörper ließ sich noch einmal zeigen, daß das SCBP nur in der synchronen Muskulatur der Fliegen vorkommt. Die schwache Reaktion mit dem Antikörper in der Probe der Drosophila-Flugmuskulatur ist wahrscheinlich auf eine Kontamination mit einem synchronen Muskel zurückzuführen. Der Tergotrochanter Muskel liegt z.B. in engem Kontakt mit der Flugmuskulatur. Bei Calliphora, bei der die Präparationen sehr viel einfacher durchzuführen sind, ist das Ergebnis dagegen eindeutig.



Abb. 25: Immunologische Reaktionen

Verschiedene Organextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine anschließend auf Nitrocellulose transferiert und mit verschiedenen Antikörpern zur Reaktion gebracht. [1 - 10] Reaktionen mit dem anti-DCABP23-Antikörper, [11, 12] Reaktionen mit dem anti-SCBP₂-Antikörper.

[1] Drosophila-Kopf-Rohextrakt; [2] Drosophila-Thorax-Rohextrakt; [3] Drosophila-Thorax-60°C-Überstand; [4] Drosophila-Abdomen-Rohextrakt; [5] Drosophila-Tergotrochentermuskel-Rohextrakt; [6] Drosophila-Flugmuskulatur-Rohextrakt; [7] Calliphora-Tergotrochantermuskel-Rohextrakt; [8] Calliphora-Flugmuskulatur-Rohextrakt; [9] Calliphora-Thoracalganglion-Rohextrakt; [10] Regenwurm-SCBP; [11] Drosophila-SCBP; [12] Regenwurm-SCBP; Der obere Pfeil markiert die Position der Fliegen-SCBP, der untere Pfeil die des Regenwurm-SCBP.

3.3. Die SCBPs des Regenwurms

8 0,15

0,10

0,05

0,00

0

2

200

Aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms Lumbricus terrestris können nach der Standardpräparation drei Isoformen des SCBP isoliert werden. Diese



400

min



600

Hitzestabile Proteine (60°C/80%Pellet) einer Präparation von Regenwurm-SCBP wurden in einer Gelfiltration aufgetrennt. Die Maße der Gelfiltrationssäule betrugen \emptyset x h=3cmx90cm, die Flußrate 0,5ml/min. Die Fraktionen, in denen SCBP eluiert, sind grau unterlegt. Diese Fraktionen wurden in einer Ionenaustauscherchromatographie weiter aufgetrennt. Die Säulendimensionen waren 1,8x9cm, die Flußgeschwindigkeit war 0,25ml*min⁻¹. Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit 32ml IAC-Puffer gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 300mM NaCl in IAC-Puffer (160ml) eluiert. SCBP eluiert in drei Fraktionen(1 - 3), die auch hier grau unterlegt sind.

150

100

50

0

800
wurden von Dr. Ralf Huch isoliert und biochemisch charakterisiert. Die drei Isoformen wurden nach ihrem Elutionsverhalten bei der Ionenaustauscherchromatographie durchnummeriert. SCBP₁ eluiert dabei als erstes und SCBP₃ als letztes. Gegen zwei der Isoformen - dem SCBP₂ und dem SCBP₃ - wurden polyklonale Antikörper produziert (Huch et al. 1988; Huch 1991). Das Ergebnis einer Präparation der Regenwurm SCBPs wird in Abb. 26 - 27 gezeigt:



Abb.27: Elektrophoretische Auftrennung verschiedener Fraktionen der SCBP-Präparation aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms
Es werden die Ergebnisse der Elektrophorese verschiedener Fraktionen der Präparation von SCBP aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms gezeigt.
[M] Molekularmassenmarker; [1] Rohextrakt; [2] pH 5,5-Überstand; [3] 40% Überstand;
[4] 80%-Pellet; [5] 60°CÜberstand; [6] 100000g-Überstand; [7] vereinigte Fraktionen der Gelfiltration, markierter Bereich in Abb.26; [8] Peak 1 der Ionenaustauscherchromatographie (Fraktion "1" in Abb.26); [9] Peak 2 der Ionenaustauscherchromatogra phie (Fraktion "2" in Abb.26); [10] Peak 3 der Ionenaustauscherchromatographie – (Fraktion "3" in Abb.26). Die Isoformen des Regenwurm SCBPs comigrieren etwa mit dem 20100 Molekularmassenmarker.

Aus der Abbildung 27 und 28 geht hervor, daß es hier nicht gelungen ist, alle Isoformen rein zu präparieren. Aber aus der Präparation geht eindeutig hervor, daß es drei ionenchromatographisch trennbare SCBP-Isoformen gibt, die alle eine Ca⁺⁺- abhängige elektrophoretische Mobilität haben. Es ist dabei offensichtlich, daß zumindest hier das SCBP₁ in deutlich geringerer Konzentration vorliegt als die beiden anderen Isoformen.



Abb.28: Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität der Isoformen des SCBPs des Regenwurms

Die Proteine der Fraktionen 1 - 3 der Ionenaustauscherchromatographie wurden in Harnstoffgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die linke Hälfte zeigt mit Comassie Brilliant Blau gefärbte Gele, die rechte Hälfte das Ergebnis eines Transfers dieser Proteine auf Nitrocellulose und ihren Nachweis mit dem anti-SCBP₃-Antikörpers. Die mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gele zeigen deutlich die Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität des SCBP₂ und SCBP₃. Für die Reaktion mit dem Antikörpern wurde das Gel aber mit diesen Isoformen überladen, so daß das Ergebnis eigentlich nicht zufrieden stellend ist. Aber für das SCBP₁ zeigt der Vergleich des mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gels mit der Antikörperreaktion, daß das SCBP₁ in der ausgewählten Fraktion nur in geringer Konzentration vorhanden ist und die Masse der Proteins von einem anderen Protein gestellt wird.

Die Ziffern 1 - 3 stehen für die Fraktionen 1 -3 der Ionenaustauscherchromatographie (Abb.26), "C" bedeutet, daß Ca⁺⁺ (5mM Endkonzentration) in der Probe war, "E" daß EGTA (10mM Endkonzentration) in der Probe war. "ak" bezeichnet die Proben, in denen SCBP mit dem SCBP₃-Antikörper nachgewiesen wurde.

Ergebnisse

3.4. Suche nach den cDNA-Sequenzen der SCBPs des Regenwurms

Dr.Thomas Giebing erstellte eine cDNA-Bibliothek des Hautmuskelschlauches des Regenwurms (Giebing 1994). Diese Genbibliothek wurde mit den SCBP-Antikörpern nach cDNA-Klonen durchsucht.

3.4.1. Die Klone 4.1, 8.1 und 15.1

Bevor die vorhandenen anti-SCBP-Antikörper für das Durchsuchen der Genbibliothek verwendet werden konnten, mußten kontaminierende, gegen *E.coli*-Proteine gerichtete Antikörper wie in 2.5.1. beschrieben entfernt werden. Ohne diese Reinigung wurden alle Phagen-Plaques markiert und das Auffinden von SCBP-Klonen damit unmöglich.

Ein weiteres Problem war, daß die Antikörper "kreuzreagierten", d.h., daß der anti-SCBP₂-Antiköper auch mit dem SCBP₃ reagiert, ähnliches gilt für den anti-SCBP₃-Antikörper (siehe Abb. 28). Daher läßt sich aus der Tatsache, daß ein bestimmter Klon mit einem bestimmten Antikörper gefunden wurde, nicht schließen, daß es sich bei diesem Klon um die zum entsprechenden Serum gehörige SCBP-Isoform handelt. Die gefundenen Klone wurden deshalb zunächst einfach mit Zahlen bezeichnet, wobei die erste Zahl für die Nummer der Agarplatte steht, die auf SCBP-Klone durchsucht wurde, die Ziffer nach dem Punkt gibt an, ob es sich um den willkürlich als ersten oder zweiten usw. ausgewählten positiven Klon handelt.

Nach dem Durchsuchen der Genbibliothek wurden für die weiteren Untersuchungen die Klone 4.1, 8.1 und 15.1 verwendet. Die Klone 4.1 und 15.1 wurden mit Hilfe der SCBP₂-Antikörper aus der cDNA-Genbibliothek gewonnen, der Klon 8.1 mit einer vom Klon 4.1 abgeleiteten DNA-Sonde.



Abb.29: Größe der Inserts der Klone 4.1, 8.1 und 15.1

Die DNA der Klone 4.1, 8.1 und 15.1 wurde extrahiert und die Inserts aus dem Vektor herausgeschnitten. Die Fragmente wurden in 1% Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

[M] DNA-Längenstandard; [1] Plasmid-DNA Klon 4.1 mit EcoRI und Xho geschnitten; [2] Plasmid-DNA Klon 8.1 mit EcoRI und XhoI geschnitten; [3] Plasmid-DNA Klon 15.1 mit BamH1 und Kpn I geschnitten. Auf der linken Seite sind die Größen der einzelnen Banden des DNA-Längenstandards in Basenpaaren angegeben, die Pfeile markieren die Positionen der Inserts bzw. Insertfragmente. Über den Inserts sind die Reste des Vektors zu sehen.

Bei der Konstruktion der cDNA-Genbank wurden die cDNA-Stücke mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und Xho I in die multiple Klonierungsstelle des Phagemids pBluescript II SK eingesetzt. Aus unbekannten Gründen ließen sich die Inserts trotzdem nicht in jedem Fall mit diesem Paar Restriktionsenzyme aus dem Vektor herausschneiden. Aus dem Klon 15.1 wurde deshalb das Insert mit dem ebenfalls geeigneten Paar Bam HI und Kpn I herausgeschnitten. Die Inserts der Klone 4.1 und 8.1 enthalten offensichtlich intern eine Schnittstelle für eines der verwendeten Restriktionsenzyme, so daß diese beim Herausschneiden ebenfalls zerschnitten werden. Die entstehenden Insertfragmente sind im Falle des Klons 8.1 etwa 700bp und 500bp lang, was eine Gesamtlänge des Inserts von etwa 1200bp ergibt. Das Insert des Klons 4.1 ist etwas kürzer. Der Klon 4.1 war der erste Klon, der ein SCBP-spezifisches Insert hatte. Bei den anschließenden Untersuchungen seiner Sequenz zeigte sich, daß diesem Klon einige Basen am 5'-Ende der codierenden Sequenz fehlten. Deshalb wurde von diesem Klon eine Didoxygeninmarkierte DNA-Sonde gemacht, mit deren Hilfe der vollständige Klon 8.1 gefunden wurde.

Das Insert des Klones 15.1 ist etwa 900bp lang.

3.4.2. Die Sequenz der Klone 4.1 und 8.1

Die Klone 4.1 und 8.1 wurden sowohl mit dem Thermocycle-Sequencer Verfahren als auch bei einem kommerziellen Sequenzierdienst sequenziert. Aus diesen Ergebnissen konnte die cDNA dieser Isoform des SCBPs rekonstruiert werden. Dabei sind die einzelnen Bereiche aber unterschiedlich stark abgesichert: Der für Protein codierende Teil, also der Teil der cDNA zwischen dem ersten Start- und dem ersten im Leseraster befindlichen Stop-Codon, kann dabei als gesichert betrachtet werden: Dieser Sequenzteil wurde mehrfach mit dem ihn komplett enthaltenen Klon 8.1 sequenziert. Dem Klon 4.1 fehlen lediglich die ersten drei Nucleotide dieses Teils, der restliche Teil wurde ebenfalls mehrfach sequenziert. Schließlich wurde der codierende Teil mit den entsprechenden Exons der genomischen Formen der entsprechenden SCBPs, die ebenfalls sequenziert wurden und die im folgenden erst besprochen werden, verglichen. Es ist also davon auszugehen, daß die hier gezeigte Sequenz des codierenden Teils richtig dargestellt ist.

Der 3'- und der 5'-nicht-codierende Teil sind dagegen nicht so oft sequenziert worden, so daß hier einzelne Fehler vorhanden sein können.

1	GGCACGAGCG	GAGTCGACTG	ACTTGACACT	CCACTGTCGT	TAGTTGAGCC	TTTCCTTGAG
61	CAGGTCACCG	TGTCGTCGTC	GTTCAGTCTC	TTGTTTTTCG	TCGTCGTCTA	GATAAATCGT
121	AGAATA <mark>ATGG</mark>	CTGATGCGTT	CATTGAAAGG	AAGCTGAAGA	CCTACTTCAG	CCGTATCGAT
181	TTCGATAAGG	ACGGAGCCAT	CACGAGAAGC	GACTTCGAGG	GATTGGGAAC	TCGGTTCGTC
241	GAGAGCGAGA	AGCTGGATGC	GGCCAAGGGA	GCCGATCTGA	AGGCCAAGCT	CGTCCAGGTC
301	TGGGAGCAAT	ACCTGAAGGG	AGTCGTTTCC	GACGGAACCA	GACTGACGCA	GGCTGTCTTT
361	GTCGAAGCCG	TCAAGAAGCA	GCTGGGCGAT	CCAAATTTCA	AGAAGGTGCT	CGCCGGTCCC
421	CTGCCGCTCT	TCTTCAGCGC	CGTCGACGGC	AACGGTGACG	GTCTGATCCA	GAAGGACGAG
481	TTCCAGCTCT	TCTTCAAACT	CCTTGGCATC	CCGGAATCTG	CAGAGAAATC	CTTCGAGGCC
541	ATCGACACGA	ACAAGGACGG	CGACATCAGC	AAGGAG <u>GAAT</u>	<u>TC</u> GTGATCGC	CGGAACCGAC
601	TTCTTCACAT	CGACGGATGA	GTCCAGCCCG	AGCAAATACT	TCTGGGGCCC	GCTCGTCTGA
661	GAAGGGACGA	CTACGAACGG	CCTACCACAA	CAACCGCGAG	CACAGCGCGC	GTGTACTTGC
721	ATGCCAGACA	TCATCATACC	AGTAATATTT	GAATAATTGA	TTGATAATTA	TATGATAATT
781	AATTCATTGG	GTGGCGTGAT	TCCCCCATGG	TGTTGTGACC	TGGACGATAA	TCCGTATTGT
841	TCGTTGCCAT	TTCATCATCA	CCACCACCCA	ACTCGCCCAG	TCTGACTCCT	CCGCCAACGC
901	CGCGGTCATC	AACACCCGGA	CCAAGCCACA	CCGGAGCATC	ATAACATTCT	CAACACTATA
961	TTATATCGTT	GTTTTATACT	TTCTTATCTA	TAGCGAAGAA	TTATTGCGTG	CGGATCTTGA
1021	CGAAGACAGC	CGTCAAAACC	TTAAGCTGAA	GCGATGGGAA	GTGCATGGTC	GGACTTGCTG
1081	TGTAAGATAC	GGAAGGCTGG	TGGAGATGGC	GTTGGACCGA	ATTGTTTGCT	ATCTTTAAAC
1141	CCATTCGTAG	CTGGTGAAGG	GCTTGGAGAA	TTGTTCACGT	GTTCCAGGTG	TTTTGGTCTT
1201	CGGCGAAGGG	CCGCCGCATG	СААААТААА	CCGTTTAAAA	СТААААААА	ААААААААА
1261	AAAA					

Abb.30: Die Sequenz der Klone 4.1 und 8.1

Die cDNA-Sequenz dieser SCBP-Isoform wurde aus verschiedenen Sequenzierungen der Klone 4.1 und 8.1 zusammengesetzt. Der für Protein codierende Teil ist rot dargestellt, die schon bei der Längenbestimmung gefundene EcoR I-Schnittstelle ist doppelt unterstrichen. Sie teilt das insgesamt 1264 Basenpaare lange Insert in ein 577 und ein 687 Basenpaare langes Fragment. Das mögliche Polyadenylierungssignal ist blau hervorgehoben.

Die cDNA dieser SCBP-Isoform ist wie gezeigt 1264 Basenpaare lang, was gut mit der Längenbestimmung durch Auftrennung der Insertfragmente in der Agarose-Elektrophorese übereinstimmt, auch die Aufteilung in ein 577 und 687 Basenpaare langes Fragment durch die interne EcoRI-Schnittstelle entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit den elektrophoretischen Ergebnissen.

In der 3'-nichtcodierenden Region der cDNA können das Polyadenylierungssignal AATAAA sowie der 12 Nucleotide später folgende erste Teil des Poly-A-Schwanzes identifiziert werden.

3.4.3. Die Sequenz des Klons 15.1

Der Klon 15.1 wurde ebenfalls mit verschiedenen Methoden sequenziert. Dabei wurde hauptsächlich auf die Untersuchung des für Protein codierenden Teils der cDNA Wert gelegt, so daß die 5'- und 3'- flankierenden Sequenzen zum Teil nur einmal sequenziert wurden. Der codierende Teil dagegen wurde wieder nicht nur mehrfach sequenziert, sondern auch wieder mit den Exons der genomischen Klone abgeglichen, so daß diese Sequenz sehr sicher ist.

1	GGCACGAGTT	AACATGTCGG	CCTTCTACCT	TCGTAAGCTG	AAGACGTACT	TCGCGGCGAC
61	TGACACGGAT	AAGGATGGAG	TTCTGACGGA	GAATGACTAC	CACGAGATGG	CTAGACGGTT
121	CATCGACATC	GTCAAGTTGG	ACGACGCGCA	GGGGAAGAAA	CTTCACGCGT	TGGCCGCAAA
181	GGTGTGGAAT	GACTTCTTCA	AAGGATGGGC	AACCGACGGA	AAATCCCTGA	CGCAGGACCA
241	GCTCATCGCC	TCCTTCCTGA	AGCGCCGCTC	GGACCCGAAG	TTCCTCGAGA	GCCTCAAGGA
301	GTTGATGACC	GTGGAATTCC	ACGTCGTTGA	CATCAACAAG	GACGGCTCCA	TCCAGCTGGA
361	CGAGTTCACC	ATCATGTTCC	GCTTCCACGG	TATCGACGCT	GCCCACGCCA	AGGCTTCCTT
421	CGAGGCCATC	GACTCGAACA	GCGATGGTGT	GATCAGTCTG	GACGAGTTCC	TTACGGCCGT
481	GGTCGACTTC	TTCACCGGTG	AAGACGAGAA	GAGTTCGAGT	CGGTTGTTCT	GGGGGCCACT
541	TGTTTAGTTA	GTTACATCCC	TTGGACACTT	CATCCTCCAT	TATACTGCCG	TGTCAAAGAC
601	CTTAGAGTTC	GTTGAGATGT	GACGGCCATT	CAATTCGCTG	TGGAACTCGT	GCACCACTCG
661	TGTGTATGTG	TGTGCGTGTG	TGTGTGCGTG	TGTGTGTGCG	TGTCTTTGTG	TGTGTGCTTG
721	CTTGCCCGCA	GCTGTTTGGA	ATTTTTTAAG	TTACAACGGA	CGGATATTCG	TAATCGTAAT
781	GGACTCTTAA	GGTCTTTCGT	ATTGGCTCCT	CAATACATCG	TTTTATTTTA	TCTCCATGTT
841	GACCCAAAAA	CTGAACCAGA	CGGGAAATTC	ATCACGTCAT	CGCCCCCCC	

Abb.31: Sequenz der cDNA des Klons 15.1

Sequenz des Klon 15.1 aus verschiedenen Sequenzierungen. Der für Protein codierende Teil ist rot markiert. Die 3'-nicht codierende Sequenz wurde zu einem großen Teil nur einmal sequenziert und enthält wahrscheinlich noch Fehler.

Die Längenbestimmung des Inserts des Klon 15.1 durch Elektrophorese zeigte, daß es etwa 900bp lang ist. Sequenziert wurden 889 Basen, demnach ist die cDNA des Klons wenigstens einmal fast komplett sequenziert worden.

3.4.4. Zuordnung der cDNA-Klone zu den aus dem Regenwurm isolierten SCBP-Isoformen

Mit Hilfe des allgemeinen genetischen Codes (Tabelle 8, Bresch und Hausmann 1972) können aus den beiden cDNAs die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Proteine abgeleitet werden (Abb. 32). Da dabei posttranslationale Modifikationen nicht berücksichtigt werden, ist es möglich, daß die nativen Proteine eine unterschiedliche Struktur haben. Beide abgeleiteten Proteine sind 177 Aminosäuren lang und zeigen auch sonst recht ähnliche physikalische Parameter, die in der folgenden Abbilung (33) aufgelistet sind. cDNA und Aminosäuresequenz des SCBP2

1	ATGT	CGG	ССТ	TCT	ACC	TTCG	ТΑ	AGC	TGA	AG	ACGI	ACT	TCG	CGG	CGA	CTGA	CA	CGG	ATA	AG
	М	S	А	F	Y	L	R	Κ	L	Κ	Т	Y	F	А	А	Т	D	Т	D	Κ
61	GATG	GAG'	TTC	TGA	CGG	AGAA	ΤG	ACT	ACC	AC	GAGA	TGG	CTA	GAC	GGT	TCAT	CG.	ACA	TCG	ΤС
	D	G	V	L	Т	Е	Ν	D	Y	Η	Е	М	А	R	R	F	Ι	D	I	V
121	AAGT	TGG	ACG	ACG	CGC	AGGG	GΑ	AGA	AAC	ТΤ	CACG	CGT	TGG	CCG	CAA	AGGT	GT	GGA	ATG	AC
	K	L	D	D	А	Q	G	Κ	Κ	L	Η	А	L	А	А	K	V	W	Ν	D
181	TTCT	TCA	AAG	GAT	GGG	CAAC	CG	ACG	GAA	AA	TCCC	TGA	CGC	AGG	ACC.	AGCT	CA	TCG	CCT	СС
	F	F	Κ	G	W	А	Т	D	G	Κ	S	L	Т	Q	D	Q	L	Ι	А	S
241	TTCC	TGA	AGC	GCC	GCT	CGGA	СС	CGA	AGT	ТС	CTCG	AGA	GCC	TCA	AGG.	AGTT	GA	TGA	CCG	ΤG
	F	L	Κ	R	R	S	D	Ρ	Κ	F	L	Ε	S	L	Κ	Е	L	М	Т	V
301	GAAT	TCC	ACG	TCG	TTG	ACAT	CA	ACA	AGG	AC	GGCI	CCA	TCC	AGC	TGG.	ACGA	GT	ТСА	CCA	ΤС
	Ε	F	Н	V	V	D	Ι	Ν	Κ	D	G	S	I	Q	L	D	Е	F	Т	Ι
361	ATGT	TCC	GCT	TCC	ACG	GTAT	CG	ACG	CTG	СС	CACG	CCA	AGG	CTT	ССТ	TCGA	GG	ССА	TCG	AC
	М	F	R	F	Η	G	Ι	D	А	А	Η	А	Κ	А	S	F	Е	А	I	D
421	TCGA.	ACA	GCG	ATG	GTG	TGAT	CA	GTC	TGG	AC	GAGI	TCC	TTA	CGG	CCG	TGGT	CG.	ACT	TCT	ТС
	S	Ν	S	D	G	V	Ι	S	L	D	Ε	F	L	Т	А	V	V	D	F	F
481	ACCG	GTG	AAG	ACG	AGA	AGAG	ΤT	CGA	GTC	GG	TTGI	TCT	GGG	GGC	CAC	TTGT	TT.	AG		
	Т	G	Е	D	Е	K	S	S	S	R	L	F	W	G	Ρ	L	V	_		

cDNA und Aminosäuresequenz des SCBP₃

1	ATGG	CTG.	ATG	CGT	TCA	TTGA	AA	AAGGAAGCTG A		AAGA	IG AAGACCTACT		TCAGCCGTAT			CGATTTCGAT				
	М	А	D	А	F	I	Е	R	Κ	L	K	Т	Y	F	S	R	I	D	F	D
61	AAGG.	ACG	GAG	CCA	TCA	CGAG	AA	GCG	ACT	ТС	GAGG	GAT	TGG	GAA	CTC	GGTT	CG	ГСG	AGA	GC
	K	D	G	А	I	Т	R	S	D	F	Ε	G	L	G	Т	R	F	V	Ε	S
121	GAGA.	AGC	TGG	ATG	CGG	CCAA	GG	GAG	CCG	ΑT	CTGA	AGG	CCA	AGC	TCG	TCCA	GG	TCT	GGG	AG
	Ε	Κ	L	D	А	А	Κ	G	А	D	L	Κ	А	Κ	L	V	Q	V	W	Ε
181	CAAT	ACC	TGA	AGG	GAG	TCGT	ΤT	CCG	ACG	GΑ	ACCA	GAC	TGA	CGC	AGG	CTGT	CT	ΓTG	TCG	AA
	Q	Y	L	K	G	V	V	S	D	G	Т	R	L	Т	Q	А	V	F	V	Ε
241	GCCG	TCA	AGA	AGC	AGC	TGGG	CG	ATC	CAA	ΑT	TTCA	AGA	AGG	TGC	TCG	CCGG	TC	CCC	TGC	CG
	А	V	Κ	Κ	Q	L	G	D	Ρ	Ν	F	Κ	Κ	V	L	A	G	Ρ	L	Ρ
301	CTCT	ТСТ	ТСА	GCG	CCG	TCGA	CG	GCA	ACG	GΤ	GACG	GTC	TGA	TCC	AGA.	AGGA	CG	AGT	TCC	AG
	L	F	F	S	А	V	D	G	Ν	G	D	G	L	I	Q	K	D	Е	F	Q
361	CTCT	ТСТ	ТСА	AAC	TCC	TTGG	СА	TCC	CGG	AA	TCTG	CAG	AGA	AAT	ССТ	TCGA	GG	ССА	TCG	AC
	L	F	F	K	L	L	G	Ι	Ρ	Е	S	А	Ε	Κ	S	F	Е	А	Ι	D
421	ACGA	ACA	AGG	ACG	GCG	ACAT	СА	GCA	AGG	AG	GAAT	TCG	TGA	TCG	CCG	GAAC	CG	ACT	TCT	ТC
	Т	Ν	Κ	D	G	D	Ι	S	Κ	Е	E	F	V	I	А	G	Т	D	F	F
481	ACAT	CGA	CGG	ATG	AGT	CCAG	СС	CGA	GCA	AA	TACT	TCT	GGG	GCC	CGC	TCGT	CT	GΑ		
	Т	S	Т	D	Е	S	S	Ρ	S	Κ	Y	F	W	G	Ρ	L	V	-		

Abb.32: cDNA und Aminosäuresequenz der SCBP₂ und SCBP₃

Die cDNA der beiden SCBP-Isoformen wurden nach dem genetischen Standardcode in eine Aminosäuresequenz übersetzt.

	Gemessen mit nativem SCBP ₂	gemessen mit nativem SCBP ₃	berechnet aus SCBP ₂ -Sequenz	berechnet aus SCBP ₃ -Sequenz
Anzahl der AS	-	-	177	177
Isoelektr. Punkt	5,4	5,1	4,88	4,72
relative Moleku- larmasse	18000	21000	20131	19642

Abb.33:Gemessene und berechnete physikalische Parameter von SCBP2 und SCBP3

Die gemessenen Werte stammen aus Huch et al. (1988), die aus der Sequenz abgeleiteten Werte wurden mit WinPep berechnet.

Bei der ursprünglichen Isolierung und Charakterisierung der SCBPs des Regenwurms wurde unter anderem ihre Aminosäurezusammensetzung ermittelt (Huch et al. 1988). Aus den Aminosäuresequenzen wurde die Aminosäurezusammensetzung errechnet. Durch Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen sollten sich die beiden cDNAs den entsprechenden SCBPs des Regenwurms zuordnen lassen:

	Aminosäurez	usammensetzunę	g der Proteine	Aminosäurezusammensetzung nach cDNA			
	[Ar	zahl der AS pro 2	20k]	[Anzahl der AS/	Proteinmolekül]		
Aminosäure	SCBP ₁	SCBP ₂	SCBP ₃	Klon 4.1/8.1	Klon 15.1		
Alanin	17,8	18,8	17,2	14	16		
Arginin	5,7	6,5	4,8	5	7		
Asparagin	-	-	-	3	4		
Asparaginsäure	19,4	27,2	23,2	17	20		
Cystein	1,1	0,0	0,0	0	0		
Glutamin	-	-	-	6	4		
Glutaminsäure	20,4	18,0	13	10			
Glycin	16,3	10,3	15,2	15	9		
Histidin	1,5	4,0	0,0	0	5		
Isoleucin	8,2	10,0	9,1	8	9		
Leucin	16,5	19,2	18,3	16	17		
Lysin	16,9	15,3	19,2	18	15		
Methionin	1,2	1,2	0,0	1	4		
Phenylalanin	13,0	15,7	18,4	17	16		
Prolin	8,6	3,2	8,2	6	2		
Serin	12,8	13,1	12,3	12	13		
Threonin	10,0	10,6	9,1	9	10		
Tryptophan	n.d.	2,2	2,0	2	3		
Tyrosin	3,0	1,3	1,9	3	3		
Valin	12,2	6,6	5,6	12	10		

Abb.34: Vergeich der Aminosäurezusammensetzung der drei Isoformen des SCBP des Regenwurms und der aus den cDNA-Klonen abgeleiteten Aminosäurezusammensetzung

Die Zahlen für SCBP₁₋₃ stammen aus Huch et al. (1988). Die Werte für Glutamin/Glutaminsäure sind unter Glutaminsäure aufaddiert, analoges gilt für Asparagin/Asparaginsäure. Der Wert für Tryptophan für SCBP₁ wurde nicht gemessen ("n.d.").Die Werte wurden auf ein 20k-Protein bezogen, da dies die ungefähre molekulare Masse aller drei SCBPs ist.

Die Werte für die Aminosäurezusammensetzung der Proteine sind in der Regel mit Rundungsfehlern behaftet, deshalb kommen für die drei SCBP gebrochene Zahlen für Aminosäuren zustande. Daher ist es am einfachsten, erst nur die Aminosäuren auszuwerten, die in den einzelnen Proteinen nicht gefunden wurden. Da es sich hier um ja/nein-Entscheidungen und weniger um quantitativ auszuwertende Meßwerte handelt, ist es mit ihrer Hilfe einfacher, eindeutige Entscheidungen zu treffen.

SCBP₁ enthält Cystein, welches in den beiden anderen Isoformen des SCBPs nicht vorkommt. Da in den untersuchten cDNAs kein Codon für Cystein gefunden wurde, können diese nur noch für SCBP₂ oder SCBP₃ codieren. SCBP₂ und SCBP₃ unter-

scheiden sich untereinander dadurch, daß SCBP₂ Histidin enthält. Histidin wird aber nur von der cDNA des Klons 15.1 codiert, deshalb muß diese cDNA für SCBP₂ codieren. Übrig bleibt, daß die cDNA von Klon 4.1/8.1 für SCBP₃ codiert. Daher wird ab jetzt davon ausgegengen, daß Klon 15.1 für das SCBP₂ des Regenwurms codiert und daß der Klon 8.1 für das SCBP₃ codiert und die cDNA-Klone werden nun auch so bezeichnet. Der Klon 4.1 ist demnach ein unvollständiger SCBP₃-Klon.

3.5. Die genomischen Sequenzen von SCBP₂ und SCBP₃

3.5.1. Präparation von genomischer DNA aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms

Aus dem Hautmuskelschlauch eines Regenwurms (3,21g) wurden mit Hilfe der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation 270µg DNA isoliert. Die mittlere Länge dieser DNA betrug etwa 25k und zeigte eine überraschende Homogenität in der Größenverteilung (Abb.35).



Abb.35: DNA aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms

DNA aus dem Hautmuskelschlauch wurde mit Hlfe der CsCI-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die gereinigte DNA wurde in einem 1%igem Agarose-Gel in TBE aufgetrennt. [M] Größenmarker; [1] Regenwurm-DNA; die Zahlen geben die Größe des Größenstandards in Basaenpaaren an.

3.5.2. Amplifizierung und Klonierung der genomischen DNA von SCBP₂ und SCBP₃

Mit Hilfe der Primerpaare "S3seb" und "32ash", sowie "15seb" und "15ash", die jeweils dem Anfang und dem Ende des für Protein codierenden Teils der cDNA entsprechen, wurden zunächst die genomischen Formen der beiden SCBP aus der Regenwurm-DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend in dem Vektor pCR T7/NT-TOPO kloniert.



Abb.36: Die genomischen SCBP-Sequenzen

Die PCR-Produkte, die mit den SCBP-spezifischen Primern und der genomischen DNA des Regenwurms gewonnen wurden, wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt. [M] Längenstandard, [1] PCR-Produkte, die mit Regenwurm-DNA und SCBP₂-spezifischen Primern erhalten wurden, [2] PCR-Produkte, die mit Regenwurm-DNA und SCBP₃-spezifischen Primern erhalten wurden, [3] PCR-Produkt aus einem SCBP₂-Klon mit kurzem Intron, [4]] PCR-Produkt aus einem SCBP₂-Klon mit langem Intron, [5] PCR-Produkt aus einem SCBP₃-Klon

Das Ergebnis war im Falle der SCBP₂-spezifischen Primer zwei DNA-Stücke mit den ungefähren Längen von 2750bp und 3000bp. Mit den SCBP₃-spezifischen Primern ergab sich ein Produkt mit der ungefähren Länge von 2750bp (Abb.36).

Der Vector pCR T7/NT-TOPO ist eigentlich als Expressionsvektor konstruiert. Diese Eigenschaften werden bei der Klonierung von intronhaltigen genomischen Sequenzen nicht benötigt, da aber die Klonierung von PCR-Produkten mit diesem Vektor nach eigenen Erfahrungen sehr zuverlässig funktioniert, wurde er auch hier verwendet. Nach Insertion der PCR-Produkte wurde das Plasmid in den Bakterienstamm Top 10 F' transformiert. Im Falle des SCBP₃ wurden sieben Klone, im Falle des SCBP₂ wurden 50 Klone untersucht, ob sie das gewünschte Insert haben. Dazu wurde die Plasmid-DNA der Klone isoliert und mit den ursprünglich verwendeten Primern in einer PCR eingesetzt. In Abb.36 ist die elektrophoretische Auftrennung dreier ausgewählter PCR-Produkte abgebildet. Es wurden 5 SCBP₂-Klone der "kurzen" Variante, 2 SCBP₂-Klone der "langen" Variante und vier SCBP₃-Klone gefunden.

Ergebnisse

Bei der Klonierung der PCR-Produkte können diese sowohl in der "richtigen" als auch in der "falschen" Orientierung eingebaut werden. Hier wird unter der richtigen Orientierung die verstanden, bei der das PCR-Produkt so eingebaut ist, daß das erste Exon 3' hinter dem His-Tag des Vektors liegt. Nach den Sequenzierungen (s.u.) wurde auch die Orientierung bestimmt. Von den 5 Klonen der kurzen SCBP₂-Variante waren drei richtig und 2 falsch eingebaut. Bei den zwei Klonen mit der langen SCBP₂-Variante war von jeder Einbauvariante eine vorhanden. Bei den SCBP₃ Klonen waren alle Inserts falsch eingebaut.

3.5.3. Sequenzen der genomischen Formen des SCBP₂

Die Plasmide mit den Inserts der genomischen Formen des SCBP₂ wurden mit den bei der Sequenzierung der cDNA beschriebenen Methoden sequenziert. Die Sequenzen der kurzen Variante wurden im Exonbereich und in den exonnahen Intronteilen wenigstens dreimal sequenziert und sind damit recht sicher bestimmt. Für die lange Variante ist die Sicherheit geringer, da diese Variante nur zweimal sequenziert wurde.

Unabhängig davon, ob es sich um die lange Variante oder die kurze Variante der genomischen Form des SCBP₂ handelt, zeigte die Untersuchung der Sequenzen, daß die genomischen SCBP₂-Formen nur ein Intron besitzen: Das erste Exon und das zweite Exon ergeben das komplette SCBP₂, die Insertionsstelle beider Introns liegt zwischen den Basen 168 und 169 der cDNA-Sequenz, wenn das "A" des Startcodons als Base 1 angesehen wird. Da der codierende Teil der SCBP₂ -cDNA 534 Basenpaare lang ist, und da die Gesamtlängen der genomischen Sequenzen 2750bp bzw. 3000bp waren, bedeutet dies, daß das kurze Intron ca. 2450bp lang sein muß. Da nie mehr als etwa 800 Basen des 5'- bzw.3'-Ende des Introns sequenziert wurden, wurde weder das kurze noch das lange Intron vollständig sequenziert. In Abb.37 sind die Sequenzen soweit bekannt abgebildet.



Exon 1

		10)	20	30	40	50	60
1	T	3	*		*	*	*	*
langes	Intron	ATGTCGGCCI	TCTACCI I	CGTAAGCIC CGTAAG t TO	GAAGACGIAC	TTCGt GGCGA	CTGACACGGA. CTGACACGGA'	TAAG TAAG
Langoo	11101011	7()	80	90	100	110	120
		ł	k	*	*	*	*	*
kurzes	Intron	GATGGAGTTO	CTGACGGAG	GAATGACTAC	CCACGAGATG	GCTAGACGGT	TCATCGACAT	CGTC
langes	Intron	GATGGAGTTO	CTGACGGAG	GAATGACTAC	CACGAGATG	GC <mark>g</mark> AGACGGT	TCATCGAaAT	CGTC
		130) 1 F	40	150	160	170	
kurzos	Introp	A A GTTCCACO				TTCCCCCAA	AC	
langes	Intron	AAGTTGGAC	GALGCGCAC	GGGGAAGAA	CTCCACGCG	TTGGCCGCAA	AG	
5					,			
5'Ende	des Int	rons						
		1 ()	20	30	40	50	60
		4	k k	*	*	*	*	*
kurzes	Intron	GTAGTGTACA	ATGTACAG	GGCTTCTT	TATGGAGTC	ATTAGAACTG	CTTAACTCCT	ICTT
langes	Intron	GTAtTGTACA	ATGTACAG	GGCTTCTT	TATGGAGTC	ATTAGAAtTG	CTTAtCTCCT	ICTT
		7()	80	90	100	110	
1	T	, , ,	*	*	*	*	*	~~~~
langes	Intron	TCcCTTtcCZ	AICCICIAI	GGIGAAAIA		GUGGAIUUAA Chocathoaa		
ranges	11101011	120 1	130	140	150	JUUUAIUUAA	160	170
		*	*	*	*		*	*
kurzes	Intron	CCCTTCCACO	GCCTCCCA	TTGGGAAAT	TT-GCGCTGG	ACCT	-CCCCATCAT	GTCT
langes	Intron	tCCaTCCAt	GGCtcCCCA	ATTGaaAAA	TtGCaCaGG	ACgTgccccc	CCCCCATCAT	GTtT
		180) 1	.90	200	210	220	
laurage	Tntron		י רידי א א ידי הי א א	*	* • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	*	*	~ \ \ \ \ \
langes	Intron	aAACAGGtT	TTT AATCAP	TGaAgCaG	GAAAGGIGAG. Gaaaagtgtg	AGGAAAAAAG AGatAAAAAtG	TAGCATAT(TAaCATATat(GATG
rangeo	11101011	230 2	240	250	260	270	280	51110
		*	*	*	*	*	*	
kurzes	Intron	CAATGTCTGA	ACAAGTTI	TGAAACAA	GTAGCGGGG	GAAAGGTGAG	AAAAGAAATAA	ACAT
langes	Intron	CAATGTtTGA	ACAAGTTI	TGAAACAAT	[GTAcCGGGG	aAAAGGTGAG	AAAAGAAATgi	ACA-
		290 3	300	310	320	330	340	
kurzos	Introp		^ \		^ ГСАСТТАТТТ'	^ TTTGGCGGTG	^ TAAATTGTAT(~TCT
langes	Intron	TACGo	CTAAAAAA	GTCCTCAC	ICAGTIAIII ICAGTTAT'	TTTGGCGGaG	TAAATTGTAT	CTtT
5		350 3	360	370	380	390	400	
		*	*	*	*	*	*	
kurzes	Intron	TCATGATAT	TTCGACCAA	ACGGCAAA	AAAAGTCA	ICACATTTTT	TCGGCCAACG	ATCA
langes	Intron	TCATGATAT	TGGACCAA	ACGGCtAA	AAAagGTCA	ICACATTTTT	TCGGCCAACG	AcCA
		4⊥U *	420 *	430	440	450	460	
kurzes	Introp	ACGAATTTT	ГТТАСАСАЛ	TTGTCCAA	" AAGACACAA		~ CCCGTTCTAA;	ΔΔΤΤ
langes	Intron	ACG-ATTTT	TTAGAGAT	TTGTCCAA	CAtGACACAA	TTTGTaTTGC	CCCGTTCTAA	AATT

		470	480	490		500	510	
kurzes langes	Intron Intron	TCTGTATCCA TCTGTATCCA	АСССТБААТА АСССТБААТА	.GGCCCTA .GGCCCTAta	CTC aggcctaCTC	CCAATCGGA CCAATCGGA	TAACAATGAACAI Icacaatgaacai	Г Г
		520 *	530 *	540 *	550 *	560 *	570 *	
kurzes langes	Intron Intron	TTTACCATTT TTTACCATTT	TTT-AAACTG TTTtAAACTG	CAAATAAG CAAATAAG	IGCTTTTATA IGCTTcTAcA	ATTTGAAAAA AcTctAAAAA	ATCCATTTATCAC ATCtAcTaATaAC	(7)
		580 *	590 *	600 *	610 *	620 *	630 *	
kurzes	Intron	TGTTAT-TGC	AAATTTTTTG	CAGAACTG	CGCGCTA-AA	AAGCACTGG	IGAGCGTAATCGI	Г
langes	Intron	TGTTATcTGC	AcATTTTgTG	CtGAACTG	CtCGCcAcAA	AAaCcCTGa	IGAtCtTAA-CGI	Г
		640	650	660	670	680	690	
		*	*	*	*	*	*	
kurzes	Intron	AAATTCTGAA	CTT-CTACAG	GGTGCTGGA	ACTACCGTAT	AGGCCTACT	ITTGCAATCGCTI	Г
langes	Intron	AAATgggGAA	CTTtCTACAG			AtGCC		-
		*	*	*	*	*	*	
kurzes	Intron	AATTGCTTGT	TACATGCTTA	ACGACCCC	IGCCATATCA	AAGATGATT	AGTGTCCGCCCTI	Г
langes	Intron	T	TAtAT		AgATCc	AAGTgo	gGTG	-
		760 *	770 *	780 *	790 *	800 *	810 *	
kurzes	Intron	CCTTCCTTTT	ATCCAGGCTT	TGGAACTG	GCACTTGGCA	AAGAACAAC	CAAGTGGTGGAGI	Г
langes	Intron	TaCCgTaT	AAGGC	Gt	acCTTtGC-			-
2		820	830 *	840	850 *	860 *		
kurzes	Intron	TCAATCCGTT	AATTTCATGT	CATGCTTT	TTTTTCCAGG	CTTCGTGGG	ТТАСА	
langes	Intron	-CAATCCGaT	AATTT			Gc'	TTatc	
		10	20		30	40	50 60)
kurzes	Intron	AAAAAATCGA	AAACGGTCTT	TTTGCGTG	GAATAAGAAG	GGGGGGAAGG	GGTTTATAAAGTA	-
ranges	11101 011	70	80	(90 1	00	110 120)
kurzes	Intron	GTCCCCCTGG	* AAGGAAGCGG	TTACAAGG	* AATGGAATGA	* AAGGGAATG	AAATGATTGATTG	3
langes	Intron	GaCC				-AGGGAAT-		-
		130	140	15	50 I *	60 . *	* * *) *
kurzes langes	Intron Intron	AAATGAATGA	AAGGAATGAA TGtA	ATAAAGAAG ATtcgGAAa	GGGAATGGAA aGcA	GTGAAGGAG	ATTGAATGAATGA tTTccAatAATGA	A A
		190	200	210	* 220	23	0 240	*
kurzes	Intron	ATGAATGAAT	GAATGAATGA	ATGAATGAA	ATGAATGAAT	GAATGAATG	AATGAAGTATAGA	Ŧ
langes	Intron	cictgi	260		-CGAACGAGT	CAGgt1ti	LACGTTGGATAAA 200 300	7
		200	200	Δ	/∪ ∠ *	• • •	× × ×) *
kurzesl	Intron	GGACTACGGT	AGCCATTATA	TGCAGAGG	GCAGTAAATT	GTAGGCCTA	ITCGCTAGCACTI	Г
⊥anges	incron	agtGGT 210	AAUUGIGATA	, ,		SINGTCATO	JICALCATUA	-
		*	520		*	340 *	*	
kurzes	Intron	TCCACTAATG	GCTCTCTCAA	ACTGTTTG-	-CTTTTACCT	TCGTTAT	CATCGTCATCGTC	2
langes	Intron	-CCACcAtTG		TGgTcGt	CaTTgACaT	ggTgGTcAT	CATCaTCATaGTo	J
		360	370	380	390		400 410)
kurzes	Intron	* ACAGTCGTCA	* TCGTCATCAT	* CACCACCAC	* CCATTG	TCGTCG	* * ICATTGACATCGI	۲
langes	Intron	gtgGTaGTgA	TCcTCATCAc	CACCACCA	CCAaTcacga	ccaTCGTCG	ICgTcGtCgTaGI	Г

		4	20		430	440	450	
			*		*	*	*	
kurzes	Intron	CGTCGTCA	TCATCATCA	AT		CATCATCGTA	GTCGTCGTCA	ATCATC
Tanges	INCLON	160	1CAICAICA 170	41000000	LatCalCAI	500	GICGICGICF 510	AICAIC
		*	*	400	4JU *	*	*	
kurzes	Intron	ATGATCAC.	ACCGTCCC	АААСАСАААТ	CCTAATGAC	СТААТСАСТТ	CACAGCACTA	ATAAC
langes	Intron	ATGATCAC.	ACCGTCCC	АААСАСАААТ	CCTAATGAC	СТААТСАСТІ	CACAGCACT	gATAgC
-		520	530				-	
		*	*					
kurzes	Intron	CAACCATC	CAACAG					
langes	Intron	CAAtCATC	CAACAG					
ito	Even							
zweites	5 EXON							
			10	2.0	30	40	50	60
		\downarrow	*	*	*	*	*	*
kurzes	Intron	• GTGTGGAA	TGACTTCT	TCAAAGGATO	GGCAACCGA	CGGAAAATCC	CTGACGCAG	GACCAG
langes	Intron	GTGTGGAA	TGACTTCT	[CAAAGGATC	GGCAACCGA	CGGAAAATCC	CTGACGCAG	GACCAG
2			70	80	90	100	110	
			*	*	*	*	*	
kurzes	Intron	CTCATCGC	СТССТТССТ	IGAAGCGCCO	GCTCGGACCC	GAAGTTCCTC	GAGAGCCTCA	AAGGA
langes	Intron	CTCATCGC	CTCCTTCC	IGAAGCGCCO	GCTCG <mark>C</mark> ACCC	GAAGTTCCTC	GAGAGCCTCA	AAGGA
			130	140	150	160	170	
1	T 1	0	*	*	*	*	*	
kurzes	Intron	GIIGAIGA	CCGTGGAA	TTCCACGTCC	TTGACATCA	ACAAGGACGG	CTCCATCCAC	CTGGA
Tanges	INCLON	GIIGAIGA	LCGIGGAA. 190	200	210	220	230	JUIGGA
			*	200	*	*	*	
kurzes	Intron	CGAGTTCA	CCATCATG	ITCCGCTTCC	ACGGTATCG	ACGCTGCCCA	CGCCAAGGCI	тсстт
Langes	Intron	CGAGTTCA	CCATCATG	TTCCGCTTCC	CACGGGATCG	ACGCTGCCCA	CGCCAAGGCI	TCCTT
-			250	260	270	280	290	
			*	*	*	*	*	
kurzes	Intron	CGAGGCCA	TCGACTCGA	AACAGCGAT	GTGTGATCA	GTCTGGACGA	GTTCCTTAC	GCCGT
langes	Intron	CGAGGCCA	TCGACTCGA	AACAGCGAT	GaGTGATCA	GTCT <mark>C</mark> GACGA	GTTCCTTAC	GCCGT
			310	320	330	340	350	
,			*	*	*	*	*	
kurzes	Intron	GGTCGACT	TCTTCACCO	GTGAAGACO	GAGAAGAGTT	CGAGTCGGTT	GTTCTGGGGG	TCCCT
randes	TUCTON	CGICGACI	ICIICACCO	JGIGAAGACO	JAGAAGAGII	JGAGIUGGII	GIICIGGGGG	JICCCI
kurzes	Introp	TGTTAAG						
langes	Intron	TGTTAAG						

Abb.37: Die genomischen Sequenzen des SCBP₂

Im oberen Teil der Abbildung sind die Sequenzen des SCBP₂ schematisch wieder gegeben. Das Intron ist blau gezeichnet, die Exons sind grundsätzlich schwarz gezeichnet, die EF-Hand-codierenden Sequenzen sind grün eingezeichnet.

Darunter sind die Sequenzen im Detail wiedergegben. Unter "kurzem Intron" ist hierbei "genomische SCBP₂-Form mit kurzem Intron" zu verstehen, gleiches gilt für Bezeichnung "langes Intron". Die Sequenzen stellen den "Mittelwert" verschiedener Sequenzierungen da. Die Sequenzierungen waren immer so angelegt, daß vom Exon her kommend in das Intron hineinsequenziert wurde. Darum sind die exonnahen Teile des Introns mit einer größeren Sicherheit bestimmt als die zentraleren Intronteile. Die Basen, die für die Aminosäuren der EF-Hände codieren, sind grün hervorgehoben. Die Sequenzunterschiede in den Exons zwischen den Genen mit langem Intron und kurzem Intron sind rot markiert.

Der Pfeil markiert den Beginn des Leserasters des zweiten Exons.

Vergleicht man die beiden verschieden langen Introns, so sind diese bei den etwa 50 exonnahen Basen einander recht ähnlich, bei den zentraler liegenden Teilen sind größere Unterschiede zu sehen. Der Übergang Exon-Intron bzw. Intron-Exon entspricht dem gängigen Schema "AGGT" (Knippers 1997).

Vergleicht man die Exon-Sequenzen der Form mit dem kurzen Intron mit der des langen Introns fallen einige Basenaustausche auf. Diese sind in der folgenden Tabelle zusammen gefaßt:

Position der ausge-	Codon der SCBP ₂ -	Codon der SCBP ₂ -	Aminosäure bei der	Aminosäure bei der
tauschten Base	Sequenz mit kurzem	Sequenz mit langem	SCBP ₂ -Sequenz mit	SCBP ₂ -Sequenz mit
	Intron	Intron	kurzem Intron	langem Intron
25	CTG	TTG	Leu	Leu
41	GCG	GTG	Ala	Val
99	GCT	GCG	Ala	Ala
114	GAC	GAA	Asp	Glu
132	GAC	GAT	Asp	Asp
147	AAA	AAG	Lys	Lys
150	СТТ	CTC	Leu	Leu
91(+168=259)	GAC	CAC	Asp	His
147(+168=315)	GTT	GTC	Val	Val
210(+168=378)	GGT	GGG	Gly	Gly
267(+168=435)	GGT	GGA	Gly	Gly
279(+168=447)	CTG	CTC	Leu	Leu
300(+168=468)	GTG	GTC	Val	Val

Tabelle 3: Unterschiede in den codogenen Bereichen der beiden genomischen SCBP₂-Varianten und ihr Einfluß auf die resultierende Aminosäuresequenz.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die meisten Unterschiede in der DNA-Sequenz auf der Aminosäureebene keine Auswirkungen haben. Die drei Austausche, die einem Wechsel der Aminosäure zur Folge haben, dürften ebenfalls keinen Einfluß auf die Funktion des Proteins haben:

Der Wechsel an der Position 41 tauscht zum einen eine hydrophobe Aminosäure gegen eine andere aus, zum anderen liegt sie an einer nicht konservierten Stelle im helicalen Teil einer EF-Hand. Die Austausche an den Positionen 114 und 259 liegen nicht in den Ca⁺⁺-bindenden Domänen.

Da weder in der SCBP₂-Form mit dem kurzen Intron noch in der Form mit dem langen Intron ein Codon für Cystein gefunden wurde, ist keine der Formen ein Gen für das SCBP₁ (siehe 3.4.4.).

Die Ergebnisse zeigen, daß es wenigstens zwei verschiedenen Allele für das SCBP₂ gibt, die sich in erster Linie durch zwei verschiedene Introns unterscheiden, die die codierende Sequenz an genau derselben Stelle unterbrechen. Kleine Unterschiede in der Aminosäuresequenz dürften für die Funktion der Proteine unerheblich sein.

3.5.4. Sequenz der genomischen Form des SCBP₃

Die Sequenzierung der genomischen Form des SCBP₃ wurde wie bei denen des SCBP₂ beschrieben durchgeführt.

Die Untersuchung der Sequenzen zeigte, daß auch das SCBP₃-Gen nur ein Intron hat, das fast genau an derselben Stelle in die Sequenz inseriert ist, wie bei SCBP₂, nämlich zwischen den Basen 171 und 172. Die Sequenzen des ersten und zweiten Exons wurden komplett gefunden.

Da das PCR-Produkt der genomischen Form des SCBP₃ etwa 2750bp lang war, die codierende Sequenz 534pb lang war, muß das Intron etwa 2200bp lang sein. Auch hier wurden nur etwa 800 Basen der Enden des Introns bestimmt, so daß die Sequenz der Mitte des Introns unbekannt ist. Die Sequenzen sind - soweit bekannt - in Abb.38 wiedergegeben.

SCB Exo 1711	6P3 n1 Inti bp	ron	2200	bp [xon <mark>2</mark> 363bp	
on 1	115 - 110					
	10	20	30	40	50	60
	*	*	*	*	*	*
ATGGC	TGATGCGTT	CATTGAAAGG	AGCTGAAG	ACCTACTTCA	GCCGTATCGA	TTTCGAT
	70	80	90	100	110	120
	*	*	*	*	*	*
AAGGA	CGGAGCCAT	CACGAGAAGCO	GACTTCGAG	GGATTGGGAA	CTCGGTTCGT	CGAGAGC
	130	140	150	160	170	
	*	*	*	*	*	
GAGAA	GCTGGATGC	GGCCAAGGGAG	GCCGATCTGA	AGGCCAAGC	ICGTCCAG	

5'-Ende-Intron

10	20	30	40	50	60							
*	*	*	*	*	*							
${\tt GTAAGAACCACACCCCGTCTTTATAGAAGCGTCATCGATTGACACCTTCGATGTCAGGAG}$												
70	80	90	100	110	120							
*	*	*	*	*	*							
CTGACATAAT	CTGACATAATCGGTAATTAGAAGTCACACTACTATTATGTGGCCTTCGATATAAAAAAAA											
130	140	150	160	170	180							
*	*	*	*	*	*							
CCTGCCTTAT	ITTATCGTCG	ATGGACTGGG	AGCGCTTCTG.	AGTGCTTATT	ITTAAAGCCT							
190	200	210	220	230	240							
*	*	*	*	*	*							
TAAGGTGCAA	GATGAATAGTA	AACAAACGAAA	ATGTATAGAT	AAGAGATGTCA	ACTGATGAGG							
250	260	270	280	290	300							
*	*	*	*	*	*							
TACCAGTGTAGATGATTGATATTAATTGGATACACAACCAAAAAAACTTTTGAGCATC												

310	320	330	340	350	360			
*	*	*	*	*	*			
TGGAATGAGGTCATTGAATGAGGAAACAGGTTGGTGAGGACTGGAAACCGCCGCTTGCGA								
370	380	390	400	410	420			
*	*	*	*	*	*			
CGGACAGGGA	ACGGGACAAGA	ACAGGAATCG	IGAGATACAG	ACAGACAAGC	AGAGAGAGAC			
430	440	450	460	470	480			
*	*	*	*	*	*			
GGACAAGCAGA	ACGATAAGAGA	ACAGAGAGTGA	AACATTTGAT	GGGACGGAAC	ATGAGCAGCT			
490	500	510	520	530	540			
*	*	*	*	*	*			
CGACAACAAGA	AGAGTGAAAGO	GATCAACAAG	GAATGAAGGA	AGGAGAATAT	AGGAAATAGA			
550	560	570	580	590	600			
*	*	*	*	*	*			
ATCAACAAAGA	AGATGGAAAAI	CGACTTTTT	CTTGCTCCCA	CATTGTTGCC	GGGTAGAGCA			
610	620	630	640	650	660			
*	*	*	*	*	*			
TCTGAGCTTC	ГСАТААТТААТ	GTCTCTATT	TTTTTTTAA	AAATCCATGT	CTATGTTCTT			
670	680	690	700	710	720			
*	*	*	*	*	*			
TTATCTCCAA	GGCACTATGGO	GCATGCCTTT	TTGCCAATGT	GTTGTGCATT	CCTGGTAAAA			
730	740	750	760	770	780			
*	*	*	*	*	*			
ATTTTCTTTC	ATTTTCTTTCCAGTTCCAATTCAATTTCCGCGAACCCGTTTTTTTGACAGCCATGCAAAG							
790	800	810	820	830	840			
*	*	*	*	*	*			
TCCTTGAAATAAGAATTTGCTTTGTCTTAAAAATGCTTTCACAACATCACCTATGCCTAC								
850	860							
*	*							
ATGGTACATCO	CATTTTCATA	ATTATTT						

3'-Ende Intron

10	20	30	40	50	60			
*	*	*	*	*	*			
GGACATTTGGGTCCGGTTGCATTGGGGAAGCTAACCGAAGGGAAATAAGGTGGTACGAAG								
70	80	90	100	110	120			
*	*	*	*	*	*			
TTCAATAATT	ATCGTCTTTA	TATGGGAAGG	GAAAATACTC	CATCATAGGG	ССТААААТАА			
130	140	150	160	170	180			
*	*	*	*	*	*			
AAGCCTAATA	ITTTAATTGC#	AATTATAGGT	GTTATTTCTG	GCAATATATA	TATATAACCC			
190	200	210	220	230	240			
*	*	*	*	*	*			
TATATATGATA	AGAAACCTAT	GTACTATATT	ΓΤΑΑΑΤΑΤΑΑ	TATTGCATAT.	ACTTGGGGGT			
250	260	270	280	290	300			
*	*	*	*	*	*			
TGTCCTTTTCAATTTAATCTCGGCGTCGGCTCCATTTGAGCAAAGGAAAAGCTATGAAGT								
310	320	330	340	350	360			
*	*	*	*	*	*			
${\tt GTAGTGTATGTCCTTCTGTCCTTCTACATATGTCTACAATATTATTATCATTGGTTTG$								
370	380	390	400	410	420			
*	*	*	*	*	*			
AATATATCTACGCACCAAGCAGCCTTTACAGACAGACAGA								
430	440	450	460	470	480			
*	*	*	*	*	*			
GAAAGTTTTTTGTGTAGGCCTACTTCGTTGACCTACAGTCAAATCGCTACACTATAATTA								
490	500	510	520	530	540			
*	*	*	*	*	*			
CAATTATTATA	ACGCTGTACT	rgagatgttt <i>i</i>	ACAAGGAATT	CGATAATTAA.	ATATGATCAT			

	550	560	570	580	590	600			
	*	*	*	*	*	*			
P	ACATGTACAGTACAATAATTGTAACACCGCAGTAGCATTTCAAATTAATT								
	610	620	630	640	650	660			
	*	*	*	*	*	*			
P	TTTGTTGTG	TTTCTGCACT	GAAAAAAACC	GATTTCCCCT	CCACAAAGCA	GGGGGAACTA			
	670	680	690						
	*	*	*						
G	ATTTAACAC	IGCCCTGTCC	ITCTTCTTCC	TGTAG					
	10	20	30	40	50	60			
	*	*	*	*	*	*			
0	TCTGGGAGC	AATACCTGAA	GGGAGTCGTT	TCCGACGGAA	CCAGACTGAC	GCAGGCTGTC			
	70	80	90	100	110	120			
	*	*	*	*	*	*			
Ι	TTGTCGAAG	CCGTCAAGAA	GCAGCTGGGC	GATCCAAATT	TCAAGAAGGT	GCTCGCCGGT			
	130	140	150	160	170	180			
	*	*	*	*	*	*			
C	CCCTGCCGC	ICTTCTTCAG	CGCCGTCGAC	GGCAACGGTG.	ACGGTCTGAT	CCAGAAGGAC			
	190	200	210	220	230	240			
	*	*	*	*	*	*			
G	GAGTTCCAGCTCTTCTTCAAACTCCTTGGCATCCCGGAATCTGCAGAGAAATCCTTCGAG								
	250	260	270	280	290	300			
	*	*	*	*	*	*			

Abb.38: Die genomische Sequenz des SCBP₃ Im oberen Teil der Abbildung ist die Sequenz des SCBP3 schematisch wieder gegeben. Das Intron ist blau gezeichnet, die Exons sind grundsätzlich schwarz gezeichnet, die EF-Handcodierenden Sequenzen sind grün eingezeichnet. Darunter ist die Sequenz im Detail wiedergegben. Das 5'-Ende des Introns ist dabei nur einmal sequenziert worden, alle anderen Sequenzen wurden durch Kombination der Ergebnisse mehrerer Sequenzierungen gewonnen. Die Basen, die für die EF-Hände codieren, sind grün

GCCATCGACACGAACAAGGACGGCGACATCAGCAAGGAGGAATTCGTGATCGCCGGAACC

GACTTCTTCACATCGACGGATGAGTCCAGCCCGAGCAAATACTTCTGGGGCCCGCTCGTC

*

330

320

*

350

340

*

360

3.5.5. Vergleich der Intronsequenzen

*

TGA

hervorgehoben.

310

zweites Exon

Die drei gefundenen Intronsequenzen können nicht direkt miteinander verglichen werden, weil ihre kompletten Sequenzen nicht bekannt sind. Es ist aber möglich, gleich lange Stücke an den 5'- bzw. 3'- Enden der Introns zu vergleichen. Dieser Vergleich zeigt, daß sich das kurze und das lange Intron des SCBP₂ untereinander relativ stark ähneln, beide sich aber stark von dem SCBP₃-Intron unterscheiden.

Am 5'-Ende stimmen bei dem kurzen und dem langen SCBP₂-Intron an 84% der Positionen die Nucleotide überein, bei kurzem SCBP₂-Intron und SCBP₃-Intron betragen die Ubereinstimmungen 49%. Am 3'-Ende sind die Werte für die entsprechenden

Übereinstimmungen 73% und 52%. Die diesen Zahlen zugrunde liegenden Vergleiche sind in Abb. 39 aufgelistet.

Vergleich der 5'-Enden der Introns

	10	20	30	40	50	60
kurzog Intron	*	* TACACCCTTC	* TTTTNTCCN	* ^	* СТССТТААС	*
langes Intron	GTAT TGTACAATG	TACAGGGCIIC	TTTTATGGA(GICAIIAGAA GTCATTAGAA	+TGCTTA+C	TCCTTCTT
SCBBP3-Intron	GTAaqAac	cACAcccCqTC	TTT	aTAGAA	GCqTcA-	
	70	80	90	100	110	
	*	*	*	*	*	
kurzes Intron	TCACTTCACATCC	TCTATGGTGAA	ATAGGTCCAG	GGGGCGGATC	CAAGCGGGG	GTCAAA
langes Intron	TCcCTTtcCATCC	TCTccGGTGAt.	ATCGaTCCA	GGGGtGGATt	CAAGCGGGG	caGgggAA
SCBBP3-Intron	TCgaTTgACAcCt	TCgATG	tCA0	GGaGCtGAca	tAAtCGGta	aTtAgA
	120	130	140	150		160
kurzes Intron	CCCTTCCA	CGGCCT	CCCATTGGG	AAATT-GCGC	TGGACCT	CCC
langes Intron	tCCaTCCA	tGGCtc	CCCATTGaa	AAATTtGCaC	aGGACqTqc	ccccCCC
SCBBP3-Intron	agtcaCaCTaCtA	ttatgtGGCCT	tCgATataa <i>A</i>	AAA	-aaACCT	gCC
	170	180	-	190		200
	*	*		*		*
kurzes Intron	C-ATCATGTC-TC.	AACAGGCTTTA.	AAT(CAATGC	AACA	GGAAAGGT
langes Intron	C-ATCATGTt-Ta	AACAGGETTTTE.	AATO	CAATGa	AgCg	GGgAAaGT
SCBBP3-Intron	210	gAtgGaliggg.	Agegettele	JAGIGUTTAT	CTTTTAAAGC	CTTAAGGI
	ZIU *	ZZU *	23U *	240 *	250	
kurzes Intron	GAGAGGAAAAAAG	TAGCATATG	ATGCAATGT	CTGAACAAGT	TTTGAAACA	ATGT
langes Intron	GtGAGatAAAAtG	TAaCATATatG.	ATGCAATGTt	TGAACAAGT	TTTGAAACA	ATGT
SCBBP3-Intron	GcaAGatgAAtAG	TAaCAaAcG	AAATGTa	aTagAtAAGa	gaTGtcACt	gatgAgGT
	260 270	28	0 29	90 3	00	310
	* *		*	*	*	*
kurzes Intron	AGCGGGGGGAAAGG	TGAGAAAAG.	AAATAACAT#	ACATGTACGA	CTAAAAAGG	TCCTCAG-
Langes Intron	ACCGGGGGAAAAGG		AAATGACA	TACGg		TCCTCAC-
SCBBPS-INCION	ACCAGLGLAGALG 320	aligalallal 330	CAAICGGAIA 340	ACACAA	ССААААААС	350
	*	*	*			*
kurzes Intron	-TCAGTTAT	TTTTTGGCGGT	GTAAATTGT <i>A</i>	AT	C	TCTTCATG
langes Intron	-TCAGTTA	-TTTTGGCGGg	GTAAATTGTA	AT	C	TtTTCATG
SCBBP3-Intron	aTCtGgaATgagg	TcaTTGaatGa	GgAAAcaGgt	Tggtgagga	ctggaaacC	gCcgCtTG
	360	370	380	390	400	410
1	*	*	*	*	*	*
kurzes Intron	ATATTTCGACCAA	ACGGCAAAAAA ACCCC+AAAAAA	-AGICAIC	CACAIIIII		AICAACGA
SCBBP3-Intron		ACGGCLAAAAA	-AagGICAIC	CALIIIII Cat gaga Tac	aGaCadACa	ACCAACG-
Sobbro incron	420	430	440	450	460	119011
	*	*	*	*	*	
kurzes Intron	ATTTTTTAGAGA	TTTGTCCAACA	AGACACAAT	ITGTTTTGCC	CCGTTCTAA	AATTTC-T
langes Intron	ATTTTTTTAGAGA	TTTGTCCAACA	tgacacaat	ITGTaTTGCC	CCGTTCTAA	AATTTC-T
SCBBP3-Intron	gAGAGA	gacGgaCAAgc.	AGACgatAaq	gaGaCa	gaGagtgAA	cATTTgaT
	480	490			500	510
kurzog Intron	^ CTATCCAACCCTC	^ ^ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~		TCCC3	^ 	^
langes Intron	GTATCCAACCCTG	AATAGGCCCTA AATAGGCCCTA	taggeetaC	ICCCA	ATCGGAT	-cacaatg
SCBBP3-Intron	GqqaCqqAaCaTG	AqcA-GCtCqA	Ca	aaCaAqaqaq	tqAaaGGAT	cAACAAqG
	520	530	540	550	560	570
	*	*	*	*	*	*
kurzes Intron	AACATTTTACCAT	TTTTT-AAACT	GCAAATAAG	IGCTTTTATA	ATTTGAAAA	ATCCATTT
Langes Intron	AACATTTTACCAT	TTTTTTAAACT	GCAAATAAG	I'GCTTCTACA	AcTctAAAA	ATCtAcTa
SCRRA3-Intron	AAIgaAggAa	ggaga-AtAta	GGAAATAgaa	atCaacaAag	Agalggaaa	ATCGACTT

<pre> * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *</pre>		580	590		600	610	620
kurzes Intron ATCACTGTAT-TGCAAATTTTTTGCAGAACTGCGCG-CTA-AAAAGCACTG Ianges Intron ATAACTGTTAT-TGCAATTTTGTGCAGAACTGCCGCG-CCACAAAAACCCTG SCBBP3-Intron GTGAGCGTAATCGTAAATTCTGAACTT-CTACAGGGTGCGGACTACCGTATAGGCCTAC aTGACCTTAA-CGTAAAATGCGAAATTCTGAACTT-CTACAGGGTGCGGACTACCGTATAGGCCTAC aTGACCTTAA-CGTAAAATGCGAAATTCTGAACTT-CTACAGGGTGCTGGACTACCGTATAGGCCTAC aTGACCTTAA-CGTAAAATGCGAAATTCTGAACTT-CTACAGGGTGCGGACTACCGTATAGGCCTAC 690 700 * * * * * * * * * * * * * * * * *		*	*		*	*	*
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	kurzes Intron	ATCACTGTTAT-	TGCAAATTTTTT	GCAG	AACTGCG	CG-CTA-AA	AAGCACTG
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	langes Intron	ATaACTGTTATc	TGCAcATTTTqT	GCtG	AACTGCt	CG-CcAcAA	AAaCcCTG
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	SCBBP3-Intron	tTTcTTqc-	TcCcAcaTTgTT	GCcGqqtaqa	qcAtCTGaG	CttCTc-At	AAttAaTG
kurzes Intron GTGAGCGTAATCGTAAATTCTGAACTT-CTACAGGGTGCTGGACTACCGTATAGGCCTAC		630	640	650	660	670	680
		*	*	*	*	*	*
langes Intron aTGAtCtTAA-CGTAAATgggGAACTTtCTACAGaTGCctTATATAG SCBBP3-Intron tCtctATttTttTtTaAAATC-CatgtctaTGTctttTAtCtccaAGGCAC 690 700 kurzes Intron TTTGCAATCGCTTAATTGC langes Intron atCCA4gtGgT-gTacC SCBBP3-Intron TaTgGgcATgcCTTtTgccaaTGt Vergleich GarataGGGGCAGTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGCAGTAAATGTAGG langes Intron GAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGGCAGTAAATGTAGG langes Intron GAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGGCAGTAAATGTAGG langes Intron GAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGGCAGTAAATGTAGG langes Intron GAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGGCAGTAAATGTAGG langes Intron GAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCACGTGGTGGTAACtgtAGTGATAGTAGG langes Intron GAAGA	kurzes Intron	GTGAGCGTAATC	GTAAATTCTGAA	CTT-CTACAG	GGTGCTGGA	CTACCGTAT	AGGCCTAC
$ \begin{array}{c} \text{SCBBP3-Intron} &CtCtTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT$	langes Intron	aTGAtCtTAA-C	GTAAATaaaGAA	CTT+CTACA-	GaTGcc	+ TATAT	AG
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	SCBBP3-Intron	tCtctATt	tTtttTTtaaAA	aTc-Catotc	taTGtTctt	t TAt Ct c ca	AGGCAC
kurzes Intron TTTTGCAATCGCTTAATTGC langes Intron TTTGCAATCGCTTAATTGC aTCCAAgtGgTgTGTaCC SCBBP3-Intron TaTGGGATGCCTTATGCCAAGGGCAGTAAATTGT-AGG (arrow a total arrow arrow a total arrow a total arrow a total arrow arrow arrow a total arrow arrow arrow a total arrow a	bebbi 5 incion	690	70	n are catgee	curocrecc		110000 110
kurzesIntronTTTTGCAATCGCTTAATTGC aTCCAAgtGgGT-gTaCC TaTgGGCATgCCTTtTgccaaTGtVergleich der3'-Enden der Introns 10 203040kurzes10203040SCBBP3-IntronGAAGTATAGAGAGCTACGGTAGCATTATATGCAAGAGGGAGTAAATTGTAGG GAgTCagGttTACGGTGGCATTATATGCAAGAGGAGGAGTAAATGTAGG GAgTCagGttTACGTGGCAGTGGAAAGTttAGGTGTAACgGAGTGGAA CGAACAACAGACAGACAGACGACGACGACGACGACGAGTGTGAAAGTTTGTGTAGG 607080SCBBP3-IntronCCTATTGCGTAGCACTTCCACTAATGGCTCTCTCAAACTGTTTG-CTTTTACCTT CaTgGTCAtCACACCACACATGAGACTATATTA-CATTATACA- T10120130SCBBP3-IntronCCTATTGGCTAGCACTTCCACTAATGGCTCTCTCAAACTGTTGGCCATTGACATGGTG CCTATTGGTCACACCACTGTCACACACGCCCGTCATCACACACGCA CaGTGTACTCGTCATCGTCACGCCA		*	70	*			
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	kurzos Intron	ͲͲͲͲϹϹϠϪͲϹϹϹ	TTλλTTC	C			
langes IntronTargGqATgcCTTttTgccaaTGtSCBBP3-IntronTargGqATgcCTTttTgccaaTGtVergleich der3'-Enden der Introns10203040 $*$ **GAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGCAGTAAATGTAGGlanges IntronGAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGCAGTAAATGTAGGSCBBP3-IntronGAAGTATGGCAGCATTACGTGGCAGTAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	langes Intron	aTaCAArtCa		C C			
SCEBP3-IntrolTargegeArgeCritcingCoardsVergleich der3'-Enden der Introns10203040 x x x kurzes IntronGAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGCAGTAAATTGTAGGlanges IntronGAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGGCAGTAAATTGTAGGSCBP3-IntronGAAG-ACAGACGACAGCAGacTgTGGAAGTtTTGTgTAGG 60 708090 100 x x x x x kurzes IntronCCTATTCGCTAGCACTTCCACATGGCTCTCCAAACTGTTTGG-CTTTTACCT-TSCBP3-IntronCCTACTCgTGGacCTaccagtCaAATCGCTAGACTaTaaTTa-CaaTTAttaT 110 120 130 140 150 x <tr< td=""><td>CCDDD2 Intron</td><td>alccaayugg</td><td>gi-giac</td><td>+</td><td></td><td></td><td></td></tr<>	CCDDD2 Intron	alccaayugg	gi-giac	+			
Vergleich der 3'-Enden der Introns1020304050 \star \star \star \star kurzes IntronGAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGCAGTAAATTGTAGGSCBBP3-IntronGAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGGCAGTAAATTGTAGGSCBBP3-IntronGAAGTATAGAGCACTACGTTGCACTATAGGCTCTCTCAAACTGTTTG-CTTTGCTTGACATGGlanges IntronCCTATTCGCTAGCACTTCCACTAATGGCTCTCTCAAACTGTTTG-CTTTACCTTlanges IntronCCTATTCGCTAGCACTACACCACCACTGCTCGTCGT-CATGACTGTGACATGGTSCBBP3-IntronCCTATTCGTCAGCACTGCGCCACAGTCGTCATGGTCAT-CACTGACAGCAC-CGTTATCATCGTCATCGTCACAGCTCGTCATCGTCAT-CACCACCACacGCTGTaCTATCGTCATCGTCACAGCTCGTCGTCACTCGTCAT-CACCACCACSCBBP3-IntronCACCATTGTCGTCGTCATGGACATCGTCGTCGTCGTCAT-CATCATGT4CACGacGCTGTaCTTGGAGATGCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCAT-CATCATCATCATacGCTGTaCATCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCAT-CATCATCATCATacGCTGTaCATCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCAT-CATCATCATCATCATacGCTGTaCATCGTGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCAT-CATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATC	SCBBPS-INCION	TalyGyCAlyCC	littigecaalG	L			
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		01 Durden den	T				
1020304050kurzes IntronGAAGTATAGAGAGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGCAGTAAATTGT-AGGSCBBP3-IntronGAAGTATAGAGAGACcaGacAGaCAgacTgTGAAATTGT-AGGSCBBP3-IntronGAAGTATAGAGACcaGacAGaCAgacTgTGAAATTGT-AGTacAGACAGAcaGacAGaCAgacTgTGAAATTGT-AGTacAGTATAGAGAcaGacAGaCAgacTgTGAAATTGT-AGTacAGTATAGAGAcaGacAGaCAgacTgTGAAATTAAadtgGTAAtcgtgATaGT-AGTacAGACAGAcaGacAGaCAgacTgTGAAATTGTTTG-CTTTACCTTlanges IntronCCTATTGCTAGCACTTCCACATATGGCTCTCTCAAACTGTTTG-CTTTACCTT10120101201012010120101201012010120101401010010120101401012010140101201014010120101401012010140101201014010120101801017010180100140100120100180100140100120100140100120100120100140100120100120100120100120100120100140	vergieich der	2Fugeu get	Introns				
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		1.0	20	20	10		БÓ
kurzes Intron langes Intron SCBBP3-IntronGAAGTATAGAGGACTACGGTAGCCATTATATGCAGAGGGCAGTAAATTGTAGG GAgTcagGtttTACGtTgGATAAaGtgGTAAtcgtgATAGTAGt 		10	20		40		50
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	1	^	^ 	^ 	^		
Ianges IntronGACglCagGtttIACGtIgGAIAAGaGtgGIAAtCgtgAIaGIAGtSCBBP3-IntronacAG-AcAGAcaGacAGaCAgacTgTGAAAGTtttTTGGTgAGG60708090100*****kurzes IntronCCTATTCGCTAGCACTTTCCACTAATGGCTCTCTCAAACTGTTTG-CTTTACCTTlanges IntronCATGTGTGACACCACCACCATGTGGTCGTCATGACATGGTGSCBBP3-IntronCCTACTCgTGGCACTGCGTCACAGCAATCGCTAcACTATAATTA-CATTAttaT110120130**kurzes Intron-CGTTATCATCGTCATCGTCACAGGTCGTCATCGTCAT-CATCACCAClanges Intron-CGTTATCATCGTCATCGTCATGGTGAGGATCGTCGTCAT-CATCACCACCACaCGCTGTaCTGAGATGTTTACAAggaatTCGGAAttaaataTgaTCATACATgtaCAg160110170180190*****kurzes IntronCACCATTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATttcatSCBBP3-IntronCACCAATCacagaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATttcatSCBBP3-IntronCACCAATCacagaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCACACCGTCCCAAAscBBP3-IntronCATCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAAlanges IntrontttatcatCATCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-Intron	kurzes intron	GAAGIAIAGAGG		AIIAIAIGCA	GAGGGCAGI.	AAA1	IGIAGG
SCBBP3-IntronacAG-ACAGACaGaCAGaCAGaCAGaCAGaCAGaCAGaCAGaCAGaCAGa	langes Intron	GAgrcagGt	ttTACGtTgG	ATA	-AaaGtgGT	AAtcgtgAl	agrAgt
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	SCBBP3-Intron	acag-acaga	caGacAGaC	AgacigiGaA	AGT		TGTGTGTAGG
xxxxkurzes IntronCCTATTCGCTAGCATTCCACATATGGCTCTCTAAACTGT-TTG-CTTTACCT-Tlanges IntronCCTACTCGTCGCACACAACGGCTACACTATATTA-CAATTGACATGGTSCBBP3-Intron120130110120130130140150150130160140150160170180190160170180190180190180190180190180190180190180190180190180190180190180190180190180190		60	70	80	90	100	
kurzesIntronCCTATTCGCTAGCACTTTCCACTAATGGCTCTCTCAAACTGTTTG-CTTTTACCTTlangesIntronCaTggTCatcAtCACCACcAtTGTGGTcGtCaTTgACaTggTSCBBP3-IntronCCTACTcgTtGacCTacagtCaAATcGCTAcACTaTaaTTa-CaaTTAttaT110120130101201301012013010120130101201301012013010120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130120130140150		*	*	*	*	*	
langesIntronCaTggTCatcAtCACCACcAtTGTGgTcGtCaTTgACaTggTSCBBP3-IntronCCTAcTtcgTtGacCTacagtCaAATcGCTAcACTaTaaTTa-CaaTTAttaT110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120130110120140110120130110120130110120130110120130110120130110120140110	kurzes Intron	CCTATTCGCTAG	CACTTTTCCACTA	ATGGCTCTCT	CAAACTGT-	-11G-C111	TACCTT
SCBBP3-IntronCCTAcTtcgTtGacCTacagtCaAATcGCTAcACTaTaaTTa-CaaTTAttaT110120130140150*****kurzesIntron-CGTTATCATCGTCATCGTCACAGTCGTCATCGTCAT-CATCACCAClangesIntron-GGTcATCATCaTCATaGTggtgGTaGTgATCCTCAT-CAcCACCACSCBBP3-IntronaCGCTgTacTtGagATgtTACAaggaatTCGatAattaaataTgaTCATaCATgtaCAg160170180190***kurzesIntronCACCAATGaTCGTCGTCATTGACATCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATCATlangesIntronCACCAATcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCAT-CATCATCATtttcatSCBBP3-IntronCACCAATaaTtGTaACACCGcaGTaG-CATttCAaatTaAT200210220230240*****kurzesIntronCATCATCATCGTGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAAlangesIntrontAatTtATCAaatTtGTtGTgtTcTGacAtGGCAAaAACCGattTCCCctc250260270280290250260270280290x****kurzesIntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAGlangesIntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAG	langes Intron	CaTggTCatcAt	CACCACcA	tTG	TGg-	-TcGtCaTI	GACaTggT
110120130140150******kurzes Intron-CGTTATCATCGTCATCGTCATCGTCACAGTCGTCATCGTCAT-CATCACCACSCBBP3-IntronaCGcTgTacTtGagATgtTtACAaggaatTCGatAattaaataTgaTCATaCATgtaCAg160170180190****kurzes IntronCACCATTGTCGTCGTCATTGACATCGTCGTCGTCATCATCATCATlanges IntronCACCATGacagaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATttcatSCBBP3-IntronCACCATcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATtttcatSCBBP3-Intron200210220200210220230200210220240****kurzes IntronCATCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAAlanges IntrontttatcatCATCATCATCGTGGTCGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-Intron	SCBBP3-Intron	CCTAcTtcgTtG	acCTacagtCaA	ATCGCT	-АсАСТаТа	aTTa-Caal	TAttaT
******kurzes Intron langes Intron SCBBP3-Intron-CGTTATCATCGTCATCGTCACAGTCGTCATCGTCAT-CATCACCAC aCGCTgTacTtGagATgtTtACAaggaatTCGatAattaaataTgaTCATaCATgtaCAg 160170180190***kurzes Intron langes IntronCACCATTGTCGTCGTCATTGACATCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATCAT CACCAaTcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTGGTCATCATCATCATCATttccat 		110 12	0 130			140	150
kurzesIntron-CGTTATCATCGTCATCGTCATCGTCAGGTCGTCATCGTCAT-CATCACCAClangesIntron-GGTCATCATCATCGTCGTCGTCGTGGTGGATCCTCAT-CACCACCACSCBBP3-IntronaCGCTGTacTtGagATgtTtACAaggaatTCGatAattaaataTgaTCATaCATgtaCAg160170180190*****kurzesIntronCACCATTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATlangesIntronCACCAATcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATttcatSCBBP3-IntrontACaATaaTtGTaACAcCGcaGTaG-CATttCAaatTaAT200210220230240***kurzesIntronlangesIntronttatcatCATCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAAlangesIntronttatcatCATCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-IntronttatcatCATCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-IntroncacaaatttATCAaatTtGTtGTgtTtcTgcaCtgaAaaAaACCGattTCCCctc250260270280290300***kurzesIntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAGlangesIntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGAATAGCCAAtCATCCAACAG		*	* *			*	*
langesIntron-gGTcATCATCATCATGATGGTggtgGTaGTgATCCTCAT-CACCACCACSCBBP3-IntronaCGCTgTacTtGagATgtTtACAaggaatTCGatAattaaataTgaTCATaCATgtaCAg 160170180190*****kurzesIntronCACCATTGTCGTCGTCATTGACATCGTCGTCGTCGTCAT-CATCATCAT CACCAaTcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTGGTGGTCAT-CATCATCATCATttcat tACaATaaTtGTaACAcCGcaGTaG-CATttCAaatTaAT 200210220230240*******kurzesIntronCA-TCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAA ttatcatCATCATCATCGTGGTCGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAA SCBBP3-IntrontAatTtATCAaatTtGTtGTgtTtcTgcaCtgaAaaAaACCGattTCCCctc 250260270280290300********kurzesIntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAG CACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAACCATCCAACAG	kurzes Intron	-CGTTATCATCG	TCATCGTCACAG	TCGTC	A	TCGTCAT-C	CATCACCAC
SCBBP3-IntronaCGCTGTacTtGagATgtTtACAaggaatTCGatAattaaataTgaTCATaCATgtaCAg 160160170180190***kurzes IntronCACCATTGTCGTCGTCATTGACATCGTCGTCGTCGTCATCATCATCAT CACCAaTcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTGGTGTGTCATCATCATCATCATttcat tACaATaaTtGTaACAcCGcaGTaG-CATttCAaatTaAT 200210200210220230200210220230200210220240****kurzes IntronCATCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAA ttatcatCATCATCATGTGGTCGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAA SCBBP3-IntrontAatTtATCAaatTtGTtGTgtTtcTgcaCtgaAaaAaACCGattTCCCctc 250250260270280290300****kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAG langes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG	langes Intron	-gGTcATCATCa	TCATaGTggtgG	TaGTg	A	TCcTCAT-C	CACCACCAC
160170180190****kurzes IntronCACCATTGTCGTCGTCATTGACATCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATlanges IntronCACCAaTcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTGTGTCGTGGTCGTCATCATCATCATCATSCBBP3-IntrontACaATaaTtGTaACAcCGcaGTaG-CATtCAaatTaAT200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200210220230200200200300tAatTtATCAaatTtGTtGTgtTtcTgcaCtgaAaaAaAcCGattCCCtcc250250260270280250260270280250260270280250260270280250260270280250260270280250260270280250 </td <td>SCBBP3-Intron</td> <td>aCGcTgTacTtG</td> <td>agATgtTtACAa</td> <td>ggaatTCGat.</td> <td>Aattaaata</td> <td>TgaTCATaC</td> <td>CATgtaCAg</td>	SCBBP3-Intron	aCGcTgTacTtG	agATgtTtACAa	ggaatTCGat.	Aattaaata	TgaTCATaC	CATgtaCAg
kurzes IntronCACCATTGTCGTCGTCATTGACATCGTCGTCGTCATCATCATCATCATlanges IntronCACCAaTcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATCATCSCBBP3-IntronCACCAATaaTtGTaACAcCGcaGTaG-CATttCAaatTaAT200210220200210220200210220200210220200210220200210220200210220200210220200210220200210220200210230200210220200210230200210220200210230200210230200210230200210230200210230200210230200210230200230240kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAGlanges IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG		160	170	180		190	
kurzes IntronCACCATTGTCGTCGTCGTCATTGACATCGTCGTCGTCGTCATCATCATCAT CACCAaTcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCATCATCATCATCATCAT tACaATaaTtGTaACAcCGcaGTaG-CATttCAaatTaAT 200210220230240******kurzes IntronCATCATCATCGTGGTCGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAA langes IntronCATCATCATCGTGGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAA ctAatTtATCAaatTtGTtGTgtTtcTgcaCtgaAaaAaACCGattTCCCctc 250260270280290300********kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAG langes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAACCATCCAACAG		*	*	*		*	
langes IntronCACCAaTcacgaccaTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTGTCGTGTCGTAGTCATCATCATCATtttcatSCBBP3-IntrontACaATaaTtGTaACAcCGcaGTaG-CATttCAaatTaAT 200200210220230240***kurzes IntronCATCATCATCGTGTCGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAAlanges IntrontttatcatCATCATCATCGTgGTCGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-IntrontAatTtATCAaatTtGTtGTgtTtcTgcaCtgaAaaAaACCGattCCCctc250260270250260270250260270250260270250260250260250260270280290300**kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAGlanges IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG	kurzes Intron	CACCATTG	TCGTCGTCA	TTGACATCGT	CGTCGTCAT	CATCATC	CAT
SCBBP3-IntrontACaATaaTtGTaACAccGcaGTaG-CATttCAaatTaAT 200210220230240******kurzes IntronCATCATCATCGTGGTCGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAA langes IntrontttatcatCATCATCATCGTgGTCGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAA ctAatTtATCAaatTtGTtgTttcTgcaCtgaAaaAaACCGattCCCctc 250260270280290300********kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAACCAACCATCCAACAG langes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG	langes Intron	CACCAaTcacga	ccaTCGTCGTCg	TcGtCgTaGT	CGTaGTCAT	CATCATC	CATtttcat
200210220230240*****kurzes IntronCATCATCATCGTGGTCGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAAlanges IntrontttatcatCATCATCATCGTgGTCGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-IntrontttatcatCATCATCATCGTgGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG	SCBBP3-Intron	tACaATaa	TtG	-TaACAcCGc	aGTaG-CAT	ttCAaatTa	AT
kurzes Intron*****hunges IntronCATCATCATCGTGGTCGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-IntrontttatcatCATCATCATCGTgGTCGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAAtAatTtATCAaatTtGTtGTgTtcTgcaCtgaAaaAACCGattCCCctc250260250270280290300**kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAACCAACCATCCAACAGlanges IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG		200	210	220	230		240
kurzes IntronCATCATCATCGTAGTCGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAAlanges IntrontttatcatCATCATCATCGTgGTCGTCGTCATCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-IntrontAatTtATCAaatTtGTtGTgtTtcTgcaCtgaAaaAaACCGattTCCCctc250260270280290300**kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAACCAACCACCACCAACAGlanges IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG		*	*	*	*		*
langes IntrontttatcatCATCATCATCGTgGTCGTCGTCGTCATCATGATCACACCGTCCCAAASCBBP3-IntrontAatTtATCAaatTtGTtGTgtTtcTgcaCtgaAaaAaCCGattTCCCctc250260270280290300***kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAACCATCCAACAGlanges IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG	kurzes Intron	CA	TCATCATCGTAG	TCGTCGTCAT	CATCATGAT	CACACCG	
SCBBP3-IntrontAatTtATCAaatTtGTtGTtGTtCTgcaCtgaAaaAaACCGattTCCCctc 250260270280290300*********kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAG langes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTgATAgCCAAtCATCCAACAG	langes Intron	tttatcatCA	TCATCATCGTgG	TCGTCGTCAT	CATCATGAT	CACACCG	-TCCCAAA
250260270280290300******kurzes IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAGlanges IntronCACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG	SCBBP3-Intron	tAat	TtATCAaatTtG	TtGTgtTtcT	gcaCtgaAa	aAaACCGat	tTCCCctc
***		250	260	270	280	290	300
kurzes Intron CACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTAATAACCAACCATCCAACAG langes Intron CACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG		*	*	*	*	*	*
langes Intron CACAAATCCTAATGACCTAATCACTTCACAGCACTGATAGCCAAtCATCCAACAG	kurzes Intron	САСАААТССТАА	TGACCTA	ATCACTTCAC	AGCACTAAT.	AACCAACCA	TCCAACAG
	langes Intron	САСАААТССТАА	TGACCTA	ATCACTTCAC	AGCACTaAT.	AqCCAAtCA	TCCAACAG
SCBBP3-Intron CACAAAqCaqqqqGAaCTAqatttAaCACTqCcCtGtcCTtcTtCtTCCtqtAG	SCBBP3-Intron	CACAAAqCaqqq	gGAaCTAgattt.	AaCACTqCcC	tGtcCTtcT	tCt	TCCtqtAG

Abb.39 Vergleich der ersten 700 und letztzen 300 Nucleotide der SCBP-Introns Kurzes bzw. langes Intron bedeutet wieder kurzes bzw. langes SCBP₂-Intron.

Ergebnisse

3.6. Expression rekombinanter SCBPs

3.6.1. Expression von rekombinantem SCBP₃ mit Hilfe des pBluescript-Systems

Bei den SCBP-Klonen, die in der Genbibliothek gefunden wurden, liegt das Insert in dem Expressionsvektor pBluescript vor. Das in diesem System exprimierte SCBP wurde nach der Standardmethode aus den aufgeschlossenen Bakterien präpariert. Dabei gelang es aber nicht, das SCBP vollständig von bakteriellen Proteinen abzutrennen (Abb. 40). Es konnte aber trotzdem gezeigt werden, daß das rekombinante Protein in der Lage ist, Ca⁺⁺ zu binden, obwohl sein N-terminales Ende durch ein vom Vektor stammendes, 45 Aminosäuren großes Peptid verlängert wurde: Das Protein zeigt eine Ca⁺⁺-abhängige Mobilität bei der Elektrophorese in Harnstoffgelen und sogar in der SDS-PAGE. Dies erkärt, warum der gereinigte SCBP-Antikörper nach elektrophoretischer Auftrennung mit mehreren SCBP-Banden reagiert (Abb.40,41).



Abb.40: Präparation von rekombinantem SCBP₃ aus Bakterien mit dem Bluescript-Vektor In der Abbildung sind die Elutionsprofile der chromatographischen Reinigungsschritte dargestellt, die Bereiche der weiter verwendeten Fraktionen sind grau markiert. Die Maße der Gelfiltrationssäule betrugen Ø x h=3cmx90cm, die Flußrate betrug 0,5ml/min; aufgetrennt wurden 15,75mg Protein.

Die Fraktionen der Gelfiltration mit rekombinanten SCBP (0,24mg Protein) wurden in einer lonenaustauscherchromatographie über DEAE-Cellulose aufgetrennt. Die Säulendimensionen waren 1,6x6cm, die Flußgeschwindigkeit war 0,25ml•min⁻¹. Nach Auftragen der Probe wurde die Säule mit 40ml IAC-Puffer gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 300mM NaCl in IAC-Puffer (200ml) eluiert.

Ergebnisse

Eigentlich muß die Expression von rekombinantem Protein mit dem Vektor pBluescript mit IPTG induziert werden. Bei den Expressionsversuchen zeigte sich aber, daß die Expression offensichtlich unabhängig von IPTG, sogar in Gegenwart von Glucose, erfolgt (Abb. 42).



Abb.41: Elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen rekombinanter SCBPs

Verschiedene Fraktionen der Präparation von rekombinantem SCBP₃ wurden elektrophoretisch aufgetrennt (wenn nichts anderes vermerkt, handelt es sich um Coomassie Brilliant Blau-Färbungen):[M, 1 - 6A] SDS-PAGE; [Ca⁺⁺, EGTA] Harnstoffelektrophorese

[M] Molekularmassenstandards; [1] Bakterienlysäte Klon 8.1 (SCBP₃) [1A] wie 1, aber SCBP₃-Nachweis mit SCBP₃-Antikörpern; [2] 35% Ammoniumsulfat-Überstand; [3] 35% Ammoniumsulfat-Pellet; [4] 60°CÜberstand; [4A] wie 4, aber SCBP₃-Nachweis mit SCBP₃-Antikörpern; [5] SCBP₃-haltige Fraktionen der Gelfiltration; [5A] wie 5, aber SCBP₃-Nachweis mit SCBP₃-Antikörpern; [6] SCBP₃-haltige Fraktionen der Ionenaustauscher-Chromatographie; [6A] wie 6, aber SCBP₃-Nachweis mit SCBP₃-Antikörpern;

Nachweis der Ca⁺⁺-Bindung durch Ca⁺⁺-abhängige Mobilität in der Harnstoff-Elektrophorese: Auftrennung der rekombinanten SCBP₃-haltigen Fraktionen der Gelfiltration in Gegenwart von 1mM Ca⁺⁺ [Ca⁺⁺] bzw. 10mM EGTA [EGTA] in einem Harstoffgel.

Die Zahlen und Striche geben die Positionen und Größen der Molekularmassenstandards an, die Pfeile markieren die Postion des SCBP₃.



Abb.42: Induktion der Expression rekombinanten SCBPs durch IPTG

Verschiedene Klone des Bakterienstammes DH5 α F' wurden unter verschiedenen Bedingungen über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in Probenpuffer für die SDS-Elektrophorese aufgenommen, erhitzt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulose wurde mit einem SCBP-Antikörper rekombinantes SCBP₃ nachgewiesen. Rekombinantes SCBP₃ kann in allen Kulturen, deren Zellen die Information für SCBP₃ besitzen, nachgewiesen werden, unabhängig von den Kulturbedingungen. Da hier ungereinigte Antikörper verwendet wurden, wurden noch bakterielle Proteine angefärbt.

[1] reine Bakterien ohne Plasmid; [2] Bakterien mit dem reinen pBluescript-Vektor ohne SCBP₃-Insert; [3] Bakterien mit SCBP₃-Insert, in Gegenwart von 1mM IPTG gewachsen (induziert); [4] Bakterien mit SCBP₃-Insert, in Gegenwart von 0,2% Glucose gewachsen (supprimiert)

Die Striche und die Zahlen geben die Positionen und Größen der Molekularmassenmarker an, der Pfeil markiert die Position des rekombinanten SCBP.

3.6.2. Expression von SCBP₂ und SCBP₃ im Vektor pCR T7/NT-TOPO und Nachweis der Ca⁺⁺-Bindung der rekombinanten Proteine

Die im vorigen Kapitel beschriebene Präparation von rekombinanten SCBP ist immer noch recht umständlich. Mit dem "His-Tag" des Vektors pCR T7/NT-TOPO soll eine schnelle Reinigung der rekombinanten Proteine durch Affinitätschromatographie mit NiNTA-Agarose möglich sein. Deshalb wurden die für SCBP₂ und SCBP₃ codierenden Sequenzen mit Hilfe der Primer 15hi und 15rü bzw. 81hi und 81rü in den genannten Vektor integriert. Die Konstrukte wurden zunächst in Bakterien des Stammes *E.coli* TOP10F' transformiert.

Aus je 7 SCBP₂ bzw. SCBP₃ - Klonen wurde die Plasmid-DNA extrahiert. Anschließend wurde der für SCBP codierende Teil in einer PCR mit Primerpaaren amplifiziert, die diese nur zulassen, wenn die Inserts in der Orientierung vorliegen, bei der die Expression von SCBP möglich ist. In Abb. 43 sind die Amplifizierungsprodukte zweier Klone mit richtig orientiertem Insert abgebildet.



Abb.43: Orientierung der für SCBP codierenden Sequenzen im Vektor pCR T7/NT-TOPO

Die DNA von verschiedenen SCBP₂ und SCBP₃-Klonen im Vektor pCR T7/NT-TOPO wurde isoliert. Mit den Primerpaaren 15hi/pRSET bzw. 81hi/pRSET wurde die Orientierung des Einbaus der Inserts überprüft. Gezeigt wird die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem Agarose-Gel.

[M] Größenmarker; [1] PCR-Produkt eines SCBP₃-Klons in richtiger Orientierung; [2] PCR-Produkt eines SCBP₂-Klon in richtiger Orientierung. Die Positionen der Größenmarker sind mit den Strichen markiert, die Zahlen geben ihre Länge in Anzahl der Basenpaare an.

Die Länge der beiden PCR-Produkte beträgt nach der Elektophorese etwa 630 Basenpaare. Dies passt gut zu dem rechnerisch zu erwartenden Wert von 622 Basenpaaren: Beide für SCBP-codierende Sequenzen sind 534 Basen lang, der Primer pRSET liegt 88 Basenpaare hinter der Insertionsstelle auf dem Vektor.

Die DNA dieser Klone wurde anschließend in den Expressionswirt *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformiert.

Auch in diesem Expressionssystem war die Expression überraschenderweise unabhängig von der Induktion mit IPTG (Abb.44).



Abb.44: Expression von rekombinantem Protein mit und ohne Induktion in BL21(DE3)pLysS

Je zwei Kulturen mit dem Plasmid für rekombinantes SCBP₂ und SCBP₃ wurden einmal unter induzierenden Bedingungen mit IPTG und einmal ohne Induktion bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus 2ml Kulturflüssigkeit abzentrifugiert, in Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen, erhitzt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulose wurden die rekombinanten SCBPs mit dem SCBP₃-Antikörper nachgewiesen.

[1] Klon mit rekombinantem SCBP₃ nach 2 Stunden Kultur ohne IPTG; [2] Klon mit rekombinantem SCBP₃ nach 2 Stunden Kultur mit IPTG; [3] Klon mit rekombinantem SCBP₂ nach 4 Stunden Kultur ohne IPTG; [4] Klon mit rekombinanten SCBP₂ nach 4 Stunden Kultur mit IPTG; die Striche markieren die Positionen der Molekularmassenmarker, die Zahlen geben die zugehörige relative Molekularmasse an.

Trotz des letzten Ergebnisses wurden zur Präparation von rekombinanten SCBP die Zellen in Gegenwart von IPTG kultiviert. Der Zellaufschluß durch Behandlung mit Lysozym und anschließenden Einfrier/Auftauzyklen erwies sich dabei als einfacher als der vom Hersteller als einzige Methode beschriebene Ultraschallaufschluß. In den unlöslichen Bestandteilen nach Aufschluß der Bakterien konnte rekombinantes SCBP nachgewiesen werden. Da die Präparation des SCBPs aus dieser Fraktion recht umständlich ist, und das gesuchte Protein auch in der löslichen Fraktion zu finden war, wurde auf die Elution der unlöslichen Fraktion verzichtet. Das Ergebnis solcher Präparationen wird in Abb.45 gezeigt. Der Nachweis von rekombinanten SCBPs mit Antikörpern zeigt deutlich, daß durch das Säulenmaterial das rekombinante Protein komplett gebunden wird und bei höheren Imidazolkonzentrationen eluiert. Die mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gele zeigen, daß das rekombinante SCBP₃ nach dieser Extrak-



Abb.45: Reinigung rekombinanten SCBPs mit NiNTA und Nachweis der Ca⁺⁺-Bindung

Im oberen Teil sind Coomassie Brilliant Blau gefärbte Gele, im unteren Teil werden in denselben Fraktionen wie direkt darüber rekombinantes SCBP mit dem jeweils spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Striche markieren die Positionen der Molekularmassemarker, die Zahlen geben die zugehörige relative Molekularmasse an. Die Pfeile auf den linken Seiten markieren die Position der Ca⁺⁺-freien bzw. Ca⁺⁺-haltigen Form des SCBP in den Gelen der SDS-PAGE, entsprechendes gilt für die Pfeile auf den rechten Seiten für die Harnstoffgele. [A] Präparation von rekombinanten SCBP₃; [B] Präparation von rekombinanten SCBP₂; [M, 1-

7] SDS-PAGE; [Ca, EG] Harnstoff-PAGE

[M] Molekulargewichtsmarker; [1] geklärtes Lysat; [2] Durchfluß; [3] Waschfraktion; [4] Eluat; [5] 80% Ammoniumsulfat-Pellet des Eluats; [6] eingeentes Eluat mit 5mM Ca⁺⁺ in der Elektrophorese-Probe; [7] eingeentes Eluat mit 10mM EGTA in der Elektrophorese-Probe; [Ca] Eluat mit 1mM Ca⁺⁺ in der Elektrophorese-Probe; [EG] Eluat mit 10mM EGTA in der Elektrophorese-Probe. tion fast rein ist. Die Präparation von SCBP₂ war aus unbekannten Gründen problematischer als die des SCBP₃. Die Ausbeute war geringer als bei SCBP₃, z.T. ließ es sich nicht völlig rein präparieren.

Wurden Proteine aus Bakterien untersucht, die rekombinantes SCBP enthielten, wurden nach elektrophoretischer Auftrennung dieser Proteine oft mehrere Banden gefunden, die sich mit SCBP-Antikörpern nachweisen ließen (Abb.44). Da in einem Klon eigentlich maximal ein SCBP zu finden sein sollte, wurde untersucht, ob sich die Vervielfachung der Banden darauf zurückführen läßt, daß SCBP selbst bei der SDS-PAGE in der Lage sind, Ca⁺⁺ zu binden. Die Bahnen 6 und 7 der Abbildung 45 zeigen, daß dies tatsächlich der Fall ist: In Gegenwart von Ca⁺⁺ haben rekombinantes SCBP₂ und SCBP₃ eine höhere elektrophoretische Mobilität als ohne Ca⁺⁺. Interessant ist in diesem Zusammenhang insbesondere die Auftrennung des Eluats des rekombinanten SCBP₃ (Abb. 45, Teil A, Bahn 4): Die Probe ansich enthält offensichtlich kein oder nur sehr wenig Ca⁺⁺, so daß das SCBP₃ eigentlich in einer Bande mit geringer elektrophoretischer Mobilität laufen müßte. Aus der daneben liegenden Bahn müssen aber Spuren von Ca⁺⁺ in die Bahn der Eluat-Probe diffundiert sein und haben so einen Teil des SCBP₃ mobilisiert. Dies erklärt den kurvenförmigen Verlauf der SCBP-Bande in Bahn 4.

Auch in der Harnstoffelektrophorese konnte sowohl für das rekombinante SCBP₂ als auch für das SCBP₃ eine Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität nachgewiesen werden. Also haben beide SCBP ihre Fähigkeit, Ca⁺⁺ zu binden behalten, obwohl durch die Integration in den Expressionsvektor ein relativ großes Peptid an das N-terminale Ende der Proteine gehängt wurde.

Es fällt dabei auf, daß sich die Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität der beiden SCBP gewissermaßen reziprok verhält: In der SDS-PAGE hat das SCBP₃ einen größeren Unterschied in der elektrophoretischen Mobiliät zwischen Ca⁺⁺-freier und Ca⁺⁺-haltiger Form als das SCBP₂, in der Harnstoff-PAGE ist dies umgekehrt. Beiden Formen gemeinsam ist, daß in der SDS-PAGE die Ca⁺⁺ -haltige Form die höhere elektrophoretische Mobilität hat, in der Harnstoff-PAGE ist dies die Ca⁺⁺-freie Form.

Die relative Molekularmasse der Ca⁺⁺-freien SCBPs nach der SDS-PAGE beträgt etwa 27000. Die aus der Sequenz abgeleitete relative Molekularmasse beider

SCBPs beträgt etwa 20000, die des durch den Vektor an die rekombinanten Proteine angehängten Peptides etwa 4000. Die Summe 24000 paßt im Rahmen der Meßgenauigkeit zu den beobachteten 27000.

Die Ausbeute an rekombinantem Protein beträgt etwa 2-4% der löslichen Proteine oder etwa 1-10mg pro Liter Kulturflüssigkeit.

Die Ausbeute der SCBP-Präparation aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms beträgt 240mg/kg Feuchtgewicht. Pro Kilogramm Bakterien wurden bei bester Ausbeute 1950mg SCBP₃ erzielt, bei schlechtester Ausbeute 252mg SCBP₂.

Nummer des Expressionsversuchs	13	14a	17	18
SCBP-Typ	SCBP ₂	SCBP₃	SCBP ₂	SCBP ₃
Kulturvolumen	250ml	250ml	500ml	500ml
Ausbeute Bakterien	1,35g	1,52g	1,98g	2,46g
Proteine im geklärten Lysat	9,1mg	77,3mg	45,4mg	138,5mg
Ausbeute löslicher Proteine bezogen auf Bakterienmenge	0,7%	5,1%	2,3%	5,6%
Proteine im Eluat	0,34mg	1,23mg	0,75mg	4,80mg
Ausbeute eluierte Proteine bezogen auf lösliche Proteine	3,7%	1,6%	1,7%	3,5%
Reinheit des Eluats (gezeigt wird die elektrophoretische Auftrennung der von der NiNTA-Säule eluierten Proteine in der SDS-PAGE. Da nur die Reinheit der eluierten Fraktion demonstriert weren soll, wurde auf die Darstellung der Größenstandards ver- zichtet.)				

Tabelle 4: Ausbeuten bei Präparationen von rekombinanten SCBP mit NiNTA



3.7. Räumliche Struktur von SCBP2 und SCBP3

Abb.46:Räumliche Struktur verschiedener SCBPs

Gezeigt wird die räumliche Struktur des SCBP₂ ("Lumte SCBP2") und des SCBP₃ ("Lumte SCBP3") des Regenwurms *Lumbricus terrestris* sowie die des SCP ("Nerdi SCP") des Seeringelwurms *Nereis diversicolor*. Die Strukturen der Regenwurm SCBPs sind Vorhersagen von Swissmodel (Guex und Peitsch1997; Peitsch1996; Peitsch 1995) nach den entsprechenden Aminosäuresequenzen, die des Seeringelwurms ist aus der Datei "2SCP" (Vijay-Kumar und Cook 1992, aus aus PBDLite). Die Abbildung wurde mit dem Programm Deep View angefertigt.

Die einander entsprechenden EF-Hände sind immer in dergleichen Farbe dargestellt, beim SCBP des Seeringelwurms sind sie zusätzlich beschriftet.

Aus den abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde bei Swissmodel (Guex und Peitsch1997; Peitsch1996; Peitsch 1995) die vermutliche räumliche Struktur der SCBPs des Regenwurms berechnet (Abb. 46). Dabei zeigte sich, daß ihre Strukturen nahezu identisch sind und auch mit der des SCBPs aus dem Seeringelwurm *Nereis diversicolor* übereinstimmen.

Werden die räumlichen Strukturen von SCBP₂ und SCBP₃ übereinander gelegt, sind die strukturellen Unterschiede besser zu erkennen (Abb. 47).



MSAFYLR<u>KLKTYFAATDTDKDGVLTENDYHEMARRF</u>IDIVKLDDAQGKKLHALAAKVW <u>NDFFKGWATDGKSLTQDQLIASFL</u> KRRSDPKFLESLK <u>LMTVEFHVVDINKDGSIQLDEFTIMFRFHGIDAA</u> HAKASFEAIDSNSDGVISLDEFLTAVVDFFTGEDEKSSSRLFWGPLV

Abb.47: Unterschiede in der räumlichen Struktur bei SCBP₂ und SCBP₃

In der Abbildung wird das SCBP₃ des Regenwurms grau dargestellt, die Bereiche, in denen die räumliche Struktur des SCBP₂ von der des SCBP₃ abweicht sind rot eingezeichnet. Unter dem Modell ist die Aminosäuresequenz des SCBP₂ notiert. Hier sind die EF-Hände unterstrichen und die Aminosäuren, die die in der räumlichen Struktur abweichenden Bereiche bilden, sind rot markiert. Die Strukturen der Regenwurm SCBPs sind Vorhersagen von Swissmodel (Guex und Peitsch1997; Peitsch1996; Peitsch 1995). Die Abbildung wurde mit dem Programm Deep View angefertigt.

Das SCBP₂ weicht im wesentlichen an drei Positionen vom SCBP₃ ab. Diese drei Bereiche sind die nicht Ca⁺⁺-bindende EF-Hand, der Bereich zwischen dritter und vierter EF-Hand sowie der C-terminale Teil hinter der letzten EF-Hand.

4. Diskussion

4.1. Gibt es SCBP bei Nematoden?

Im Regenwurm *Lumbricus terrestris* wird SCBP vorzugsweise in schnell kontrahierenden Muskelfasern gefunden (Huch et al.1988; Huch und D'Haese 1992). Diese stellen den größten Teil der Muskulatur des Hautmuskelschlauchs und zeichnen sich durch eine besondere Isoform der regulatorischen leichten Kette des Myosins aus (Carlhoff 1988; D' Haese und Carlhoff 1987).

Der Hautmuskelschlauch der Nematoden besteht lediglich aus Längsmuskulatur, der des Regenwurms aus Längs- und Ringmuskulatur, die Muskelzellen selber sind bei beiden Gruppen aber ähnlich aufgebaut. Es sind schräg gestreifte Muskelzellen (Mill und Knapp 1970; Rosenbluth 1965). Diese Ähnlichkeit im grundsätzlichen Aufbau läßt es möglich erscheinen, bei Nematoden SCBPs zu finden. Dennoch konnte weder bei *Caenorhabditis elegans* noch bei *Ascaris suum* ein Protein mit den Eigenschaften der SCBPs gefunden werden.

Die Ähnlichkeit in der Anordnung der Elemente des kontraktilen Apperates bei Nematoden, die zu der Schrägstreifung der Muskulatur führt, setzt sich offensichtlich nicht in allen Details des Muskelaufbaus und der beteiligten Proteine fort. Im Gegensatz zu *Lumbricus terrestris* wurden bei *Caenorhabditis elegans* keine unterschiedlich schnell kontrahierende Muskelfasern beschrieben, wobei dessen Muskulatur sehr gut untersucht ist (Moerman und Fire 1997). Das Fehlen von SCBP in der Muskulatur des Hautmuskelschlauchs der untersuchten Nematoden ist ein weiterer Hinweis auf Unterschiede in der Muskulatur zwischen den Tierstämmen.

Es wäre denkbar, daß bei Nematoden SCBP zwar nicht im Hautmuskelschlauch vorkommt, wohl aber in anderen Muskeln. Die einzige Möglichkeit dafür wäre die Pharynx-Muskulatur, die als schnell relaxierend beschrieben wird (Avery 1993; Davis et al. 1995). Die Pharynxmuskulatur von *Ascaris suum* wurde nicht auf ihren SCBP-Gehalt untersucht. Bei *Caenorhabditis elegans* wurden komplette Tiere und damit auch der Pharynx untersucht. Die Pharynxmuskulatur liegt in wesentlich geringerer Menge vor als die Längsmuskulatur des Hautmuskelschlauchs. Deshalb könnte es sein, daß die SCBP-Menge aus dieser Muskulatur so gering war, daß sie in den Experimenten nicht gefunden wurde. Dies ist aber nicht wahrscheinlich: Sollen SCBPs als relaxierende Faktoren wirken, müssen sie in hoher Konzentration im Muskel vorliegen. Im Thorax von Drosophila und Calliphora stellen die asynchronen, SCBPfreien Flugmuskeln den größten Teil der Muskulatur. Trotzdem konnten die SCBPs der synchronen Muskulatur problemlos nachgewiesen werden. Die Methode sollte also in der Lage sein, auch dann SCBP nachzuweisen, wenn es nur in der Pharynxmuskulatur zu finden wäre.

Ein weiterer Hinweis, daß in der Muskulatur der untersuchten Nematoden tatsächlich kein SCBP vorhanden ist, ist, daß auch bei der Durchsuchung des vollständig sequenzierten Genoms von *Caenorhabditis elegans* kein SCBP gefunden werden konnte. Diese Suche wurde so gestaltet, daß in dem Genom nach Sequenzen gesucht wurde, die entweder dem SCBP₂ oder SCBP₃ des Regenwurms oder einem allgemeinen SCBP (s.u.) ähneln. SCBPs sind sehr polymorphe Proteine, die untereinander nur sehr wenig Ähnlichlichkeit zeigen. So ist es denkbar, daß mit dem beschriebenen Vorgehen ein von Caenorhabditis codiertes SCBP deshalb nicht gefunden wurde, weil die Ähnlichkeit mit den "Musterproteinen" zu gering ist. Dagegen spricht, daß mit dem beschriebenen Vorgehen die SCBPs von *Drosophila melanogaster*, die mit den Musterproteinen nur relativ geringe Ähnlichkeiten teilen, problemlos gefunden wurden.

Es deutet also alles darauf hin, daß zumindest die untersuchten Nematoden für die Funktion ihrer Muskulatur kein SCBP benötigen. Dies wäre auch nicht ohne Beispiel: Bei Plathelminten und Echinodermen konnte ebenfalls kein SCBP isoliert werden (Cox 1996).

4.2. SCBP bei Drosophila und Calliphora

Sowohl bei *Drosophila melanogaster* als auch bei *Calliphora erythrocephala* konnten Proteine nachgewiesen werden, die alle physikalischen Eigenschaften der SCBPs haben: Sie sind löslich bei geringer Ionenstärke, sowohl säure- als auch hitzestabil und binden Ca⁺⁺. Ihre relative molekulare Masse ist 24k.

Eine Verwechslung mit anderen Ca⁺⁺-bindenden Proteinen des Muskels kann ausgeschlossen werden: Die regulatorische leichte Kette des Myosins - ein ebenfalls

Diskussion

Ca⁺⁺-bindendes Protein vergleichbarer Masse - bindet bei den gewählten Extraktionsbedingungen an die schweren Myosinketten und befindet sich deshalb im Rohextraktpellet. Eventuell dennoch im Rohextrakt vorhandene Verunreinigungen fallen bei Einstellen des pH 5,5 im Rohextrakt aus (Abb.17).

Es kann auch ausgeschlossen werden, daß das weit verbreitete Calmodulin mit dem gefundenen Protein identisch ist: Im ersten Präparationsschritt findet die Extraktion löslicher Proteine in Gegenwart von Ca⁺⁺ statt. Unter diesen Bedingungen bindet Calmodulin an seine Zielproteine und ist ähnlich wie die leichten Myosinketten unlöslich (Nelson und Chazin 1998, O´ Neil und DeGrado 1990). Diese Eigenschaft wird auch bei der hydrophoben Interaktionschromatographie ausgenutzt: In Gegenwart von Ca⁺⁺ bindet Calmodulin an dieses Säulenmaterial (Gopalakrishna und Anderson 1982), SCBP (Cox 1989) - und das 24k-Protein aus Drosophila - binden nicht daran.

SCBPs werden in hoher Konzentration - bis 350µM - in schnell kontrahierenden Muskeln gefunden (Gerday 1988). Die indirekte Flugmuskulatur von Dipteren besteht aus besonders schnell kontrahierenden Muskeln, aber gerade in ihnen konnte kein SCBP nachgewiesen werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in dem ungewöhnlichen Mechanismus der Stimmulierung der Kontraktion dieser Muskulatur: Die Kontraktion der indirekten Flugmuskulatur wird ausgelöst, wenn in dem Muskel eine erhöhte Ca⁺⁺-Konzentration vorliegt und wenn der Muskel gespannt wird (s. Einleitung). Unter diesen Umständen ist eine schnelle Löschung des Ca⁺⁺-Signals für eine erneute Kontraktion nicht notwendig. Aus diesem Grund ist die indirekte Flugmuskulatur nicht auf das Ca⁺⁺-Puffersystem der SCBPs zur schnellen Relaxation angewiesen. In der synchronen Muskulatur des Tergotrochantermuskel und der Beinmuskulatur wird das Ca⁺⁺-Signal durch SCBP gelöscht. Obwohl synchrone Muskeln nur einen geringen Anteil der Muskulatur des Thorax stellen, ist das SCBP in so hoher Konzentration vorhanden, daß es schon im Rohextrakt des Thorax zu identifizieren ist.

Bei den SCBP-Präparatonen aus ganzen Drosophila wurden bei der Harnstoffelektrophorese zwei Proteinbanden mit Ca⁺⁺-abhängiger elektrophoretischer Mobilität gefunden (Abb. 20), ebenso eluierten bei der Ionenaustauscherchromatographie zwei Proteinpeaks (Abb. 19). In beiden Versuchen wurde eine Mischung aus verschiedenen Drosophila - Stämmen untersucht. Bei der Untersuchung verschiedener Tagmata und einzelner Muskeln wurden nur Tiere des Wildtyp – Stammes Oregon R
verwendet. In diesen Fällen wurde bei der Harnstoffelektrophorese nur eine Proteinbande mit Ca⁺⁺-abhängiger elektrophoretischer Mobilität gefunden (Abb. 22). Dies könnte bedeuten, daß in verschiedenen Drosophila-Stämmen verschiedene SCBP-Isoformen vorhanden sind. In welchem Stamm welche Isoform vorhanden ist, oder ob auch beide Isoformen in nur einem Stamm existieren, wurde nicht untersucht.

SCP1 und SCP2 sind zwei aus *Drosophila melanogaster* isolierte EF-Hand-Proteine (Kelly 1990, Kelly et al. 1997). Insbesondere SCP1 hat identische Eigenschaften wie das hier beschriebene SCBP: Es ist bei niedriger Ionenstärke löslich, hitzestabil und bindet Ca⁺⁺. Nachdem zunächst eine muskuläre Lokalisation verneint wurde (Kelly 1990), stellte sich später heraus, daß es in hoher Konzentration in dem Tergotrochantermuskel vorkommt (Kelly et al. 1997). Dieses Protein ist wahrscheinlich mit dem hier beschriebenen SCBP aus Drosophila identisch. Das von Kelly beschriebene SCP2 soll hingegen nur in Nervengewebe exprimiert werden. Die Konzentration muß dabei aber recht gering sein, bei der Untersuchung von Kopf- und Thoracalganglionextrakten konnten keine Spuren dieses Proteins nachgewiesen werden.

Bei der Sequenzierung des Genoms von *Drosophila melanogaster* wurde eine Sequenz ("CBP") gefunden, deren Transkript aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem SCBP aus *Perinereis vancaurica tetradentata* als sarkoplasmatisches Ca⁺⁺bindendes Protein bezeichnet wird. Aus demselben Grund wird als Herkunft das Sarkoplasma angegeben (Flybase, Gen CBP, CT3375, FBan0001435). Experimentell wurden diese Befunde aber nicht überprüft.

Dieses "CBP" hätte aber für ein SCBP eine ungewöhliche Struktur: Zum einen ist es mit einer Länge von 296 Aminosäuren und einer relativen molekularen Masse von 33784 für ein SCBP ungewöhnlich groß, zum anderen hat es mit pH 7,05 einen ungewöhnlich hohen isoelektrischen Punkt. Alle anderen bekannten SCBPs und verwandte Proteine haben einen im sauren Bereich liegenden isoelektrischen Punkt (Tabelle 5).

Name	Anzahl AS	MG	IEP
Drome CBP	296	33784	7,05
Brala-SCP-1	185	21419	4,48
Brala SCP 2	185	21286	4,40
Patye SCP	179	20375	4,50
Ponle SCP	192	21626	4,46
Pensp SCP 1	191	21852	4,49
Pensp SCP 2	192	21968	4,40
Nerdi SCP	174	19486	4,25
Pervt SCP	174	19525	4,41
Lumte SCBP3	177	19642	4,72
Lumte SCBP2	177	20131	4,88
Drome SCP1	189	21648	4,67
Drome SCP2	184	21280	4,36
Common	186	20829	4,03
Patye-SCPA	178	20347	4,62
Patye-SCPB	178	20465	4,64
Merlu-SCP	180	20809	4,96
Venph-SCP	180	20881	4,83
Sacer-Calerythrin	177	19246	4,36

Tabelle 5: Physikalische Eigenschaften von SCBPs und verwandten Proteinen

Die Struktur des Drosophila CBP kann willkürlich in zwei Teile geteilt werden: Der Cterminale Teil ist der, der tatsächlich große Ähnlichkeit mit SCBPs hat. In diesem Bereich liegen vier EF-Hand-Domänen (siehe Abb. 47), von denen eine die Fähigkeit verloren hat, Ca⁺⁺ zu binden. Es gibt dabei eine Besonderheit: Wurden verschiedene SCBPs innerhalb einer Gruppe - z.B. Anneliden - oder einer Art gefunden, war bei allen SCBPs entweder immer die zweite oder die vierte EF-Hand nicht mehr in der Lage, Ca⁺⁺ zu binden. Bei dem Drosophila CBP kann die zweite EF-Hand kein Ca⁺⁺ mehr binden, bei beiden Drosophila SCPs - von denen wenigstens eines sicher im Sarkoplasma lokalisiert ist - ist dies die vierte EF-Hand. Der N-terminale Teil des Drosophila CBP ist etwa 120 Aminosäuren lang. Er enthält keine weiteren EF-Hände und wurde bisher bei keinem weiteren SCBP nachgewiesen.

Es scheint unwahrscheinlich, daß ein Zusammenhang zwischen den SCBPs aus Drosophila und dem CBP besteht. Die Molekularmasse unterscheidet beide Proteine deutlich. Weiterhin geben die Sequenzen der Drosophila-SCP (Kelly et al. 1997) und der Regenwurm-SCBPs keinen Grund zur Annahme, daß das CBP ein Vorläuferprotein ist, aus dem reife SCBPs heraus geschnitten werden.

Diskussion

4.3. Die drei SCBPs des Regenwurms

Bei den ersten Versuchen, SCBP aus dem Regenwurm zu isolieren, wurden drei nacheinander in der Ionenaustauscherchromatographie eluierende SCBP-Isoformen gefunden. Das bei der niedrigsten Salzkonzentration eluierende SCBP₁ konnte jedoch bei weiteren Versuchen nicht oder nur in geringer Menge isoliert werden (Huch et al. 1988). Dies ist auch der Grund, warum nur gegen die Isoformen 2 und 3 gerichtete Antikörper existieren.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit gezeigten Versuch, SCBP aus der Muskulatur des Regenwurms zu isolieren, konnte noch einmal gezeigt werden, daß es drei Isoformen des SCBP des Regenwurms gibt (Abb. 28). Aber auch hier wurde das SCBP₁ nur in sehr geringer Konzentration gefunden. Sein sicherer Nachweis gelang erst durch eine Kreuzreaktion mit dem anti- SCBP₃-Antikörper. In dem gezeigten Versuch wurden insgesamt etwa 4mg SCBP isoliert, SCBP₁ hatte daran einen Anteil von etwa 5%, SCBP₂ von etwa 35% und SCBP₃ von ca. 60%.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß es prinzipiell möglich sein müßte, durch die Kreuzreaktion der Antikörper nicht nur Klone für das SCBP₂ und SCBP₃ aus der Genbibliothek zu isolieren, sondern auch für das SCBP₁. Der geringe Anteil des SCBP₁ am Gesamt-SCBP läßt aber vermuten, daß auch die SCBP₁ – cDNA nur in geringer Konzentration in der Genbibliothek vorhanden und dementsprechend schwierig zu finden ist. In der Tat konnten alle weiteren SCBP-Klone, die im Laufe dieser Arbeit gefunden, hier aber nicht vorgestellt wurden, immer eindeutig dem SCBP₂ oder SCBP₃ zugeordnet werden.

Es liegt zwar nahe zu vermuten, daß die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Aufgaben haben, nachgewiesen werden konnte dies aber bisher nicht. SCBP₂ und SCBP₃ traten in den untersuchten Organen des Regenwurms - Hautmuskelschlauch, Muskelmagen - immer gemeinsam auf (Huch 1991). Aber auch bei anderen Tieren, die verschiedene Isoformen von SCBP (Lanzetfischchen) oder Parvalbumin (Karpfen) haben, konnte keine Zuordnung von bestimmten Isoformen zu bestimmten Organen oder Aufgaben gefunden werden (Gerday 1988).

Diskussion

4.4. Sequenz und Struktur von SCBP₂ und SCBP₃

Das Durchsuchen der cDNA-Genbibliothek ergab zwei Klone mit unterschiedlicher Sequenz, denen je eine der bisher bekannten SCBP-Isoformen zugeordnet werden konnte. Dazu wurden die bekannten Aminosäurezusammensetzungen der SCBPs (Huch et al. 1988) mit den aus der cDNA abgeleiteten verglichen. So konnte den Klonen 8.1/4.1 das SCBP₃ und dem Klon 15.1 das SCBP₂ recht eindeutig zugeordnet werden. Bei dieser Zuordnung wurde ausgenutzt, daß experimentell abhängig von den verschiedenen Isoformen einige Aminosäuren nicht nachgewiesen werden konnten und die auch nicht in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu finden waren. Ein gewisses Problem macht dabei die Aminosäure Methionin. Experimentell wird sie in SCBP₃ nicht und in SCBP₂ nur in geringer Menge gefunden, kommt in den entsprechenden Sequenzen aber einmal bzw. viermal vor. Möglicherweise erklärt sich diese Abweichung damit, daß alle bisher direkt untersuchten SCBPs N-terminal modifiziert waren (Collins et al. 1988). Die Aminosäuresequenz dieser Proteine wurde unmittelbar bestimmt und nicht mit Hilfe einer cDNA. Dabei war nie Methionin die erste Aminosäure. Wenn die SCBPs des Regenwurms auf eine ähnliche Weise posttranslational modifiziert werden, würde dies gut erklären, warum bei dem nativen SCBP₃ kein Methionin gefunden wird. Diese würde dann bei einer N-terminalen Modifikation entfernt werden.

Die aus der Aminosäuresequenz berechneten relativen Molekularmassen für SCBP₂ und SCBP₃ liegen so dicht beieinander, daß sich die beiden Isoformen in der SDS-PAGE nicht unterscheiden lassen sollten. Dies ist aber offensichtlich nicht der Fall, die nativen Proteine zeigen einen gut meßbaren Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität.

Dieser Unterschied zwischen der Vorhersage und der tatsächlichen Beobachtung ist auf sequenzbedingte Unterschiede zurückzuführen - z.B. unterschiedlich effektive Bindung des Detergenz SDS. Die berechneten isoelektrischen Punkte liegen in der Größenordnung, die auch durch die isoelektrische Focussierung bestimmt wurde. Insbesondere bestätigt hier die Tatsache, daß SCBP₃ saurer als SCBP₂ ist, die nach der Aminosäurezusammensetzung getroffene Zuordnung der cDNA-Sequenzen zu den nativen SCBPs. Aus der Sequenz der Regenwurm-SCBPs sollten sich die Strukturmerkmale der SCBPs - vier EF-Hände in charakteristischen Abständen - ableiten lassen

Die Untersuchung der aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigte, daß die SCBPs des Regenwurms alle genannten Kriterien erfüllen und so als typische SCBPs angesehen werden können (Abb. 48).

SCBP₂ des Regenwurms

MSAFYLRKLKTYFAAT <mark>DTDKDGVLTEND</mark> YHEMARRFIDIVKLDDAQGKKLHALAAKVW	22
NDFFKGWATDGKSLTQDQLIASFL KRRSDPKFLESLK	13
LMTVEFHVV D I N K D G S I Q LD E FTIMFRFHGIDAA	5
HAKASFEAI <mark>D</mark> S N S D G V I S LD E FLTAVVDFFTGEDEKSSSRLFWGPLV	

 $SCBP_3$ des Regenwurms

 MADAFIERKLKTYFSRIDFDKDGAITRSDFEGLGTRFVESEKLDAAKGADLKAKLVQVW
 22

 EQYLKGVVSDGTRLTQAVFVEAV
 KKQLGDPNFKKVLAG
 15

 PLPLFFSAVDGNGDGLIQKDEFQLFFKLLGIPE
 4

 SAEKSFEAIDTNKDGDISKEEFVIAGTDFFTSTDESSPSKYFWGPLV
 4

Abb.48:EF-Hände in den Isoformen des SCBPs des Regenwurms

In dieser Abbildung wurden die Sequenzen der Isoformen der SCBPs des Regenwurms so aufgeteilt, daß in jeder Zeile eine EF-Hand zu finden ist, wobei die Sequenzen so angeordnet wurden, daß die offensichtlich am stärksten konservierte Minisequenz "DG" des Ca⁺⁺bindenden Loops immer an der selben Stelle liegt. Die EF-Hände insgesamt sind rot wiedergegeben, der Ca⁺⁺-bindende Teil ist unterstrichen, die an der Koordination von Ca⁺⁺ beteiligten Aminosäuren sind fett. Die Zahlen an den Seiten geben die Anzahl der Aminosäuren an, die zwischen den einzelnen EF-Händen liegen.

Beide Isoformen des SCBP haben vier EF-Hände, deren Abstand voneinander die bisher gefundene Unregelmäßigkeit einhalten. Die zweite EF-Hand ist hier offensichtlich so verändert, daß sie kein Ca⁺⁺ mehr binden kann. Dies erschwert allerdings die Bestimmung der Abstände zwischen der ersten und zweiten bzw. zweiten und dritten EF-Hand. Aus diesem Grunde könnten die Abstände zwischen diesen Domänen auch mit etwas anderen Werten als in Abbildung 46 angegeben angegeben werden. An dem charakteristischen Schema der Abstände der EF-Hand-Domänen würde dies aber nichts ändern.

In den je drei als Ca⁺⁺-bindend eingestuften EF-Händen der SCBPs sind gegenüber dem in Abbildung 2 gezeigten Grundschema kleinere Abweichungen zu beobachten: Die zweite Asparaginsäure ("D") des Ca⁺⁺-bindenden Loops der kanonischen EF-Hand ist in einigen der Loops durch Asparagin ("N") ersetzt. Dies ist aber nicht ungewöhnlich und kommt auch bei anderen gleichartigen Proteinen vor (s. Abb.49). Für die Koordination von Ca⁺⁺ ist es wichtig, daß der letzte Ligand zwei Koordinationsstellen zur Verfügung stellt (Nelson und Chazin 1998, Kawasaki et al 1998). Dies ist zwar in der Regel Glutaminsäure ("E"), diese kann aber auch - wie hier in der ersten EF-Hand-Domäne - durch Asparaginsäure ("D") ersetzt werden.

In der Aminosäuresequenz beider SCBPs des Regenwurms wurden also je drei EF-Hand-Motive gefunden, die ihrer Struktur nach Ca⁺⁺ binden können müßten. Dies stimmt zumindest für das SCBP₃ gut mit experimentellen Daten überein (Huch 1991): In der Gleichgewichtsdialyse in Gegenwart von 1mM MgCl₂ band das SCBP₃ 3 Mol Ca⁺⁺ pro 1 Mol Protein mit einer Dissoziationskonstanten von etwa 1,3 \cdot 10⁻⁷Mol/l.

Beim SCBP₂ ist die Lage weniger eindeutig. In einem gleichartigen Experiment band das SCBP₂ nur 2 Mol Ca⁺⁺ pro 1 Mol Protein mit einer Dissoziationskonstanten von etwa 1,5 · 10⁻⁷Mol/I. In einem Flußdialyseexperiment wurden dagegen Hinweise gefunden, daß das SCBP₂ bis zu zwei weitere Bindungsstellen für Ca⁺⁺ hat, die in Abwesenheit von Magnesium mit einer Dissoziationskonstanten von etwa 1 · 10⁻⁵Mol/I Calcium binden. Dies ließe sich so interpretieren, daß die drei in der Sequenz gefundenen EF-Hand Motive unterschiedlich Ca⁺⁺ binden. Vergleicht man die an der Ca⁺⁺-Koordination beteiligten Aminosäuren von SCBP₂ und SCBP₃ miteinander, so sind diese weitestgehend identisch. Ein Unterschied ist nur bei der vierten an der Koordination beteiligten Aminosäure zu sehen. An dieser Stelle wird aber das zur koordinativen Bindung von Ca⁺⁺ benötigte Sauerstoffatom von der Peptidbindung zur Verfügung gestellt, so daß sich ein Unterschied in der Ca⁺⁺-Bindung hier nicht durch die unterschiedlichen Aminosäuren begründen läßt. Demnach sollten SCBP2 und SCBP3 eigentlich Ca⁺⁺ gleichartig binden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch die nicht unmittelbar an der Ca⁺⁺-Bindung beteiligten Aminosäuren einen modulierenden Einfluß haben. Bisher konnte aber noch kein Zusammenhang zwischen dem Typ der EF-Hand (Ca⁺⁺-spezifisch oder Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-bindend) und ihrer Seguenz ermittelt werden (Celio et al.1996). Deshalb kann hier nicht entschieden werden, welche der EF-Hände des SCBP₂ Ca⁺⁺ mit hoher und welche mit niedriger Affinität bindet.

Vergleicht man die Sequenzen von SCBP₂ und SCBP₃ des Regenwurms miteinander, stimmen sie nicht einmal zu 50% überein (Tabelle 6), die Unterschiede zum SCBP des Seeringelwurms *Nereis diversicolor* sind zum Teil sogar noch größer.

Referenz	SCBP ₂	SCBP ₃	Nereis-SCBP
SCBP ₂	-	47	37
SCBP ₃	47	-	49
Nereis-SCBP	38	48	-

Tabelle 6: Ähnlichkeiten von SCBPs

Zur Berechnung der Ähnlichkeit wurden die Sequenzen der gezeigten Proteine mit dem Programm "Align" verglichen und der Prozentsatz der übereinstimmenden Aminosäuren bezogen auf die Länge des Referenzproteins berechnet. Bei unterschiedlich langen Proteinen werden dabei abhängig von der Wahl des Referenzproteins unterschiedliche Werte gefunden.

Vergleicht man aber die - wahrscheinliche - räumliche Struktur der drei Proteine miteinander, so sind sie nahezu identisch (Abb. 46, 47). Das SCBP₃ des Regenwurms und das SCBP Seeringelwurms haben weitestgehend dieselbe räumliche Struktur, das SCBP₂ des Regenwurms zeigt Abweichungen in drei Bereichen von den beiden anderen SCBPs. Einer dieser Bereiche ist in der EF-Hand, die kein Ca⁺⁺ mehr binden kann, lokalisiert.. Ein weiterer Bereich liegt im C-terminalen Teil des Proteins hinter der letzten EF-Hand-Domäne. Beide Bereiche sind nicht an der Bindung von Ca⁺⁺ beteiligt, deshalb ist es leicht zu verstehen, warum sie nicht hoch konserviert sind. Der dritte Bereich betrifft den letzten Teil der zweiten Helix der dritten EF-Hand, das die Helices verbindende Stück und den ersten Teil der ersten Helix der vierten EF-Hand.

Der zuletzt gezeigte Unterschied betrifft nicht unmittelbar einen an der Ca⁺⁺- Bindung beteiligten Bereich. An anderer Stelle wurde aber schon erwähnt, daß auch die nicht direkt an der Ca⁺⁺-Bindung beteiligten Aminosäuren einen Einfluß auf die Bindung haben. Es könnte also ein Hinweis darauf gefunden worden sein,

daß die experimentell ermittelten Unterschiede in den Dissoziationskonstanten für SCBP₂ und SCBP₃ (s.o.) auf Unterschiede in den beiden letzten EF-Händen zurückzuführen sind.

Da die beiden ersten EF-Hände bei den Regenwurm-SCBPs keinen Unterschied in der vorhergesagten Raumstruktur zeigt, kann angenommen werden, daß sie gleich gut Ca⁺⁺ binden. Für das SCBP₂ würde das bedeuten, daß die erste EF-Hand Ca⁺⁺ mit einer Dissoziationskonstante von etwa 1,5^{-10⁻⁷}M bindet und wenigstens eine der beiden C-terminalen EF-Hände eine Dissoziationskonstante von ca. 10⁻⁵M hat.

Diskussion

4.5. Vergleich der Regenwurm-SCBPs mit anderen SCBPs

SCBPs wurden nicht nur aus Drosophila und dem Regenwurm isoliert, sondern auch aus Crustaceen, anderen Anneliden, Bivalviern und Acraniern (Details siehe Tabelle 7). Den SCBPs recht ähnlich und deshalb auch für einen Vergleich mit den hier identifizierten Sequenzen geeignet sind noch einige andere Proteine:

Das "allgemeine SCBP" ist eine künstlich abgeleitete Aminosäuresequenz, von der angenommen wird, daß sie die Sequenz ist, die ein "Ur-SCBP" gehabt haben könnte (Collins et al. 1988). Abweichend von realen SCBPs besitzt diese Sequenz vier Ca⁺⁺- bindende EF-Hände. Diese Sequenz ist hier auch deshalb wichtig, weil mit ihr die Datenbanken der vollständig sequenzierten Genome von Drosophila und Cae-norhabditis nach potentiellen SCBPs durchsucht wurden.

Kürzel	Beschreibung	Quelle	
Aequorin1	Aequorin aus Aequorea macrodacty-	TrEMBL: Q8WQY7 (2000)	
	la		
Aequorin2	Aequorin aus Aequorea parva	TrEMBL: Q8WQY8 (2002)	
Brala-SCP1	SCP1 aus Branchiostoma lanceola-	Takagi und Cox 1990.	
	tum		
Brala-SCP2	SCP2 aus Branchiostoma lanceola-	Takagi et al. 1992	
	tum		
Common-SCBP	allgemeines SCBP	Collins et al. 1988	
Drome-CBP	Pervt-SCP-ähnliches Protein aus	FlyBase ID: FBgn0026144	
	Drosophila melanogaster		
Drome-SCP1	SCP1 aus Drosophila melanogaster	Kelly et al. 1997	
Drome-SCP2	SCP1 aus Drosophila melanogaster	Kelly et al. 1997	
Esolu-PV	Parvalbumin aus <i>Esox lucius</i>	Frankenne et al. 1973	
Human-PV	Parvalbumin aus dem Menschen	Foehr et al. 1993	
Lumte-SCBP2	SCBP2 aus Lumbricus terrestris	-	
Lumte-SCBP3	SCBP3 aus Lumbricus terrestris	-	
Merlu-SCP	SCP aus Meretrix Iusoria	TrEMBL: O61284 (1998)	
Mouse-PV	Parvalbumin aus der Maus		
Nerdi-SCP	SCP aus Nereis diversicolor	Collins et al. 1988	
Patye-SCP	SCP aus Patinopecten yessoensis	Tagaki et al. 1984	
Patye-SCPA	SCP A aus Patinopecten yessoensis	TrEMBL: Q9TVJ4 (2000)	
Patye-SCPB	SCP B aus Patinopecten yessoensis	TrEMBL: Q9U5C4 (2000)	
Pensp-SCP1	SCP1 aus <i>Penaeus sp.</i>	Tagaki und Konishi 1984	
Pensp-SCP2	SCP2 aus <i>Penaeus sp.</i>	Tagaki und Konishi 1984a	
Pervt-SCP	SCP aus Perinereis vancaurica	Kobayashi et al. 1984	
	tetradentata		
Ponle-SCP	SCP1 aus Pontastacus leptodactylus	Jauregui-Adell et al. 1989	
Rabit-PV	Parvalbumin aus dem Kaninchen	Capony et al. 1976	
	Oryctolagus cuniculus		
Sacer-Calerythrin	Calerythrin aus Saccharopolyspora	Swan et al. 1989	
-	erythraea		
Venph-SCP	SCP aus Venerupis philippinarum	TrEMBL: O97050 (1999)	

Tabelle 7: SCBP-ähnliche Proteine

In der Tabelle sind die Kürzel der Proteine aufgelistet, die miteinander verglichen werden. Neben der Beschreibung der Proteine ist die Quelle der für den Vergleich verwendeten Sequenz angegeben. Einige der Sequenzen sind nur in den Sequenzdatenbanken eingetragen worden. In diesen Fällen ist die entsprechende Identifikationsnummer angegeben.

Die Sequenzen Patye-SCPA und Patye-SCPB, wurden von den selben Autoren in die Datenbank eingetragen, die auch die Sequenz Patye-SCP beschrieben haben. Es ist unklar, ob es sich bei den neuen Sequenzen um zusätzliche SCBPs aus diesem Organismus handelt, oder ob sich später herausstellte, daß das zuerst gefundene Potein aus zwei Isoformen besteht.

In die Liste der mit SCBP zu vergleichenden Proteine wurden auch Aequorin und Calerythrin aufgenommen. Obwohl beide Proteintypen nicht aus Muskeln stammen, sollen sie in der Struktur den SCBPs gleichen (siehe Einleitung).

Da Parvalbumin und SCBP ähnliche Strukturen aufweisen und eine gleiche Funktion angenommen wird, wurden die SCBPs auch mit einigen Parvalbuminen verglichen.

A contraction 1	
Aequorini	
Aequorin2	
Human-PV	
Pabit-DV	
Mouse-PV	
Esolu-PV	
Nerdi-SCP	
Bewet GGD	
Pervt-SCP	
LumteSCBP3	
LumteSCBP2	
Builder CDD	MARGENIAR CTI RECORD TO REVISION CONSCREPTION AND TOUCHOUSE A CONTRACTOR
Drome-CBP	MAF SIVSRGILRISREILERNMAAIVGVLQQNASPPPNIPISHSDCHRLASGGIICGHGA
Brala-SCP1	
Brala-SCP2	
Semman CCBD	
COMMON-SCBP	
Pensp-SCp2	
Ponle-SCP	
P GGP1	
Pensp-SCP1	
Drome-SCP1	
Patve-SCPA	
racyc bern	
Patye-SCPB	
Patve-SCP	
Morly-CCD	
Meriu-SCP	
Venph-SCP	
Drome-SCP2	
Cocon Colonythmin	
Sacer-Calerythrin	
Aequorin1	MTSFOVSUUT TUTOTO
Acquorini	
Aequorin2	MTSRQYSVKLTSDFDN
Human-PV	
Dobit DV	
Radit-PV	
Mouse-PV	
Esolu-PV	
Nerdi-SCP	S
Pervt-SCP	S
LumtoSCBP3	M
LuniceSCDF 5	AH
LumteSCBP2	MS
Drome-CBP	HSLLWHOMPTAVVOAVROYSKKAGAAKLBREVESDSDSDDDEFEBBROKMDSKBSEBGDS
Buele COP1	
Brala-SCP1	GLN
Brala-SCP2	GLN
common-SCBP	2
Pensp-SCp2	A
Ponle-SCP	A
Ponco-SCP1	Δ
rensp seri	А А
Drome-SCP1	МА
Patve-SCPA	МТ
Detwo CCDD	
ratye-strb	M1
Patye-SCP	T
Merlu-SCP	MAN
Manah GGD	 אר די
venpn-scP	MAAN
Drome-SCP2	MSIS
Sacer-Calerythrin	МТ
Sacer careryenrin	FIL .
Aequorin1	PKWIG-RHKHMFN-FLDVNHNGRISLDEMVYKASDIVINNLGATPEQAKRHKDAVEA
Aeguorin2	PRWIG-RHKHMEN-FLOVNHNGKISLDEMVYKASDIVINNLGATPEOAKRHKDAVEA
However DV	
numan-PV	SMIDLLNAEDIKKAVGA
Rabit-PV	AEDIKKAIGA
Mouse-PV	SMTDVLSAEDIKKAIGA
Deele DV	
Esolu-PV	AKDLLKADDIKKALDA
Nerdi-SCP	DLWVO-KMKTYFN-RIDFDKDGAITRMDFESMAERFAKESEMKAEHAKVLMDSLTGVWDN
Dorrit - CCD	DI WYO - KWKTYEN - DIDEDKDCA ITDKDERCMA TREAKE CEMKDENA KVI MOSI TOVWOK
reivi-scr	DLWVQ-KMKTTFN-KTDFDKDGATTKKDFESMATKFAKESEMKFERAKVLMD3LTGVWDK
LumteSCBP3	DAFIERKLKTYFS-RIDFDKDGAITRSDFEGLGTRFVESEKLDAAKGADLKAKLVQVWEQ
LumteSCBP2	AFYLR-KLKTYFA-ATDTDKDGVLTENDYHEMARRETDTVKLDDAOGKKLHALAAKVWND
Builder GPD	
DTOILIG-CBL	AF WAA - MPIKILIAK - ILDVINIDGVVSFDDF SLLAKKF SDG-HLTPEVAAEFNDVIKHTWEE
Brala-SCP1	DFQKQ-KIKFTFDFFLDYNKDGSIQWEDFEEMIKRYKEVNKGSLSDADYKSMQASLED
Brala-SCP2	DECKO-KIKETEDEEL DMNHDCSTODNDEEDMMTDYKEVNKCSI SDADYKSMOASI ED
DIAIN DULL	
common-SCBP	DLWVQ-KLKFVFK-FLDLDKDGAISREDFEEMVNRFTELSELKGELSAADYASMQKLWED
Pensp-SCp2	YSWDN-RVKYIVRYMYDIDNDGFLDKNDFECLAVRVTLTEG-RGEESPEGYAKNKETMAN
Deple CCD	VOIDN DWWWWDDWWWDDDWWDDWWDDWDDWDDWWWWWDDWWWDDWWWDDWWWDDWWWDDWWWDDWWWDDWWWDDWWWDDWWWDDWWDDW
ronite-SCP	I SWDN-KVKIVVKIMI <u>DIDNNGFLDKND</u> FECLALKNILIEG-RGEFNEAAYANNQKIMSN
Pensp-SCP1	YSWDN-RVKYVVRYMYDIDDDGFLDKNDFECLAVRNTLIEG-RGEFSAADYANNOKIMRN
Drome-SCP1	Y SWDN-RVDFVVRYMYD I DNNGFLOONDFLCMAVRACVVFG-KGDCSTARLDDVKKI MKN
DIGNIC DOLL	TOUR AND WATER DIVERSE IN THE AVERAGE AND THE AVERAGE AND THE AVERAGE AND THE AVERAGE AND THE AVERAGE
ratye-SCPA	DYLVS-KWKIWYK-SLDVNHDGIISIEDVEESRNKFTDLHKLVGDKSTGVKVDMQK
Patve-SCPB	DYLVS-KWKIWYK-SLDVNHDGIISIEDVEF.SRNKFTDI.HKI.VGDKSTGVKVDMOK
Datua SCD	
ralye-str	DIEVS-KWKIWIK-SLDVNHDGIISIENVEESKNKFIDLHKLVGDKSIGVKVDMQSCP-K
Merlu-SCP	EFLIS-KWKIWYK-SLDVNHDGTISMADVEESRSKFSELHHLDAEKKDMVMKNFEK
Venph-SCP	DFLVS-KWKIWYK-SLDVNHDGTISMEDVEFSROKFSELHHLDAEKKKMVMENFEK
Dromo-SCD2	DEDKK_KIIFTENVEEDVNOSCETDVKDEETATEDVOOLDONOKDEDK NKEEVOLME
DIONE-SCR2	DE VUY-UTTE PENALE DANÖGGETDAVDLE PUTEKACŐFRÖMŐKDIAKNKELADPWWE
Sacer-Calerythrin	TALASDRLKKRFD-RWDFDGNGALERADFEKEAQHIAEAFG-KDAGAAEVQTLKNAFGG

Aequorin2	FFGGAGMKYGVETDWPAYIEGWKKLATDELEKYAKNEPTLIRI
Human-PV	FSATDSFDHKKFFQMVG-LKKKSAD
Rabit-PV	FAAAESFDHKKFFQMVG-LKKKSTE
Mouse-PV	FAAADSFDHKKFFQMVG-LKKKNPD
Esolu-PV	VKAEGSFNHKKFFALVG-LKAMSAN
Nerdi-SCP	FLTAVAG-GKGIDETTFINSMKEMVKNPEAKSVVEG
Pervt-SCP	FLANVAG-GKGIDQATFISSMKEKVKDPNAKAVVEG
LumteSCBP3	YLKGVVSDGTRLTQAVFVEAVKKQLGDPNFKKVLA-G
LumteSCBP2	FFKGWATDGKSLTQDQLIASFLKRRSDPKFLESLKE
Drome-CBP	QFGEITP-YNLVTAEQFLTDLHHRLNDKKMAKRIGR
Brala-SCP1	EWRDLKGRA <u>DINKDDVVSWEE</u> YLAMWEKTIATCKSVADLPAWCQN
Brala-SCP2	EWRDLKGRA <u>DINKDDVVSWEEYLAMWEKT</u> IATCKSVADLPAWCQN
common-SCBP	EWRELAEGADINKDGVVSVEEFLAMVQKTIQTKKS-AEFPAALEA
Pensp-SCp2	LWNEIAELA <u>DFNKDGEVTVDE</u> FKQAVQKNCKGKAF-ANFPNAFKV
Ponle-SCP	LWNEIAELADFNKDGEVTIDEFKKAVQNVCVGKAF-ATFPAAFKV
Pensp-SCP1	LWNEIAELADFNKDGEVTVDEFKMAVQKHCQGKKY-SEFPGAFKV
Drome-SCP1	LWDEISAIADDDKDGKISNQEFKDAVKKTCVGKKY-EEFPQAMRA
Patye-SCPA	WWDTYIFLTPGAEISETQFVENLGNSFKKDKKAFLATMTA
Patye-SCPB	WWDTYIFLTPGAEISETQFVENLGNSFKKDKKAFLDTMTA
Patye-SCP	WWDTYIFLTPGAEISETQFVENLGNSFKKDKAFLATMTA
Merlu-SCP	WWKEYIFRGKDGEISEQEFVDALNKDFTADKNKFIATMQS
Venph-SCP	WWNEYVFRGKKGEVSETQFIEALQNDYKADKDKFKKQMET
Drome-SCP2	IWTGLRSKADKDNDGQVSVDEWCNMWDAYAKDPSSVMDWQNA
Sacer-Calerythrin	LFDYLAKEAGVGSDGSLTEEOFIRVTENLIFEOGE-ASFNRVLGP
Acquerini	
Aequorin2	WGDALFDIIDKDQNGAISLDEWKAYIK AACIIQSSE
Nequorinz	WGDALFDIVDRUQNGAIILDEWRAIIRAAGIIQSSE
Human-PV Debit DV	DVKKVFHMLDKDKSGFIELELGFILKGFSPDARDLSAK
RADIC-PV	
Mouse-PV	EVKKVFHILDKDKSGFIEEDELGSILKGFSSDARDLSAK
Esolu-PV	DVKKVFKAI <u>DADASGFIEEEE</u> LKFVLKSFAADGRDLTDA
Nerdi-SCP	PLPLFFRAV <u>DTNEDNNISRDE</u> YGIFFGMLGLDKT
Pervt-SCP	PLPLFFRAV <u>DTNEDNMISRDE</u> YGIFFNMLGLNPD
LumteSCBP3	PLPLFFSAV <u>DGNGDGLIQKDE</u> FQLFFKLLGI-PE
LumteSCBP2	LMTVEFHVV <u>DINKDGSIQLDE</u> FTIMFRFHGIDAA
Drome-CBP	FLPYLFKAV <u>DFDHTGHLDLEQ</u> YKLFFRCLGLTED
Brala-SCP1	RIPFLFKGM <u>DVSGDGIVDLEE</u> FQNYCKNFQLQCA
Brala-SCP2	RIPFLFKGM <u>DVSGDGIVDLEE</u> FQNYCKNFQLQCA
common-SCBP	AIPLLFKAI <u>DTNGDGSIDLDE</u> FRLLFAAFGLEKE
Bonon-CCn2	
rensp-scpz	FIGNQFKTI <u>DVDGDGMVGVDE</u> YRLDCITRSAFADVKE
Ponle-SCP	FIGNQFKTI <u>DVDGDGMVGVDE</u> YRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE
Ponle-SCP Pensp-SCP1	FIGNQFKTI <u>DVDGDGMVGVDE</u> YRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTV <u>DVNGDGLVGVDE</u> YRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE
Ponle-SCP Pensp-SCP1 Drome-SCP1	FIGNQFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP
Pensp-SCP Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENEP
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENEP CFNMIFDVIDTDKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES
Pensp-SCP1 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTDKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venoh-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEEFLIAFKAYGHENVA
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCP8 Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTV <u>DVNGDGLVGVDE</u> YRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAI <u>DVNGDGKVGLDE</u> YRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLL <u>DIDSDGIVGVKE</u> YRVNCITRVAIDDITP CFNMIFDVI <u>DTNKDRSIDLNE</u> FIYAFAAFGHENES CFNMIFDVI <u>DTNKDRSIDLNE</u> FIYAFAAFGHENES CFDILFDVI <u>DTNKDRSISEDEFIIAFFAAYGHENVA</u> CFDIIFDVI <u>DTNKDRSISEDEFIIAFEAYGHENVA</u> YMNEMEDLEDASHDGGIDVTEFTLVGSSYGLEKT
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCP8 Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGKVGLDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEEFLIAFKAYGHENVA CFDILFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGGINADEFAAWLTALGMSKA
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCP8 Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCISRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFIAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDFIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFILVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFIAFEAYGHENVA VMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFIAFKAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFIAFEAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISELEFLIAFKAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGKVGLDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA CFDIIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGGINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES
Penisp-ScP2 Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYG-HENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES
Penisp-ScP2 Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKNTDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDFLIAFEAYGHENVA MNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKNTDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGGGKIGIDEFETLVHEA MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFMN-DGDSTNKVFWGPLV
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKKLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGKIGIDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGKIGIDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGIDEFSTLVAES MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFNN-DQDSTNKVFWGPLV
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFLIAFEAYGHENVA CFDIIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLAAGDKDGGGKIGVDEFSTLVAES
Penisp-ScP2 Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Werlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP2	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCISR-SAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITR-VAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAY-G-HENVA CFDIIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAY-G-HENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAY-G-HENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAY-G-HENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGGK-IGVDEFSTLVAET ETKAFLKAADKDGDGK-IGIDEFETLVHEA MAPASFDAIDTNNDGL-LSUEFFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV SAEKSFEAIDTNNDGL-LSUEFVIAGTDFFTSTDESSPSKYFWGPLV
Penisp-ScP2 Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Werlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP2 Drome-CBP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKNTDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFIAFEAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDEFIAFEAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDEFIAFEAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAET ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFFTLVHEA MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFMN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV MAKASFEAIDTNNDGQISLDEFIAVVDFFTGEDEKSSSRJFWGPLV
Pensp-ScP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCP Merlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP2 Drome-CBP Brala-SCP1	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKNDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFADVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEEFLIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKKLLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGGKIGUDEFETLVHEA MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV BAVSFAVIDKNGDGQLSLEFFTLAVVDFFTGEDEKSSRLFWGPLV DAVSFAVIDKNGDGQ-LSLKEFVHLGRQFFLTEDDSKISKMFWGPLVADH DVPAVYNVITDGGKVTFDLNRYKELYYRLLTSPAADAGNTLMGQKP
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCPB Merlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP2	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGKIGIDEFFTLVHEA MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSUEFIAVGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV BAEKSFEAIDTNKDGDISLDEFIAVVDFFIGEDEKSSSRJFWGPLV DAVSFAVIDKNGDGQLSLKEFVIAGSDFFIN-DQDSKISKMFWGPLVADH DVPAVYNVITDGGKVTFDLNRYKELYYRLLTSPAADAGNTLMGQKP
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCPB Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP2 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP2 common-SCBP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA CFDIIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGUDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGUDEFSTLVAET ETKAFLKAADKDGDGKIGUDEFTLVHEA MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFIN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV MAPASFPAIDTNNDGLLSLEFIVAGSDFFIN-DQDSNKVFWGPLV MAPASFAIDSNSDGVISLKEFVIAGTDFTSTDESSPSKYFWGPLV
Penisp-Scp2 Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Werlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP2 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP2 common-SCBP Penisp-SCp2	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVGSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKISLEEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFN-DGDSTNKVFWGPLV DAVSFAVIDKNGDGQLSLKEFVHLGRQFFITEDDSKISKMFWGPLV DVPAVYNVITDGGKVTFDLNRYKELYYRLLTSPAADAGNTLMGQKP DVPAVYNVITDGGKVTFDLNRYKELYYRLLTSPAADAGNTLMGQKP
Penisp-Scp2 Penisp-ScP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Werlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP2 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP1 Penisp-SCP2 Ponle-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFAEVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDEFIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDEFIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKKLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAET MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV HAKASFEAIDTNNDGLISLDEFIAVVDFFTGEDEKSSSRFWGPLV HAKASFEAIDTNNDGQISLDEFVIAGSDFFIN-DQDSNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFIN-DQDSNKVFWGPLV MAPASFAVDMGGQISLDEFVIAGSDFFIN-DQDSNKVFWGPLV MAPASFAVIDKGDQSKEFVIAGSDFFIN-DQDSNKVFWGPLV MAPASFAVIDKGDISLDEFVIAGSDFFIN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFAVIDKNGDQLSLKEFVIAGSDFFIN-DDSSNKVFWGPLV MAVSFAVIDKNGDGQLSLKEFVIAGSDFFIN-DDSSNKVFWGPLV MAVSFAVIDKNGDGQLSLKEFVIAGSDFFITEDDSKISKMFWGPLVA MAPASFAVDDTFDLNRYKELYYRLLTSPAADAGNTLMGQKP DVPAVYNVITDGGKVTFDLNRYKELYYRLLTSPAADAGNTLMGQKP MVPASAFAVDDDTLLLTEFDTWAGSLFFTNEDDSTTKVISSPLES
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP2 common-SCBP Pensp-SCP2 Ponle-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFADVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCP Merlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP2 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP2 common-SCBP Pensp-SCP2 Ponle-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRVNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGKIGIDEFETLVHEA MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV BAKSFEAIDTNKDGDISKEEFVIAGSDFFIN-DQDSKISKMFWGPLV DAVSFAVIDKNGDGQ-LSLKEFVHLGRVFFLTEDDSKISKMFWGPLVADH DVPAVYNVITDGGKVTFDLNRYKELYYRLLTSPAADAGNTLMGQKP DVPAVYNVITDGGKVTFDLNRYKELYYRLLTSPAADAGNTLMGQKP MVPASAFAIVDTDDTLLLTEPDTWAGSLFFTNEDDSTTKVISSPLES- IDDAYDKLCTEEDKAAGGISLARYQELYAQFISNEPESCAACHFGPLKEVQ IDAYNKLATDADKKAGGISLARYQELYAQFISNEPESCAACHFGPLKEVQ IDDAYDKLTTEDDRKAGGLTLERYQDLYAQFISNEPESCAACHFGPLKEVQ IDDAYDKLTTEDDRKAGGLTLERYQDLYAQFISNEPESCAACHFGPLKEVQ IDDAYDKLTFEDRKAGGLTLERYQDLYAQFISNEPESCAACHFGPLKEVQ
Pensp-SCP2 Ponsp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP1 Pensp-SCP1 Pensp-SCP1 Patye-SCPA	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKAUDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKKLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGJDEFFTLVHEA ETKAFLKAADKDGDGKIGJDEFFTLVHEA MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV DAAVSFAVIDKNGDGISLEFTUAGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV
Penisp-Scp2 Penisp-ScP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Werlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP2 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP2 common-SCBP Penisp-SCP2 Ponle-SCP Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITRSAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITRSAFANIKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITRVAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAFGHENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA CFDIIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAYGHENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKTLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGKIGVDEFSTLVAES
Penisp-Scp2 Ponle-SCP Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Werlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP1 Brala-SCP2 Ponle-SCP Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCP8 Patye-SCP8	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGLVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITR-SAFADVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITR-VAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFIAFKAY-G-HENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDEFIAFKAY-G-HENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGK-IGVDEFSTLVAET MAPASFDAIDTNNDGL-LSLEEFVIAGSDFFMN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGL-LSLEEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV MAPASFDAIDTNNDGL-SKEEFVIAGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV DAVSFAVIDKGGQ-ISLDEFITAVVDFFTGEDEKSSRJFWGPLV MAPASFAIDTNNDGL-SKEEFVIAGSDFFIN-DQDSNKVFWGPLV
Penisp-Scp2 Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCP Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP1 Brala-SCP2 Ponle-SCP Pensp-SCP2 Ponle-SCP Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCP8 Merlu-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGLVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITR-SAFADVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITR-VAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFDILFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAY-G-HENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKAFLKAADKDGDGK-IGVDEFSTLVAES
Pensp-SCP2 Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCP Merlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Huma-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP2 Ponle-SCP Pensp-SCP2 Ponle-SCP Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCPA Merlu-SCP	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKIDVNGDGLVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITR-SAFADVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITR-VAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFDILFDVIDTNKDRSISELEFLIAFKAY-G-HENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAY-G-HENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFEAY-G-HENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESQ-LDVDEMTRQHLGFWY-TMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESQ-LDVDEMTRQHLGFWY-TMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGUDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGK-IGUDEFSTLVAES ETKLMAAGDKDGDGK-IGUDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGK-IGUDEFSTLVAES ETKALKAADKDGOGK-IGUDEFSTLVAES ETKALKAADKDGOGK-IGUDEFSTLVAES ETKALKAADKDGOGK-IGUDEFSTLVAES ETKALKAADKDGOGK-IGUDEFSTLVAES ETKALKAADKDGOGK-IGUDEFSTLVAES
Penisp-Scp2 Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCP Merlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Mouse-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP2 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP1 Brala-SCP1 Pensp-SCP2 Ponle-SCP Pensp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Merlu-SCP Venph-SCP Drome-SCP2	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKTVDVNGDGLVGVDEYRLDCITR-SAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITR-SAFANIKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITR-SAFADVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITR-VAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFDILFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAY-G-HENVA CFDIFDVIDTNKDRSISEDEFLIAFKAY-G-HENVA VMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGKIGJDEFSTLVAES ETKLLAAGDKDGDGKIGIDEFTLVHEA MAPASFDAIDTNNDGLLSLEEFVIAGSDFFNN-DGDSTNKVFWGPLV SAEKSFEAIDTNNDGLLSLEFVIAGSDFFIN-DQDSPNKVFWGPLV
Penisp-Scp2 Penisp-SCP1 Drome-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPB Patye-SCP Werlu-SCP Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin Aequorin1 Aequorin2 Human-PV Rabit-PV Mouse-PV Esolu-PV Esolu-PV Nerdi-SCP Pervt-SCP LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP3 LumteSCBP4 Drome-CBP Brala-SCP1 Brala-SCP2 Common-SCBP Penisp-SCP1 Penisp-SCP1 Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCPA Nerlu-SCP Venisp-SCP2 Ponie-SCP Patye-SCPA Patye-SCPA Patye-SCP2 Drome-SCP2 Sacer-Calerythrin	FIGNOFKTIDVDGDGMVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGLVGVDEYRLDCITR-SAFADVKE FIANQFKAIDVNGDGKVGLDEYRLDCITR-SAFADVKE FIESNFKLLDIDSDGIVGVKEYRYNCITR-VAIDDITP CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFNMIFDVIDTNKDRSIDLNEFIYAFAAF-G-HENES CFDILFDVIDTNKDRSISEDEFIAFKAY-G-HENVA CFDTIFDVIDTNKDRSISEDEFIAFKAY-G-HENVA YMNFMFDLEDASHDGGIDVTEFTLVCSSYGLEKT VVKGTWGMCDKNADGQINADEFAAWLTALGMSKA DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP DCEETFRVCDIDESGQ-LDVDEMTRQHLGFWYTMDPACEKLYGGAVP ETKMLMAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGVDEFSTLVAES ETKTLLAAGDKDGDGK-IGJDEFETLVHEA

Abb.49: Sequenzvergleich löslicher Ca⁺⁺-bindender Proteine Die Sequenzen wurden mit Clustalw verglichen. EF-Hand-Bereiche sind rot markiert, Ca⁺⁺-bindende Loops sind dann unterstrichen, wenn sie wahrscheinlich Ca⁺⁺ binden.

Der Sequenzvergleich zeigt, daß immer wenn eine EF-Hand nicht mehr in der Lage ist, Ca⁺⁺ zu binden, es sich um die zweite Domäne eines Paares handelt. Bei Arthropoden (Drome, Ponle, Pensp) und Branchiostoma (Brala) betrifft dies immer das zweite EF-Hand-Paar, bei Anneliden (Lumte, Nerdi, Pervt) das erste EF-Hand-Paar, bei Bivalviern (Patye, Venph, Merlu) sogar beide Paare.

Der Sequenzvegleich zeigt noch einmal deutlich, wie groß der Größenunterschied zwischen dem Drome-CBP und allen anderen löslichen Ca⁺⁺-bindenden Proteinen. Bei den potentiell Ca⁺⁺-bindenden Dömänen liegt die nicht Ca⁺⁺-bindende EF-Hand wie bei den Anneliden im ersten Paar und nicht wie bei den Arthropoden üblich im zweiten Paar.



Abb.50: Dendrogramm des Alignments

Das Dendrogramm wurde mit Clustalw berechnet. Die Länge der Äste ist jeweils an ihrem rechten Ende angegeben. An den Stellen, an denen das nicht möglich ist, wurden die Werte an anderer Stelle notiert mit dem entsprechende Ast verbunden.

Berechnet man aus dem Sequenzvergleich ein Dendrogramm (mit den Programm Clustalw, Thompson et al. 1994, Saitou und Nei 1987, Hansen 2001), erhält man einen besseren Überblick über die Ähnlichkeit der Sequenzen (Abb. 50). Dabei steht die Länge der Zweige für den Grad der Ähnlichkeit der Proteine untereinander. Ähnliche Proteine sind durch kurze Zweige miteinander verbunden, sich weniger ähnelnde Proteine mit längeren.

Im allgemeinen entsprechen die gebildeten Gruppen gut den verwandschaftlichen Verhältnissen:

Die SCBPs der Bivalvier (Merlu, Venph, Patye) bilden eine Gruppe für sich, gleiches gilt für die Parvalbumine (PV) der Vertebraten, Aequorin, und die SCBPs der Anneliden (Lumte, Nerdi, Pervt) und Arthropoden (Pensp, Ponle, Drome).

Überraschend ist, daß nach dieser Berechnung die Drosophila-SCPs untereinander nur sehr wenig Ähnlichkeit zeigen. Normalerweise ähneln sich die SCBPs einer Art untereinander mehr als die verwandter Arten (Patye, Brala), hier besteht mehr Ähnlichkeit zwischen SCP1 und den SCBPs der Crustaceen (Pensp, Ponle) als zwischen SCP1 und SCP2.

Nach diesem Dendrogramm ähneln sich die SCBPs des Regenwurms untereinander auch nur relativ wenig, wobei das SCBP₃ sogar den SCBPs verwandter Arten etwas ähnlicher ist als dem SCBP₂.

Das Drosophila-CBP zeigt eine geringe Ähnlichkeit mit den SCBPs der Anneliden, ist dort aber isoliert. Diese Einordnung erklärt sich aus der strukturellen Ähnlichkeit des C-terminalen Teils dieses Proteins mit den genannten SCBPs und dem völlig abweichenden Aufbau des N-terminalen Teils. Da bisher keinerlei experimentelle Daten über dieses Protein vorliegen, wäre es sehr spekulativ, aus dieser Ähnlichkeit mit den SCBPs eine Verwandschaft zu ihnen abzuleiten.

Dem Calerythrin, dem einzigen EF-Hand-Protein aus Bakterien, wird hier eine geringe Ähnlichkeit zu den Parvalbuminen zugesprochen, steht aber eigentlich recht isoliert von allen anderen Proteinen.

Diskussion

4.6. Die genomische Struktur der Regenwurm-SCBPs

Die genomische Struktur der Regenwurm-SCBPs zeigte ein einfaches einheitliches Muster: Unabhängig von der Isoform wurde nur ein Intron in dem für Protein codierenden Teil gefunden. Dieses Intron ist zudem bei beiden Isoformen an fast derselben Stelle integriert (Abbildungen 38 und 39).

Da in der vorliegenden Arbeit nur der für Protein codierende Teil des Gens untersucht wurde, kann nicht zwingend angenommen werden, daß die SCBP-Gene des Regenwurms nur ein Intron besitzen. Denkbar wäre es, daß Introns auch in den nicht translatierten Teilen des primären Transkriptionsprodukt liegen. Dies wurde zum Beispiel beim Parvalbumingen der Ratte gefunden: Hier ist in dem 5'-nicht-translatierten Teil 26 Basenpaare vor dem Startcodon ein Intron integriert (Berchtold 1988).

Für das SCBP₃ wurde nur eine genomische Form gefunden. Dies bedeutet, daß dieses Gen auch transkribiert und translatiert werden muß. Etwas komplizierter ist es im Falle des SCBP₂: Für diese Isoform wurden zwei genomische Formen gefunden, die sich durch die Länge des Introns und durch kleinere Unterschiede in der codierenden Sequenz unterscheiden (Absatz 3.5.3.). Die codierende Sequenz der Form mit dem kurzen Intron stimmt dabei mit der Sequenz des cDNA-Klones überein. Also wird wenigstens das Gen mit dem kurzen Intron exprimiert.

Aus den vorliegenden experimentellen Ergebnissen läßt sich nicht zwingend ableiten, daß auch die Form mit dem langen Intron exprimiert wird. Dennoch erscheint dies wahrscheinlich: Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde, wären die Unterschiede im reifen Protein zu vernachlässigen. Sollte die Form mit dem langen Intron ein nicht exprimiertes Pseudogen sein, wäre es ausgesprochen hoch konserviert. Die Sequenzierungen der cDNA des SCBP₂ beruhen alle auf einem einzigen Klon ("15.1"). Da dieser Klon direkt die codierende Sequenz für das SCBP₂ enthielt, wurden keine weiteren Klone für dieses SCBP gesucht. Es ist deshalb durchaus möglich, daß nur aus diesem Grund keine cDNA gefunden wurde, die von der genomischen Sequenz mit dem langen Intron abstammt. Die beiden genomischen Formen müssen dabei nicht unbedingt unterschiedliche Gene sein. Wie gezeigt, wären die abgeleiteten Proteine sich sehr ähnlich und wahrscheinlich funktionsgleich. Es ist deshalb denkbar, daß die



Abb.51: genomische Struktur der SCBP

In der Abbildung werden die genomischen Strukturen verschiedener Ca⁺⁺bindender Proteine gezeigt. Die Exons sind schwarz, die Introns blau eingezeichnet. Die Bereiche der EF-Hände sind grün, der Ca⁺⁺-bindende Loop selber rot markiert. Wird einer dieser Bereiche durch ein Intron unterbrochen, sind die unterbrochenen Bereiche mit einer dünnen Linie entsprechender Farbe verbunden. Über die einzelnen Abschnitte ist die Länge in bp soweit bekannt notiert. Die Sequenz für das Drosophila-SCP1 ("Drome-SCP1") wurde aus der Sequenz mit der Accession-Nummer AE002777 herausgesucht, die für das SCP2 ("Drome-SCP2") aus der mit der Accession-Nummer AE003714 (Flybase). Weiterhin sind die genomischen Strukturen des Parvalbumins der Ratte ("Rat-PV", Berchtold 1987; Epstein et al. 1986) sowie die der Calmoduline von *Drosophila melanogaster* ("Drome-CAM"; Beckingham et al. 1987) des Huhnes ("Chicken-CAM", Epstein et al. 1987) abgebildet.

beiden genomischen Formen Allele desselben Gens sind. Ein Indiz für diese Interpretation ist, daß auch das Intron bei beiden Formen an genau derselben Stelle eingebaut ist.

Die einfache Situation bei der genomischen Form des SCBP₃ könnte möglicherweise ein "Artefakt" sein: Die untersuchte genomische DNA wurde aus einem einzigen Hautmuskelschlauch des Regenwurms präpariert. Sollte es weitere Allele des SCBP₃ geben, würden sie unter den gegebenen Umständen nicht gefunden werden, wenn der untersuchte Wurm homozygot für das SCBP₃ gewesen ist. Die Ergebnisse belegen eindeutig, des es für SCBP₂ und SCBP₃ getrennte Gene gibt, die nebeneinander in einen Tier vorkommen. Es gibt keinen Hinweis darauf, daß die gefundenen Isoformen der Proteine das Ergebnis eines unterschiedlichen Spleißens nur eines Genes sind: Die Exons der Gene von SCBP₂ und SCBP₃ ergeben genau die in den cDNAs gefundenen Sequenzen, so daß ein unterschiedliches Spleißen nicht angenommen werden muß.

Ein Vergleich der genomischen Struktur der Regenwurm-SCBPs mit der anderer SCBPs wird erschwert dadurch, daß bei allen bisherigen Sequenzierungen von SCBPs entweder nur die cDNA oder die Proteine direkt sequenziert wurden. Da das Drosophila-Genom vollständig sequenziert wurde, konnten in der entsprechenden Genbank (Flybase) auch die entsprechenden genomischen Formen der Drosophila-SCPs gefunden werden. Abblidung 51 zeigt die genomischen Sequenzen der SCBPs von Regenwurm und Drosophila.

Hier ist noch einmal deutlich zu sehen, daß die Introns in den Genen des Regenwurms zwischen erster und zweiter EF-Hand inserieren. Bei Drosophila dagegen liegen die Introns nicht nur in in der EF-Hand, sondern sogar innerhalb des Ca⁺⁺bindenden Loops. Werden die Länge des primären Transkriptionsprodukts für den codierenden Teil der mRNA berechnet, zeigt sich, daß es ein Glücksfall war, daß diese beim Regenwurm mit maximal etwa 3300 Basenpaaren relativ kurz ist. Die Struktur der entsprechenden Drosophila-Sequenzen mit etwa 4000 bis knapp 35000 Basenpaaren Länge hätte sich mit der gewählten Methode nicht so einfach aufklären lassen.

Die genomische Struktur der SCBPs wurde untersucht, um weitere Daten zur Einordnung der SCBPs zu erhalten. Die Ca⁺⁺-bindenden Proteine Calmodulin, Troponin C, essentielle und regulatorische leichte Myosinkette werden zu einer Gruppe zusammengefaßt (Kawasaki et al. 1998). Einer der Gründe dafür war, daß diese Proteine eine ähnliche genomische Struktur haben (Berchtold 1988). Die typischen Merkmale dieser Gruppe sind die Positionen des ersten und des letzten Introns in dem für Protein codierenden Teils der Sequenz. Das erste Intron inseriert unmittelbar nach dem Startcodon "ATG", die Insertionsstelle des letzten Introns liegt 26 Basenpaare vor den Stop-Codon (Abb. 51, Chicken-CAM, Drome-CAM). Oft sind die weiteren Exons des codierenden Teils etwa 30, 140, 100 und 130 Basenpaare lang, wie in Abb.51 beispielhaft für das Calmodulingen des Huhnes gezeigt wird. Daß diese zuletzt genannten Charakteristika aber nicht streng eingehalten werden, zeigt die abgebildete Struktur des Calmodulingens aus *Drosophila melanogaster* (Abb. 50).

Die Interpretation der genomischen Struktur des Parvalbumingens der Ratte führte zu der Annahme, daß auch dieses Protein zu der Calmodulin-Gruppe gehört. In der genomischen Sequenz dieses Proteins inseriert ein Intron 26 Basenpaare vor dem Stop-Codon. Am 5'-Ende ist aber kein Intron hinter dem Start-Codon gefunden worden. Dies wird als Folge eines Deletionsprozesses betrachtet, bei dem auch die ursprünglich erste EF-Hand dieses Proteins verloren ging. Dies liefert gleichzeitig eine Erklärung für die ungewöhnliche ungerade Anzahl von drei EF-Händen bei diesem Protein.

Wie in der Einleitung beschrieben wird angenommen, daß die SCBPs in Evertebraten dieselbe Aufgabe haben wie die Parvalbumine bei den Vertebraten. Dies legt natürlich den Gedanken an eine verwandtschaftliche Beziehung nahe. Dafür liefert aber weder die genomische Struktur der Drosophila SCPs noch die der Regenwurm SCBPs einen Hinweis. Weder ein Intron hinter dem Start-Codon noch ein Intron 26 Basenpaare vor dem Stop-Codon sind hier zu finden. Da es aber auch vollkommen intronfreie Calmodulingene - bei *Saccharomyces cerevisiae* - gibt, bedeutet das, daß das Auftreten gleichartiger genomischer Strukturen zwar Verwandtschaft andeutet, das Fehlen dieser Strukturen aber nicht unbedingt keine Verwandtschaft bedeutet. Dennoch zeigen weder die genomischen Formen der Regenwurm-SCBPs noch die von Drosophila auch nur eines der genannten Charakterisika der genomischen Struktur der Calmodulingruppe. Dies würde bedeuten, daß Parvalbumin und SCBPs über die Verwendung desselben Ca⁺⁺-bindenden Motivs hinaus nicht nahe miteinander verwandt sind.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß das Lanzettfischchen *Branchiostoma lanceolatum* - ein Chordat, der relativ nahe mit den Vertebraten verwand ist - SCBPs besitzt, Vertebraten selber aber Parvalbumin haben. Eine plausible Erklärung dafür wäre, daß bei der Entwicklung von Vertebratenvorläufern zu Vertebraten das ursprünglich vorhandene SCBP-Gen verloren wurde. Bei Vertebraten entwickelte sich dann aus einem Calmodulin-ähnlichen Protein ein löslicher relaxierender Faktor neu. Möglicherweise wurden lösliche relaxierende Faktoren mehrfach entwickelt und auch die SCBPs der Evertebraten sind keine einheitliche Gruppe. Wie beschrieben wurde

Diskussion

innerhalb einer Tiergruppe in der Regel gefunden, daß bei den SCBPs immer dieselbe EF-Hand die Fähigkeit Ca⁺⁺ zu binden verloren hat. Bei den Anneliden ist dies die zweite EF-Hand, bei Arthropoden und Acraniern ist es die vierte EF-Hand.

Weiterhin wird angenommen, daß Arthropoden und Anneliden relativ nahe verwandt sind, und deshalb als Articulaten zusammengefaßt werden. Beide Gruppen der Artikulaten haben aber SCBPs entwickelt, bei denen nicht dieselbe EF-Hand die Fähigkeit verloren hat, Ca⁺⁺ zu binden. Andererseits umfaßt die Gruppe der Tiere, bei denen die vierte EF-Hand die Fähigkeit der Calciumbindung verloren hat, Protostomier (Arthropoden) und Deuterostomier (Acranier), die nicht nahe miteinander verwandt sind.

Dies alles läßt sich nur schwer mit einer Entwicklung aus einem einzigen Vorläuferprotein erklären, obwohl es dann andererseits überraschend ist, daß das charakteristische Abstandsmuster der EF-Hände, das bei allen bisher bekannten SCBPs gefunden wurde, sich mehrfach entwickelt haben müßte, dem bisher keine biologische Funktion – und damit kein Selektionsvorteil - zugeordnet werden konnte.

4.7. Die rekombinanten SCBPs des Regenwurms

Die rekombinanten SCBPs wurden mit zwei verschiedenen Vektorsystemen exprimiert. Obwohl durch den Klonierungsprozeß bei beiden Systemen etwa 35 Aminosäuren an das N-terminale Ende der SCBPs angehängt wurden, unterschieden sich die exprimierten Proteine funktionell nicht von den nativen. Auch die rekombinanten Proteine binden Ca⁺⁺ und zeigen eine Ca⁺⁺-abhängige elektrophoretische Mobilität (Abb. 46).

Dies bedeutet, daß die eukaryontischen SCBPs auch in dem Bakterium *Escherichia coli* ihre korrekte funktionelle Faltung erhalten und dafür keine weiteren eukaryontenspezifische Hilfen - z.B. bestimmte Chaperone - benötigen.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Ca⁺⁺-bindenden Loops von SCBP₂ und SCBP₃ ließen keine großen Unterschiede in ihrer Fähigkeit, Ca⁺⁺ zu binden, erwarten. In den Bakterien scheinen sie jedoch unterschiedliche Wirkung zu haben. Bei den in Tabelle 4 aufgelisteten Ergebnissen wurden immer geringere Bakterienausbeuten mit dem SCBP₂ als mit dem SCBP₃ erzielt. Neben diesem quantitativen Merkmal unterschieden sich die Bakterienpellets auch qualitativ. Bakterienpellets, in denen SCBP₂ exprimiert wurde, waren schleimig und ließen sich wesentlich schlechter resuspensieren als entsprechende Pellets, die SCBP₃ enthielten.

Bisher wurden nur sehr wenige SCBP-artige Proteine in Bakterien exprimiert: Einmal wurde die Aminosäuresequenz des SCBPs von *Nereis diversicolor* in DNA rückübersetzt und dieses Konstrukt in Bakterien exprimiert (Dekeyzer et al. 1994), dann wurde das SCBP-ähnliche Calerythrin in *E.coli* exprimiert (Swan et al. 1989). Obwohl die rekombinanten Protein bis 30% des Zellprotein stellten, wurden keine Probleme beim Wachstum der Bakterien beschrieben (Swan et al. 1989).

Daß sich rekombinante SCBPs offensichtlich leicht exprimieren lassen, erleichtert künftige Untersuchungen:

Bei der Untersuchung der räumlichen Struktur wurde ein Bereich identifiziert, in dem sich SCBP₂ und SCBP₃ wahrscheinlich unterscheiden und der möglicherweise für die unterschiedlichen Ca⁺⁺-Bindungseigenschaften verantwortlich ist. Da jetzt auch die Sequenz der cDNA dieser Proteine bekannt ist, können diese einfach in ihrer Sequenz verändert und anschließend exprimiert werden. Durch Messung der Ca⁺⁺-Bindung der veränderten Proteine kann untersucht werden, welche Auswirkungen

die Veränderungen auf diese haben. So können die hier untersuchten Regenwurm-SCBPs dazu beitragen, die Faktoren, die die Ca⁺⁺-Bindungseigenschaften von EF-Handmotiven bestimmen, zu verstehen.

Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Lösliche Ca⁺⁺-bindende Proteine ("SCBP") bei Evertebraten dienen wahrscheinlich wie das Parvalbumin der Vertebraten in schnell kontrahierender Muskulatur als relaxierende Faktoren, die das bei der Auslösung der Kontraktion in das Sarkoplasma abgegebene Ca⁺⁺ nach der Kontraktion binden und so die Relaxationszeit verkürzen. Bei den Nematoden *C.elegans* und *A.suum* konnte ein SCBP weder direkt aus diesen Tieren isoliert werden, noch wurde in der Datenbank des *C.elegans*-Genoms ein entsprechendes Gen gefunden.

Dipteren besitzen ein Protein, das alle physikalischen Eigenschaften der SCBPs hat. Dieses Protein wurde nur in der synchronen Muskulatur der Fliegen gefunden.

Aus einer cDNA-Genbibliothek des Regenwurms wurden zwei verschiedene Klone für SCBP-Isoformen isoliert und anschließend sequenziert. Ebenso wurde die zugehörige genomische DNA des für Protein codierenden Teils dieser Sequenzen kloniert und sequenziert.

Die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte, daß beide Proteine mit 177 Aminosäuren Länge gleich lang sind, aber in weniger als 50% der Aminosäuren übereinstimmen. Beide Proteine haben vier EF-Hände als Ca⁺⁺-bindende Domänen, wobei die zweite EF-Hand die Fähigkeit, Ca⁺⁺ zu binden, verloren hat. Dieses Schema wurde auch bei den SCBPs anderer Anneliden gefunden. Die vermutliche räumliche Struktur dieser Proteine ist nahezu identisch.

In der genomischen DNA der Regenwurm-Proteine wurde je ein Intron gefunden. Bei der einen Isoform inseriert ein 2200bp langes Intron 171bp hinter dem Startcodon, bei der anderen Isoform wurden ein 2200bp langes und ein 2450bp langes Intron 168bp hinter dem Startcodon gefunden.

Wenigstens die Gene mit den 2200bp langen Introns werden exprimiert, für die Expression des Gens mit dem längeren Intron gibt es keinen direkten Beweis, seiner Sequenz nach zu urteilen kann es aber ein funktionelles SCBP sein.

Parvalbumin wird mit einigen anderen Ca⁺⁺-bindenden Proteinen – z.B. Calmodulin und Troponin C - auf Grund seiner genomischen Struktur zu einer Familie zusammengefaßt. Da sich diese Struktur von der hier beschriebenen der SCBPs unterscheidet, gehören die SCBPs nicht in diese Familie.

Beide Isoformen des SCBPs wurden in *E.coli* exprimiert und binden Ca⁺⁺ wie die nativen Proteine.

6. Abkürzungen

A, C, G, T, U	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil
AcA	Acrylamid cum Agarose
AIX	Ampicilin, IPTG, X-Gal
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4Chloro-3-Indolyl Phosphat
bp	Basenpaare (als Längenangabe)
Brala	Branchiostoma lanceolatum
BSA	Rinderserumalbumin
С	"Crosslinker", Anteil des Bisacrylamids an der Gesamtmenge Acrylamid + Bisacrylamid
CAM	Calmodulin
Cam	Chloramphenicol
cDNA	Komplementäre DNA
DEAE	Diethylaminoethyl cellulose
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Drome	Drosophila melanogaster
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Esolu	Esox lucius
a	Gramm
Gardol	N-Lauroylsarcosin.Natriumsalz
GET	Glucose EDTA Tris
h	Höhe
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
Human	Mensch
IAC	Ionenaustauscherchromatographie
IPTG	Isoproylthiogalaktosid
Lumte	Lumbricus terrestris
M	Mol/Liter
Merlu	Meretrix Iusoria
ul	Mikroliter
μM	Mikromol/Liter
min	Minute
ml	Milliliter
mМ	Millimol/Liter
mm	Millimeter
Mouse	Maus
NBT	Nitroblautetrazoliumsalz
NEET	NaCI EDTA Ethanol Tris
Nerdi	Nereis diversicolor
NINTA	Nickel-Nitrilotriaceticacid=Nickel-Nitrilotri-Essigsäure
nM	Nanomol/Liter
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
Patye	Patinopecten yessoensis
PBŚ	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung ("phosphate-buffered saline")

PCR	Polymerasekettenreaktion
Pensp	Penaeus sp.
Pervt	Perinereis vancaurica tetradentata
pfu	Phagenplaque ("plaque forming unit")
pMol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ponle	Pontastacus leptodactylus
Rabit	Kaninchen (Oryctolagus cuniculus)
RNA	Ribonucleinsäure
Sacer	Saccharopolyspora erythraea
SCBP	Lösliches Calcium-bindendes Protein oder Sarkoplasmatisches Calcium-bindendes Pro- tein
SCP	Lösliches Calcium-bindendes Protein oder Sarkoplasmatisches Calcium-bindendes Pro-
202	Natriumdodecvlsulfat
500	Sekunde
SEC	(Koch-)Salz-Magnesium-Lösung
	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
550 т	Träger = Gehalt an Acrylamid und Bisacrylamid
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	N,N,N', NTetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
u/l	Einheiten/Liter
upm	Umdrehungen pro Minute
บ่ง	Ultraviolett
Venph	Venerupis philippinarum
w/v .	Masse/Volumen
X-Gal	5-Bromo-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid

In dieser Arbeit wird durchgehend die Abkürzung SCBP für die löslichen Calciumbindenden Proteine der Evertebraten verwendet. Andere Autoren benutzen z.T. andere Abkürzungen - z.B. "SCP" für diese Proteine. Wenn diese Abkürzung Teil des Proteinnamens geworden ist, wird sie als Eigennamen in der Schreibweise des jeweiligen Authors verwendet.

Die Abkürzungen der Arten wurde von SWISS-PROT (Swiss Institute of Bioinformatics, Genf; <u>http://us.expasy.org/sprot/</u>) übernommen.

Codon	Aminosäure	3 AS	1 AS	Codon	Aminosäure	3 AS	1 AS
AAA	Lysin	Lys	K	CAA	Glutamin	Gln	Q
AAC	Asparagin	Asn	Ν	CAC	Histidin	His	Н
AAG	Lysin	Lys	K	CAG	Glutamin	Gln	Q
AAT	Asparagin	Asn	Ν	CAT	Histidin	His	Н
ACA	Threonin	Thr	Т	CCA	Prolin	Pro	Р
ACC	Threonin	Thr	Т	CCC	Prolin	Pro	Р
ACG	Threonin	Thr	Т	CCG	Prolin	Pro	Р
ACT	Threonin	Thr	Т	CCT	Prolin	Pro	Р
AGA	Arginin	Arg	R	CGA	Arginin	Arg	R
AGC	Serin	Ser	S	CGC	Arginin	Arg	R
AGG	Arginin	Arg	R	CGG	Arginin	Arg	R
AGT	Serin	Ser	S	CGT	Arginin	Arg	R
ATA	Isoleucin	lle		CTA	Leucin	Leu	L
ATC	Isoleucin	lle	1	CTC	Leucin	Leu	L
ATG	Methionin	Met	М	CTG	Leucin	Leu	L
ATT	Isoleucin	lle		CTT	Leucin	Leu	L
GAA	Glutaminsäure	Glu	E	TAA	Stopcodon	Stop	-
GAC	Asparaginsäure	Asp	D	TAC	Tyrosin	Tyr	Y
GAG	Glutaminsäure	Glu	E	TAG	Stopcodon	Stop	-
GAT	Asparaginsäure	Asp	D	TAT	Tyrosin	Tyr	Υ
GCA	Alanin	Ala	А	TCA	Serin	Ser	S
GCC	Alanin	Ala	А	TCC	Serin	Ser	S
GCG	Alanin	Ala	А	TCG	Serin	Ser	S
GCT	Alanin	Ala	А	TCT	Serin	Ser	S
GGA	Glycin	Gly	G	TGA	Stopcodon	Stop	-
GGC	Glycin	Gly	G	TGC	Cystein	Cys	С
GGG	Glycin	Gly	G	TGG	Tryptophan	Trp	W
GGT	Glycin	Gly	G	TGT	Cystein	Cys	С
GTA	Valin	Val	V	TTA	Leucin	Leu	L
GTC	Valin	Val	V	TTC	Phenylalanin	Phe	F
GTG	Valin	Val	V	TTG	Leucin	Leu	L
GTT	Valin	Val	V	TTT	Phenylalanin	Phe	F

Der Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren kann Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Der genetische Code und die Abkürzungen für Aminosäuren

In der Tabelle sind in der Spalte "Codon" die 64 möglichen codierenden Basentripletts aufgelistet, in der Spalte "3 AS" die codierte Aminosäure im "drei Buchstaben Code", in der Spalte "1 AS" der entsprechende "ein Buchstaben Code" der Aminosäure.

7.Literatur

Alwine J.C., Kemp D.J. und Stark G.R.(1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Nat. Acad. Sci. **74**, 5350 - 5354.

Andersson M., Malmendal A., Linse S., Ivarsson I., Forsen S., und Svensson L.A. (1997) Structural basis for the negative allostery between Ca^{2+} and Mg^{2+} -binding in the intracellular Ca^{2+} -receptor calbindin D9k. Protein Science **6**, 1139 - 1147.

Ardizzi J.P. und Epstein H.F. (1987) Immunochemical localization of myosin heavy chain isoforms and paramyosin in developmentally and structurally diverse muscle cell types of *C. elegans*. J. Cell. Biol. **105**, 2763 - 2770.

Ashley C.C. und Ridgway E.B. (1970) On the relationships between membrane potential, calcium transient and tension in single Barnacle muscle fibres. J. Physiol **209**, 105 - 130.

Avery L. (1993): Motor neuron M3 controls pharyngeal muscle relaxation timing in *Caenorhabditis elegans*. J Exp Biol. **175**, 283 – 297.

Baksh S. und Michalak M. (1991) Expression of calreticulin in *Eschericia coli* and identification of its calcium binding domains. J. Biol.Chem. **266**, 21458 - 21465.

Beaven G.H., Holiday E.R. und Johnson E.A. (1955) Optical properties of nucleic acids and their components. in "The Nucleic Acids" (Chargaff E. und Davidson J.N., Herausgeber). Academic Press Inc. New York, 493 - 554.

Beckingham K., Doyle K.E. und Maune J.F.(1987) The calmodulin gene of *Drosophila melanogaster*. Methods of Enzymology **139**, 230 - 247.

Benzonana G., Cox J., Kohler L. und Stein E.A.(1974) Caractérisation d'une nouvelle métallo-protéine calcique du myogéne de certains crustacés. CR Acad. Sci. Paris **279**, 1491 - 1493.

Berchtold M.W.(1987) Cloning of the rat parvalbumine gene. Methods of Enzymology 139, 317 – 325.

Berchtold M.W. (1988) The rat parvalbumin gen. in "Calcium and Calcium Binding Proteins" (Gerday Ch., Bolis L. und Gilles R. eds.) Springer Verlag Berlin, 40 - 43.

Bergeron J.G.M., Brenner M.B., Thomas D.Y. und Williams D.B. (1994) Calnexin, a membrane-bound chaperone of the endoplasmatic reticulum. Trends in Biochemical Sciences **19**, 124 - 128.

Birnboim H.C. und Doly J. (1979) A rapid alcaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7**, 1513 - 1523.

Birnie G.D. (1978) Isopycnic zentrifugation in ionic media. in "Centrifugal Separations in Molecular and Cell Biology" (G.D. Birnie, D. Rickwood, eds.). Butterworth, London. 169 - 217.

Blinks J.R.(1986) Determination of intracellular [Ca⁺⁺] . in: "Intracellular Calcium regulation" (H. Bader, K. Gietzen, J. Rosenthal, R. Rüdel und H.U. Wolfe Herausgeber.). Manchester University Press, Manchester, 1 - 13.

Blum H.E., Lehky P., Kohler L., Stein E.A. und Fischer E.(1977) Comparative properties of vertebrate parvalbumins. J. Biol. Chem. **252**, 2834 - 2838.

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

Bresch C. und Hausmann R (1972) Klassische und molekulare Genetik. Springer Verlag, Berlin.

Breslauer K.J., Frank R., Blocker H. und Marky L.A.(1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc. Nat. Acad. Sci. **83**, 3746-50.

Brumbaugh J.A., Middendorf L.R., Grone D.L und Ruth J.L. (1988) Continuous on-line DNAsequencing using oligodeoxynucleotide primers with multiple fluorophores. Proc. Nat. Acad. Sci. **85**, 5610 - 5614.

Burger A. (1996) Annexin V. in "Guidebook to the Calcium-binding Proteins" (M.R. Celio, T.L. Pauls, B. Schwaller, eds.). Oxford University Press inc.New York, 194 - 197.

Burgess W.H., Jemiolo D.K. und Kretsinger R.H.(1980) Interaction of calcium and calmodulin in the presence of sodium dodecyl sulfate. Biochim. Biophys. Acta **623**, 257 - 270.

Burgoyne, R.D. (1996) Annexins. in "Guidebook to the Calcium-binding Proteins" (M.R. Celio, T.L. Pauls, B. Schwaller, eds.). Oxford University Press inc.New York, 181 - 184.

Burns K., Atkinson E.A., Bleakley R.C. und Michalak M. (1994) Calreticulin: from Ca⁺⁺ binding to control of gene expression. Trends In Cellbiology **4**, 152 - 154.

Caldicott I.M., Larsen P.M., und Riddle D.L. (1994) Laboratory cultivation of *Caenorhabditis elegans* and other free-living nematodes. in "Cell Biology: A Laboratory Handbook" (J.E. Celis, ed.). Academic Press, New York, 389 - 397.

Capony J.-P., Pina C. und Pechere J.-F. (1976) Parvalbumin from rabbit muscle. Isolation and primary structure. Eur. J. Biochem. **70**, 123 - 135.

Carlhoff D. (1988) Charaktersierung der Proteine aus der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris* mit besonderer Berücksichtigung der Myosin-gekoppelten Ca⁺⁺-Regulation. Dissertation in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf

Cartailler J.-P., Haigler H. T. und Luecke H. (2000) Annexin XII E105K crystal structure: Identification of a pH-dependent switch for mutant hexamerization. Biochemistry, **39**, 2475 - 2483.

Carter M.J. und Milton I.D. (1993) An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. Nucl. Acids Res. **21**, 1044.

Cates M.S., Berry M.B., Ho E., Li Q., Potter J.D. und Phillips jr. G.N. (1999) Metal ion affinity and specificity in EF-hand proteins: Coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin. Structure **7**, 1269 - 1278.

Celio M.R., Paulis T.L. und Schwaller B. (1996) Introduction to EF-Hand calcium binding proteins. in "Guidebook to the Calcium-binding Proteins" (M.R. Celio, T.L. Pauls, B. Schwaller, eds.). Oxford University Press inc. New York, 15 - 20.

Chattopadhyaya R., Meador W.E., Means A.R. und Quiocho F.A. (1992) Calmodulin structure refined at 1.7 Angstroms resolution. J.Mol.Biol. **228**, 1177 - 1192.

Cheney R.E. und Mooseker M.S. (1992) Unconventional myosins. Curr. Opin. in Cell Biol. 4, 27 - 35.

Collins J.H., Cox J.A. und Theibert J.L. (1988) Amino acid sequence of a sacoplasmatic calciumbinding protein from the sandworm *Nereis diversicolor*. J. Biol. Chem. **263**, 15387 - 15385.

Collins J.H., Johnson J.D. und Szent-Györgyi A.G. (1983) Purification and characterization of a scallop sarcoplasmatic calcium binding protein. Biochemistry **22**, 341 - 345.

Cox J.A.(1989) Unique calcium binding proteins in invertebrates . in "Calcium binding proteins in normal and transformed cells" (Pochet R., Lawson E. und Heizmann C, eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, 67 - 72.

Cox J.A. (1996) Sarcoplasmatic calcium-binding proteins and calerythrin. in "Guidebook to the Calcium-binding Proteins" (M.R. Celio, T.L. Pauls, B. Schwaller, eds.). Oxford University Press inc.New York, 77 - 79.

Cox J.A. (1996a) Aequorin and luciferin-binding protein. in "Guidebook to the Calcium-binding Proteins" (M.R. Celio, T.L. Pauls, B. Schwaller, eds.). Oxford University Press inc.New York, 62 - 65.

Cox J.A. und Stein E.A. (1981) Characterization of a new sarcoplasmatic calcium-binding protein with magnesium induced cooperativity in the binding of calcium. Biochemistry **20**, 5430 - 5436.

D´ Haese J. und Carlhoff D.(1987) Localization and histochemical characterization of myosin isoforms in earthworm body wall muscle. J. Comp. Physiol. **B 157**, 171 - 179.

D'Haese J. (1980) Myosin-linked Ca-regulation of the obliquely striated body wall muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. J.Muscle Res. Cell Motil. **1**, 469

Davis M.W., Somerville D., Lee R.Y., Lockery S., Avery L. und Fambrough D.M. (1995) Mutations in the *Caenorhabditis elegans* Na,K-ATPase alpha-subunit gene, eat-6, disrupt excitable cell function. J Neurosci. **15**, 8408 – 8418.

Dawson R.M., Elliot D.C., Elliot W.H. und Jones K.M. (1969) Data for Biochemical Research, Clarendon Press, Oxford.

Dekeyzer N. Engelborghs Y. und Volckaert G. (1994) Cloning, expression and purification of a sarcoplasmic calcium-binding protein from the sandworm *Nereis diversicolor* via a fusion product with chloramphenicol acetyltransferase. Protein Eng. **7**, 125 – 130

Di Mito C. und Betschart B. (1998) DNA extraction from *Ascaris suum* muscle tissue. Parasitol. Res. **84**, 596 - 597.

Doyle K.E., Kovalick G.E., Lee E. und Beckingham K.(1990) *Drosophila melanogaster* contains a single calmodulin gene. J. Molec. Biol. **213**, 599 - 605.

Epstein P., Means A.R. und Berchtold M.W.(1986) Isolation of a rat parvalbumin gene and full length cDNA. J. Biol. Chem. **261**, 5886 - 5891.

Epstein P., Simmen R.M., Tanaka T. und Means A.R.(1987) Isolation and structural analysis of the chromosomal gene for chicken calmodulin. Methods of Enzymology **139**, 217 - 229.

Feinberg A.P., Vogelstein B.(1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132**, 6 - 13.

Flucher B.E. und Franzini-Armstrong C.(1996) Formation of junctions involved in excitation – contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. **93**, 8101 - 8106.

Foehr U.G., Weber B.R., Muentener M., Staudenmann W., Hughes G.J., Frutiger S., Banville D., Schaefer B.W. und Heizmann C.W.(1993) Human alpha and beta parvalbumins. Structure and tissue-specific expression. Eur. J. Biochem. **215**, 719 - 727.

Frankenne F., Joassin L. und Gerday C.(1973) The amino acid sequence of the pike (*Esox lucius*) parvalbumin 3. FEBS Lett. **35**, 145 - 147.

Frausto da Silva J.J.R. und Williams R.J.P. (1991) Calcium:controls and triggers. in: "The biological chemistry of the elements" (Frausto da Silva J.J.R. und Williams R.J.P. eds.), Clarendon Press, Oxford.

Furuyama T. und Dzelzkalns V.A. (1999) A novel calcium-binding protein is expressed in Brassica pistils and anthers late in flower development. Plant Molecular Biology **39**, 729 - 737.

Garrigos M., Dechamps S., Viel A., Lund S., Champeil P., Moller J.V. und le Marie M. (1991) Detection of Ca⁺⁺-binding protein by electrophoretic migration in the presence Ca⁺⁺ combined with ⁴⁵Ca⁺⁺ overlay of protein blots. Anal. Biochem. **194**, 82 - 88.

Gebeyehu G., Rao P.Y., SooChan P., Simms D.A. und Klevan L.(1987) Novel biotinylated nucleotideanalogs for labeling and colorimetric detection of DNA. Nucl. Acids Res. **15**, 4513 - 4534.

Gerday C.(1982) Soluble calcium-binding proteins from fish and invertebrate muscle. Mol. Physiol. *2*, 63 - 87.

Gerday C. (1988) Soluble calcium binding proteins in vertebrate and invertebrate muscles. in "Calcium and calcium-binding Proteins" (C. Gerday, L. Bolis, R. Gillies, eds.). Springer Verlag, Berlin, 23 - 39.

Gerday C., Collin S. und Gérardin-Otthiers N.(1981) The soluble calcium binding protein from sandworm (*Nereis virens*) muscle. J. Muscle Res. Cell Motil. **2**, 225 - 238.

Gerday Ch. und Gillis J.M.(1976) The possible role of parvalbumin in the control of contraction. J. Physiol. **258**, 96 - 97.

Gerke, V. und Moss S. E. (1997) Annexins and membrane dynamics. Biochim. Biophys. Acta **1357**, 129-154.

Giebing T. (1994) Sequenzierung und Struktur-Funktions-Beziehung eines Actin-Modulators aus der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf

Giebing T., Hinssen H. und D' Haese J.(1994) The complete sequence of a 40kDa actin-modulating protein from the earthworm *Lumbricus terrestris*. Eur J Biochem. **225**, 773 - 779.

Gopalakrishna R. und Anderson W.B. (1982) Ca⁺⁺ induced hydrophobic site on calmodulin:application for purification of calmodulin by phenylsepharose affinity chromatography. Biochem. Biophys. Res. Commun. **104**, 830 - 836.

Grunberg-Manago M.(1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. Annu. Rev. Gen. **33**, 193 - 227.

Guerini D. und Carafoli E. (1996) Ca⁺⁺-ATPase (Plasma membrane). in "Guidebook to the Calciumbinding Proteins" (M.R. Celio, T.L. Pauls, B. Schwaller, eds.). Oxford University Press inc.New York, 212 - 215.

Guex N. und Peitsch M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. Electrophoresis **18**, 2714 - 2723.

Hamoir G. Gerardin-Otthiers N. und Focant B.(1980) Protein differentiation of the superfast swimbladder muscle of the toadfish *Opsanus tau*. J.Molec. Biol. **143**, 155 - 160.

Hansen A (2001) Bioinformatik. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.

Heide G. (1971) Die Funktion der nicht-fibrillären Flugmuskeln von Calliphora. Teil 1, Lage, Insertionsstellen und Innervierungsmuster der Muskeln. Zool. Jb. Physiol. **76**, 87 - 98.

Helling R.B., Goodmann H.M., Boyer H.W. (1974) Analysis of endonuclease Eco R 1 fragment of DNA from lamboid bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. J. Virol. **14**, 1235 - 1244.

Hennig, L. (1999) WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of aminoacid sequences. BioTechniques **26**, 1170-1172.

Henrotte J. G. (1952) A crystallin constituent from myogen of carp muscle. Nature 169, 968 - 969.

Heukeshoven J.und Dernick R. (1988) Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. Electrophoresis **9**, 60 – 61.

Hirschberg D.S. (1975) A linear algorithm for computing longest common subsequences. Commun. Assoc. Comput. Mach. **18**, 341 - 343.

Hresko, M.C., Williams, B.D., and Waterston, R.H. (1994) Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. J. Cell Biol. **124**, 491 - 506.

Huber R., Berendes R., Burger A., Schneider M., Karshikov A., Luecke H., Römisch J. und Paques E. (1992) Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. J. Mol. Biol. **223**, 683 - 704.

Huch R. (1991) Untersuchungen zur Wechselwirkung löslicher Calcium-bindender Proteine (SCBP) aus der Regenwurmmuskulatur mit dem Actomyosin und dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Dissertation in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf

Huch R. und D'Haese J. (1992) Quantification of the soluble calcium-binding protein (SCBP) in various muscle tissues of the terrestrial oligochaete *Lumbricus terrestris*. Soil Biol. Biochem. **24**, 1231 – 1235

Huch R., D´ Haese J., Gerday C. (1988) A soluble calcium binding protein from the terrestral annelid *Lumbricus terrestris* L. J. comp. Physiol. *B* **158**, 325-334.

Inoue H., Nojima H. und Okayama H.(1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene, **96**, 23 - 28.

Jauregui-Adell J., Wnuk W. und Cox J.A. (1989) Complete amino acid sequence of the sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP-I) from crayfish (*Astacus leptodactylus*). FEBS Lett. **243**, 209 - 212.

Josephson R.K. und Young D.(1985) A synchronous insect muscle with an operating frequency greater than 500Hz. J. Exp. Biol. **118**, 185 - 208.

Kawasaki H., Nakayama S. und Kretsinger R.H. (1998) Classification and evolution of EF-Hand proteins. Biometals **11**, 277 - 295.

Kelly L.E. (1990) Purification and properties of a 23kDa Ca⁺⁺-binding Protein from *Drosophila melano-gaster*. Biochem. J. **271**, 661 - 666.

Kelly L.E., Phillips A.M., Delbridge, M. und Steward R. (1997) Identification of a gene family from *Drosophila melanogaster* encoding proteins with homology to invertebrate sarcoplasmatic calcium-binding proteins (SCPS). Insect Biochem Molec.Biol. **27**, 783 - 792.

Khandjian E.W. (1987) Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. Bio/Technology **5**, 165 - 167.

Kleinig H. und Meier U. (1999) Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1999

Knippers R. (1997) Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1997

Kobayashi T., Takasaki Y., Tagaki T. und Konishi K.(1984) The amino acid sequence of sarcoplasmic calcium-binding protein obtained from sandworm, *Perinereis vancaurica tetradentata*. Eur. J. Biochem. **144**, 401 - 408.

Kohler L.G., Cox J.A. und Stein E.A. (1978) Sarcoplasmatic calcium binding proteins in protochordate and cyclostome muscle . Mol. Cell Biochem. **20**, 85 - 93.

Kretsinger R.H. und Nockolds C.E. (1973) Carp muscle calcium-binding protein. J. Biol. Chem. 248, 3313 - 3326.

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

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

Le Peuch C.J., Demaille J.G. und Pechere J.F. (1978) Radio-electrophoresis: a specific microassay for parvalbumins. Application to muscle biopsies from man and other vertebrates. Biochim. Biophys. Acta **537**, 153 - 159.

Marsden B.J., Shaw G.S. und Sykes B.D. (1990) Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. Biochem. Cell. Biol. **68**, 587-601.

Maruyama E., Mikawa T. und Ebashi S. (1984) Detection of calcium binding proteins by ⁴⁵Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. J. Biochem. **95**, 511 – 519.

McDonald J.R., Walsh M.P.(1985) Ca²⁺ - binding proteins from bovine brain including a potent inhibitor of protein kinase C. Biochem. J. **232**, 559 - 567.

Meador W.E., Means A.R.und Quicho F.A. (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Angstroms Structure of a calmodulin-peptide complex. Science *257*, 1251 - 1265.

Michalak M. (1996) Calreticulin. in "Guidebook to the Calcium-binding Proteins" (M.R. Celio, T.L. Pauls, B. Schwaller, eds.). Oxford University Press inc.New York, 220 - 222.

Mierendorf R.C., Percy C. und Young R.A. (1987) Gene Isolation by screening lgt11 libraries with antibodies. in "Guide to Molecular Cloning Techniques" (S.L. Berger und A.R. Kimmel, eds.). Academic Press, NY. 458 - 469.

Mill P. J. und Knapp M.F. (1970) The fine structure of obliquely striated body wall muscle in thr earthworm *Lumbricus terrestris* Linn. J. Cell Sci. **7**, 233 - 261.

Moerman, D.G. and A. Fire. (1997) Muscle: structure, function and development. In: "The Nematode C. elegans II" (D. Riddle, T. Blumenthal, B. Meyer, und J. Priess, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 417 - 470.

Morelle G. (1989) A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. B.R.L. Focus 11, 7 - 8.

Müntener M., Käser I., Weber J. und Berchtold M.W. (1995) Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA. Proc. Nat. Acad. Sci. **92**, 6504 - 6508.

Myers E.W. und Miller W. (1988) Optimal alignments in linear space. CABIOS 4, 11 - 17.

Needleman S.B. und Wunsch C.D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. Mol Biol **48**, 443 - 453.

Nelson M.R. und Chazin W.J. (1998) Structures of EF-hand Ca⁺⁺-binding proteins: Diversity in the organization, packing and response to Ca⁺⁺-binding. Biometals **11**, 297 - 318.

O' Neil K.T. und DeGrado W.F.(1990) How calmodulin binds ist targets: sequence independent ecognition of amphiphilic α -helices. Trends in Biochemical Sciences **15**, 59 - 64.

Oswald T.J. und MacLennan D.H.(1974) Isolation of a high affinity calcium binding protein from sarcoplasmatic reticulum. J. Biol.Chem. **249**, 974 - 979.

Pechere J.F., Derancourt J. und Haiech J. (1977) The participation of parvalbumin in the activation - relaxation cycle of vertebrate fast skeletal muscle. FEBS Lett. **75**, 111 - 114.

Peitsch M.C. (1995) Protein modeling by E-mail. Bio/Technology 13, 658 - 660.

Peitsch M.C. (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. Biochem. Soc. Trans. **24**, 274 - 279.

Precheur B., Cox J.A.; Petrova T., Mispelter J. und Craescu C.T.(1996) Nereis sarcoplasmatic Ca⁺⁺binding protein has a highly unstructured apo state which is switched to the native state upon binding of the first Ca⁺⁺-ion. FEBS Letters **395**, 89 - 94.

Rao S.T., Satyshur K.A., Greaser M. und Sundaralingam M. (-) X-Ray Structures of Mn, Cd, Tb metal complexes of troponin C. unveröffentlicht.

Robertson S.P., Johnson J.D. und Potter J.D.(1981) The time courses of Ca^{++} exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin and myosin in response to transient increases in Ca^{++} . Biophys. J. **34**, 559 - 569.

Rodriguez O.C. und Cheney R.E. (2000) A new direction for myosins. Trends in Cell Biology **10**, 307 - 311.

Rogers M.S. und Strehler E.F. (1996) Calmodulin in "Guidebook to the Calcium-binding Proteins" (M.R. Celio, T.L. Pauls, B. Schwaller, eds.). Oxford University Press inc.New York, 34 – 40.

Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D.S., Lin S.W., Dunn J.J. und Studier F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene **56**, 125 - 135.

Rosenbluth J. (1965) Ultrastructural organization of the obliquely striated muscle fibres in *Ascaris lumbricoides*. J. Cell Biol. **25**, 495 - 515.

Rüegg J.C. (1988) Calcium in muscle activation. Springer Verlag, Berlin.

Rushforth A.M., White C.C. und Anderson P. (1998) Functions of the *Caenorhabditis elegans* regulatory myosin light chain genes mlc-1 and mlc-2. Genetics **150**, 1067 - 1077.

Rybicki E.P.,von Wechmar M.B. und Burger J.T. (1990) Monospecific antibody preparation for use in the detection of viruses. In: "World Perspectives on Barley Yellow Dwarf" (PA Burnett, ed.), CIMMYT, Mexico DF, Mexico, 149 – 153.

Saitu N. und Nei M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. Res. **4**, 406 – 425.

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

Satyshur K.A., Pyzalska D., Rao S.T., Greaser M. und Sundaralingam M. (1994) Structure of chicken skeletal muscle troponin-C at 1.78 Angstroms Resolution. Acta Crystallogr., Sect.D **50**, 40 -49.

Schmidt E.R. (1985) Sequenzieren von DNA . in "Molekular- und Zellbiologie" (Blin N., Trendelenburg M.F., Schmidt E.R., Herausgeber). Springer Verlag, Berlin 35 - 51.

Schwaller B. (2001) Calcium-binding proteins. in: Encyclopedia of Life Science, Nature Publishing Group, http://www.els.net.

Schwaller B., Dick J., Dhoot G., Carroll S., Vrbova G., Nicotera P., Pette D., Wyss A., Bluethmann H., Hunzicker W. und Celio M.R. (1999) Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. Am. J. Physiol. **276** (Cell Physiol. **45**) C395 - C403

Schwochau M. (1979a) Die Technik der Präparativen Ultrazentrifugation. GIT 23, 357 - 360.

Schwochau M. (1979b) Die Technik der Präparativen Ultrazentrifugation. GIT 23, 1010 - 1022.

Scott B.T., Simmerman H.K.B., Collins J.H., Nadal-Ginard B. und Jones L.R. (1988) Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. J. Biol. Chem. **263**, 8958 - 8964.

Short J.M., Fernandez J.M., Sorge J.A. und Huse W. (1988) λ ZAP: An expression vector with in vivo excision properties. Nucl. Acids Res. **16**, 7583 -7599.

Shuman S.(1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. Proc. Natl. Acad. Sci. **88**, 10104-10108.

Shuman S.(1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotid synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J. Biol. Chem., **269**, 32678 - 32684.

Sia S.K., Li M.X., Spyracopoulos L., Gagne S.M., Liu W., Putkey J.A. und Sykes B.D. (1997) Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. J.Biol.Chem. **272**, 18216 – 18221

Skelton N.J., Kordel J. und Chazin W.J. (1995) Determination of the solution structure of Apo calbindin D9k by NMR spectroscopy. J. Mol. Biol. **249**, 441 - 462.

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**, 503 - 517.

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

Swan D.G., Cortes J., Hale R.S.und Leadlay P.F.(1989) Cloning, characterization, and heterologous expression of the *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*) gene encoding an EF-hand calcium-binding protein. J. Bacteriol. **171**, 5614 – 5619.

Takagi T. und Konishi K.(1984) Amino acid sequence of alpha chain of sarcoplasmic calcium binding protein obtained from shrimp tail muscle. J. Biochem. **95**, 1603 - 1615.

Takagi T. und Konishi K.(1984a) Amino acid sequence of the beta chain of sarcoplasmic calcium binding protein (SCP) obtained from shrimp tail muscle. J. Biochem. **96**, 59 - 67.

Takagi T., Cox J.A. (1990) Amino acid sequences of four isoforms of amphioxus sarcoplasmic calcium-binding proteins. Eur. J. Biochem. **192**, 387- 399.

Takagi T., Kobayashi T. und Konishi K. (1984) Amino-acid sequence of sarcoplasmic calcium-binding protein from scallop (*Patinopecten yessoensis*) adductor striated muscle. Biochim. Biophys. Acta **787**, 252 - 257.

Takagi T., Konishi K., Cox J.A. (1986) Amino acid sequence of two sarcoplasmic calcium-binding proteins from the protochordate amphioxus. Biochemistry **25**, 3585-3592.

Takagi T., Valette-Talbi L. und Cox J.A. (1992) Primary structure of three minor isoforms of amphioxus sarcoplasmic calcium-binding proteins. FEBS Lett. **302**, 159 - 160.

Takano-Ohmura H., Hirose G. und Mikawa T. (1983) Separation and identification of Drosophila myosin light chains. J.Biochem. **94**, 967 - 974.

Thompson J.D., Higgins D.G. und Gibson T.J. (1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nuceic Acids Res. **22**, 4673 - 4680.

Towbin H., Stachelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocelluose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**, 4350 - 4354.

Vijay-Kumar S. und Cook W.J. (1992) Structure of a sarcoplasmic calcium-binding protein from *Nereis diversicolor* refined at 2.0 A resolution. J. Mol. Biol. **224**, 413 - 426.

Vogel H.J., Lindahl L. und Thulin E. (1983) Calcium-dependent hydrophobic interaction chromatography of calmodulin, troponin C and their proteolytic fragments. FEBS Lett. **157**, 241 - 246.

Vogelstein B. und Gillespie D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**, 615-619.

Warburg O. und Christian W. (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Z. **310**, 384 – 421.

Walsh M.P., Valentine V.A., Ngai P.K., Carruthers C.A., Hollenberg M.D.(1984) Ca²⁺ - dependent hydrophobic-interaction chromatography. Isolation of a novel Ca²⁺ - binding protein and proteinkinase C from bovine brain. Biochem. J. **224**, 117 - 127.

Waterston R.H. (1988) Muscle . in "The Nematode *Caenorhabditis elegans*" (W.B.Wood ed.), Cold Spring Harbour Monograph Series, Cold Spring Harbour. 281 – 335

Williams T.C., Coron D.C., Oikawa W.D., McCubbin, Kay C.M. und Sykes B.D. (1986) 1H NMR spectroscopic studies of calcium-binding proteins. 3.Solution conformations of rat apo-a-parvalbumin and metal-bound rat a-parvalbumin. Biochemistry **25**, 1835 - 1846.

Williams, B.D. and Waterston, R.H. (1994) Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations. J. Cell Biol. **124**, 475 - 490.

Wooton R.J. und Newman D.J.S. (1979) Witefly have the highest contraction frequencies yet recorded in non-fibrillar flight muscles. Nature **280**, 402 - 403.

Danksagungen

8. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Jochen D´ Haese danke ich für die Anregung zur vorliegenden Arbeit, für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Hartmut Greven danke ich für die Übernahme des Gutachtens dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Heide möchte ich mich für die wertvolle Anleitung zur Präparation der Fliegenmuskulatur bedanken.

Herrn Dr. Thomas Giebing und Herrn Dr. Ralf Huch danke ich für die ungezählten Gespräche, Tips und Ratschläge, die mir im Verlauf meiner Arbeit sehr geholfen haben.

Frau Dipl-Biol. Judith Haensler, Abteilung Geobotanik. Düsseldorf, danke ich für die Hilfe bei der Atomabsorptionsspektrometrie.

Frau Dipl-Biol. Elena Hanser möchte ich besonders für die Überlassung von *Ascaris suum* danken.

Bei Herrn Martin Fey bedanke ich mich für seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen praktischen experimentellen Fragen insbesondere bei der Durchführung der chromatographischen Auftrennungen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. D`Haese, Prof. Mehlhorn und Prof. Wunderlich möchte ich für das gute, freundschaftliche Arbeitsklima danken. Frau Dr. Evelyn Krüger danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Teile dieser Arbeit wurden unter

Kiehl E., D' Haese J. (1991) A soluble calciumbinding protein from *Drosophila melanogaster*. J. Muscle Res. Cell Motil. **12**, 115.

Kiehl E., D' Haese J. (1992) A soluble calciumbinding protein (SCBP) present in *Drosophila melanogaster* and *Calliphora erythrocephala* muscle cells. Comp Biochem Physiol B. **102**, 475 – 482.

Kiehl E., D' Haese J. (1992) Thorax muscles of flies contain a soluble calcium binding protein (SCBP). Eur. J. Cell Biol. **57**, Suppl.36, 42

veröffentlicht, die Sequenzen der cDNA von SCBP₂ und SCBP₃ wurden unter den Nummern LTE440224 bzw. LTE440223 bei EMBL registriert. .

Düsseldorf, den