

**Phylogenetische und toxinologische Untersuchungen an
Conidae (Mollusca: Gastropoda) unter besonderer
Berücksichtigung west-atlantischer Vertreter der Gattung
Conus.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus Liebig Universität Giessen

Vorgelegt von
Dipl. Biol. Christian Melaun
geboren in Frankfurt am Main

Giessen, Mai 2008

Diese Arbeit wurde am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie,
Abteilung Entwicklungsbiologie,
der Justus Liebig Universität Giessen und am Department for Chemistry &
Biochemistry der Florida Atlantic University (FAU) in Boca Raton, Florida,
USA durchgeführt.

Dekan:

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Werding

Dritter Prüfer:

Prof. Dr. Rudolf Schipp

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Familie.

1. Einleitung	1
1.1. Marine Kegelschnecken der Gattung <i>Conus</i> und ihre Gifte	1
1.2. Kegelschnecken-Toxine	5
1.3. Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material & Methoden	14
2.1. Chemikalien	14
2.2. Stammlösungen und Puffer	14
2.2.1 Puffer	14
2.2.2 Kulturplatten und Kulturmedien für Bakterien	15
2.3. Probenmaterial	15
2.4. DNA-Extraktion	17
2.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	17
2.4.2 CTAB-Extraktion	18
2.4.3 Extraktion nach SOKOLOV (2000)	18
2.4.4 DNazol-Extraktion	19
2.5. RNA-Extraktion	19
2.6. Polymerase Chain Reaction (PCR)	20
2.6.1 PCR des 16S rRNA-Genabschnittes	20
2.7. RACE-PCR	21
2.7.1 3'-cDNA-Synthese	22
2.7.1.1 cDNA-Synthese nach FROHMAN <i>et al.</i> (1988)	22
2.7.1.2 3'-cDNA-Synthese mit dem SMART RACE cDNA Amplification Kit	23
2.7.1.3 3'-RACE-PCR des Genabschnittes der Toxine der I-Superfamilie	24
2.7.1.4 3'-RACE-PCR des Genabschnittes der Toxine der A-Superfamilie	24
2.7.2 5'-cDNA-Synthese	25
2.7.3 Nested PCR (Verschachtelte PCR)	26
2.8. Klonierungstechniken	27
2.8.1 Ligation	27
2.8.2 Transformation der Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen	28
2.8.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen	29
2.8.4 Restriktionsspaltung	29
2.8.5 Clon-check PCR	30
2.9. Molekulare Taxonomie und Phylogenie-Analyse	30
2.9.1 Sequenzvergleich	31

2.9.2	Distanzwertberechnung	31
2.9.3	Maximum–Parsimony Analyse	32
2.9.4	Neighbor joining Analyse	33
2.9.5	Maximum Likelihood Analyse	33
2.9.6	Auswahl der Outgroups (Außengruppen)	34
2.9.7	Datierung einer molekularen Divergenz	34
2.10.	Morphologie-Analysen	35
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Morphologie	37
3.2.	Molekulare Phylogenie	60
3.3.	Toxinologie	77
3.3.1	A-Superfamilie	77
3.3.2	F-Superfamilie	81
3.3.3	I-Superfamilie	83
3.3.4	vil1293	85
3.3.5	purpur X	85
3.3.6	Toxin-Phylogenie	87
4.	Diskussion	89
4.1.	Morphologie	89
4.2.	Molekulare Phylogenie	92
4.2.1	Zwei unterschiedliche Gruppen innerhalb der west-atlantischen/ost-pazifischen Conidae (HG1 und HG2)	94
4.2.2	Die <i>Conus musicus</i> -Gruppe (HG1a) und die <i>Conus chaldeus</i> -Gruppe (HG1b)	96
4.2.3	<i>Conus spurius</i>	97
4.2.4	Transisthmische Schwesterarten	98
4.2.5	Die <i>Conus gladiator</i> -Gruppe (HG1c)	99
4.2.6	Die südafrikanische Radiation und die <i>C. tinianus</i> -Gruppe (HG1d)	99
4.2.7	Amphinomidae als Nahrung-Die <i>C. cedonulli</i> -Gruppe (HG1e)	101
4.2.8	Molluscivore Conidae -Die <i>C. textile</i> - (HG1f), <i>C. pennaceus</i> - (HG1g) und <i>C. marmoreus</i> -Gruppe (HG1h)	103
4.2.9	Piscivore Conidae	104
4.2.10	Die basale Gruppe der Conidae (HG2)	105

4.2.11	Die Sonderstellung von <i>Conus californicus</i>	106
4.2.12	Zeichnung und Gehäusecharakteristika	107
4.2.13	Die Diversität west-atlantischer und ost-pazifischer Conidae im Vergleich	109
4.2.14	Die Problematik mit der Systematik	110
4.3.	Toxinologie	111
4.3.1	Die A-Superfamilie	111
4.3.1.1	α A-Conotoxin	111
4.3.1.2	α -Conotoxine	112
4.3.1.3	Phylogenetische Analyse der A-Superfamilien-Prepropeptide	113
4.3.2	Die F-Superfamilie	116
4.3.3	Die I-Superfamilie	116
4.3.4	vil1293	118
4.3.5	purpur X –ein potentiell neues Toxin aus der P-Superfamilie	119
4.3.6	Toxin-Phylogenie	120
5.	Zusammenfassung	126
6.	Literatur	128
7.	Abkürzungsverzeichnis	149
	Danksagung	150
	Lebenslauf	152
	Publikationsverzeichnis	153
	Eidesstattliche Erklärung	154
	Anhang	beigefügte CD

1. Einleitung

1.1. Marine Kegelschnecken der Gattung *Conus*

Dem Einvernehmen nach stellt *Conus* mit ca. 600-1000 Arten sowohl die größte Gattung räuberischer Gastropoden, als auch die größte Gattung giftiger Tiere überhaupt dar. Weiterhin wird wegen ihres Umfangs vermutet, dass es sich bei *Conus* auch um die Gattung mariner Invertebraten handelt, die die größte Diversität hervorgebracht hat (KOHN, 1997, 2001).

Die Taxonomie der Gattung beruht auf den Gehäusen der Tiere. Diese weisen zahlreiche Strukturen und farbliche Merkmale auf, denen große Bedeutung bei der Artbestimmung zukommt. Hierzu dienen Merkmale wie Form, Zeichnung, Gewicht etc.. RÖCKEL *et al.* 1995 versuchten diese formelmäßig auszudrücken, indem sie Indices zur Bestimmung anführen, die sich aus den Verhältnissen verschiedener Variablen, wie z.B. Länge, Breite, Höhe der Spira und Gewicht zusammensetzen. Allerdings unterliegen viele dieser Merkmale auch einer hohen innerartlichen Variabilität und bei vielen Artbezeichnungen ist es fragwürdig, ob sie nicht lediglich Farbmorphe bereits beschriebener Arten darstellen. Andererseits wird bei vielen Arten aufgrund ihrer großen morphologischen Variabilität vermutet, dass es sich um Artkomplexe handelt.

Die Tatsache, dass Kegelschnecken seit langem wegen ihrer Gehäuse im Blickpunkt von Sammlern stehen, hat das taxonomische Chaos um diese Gattung vergrößert. Hier wurden von Laien neue Arten eingeführt, deren Beschreibung nur im Mindesten dem Internationalen Code für die zoologische Nomenklatur entsprechen. Auch wurde in vielen Fällen eine Überprüfung der innerartlichen Variabilität versäumt.

Alle Versuche die Gattung aufzuspalten sind bisher gescheitert. Es gibt keine Nomenklatur, die allgemein anerkannt wurde, auch weil es zahlreiche Übergangsformen bei den Gehäusen (Abbildung 1.1) und teilweise große innerartliche Variabilität gibt.

Zusammen mit den Familien der Turridae und Tereberidae bilden die Conidae die Superfamilie Toxoglossa (Giftzüngler). Abgesehen von einigen Ausnahmen innerhalb der Turridae die ihre Radula reduziert haben (KANTOR & SYSOEV, 1989), sind die einzelnen Radulazähne bei den übrigen Vertretern dieser Superfamilie stark vergrößert, als Chitinblättchen eingerollt und bilden hohle, mit Widerhaken versehene harpunenähnliche Pfeile (Abbildung 1.3).



Abbildung 1.1: Verschiedene *Conus*-Arten zur Veranschaulichung der innergenerischen Gehäusevariabilität. Obere Reihe von links nach rechts: *C. gloriamaris*, *C. bengalensis*, *C. imperialis*, *C. geographus*, *C. aulicus*, *C. pergrandis*. Mittlere Reihe von links nach rechts: *C. kintoki*, *C. bullatus*, *C. tribblei*, *C. molluccensis*, *C. episcopatus*, *C. marmoreus*, *C. neotorquatus*. Untere Reihe von links nach rechts: *C. magus*, *C. glaucus*, *C. comatosa*, *C. spirofilis*, *C. typhon*, *C. generalis*.

Als Bewohner tropischer und subtropischer Gewässer leben Kegelschnecken in der Brandungszone bis ca. 1000 m Tiefe auf sandigem Untergrund, meist in der Nähe von Korallenriffen. Im natürlichen Lebensraum ist oft der einzige freiliegende Teil der Kegelschnecken der Siphon, der zur Atmung aus dem Sand gestreckt wird, während der Rest der Schnecke darin verborgen bleibt. Zuweilen wird auch die Proboscis mit den Fühlern und Augen teilweise aus dem Sand gestreckt (KOHN, 1983a, eig. Beobachtung). Wie viele Neogastropoda sind auch die Kegelschnecken getrenntgeschlechtlich. Nach einer inneren Befruchtung werden einige hundert bis mehrere Millionen Eier vom Weibchen in Eikapseln abgelegt (KORN, 1994).

Innerhalb der Gattung finden sich zwei verschiedene Entwicklungsweisen: Arten mit einer intracapsulären Entwicklung und Arten, die eine planktonische Veliger-Phase durchlaufen. Bei den wenigen Arten mit einer direkten Entwicklung schlüpfen die Larven im Veliconcha-Stadium und durchlaufen entweder gar keine oder nur eine sehr kurze (wenige Stunden)

dauernde planktonische Phase (KOHN & PERRON, 1994). Diese Arten kommen vornehmlich in Gebieten mit starker Strömung, z.B. an der Küste Südafrikas, vor. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Anpassung an den Lebensraum, um ein Abdriften der Larven zu verhindern. Arten mit einer planktonischen Phase produzieren höhere Eizahlen. Aus den Eiern schlüpfen Veliger-Larven die zunächst frei umher schwimmen, um sich anschließend zur Veliconcha-Larve weiter zu entwickeln, bevor sie die Metamorphose in benthisch lebende Juvenile durchlaufen.

Der Giftapparat der Kegelschnecken besteht aus dem Radulasack, der Giftblase, der Giftdrüse (Giftschlauch) und dem Pharynx–Proboscis–Komplex (Abbildung 1.2.). Die Giftblase dient als Speicherort für das Gift und als Pumpe bei der Giftabgabe, wobei sie das Gift aus der Giftdrüse drückt. Die Giftdrüse, ein bis zu 1 Meter langer Schlauch, ist Ort der Giftsynthese. Wie der Radulasack mündet auch die Giftdrüse in den Pharynx. Im Radulasack werden die Chitinpfeile gebildet und gelagert. Zum Beutefang wird jeweils ein Pfeil in den Pharynx gebracht und dort mit Gift gefüllt. Durch Druck der Pharynxmuskulatur wird der Pfeil, der mit einem fadenähnlichen Ligament mit dem Radulasack verbunden bleibt, aus der Proboscis in die Beute geschossen (HERMITTE, 1946; MEBS, 1989, 2000). Nach ENDEAN & RUDKIN (1965) soll die Form dieser Pfeile an die bevorzugte Beute adaptiert sein.

Sämtliche Vertreter der Conidae sind carnivor, die von ihrer Ernährungsweise her in drei Kategorien eingeteilt werden: vermivor, molluscivor und piscivor (KOHN, 1959a, b, 1983b; ENDEAN & RUDKIN, 1963). Nach LIM (1969) sind ca. 65 % der Coniden vermivor, 16 % molluscivor und ~18 % piscivor. Weiterhin gibt es auch einige omnivore Arten (<1 %) die nicht auf eine bestimmte Beute spezialisiert sind (z.B. *C. californicus*, *C. pictus*), sondern ein breit gefächertes Nahrungsspektrum besitzen (LEGALL *et al.* 1999). Piscivore Arten haben im Laufe der Evolution zwei unterschiedliche Strategien zum Fangen der Beute entwickelt. Beispielsweise hat *Conus purpurascens* sich auf das Fangen freischwimmender Fische spezialisiert (*hook-and-line* Strategie, siehe unten). *Conus geographus* benutzt dagegen eine Netzfang–Strategie, bei der das Rostrum über schlafende Fische gestülpt wird und diese erst harpuniert werden, wenn der Fisch nicht mehr in der Lage ist zu entweichen. Dadurch ist es den Tieren möglich, einen kompletten Schwarm Beutefische auf einmal zu erbeuten, indem sie die Fische im Rostrum gefangen halten und nacheinander abschießen (OLIVERA, 1997). Hingegen bringt die *hook-and-line* Strategie den Tieren den Vorteil, dass Fische aus einer größeren Entfernung erbeutet werden können. Bei dieser Strategie muss die Beute schnell immobilisiert werden (KOHN, 1956), d.h. das Gift von „*hook-and-line*-Arten“ muss andere

Komponenten aufweisen, als das Gift der Arten, welche die Netzfang-Strategie entwickelt haben (OLIVERA *et al.* 1985a; HOPKINS *et al.* 1995). Die meisten lebensgefährlichen Unfälle beim Menschen werden durch piscivore Arten verursacht. So wird von *Conus geographus* berichtet, dass 66 % der Unfälle einen tödlichen Verlauf nehmen (CORNEY, 1902; FLECKER, 1936; RICE & HALSTEAD, 1968; JOHNSON & STABLUM, 1971; MCMICHAEL, 1971; CRUZ *et al.* 1976, 1978; GRAY *et al.* 1988).

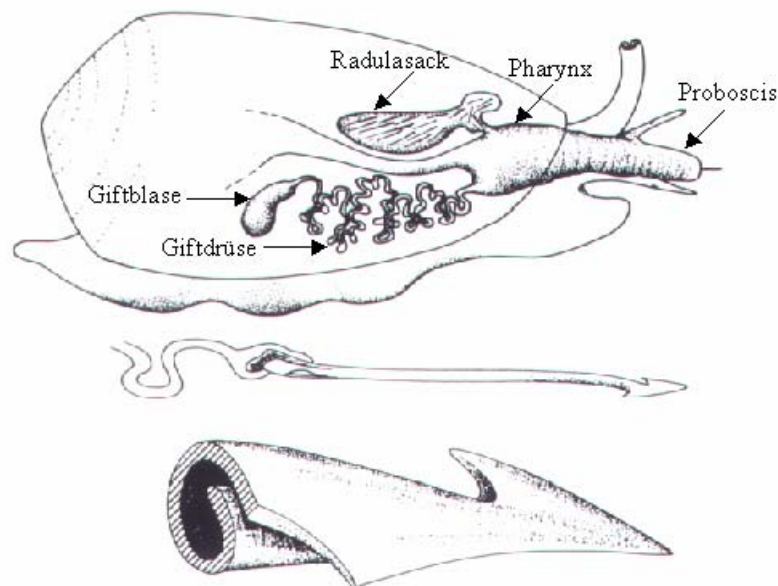


Abbildung 1.2.: Der Giftapparat von *Conus*. (Oben): Der Bildungsort des Giftes ist die Giftdrüse. In der Giftblase wird es gespeichert. Außerdem fungiert die Giftblase als Pumpe bei der Giftabgabe. Im Radulasack werden die Radulazähne (Pfeile) gebildet, gespeichert und gelagert. Zum Beutefang werden sie in den Pharynx befördert, hier mit Gift beladen und durch die Proboscis abgeschossen. (Mitte): Ein Radulazahn in der Komplettansicht. (Unten): Harpunenförmige Spitze eines Radulazahnes mit Widerhaken (MEBS, 2000).

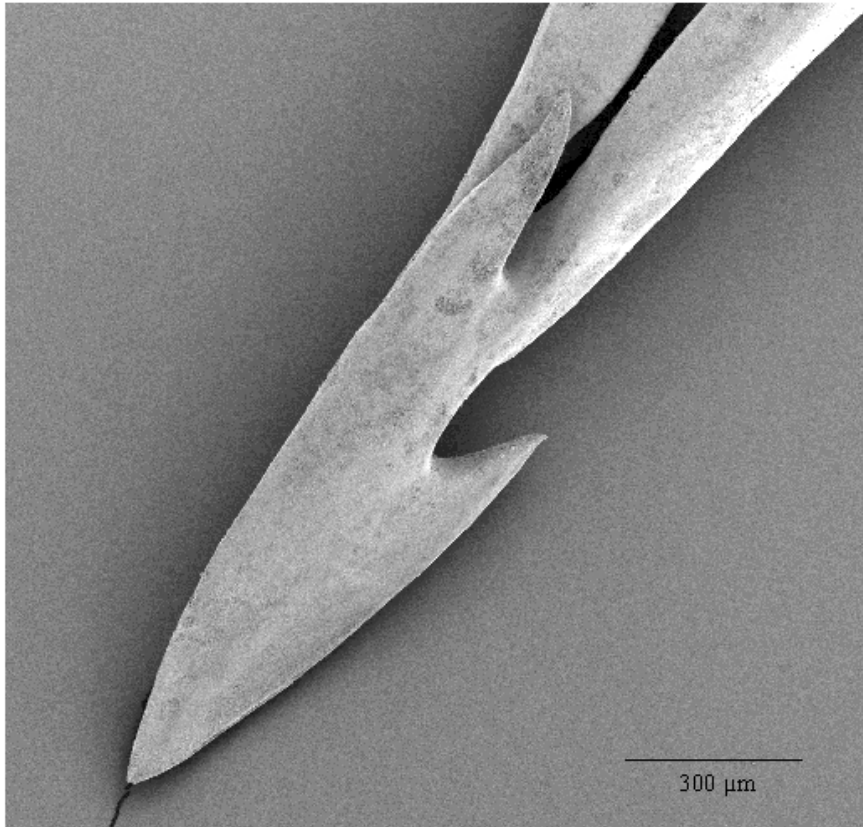


Abbildung 1.3.: REM-Aufnahme eines Radulazahnes von *Conus textile* (MEBS, 2000)

1.2. Kegelschnecken-Toxine

Kegelschnecken-Gift ist eine milchige Flüssigkeit, die überwiegend Proteine und Peptide enthält und ein komplexes Gemisch hochwirksamer Toxine darstellt. (GRAY *et al.* 1981, JIMENEZ *et al.* 1983).

Bei den Toxinen der Kegelschnecken, generell Conotoxine genannt, handelt es sich um kleine, meist basische Peptide, die Kettenlängen von 10 bis über 30 Aminosäuren besitzen. Sie werden als längere Präpropeptide mit Kettenlängen von ca. 70–120 Aminosäuren synthetisiert. Die interspezifische Divergenzrate bei homologen Präpropeptiden ist in den drei verschiedenen Bereichen (Signalregion, Proregion und Toxinregion) in unterschiedlichem Maße ausgeprägt. Während die Toxinregion hypervariabel ist, ist vor allem die Signal- aber auch die Proregion relativ konserviert. Im Genom sind diese drei Bereiche durch Introns voneinander getrennt.

Etwa 20 % der Conotoxine enthalten γ -Carboxyglutamat, was posttranslational gebildet wird. Diese Carboxylierung von Glutamat-Resten wird durch eine Erkennungssequenz in der Proregion hervorgerufen, die von einer Vitamin K-abhängigen Carboxylase erkannt wird.

Bereits jetzt sind bei Kegelschnecken mehr γ -Carboxyglutamat-enthaltende Peptide nachgewiesen worden, als in allen anderen Tiergruppen zusammengenommen. Neben der Carboxylierung von Glutamat finden sich in Conotoxinen weitere posttranslationale Modifikationen, wie die Hydroxylierung mancher Prolin-Reste, der Bromierung von Tryptophan, der Glykosylierung von Serin- und Threonin-Resten, der Sulfation von Tyrosin oder der Epimerisation von L-Tryptophan zu D-Tryptophan. Derart mannigfaltige Modifikationen sind bei keiner anderen Polypeptid-Familie nachgewiesen (JIMENEZ *et al.* 1996, 1997; CRAIG *et al.* 1997, 1998a, 1999a; LOUGHNAN *et al.* 1998; BANDYOPADHYAY *et al.* 1998; RIGBY, 1999).

Die Inhibitor-Cystein-Knoten-Anordnung (ICK *inhibitor cysteine knot*) wird in einer großen Anzahl kleiner Toxine und inhibitorischen Polypeptiden unterschiedlicher Funktion und diversen Ursprungs gefunden (NARASIMHAN *et al.* 1994; PALLAGHY *et al.* 1994; DRAKAPOULOU *et al.* 1998), so auch bei den Conotoxinen. Conotoxine sind durch drei Stränge anti-paralleler β -Faltblätter charakterisiert, die durch Disulfidbrücken (*cysteine knot*) miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1.4). Es gibt Hypothesen, die besagen, dass für die Ausbildung dieses Cystein-Motivs, die Signalregion des Prepropeptids von entscheidender Bedeutung ist (LEGALL *et al.* 1999; OLIVERA & CRUZ, 2001).

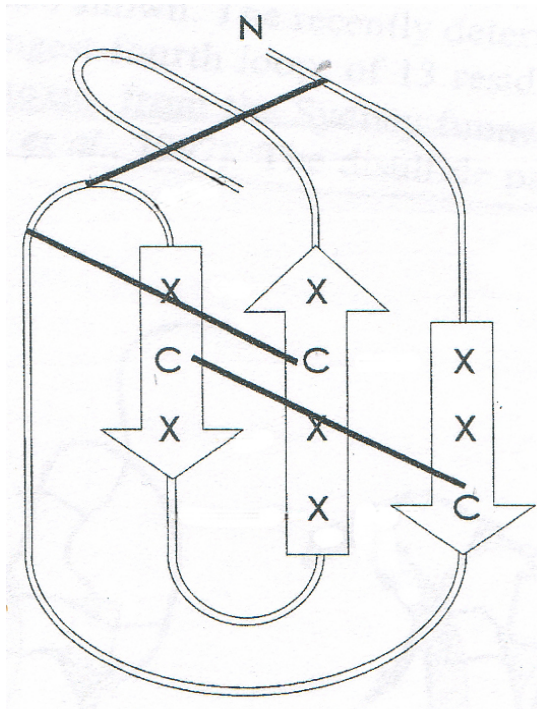


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des ICK-Motivs bei einem 4-Loop Conotoxin. Disulfidbrücken sind durch Linien gekennzeichnet (verändert nach NORTON & PALLAGHY, 1998).

Innerhalb einer Superfamilie lassen sich hinsichtlich der pharmakologischen Aktivität inkl. der Bindungsorte, Unterschiede zwischen den verschiedenen Toxinen feststellen. Insofern werden diese Toxinklassen weiter nomenklatorisch unterteilt (MCINTOSH *et al.* 1999b, WALKER *et al.* 1999). Eine weitere Klassifikation der Conotoxine bezieht sich auf die Anzahl der Regionen zwischen den Disulfidbrücken, den „Loops“. Beispielsweise werden Toxine der O-Superfamilie als 4-Loop-Toxine bezeichnet, da sie vier Loops zwischen drei Disulfidbrücken ausgebildet haben.

Gerade piscivore Kegelschnecken benötigen zur schnellen Paralyisierung ihrer Beute ein hochaktives Gift. Die rasche Paralyse der Beute wird hauptsächlich durch Toxine aus vier Toxinklassen erreicht: den α -, δ -, μ - und ω - Conotoxinen. Durch Kombination dieser einzelnen Komponenten (auch mit anderen Giftbestandteilen) kommt es zusätzlich zu einer Wirkungssteigerung.

α -Conotoxine bestehen aus einer Kette von 12–15 Aminosäuren die intramolekular durch zwei Disulfidbrücken verknüpft sind. Bei den α -Conotoxinen handelt es sich um ein Analogon zu dem südamerikanischen Pfeilgift Curare und α -Bungarotoxin (aus dem Gift des Vielbinden-Kraits *Bungarus multicinctus*). Diese Toxine binden an die nicotiniergen ACh-Rezeptoren der postsynaptischen Membran motorischer Endplatten, wodurch die Erregungsfortleitung auf den Muskel unterbunden wird. Diese Bindung ist hochspezifisch und nur z.T. reversibel (MCMANUS *et al.* 1981; MCINTOSH *et al.* 1982; ZAFARALLA *et al.* 1988; MYERS *et al.* 1991, MARTINEZ *et al.* 1995; CARTIER *et al.* 1996; LUO *et al.* 1998).

Abgesehen von den α -Conotoxinen sind noch vier andere Toxingruppen beschrieben, die als Antagonisten der nicotiniergen ACh-Rezeptoren wirken: α A-Conotoxine, α S-Conotoxine, ψ -Conotoxine und α D-Conotoxine. α A-Conotoxine binden v.a. an die nicotiniergen ACh-Rezeptoren im Muskel, allerdings fehlt ihnen die Affinität zu manchen Rezeptor-Untertypen ($\alpha 1/\alpha$ -interface) an die α -Conotoxine binden. Auch die α S- und ψ -Conotoxine binden selektiv an ACh-Rezeptoren des Muskels, jedoch an unterschiedlichen Untereinheiten. Diese Toxinklassen sind aus verschiedenen Arten beschrieben und treten selten gemeinsam auf. Aus *C. vexillum* sind beispielsweise nur α D-Conotoxine beschrieben (ARIAS & BLANTON 2000, NICKE *et al.* 2004, TERLAU & OLIVERA 2004, TEICHERT *et al.* 2005a, LOUGHNAN *et al.* 2006).

δ -Conotoxine sind Peptide mit 25–32 Aminosäuresubstituenten und drei Disulfidbrücken-Bindungen. Diese Toxine verzögern die Inaktivierung des Natriumkanals, indem sie an die

Untereinheit VI binden. Bei *Conus purpurascens* scheinen δ -Conotoxine eine Schlüsselrolle bei der schnellen Immobilisierung der Beutetiere zu spielen, da sie zu einer tetanischen Kontraktion der Muskulatur führen und damit eine Lähmung bewirken (FAINZILBER *et al.* 1994, 1995a; SHON *et al.* 1995; TERLAU *et al.* 1996a; MCINTOSH *et al.* 1999b).

ω -Conotoxine besitzen bei Kettenlängen von 25–32 Aminosäuren ebenfalls drei Disulfidbrücken. Sie blockieren Calciumkanäle und unterbinden dadurch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle nach der Depolarisation der Zellmembran, was die Freisetzung von Acetylcholin aus der Endplatte verhindert. ω -Conotoxine sind die ersten bekannten Toxine tierischen Ursprungs, die Ca^{2+} -Kanäle als Wirkungsort haben (OLIVERA *et al.* 1984, 1987, 1994; CRUZ *et al.* 1987a; MCCLESKY *et al.* 1987; DUNLAP *et al.* 1995; LEWIS *et al.* 2000).

μ -Conotoxine stellen eine Kette aus etwa 20 Aminosäuren dar, die ebenfalls durch drei Cysteine miteinander verbunden ist. Aufgrund des abweichenden Cystein-Motivs gehören sie jedoch der M-Superfamilie an, gegensätzlich zu den δ - und ω -Conotoxinen die zur O-Superfamilie gerechnet werden. Analog zum Tetrodotoxin führen μ -Conotoxine, durch eine Bindung an Untereinheit I der extrazellulären Seite der Porenregion, zu einer Inaktivierung der Natriumkanäle, wodurch der Kanal blockiert wird. Hingegen werden Natriumkanäle von Nervenmembranen nicht von μ -Conotoxinen blockiert. Ihr spezifischer Angriffspunkt sind Natriumkanäle der Muskelmembran (SATO *et al.* 1983; CRUZ *et al.* 1985b; MOCYDLOVSKY *et al.* 1986, OHIZUMI *et al.* 1986; SHON, 1998a).

Neben den erwähnten Toxinen sind noch eine Reihe weiterer Peptide aus den Giften der Kegelschnecken isoliert worden. So bewirkt das κ -Conotoxin PVIIA aus dem Gift von *Conus purpurascens* eine Blockade des Kalium-Kanals bei *Drosophila* und *Xenopus* und führt zu einer Blockade des K^+ -Ausstroms aus der Zelle. In Kombination mit dem δ -Conotoxin PVIA, das einen vermehrten Na^+ -Einstrom bewirkt, führt es zur Depolarisation der Zellmembran und somit zur Dauerkontraktion der Muskulatur (TERLAU *et al.* 1996a, SHON *et al.* 1998b). Andere Peptide verursachen nach intracranialer Injektion bei Mäusen u.a. ein charakteristisches Zittern wie das „*shaker*“-Peptid oder unkoordinierte Bewegungen wie das „*spasmodic*“-Peptid. Contulakin-G (früher als *sluggish peptide* bekannt) ruft bei intracerebroventricularer Injektion depressive Aktivität und Apathie hervor, bei intrathekaler Injektion an Hunden wurde aber ebenfalls eine schmerzlindernde Wirkung nachgewiesen (CRUZ *et al.* 1987a; CRAIG *et al.* 1998a, 1999b; LIRAZAN *et al.* 2000; NARANJO, 2002, ALLEN *et al.* 2007; KERN *et al.* 2007).

Das Toxin ViTx aus der I-Superfamilie, das aus dem Gift von *Conus virgo* isoliert wurde, weist funktionelle Analogien zu PVIIA auf, da es auch an den K⁺-Kanal bindet. Wie PVIIA hemmt ViTx nicht nur Kalium-Kanäle von Invertebraten. Auch die Bindung von ViTx ruft eine verlängerte Depolarisation und eine daraus resultierende Dauerkontraktion hervor. Aus der gleichen Superfamilie finden sich aber auch Toxine in den Giften von *C. capitaneus* und *C. vexillum*, die ebenfalls an die Kaliumkanäle Kv 1.1 und Kv 1.3 binden, ebenso wie die κ A-Conotoxine. Dabei weisen diese unterschiedlichen Toxin-Gruppen z.T. stark voneinander abweichende Cystein-Motive auf (CRAIG *et al.* 1998b, KAUFERSTEIN *et al.* 2003, 2004).

Bei den sogenannten Conantokinen handelt es sich um Peptide aus 17 bis 21 Aminosäuren, sie besitzen keine Disulfidbrücken und zeichnen sich durch einen hohen Anteil an γ -Carboxyglutamat aus. Die Conantokine sind die ersten toxischen Peptide, von denen diese Aminosäure beschrieben wurde. Intracranial in junge Mäuse injiziert (<2 Wochen) löst Conantokin-G ein schlafähnlichen Zustand aus, weshalb es früher als *sleeper peptide* bezeichnet wurde. Bei Mäusen, die älter als drei Wochen sind, führt es jedoch zu Hyperaktivität. Conantokin-G befindet sich in den USA in Phase I der klinischen Erprobung als Mittel gegen Schmerz und Epilepsie. Der Wirkungsort der Conantokine sind die NMDA-Rezeptoren (N-methyl-D-aspartat; ein Subtyp excitatorischer Aminosäure-Rezeptoren, der auf erregende Aminosäuren wie Glutamat, Glutamin und Glycin anspricht. NMDA-Rezeptoren steuern z.B. im Gehirn die Gedächtnisleistungen), was zur Folge hat, daß dort kein Kationen-Austausch mehr stattfinden kann. Interessant sind sie deshalb, da außer den Conantokinen keine Toxine bekannt sind, die die NMDA-Rezeptoren als Wirkungsort besitzen (MCINTOSH *et al.* 1984; OLIVERA *et al.* 1985b; HAACK *et al.* 1990; BINGHAM *et al.* 1995; OLIVERA, 2006).

Bei der Immobilisierung der Beute wirken noch weitere Peptide wie beispielsweise die Vasopressin-Homologe (z.B. Lys-Conopressin-G, γ -Conopressin). Conopressine haben gefäßverengende Eigenschaften, und bewirken auf diese Weise einen schnelleren Transport der Toxine über den Kreislauf an ihren Wirkungsort (Cruz *et al.* 1987b; NIELSEN *et al.* 1994). Ähnliche Wirkungen könnte ebenfalls das Neurophysin-Homolog Conophysin-R besitzen, das aus dem Gift von *C. radiatus* isoliert wurde (LIRAZAN *et al.* 2002, TERLAU & OLIVERA 2004, MÖLLER & MARÍ 2007).

Es wird vermutet, dass jede Kegelschneckenart zwischen 100 und 200 unterschiedliche Peptide in ihrem Gift sezerniert, von denen bei der überwiegenden Zahl weder die biologische Wirkung, noch ihr Angriffspunkt bisher bekannt sind (OLIVERA *et al.* 1990). Funktionell homologe Toxine sind zwar im interspezifischen Vergleich gefunden worden, jedoch variieren sie z.T. erheblich in ihrer Aminosäure-Sequenz. Während des Evolutionsverlaufs konnte offenbar eine große Vielfalt an Toxinen entstehen. Im Hinblick auf die Größe der Gattung schätzt man die Zahl an Conotoxinen auf ca. 70.000 (ESPIRITU *et al.* 2001). Diese hohe Diversitätsrate wird vor allem drei Parametern zugeschrieben:

1. Die Aminosäurereste zwischen den Loop-Regionen sind hypervariabel, lediglich die Cysteine besitzen eine konservierte Anordnung. Bei GVIA, einem ω -Conotoxin aus *C. geographus*, sind die wichtigsten Aminosäuren, die für die Affinität zum Calciumkanal verantwortlich sind, Lys² und Tyr¹³. Dabei handelt es sich um zwei Aminosäuren, die relativ konserviert sind und auch bei den Toxinen anderer Arten zu finden sind, z.B. bei MVIIA, MVIIB, MVIIC aus *C. magus* und SVIB aus *C. striatus* (WOODWARD *et al.* 1990; KIM *et al.* 1994; LEW *et al.* 1997). Andere Aminosäuren innerhalb der Loop-Regionen dieser Toxine sind hingegen variabel. Die Loop-Regionen der Conotoxine sind starken Modifikationen in Bezug auf ihre Sequenz und Länge unterworfen. Durch diese Veränderungen konnten sich evolutionsgeschichtlich die mannigfachen Spezifitäten für die verschiedenen Rezeptoren entwickeln.

2. Durch Umgestaltung der Cystein-Anordnungen kann eine breitere Vielfalt ausgebildet werden. So besitzen die α A- und die ψ -Conotoxine jeweils drei Disulfidbrückenbindungen, allerdings mit voneinander abweichendem Cystein-Motiv sowie unterschiedlichen Orten der physiologischen Aktivität (*targets*). Die Anordnung der Disulfidbrücken ist jedoch bei beiden Toxinklassen für ihre biologische Aktivität von Bedeutung. α - und λ -Conotoxine besitzen beide die gleiche Cystein-Anordnung, es findet jedoch eine unterschiedliche Disulfidbrückenbildung statt. α - und α A-Conotoxin hingegen binden beide an den kompetitiven Antagonisten des ACh-Rezeptors, haben jedoch abweichende Cystein-Motive. (FAINZILBER *et al.* 1995b; MCINTOSH *et al.* 1999a, c, 2000; BALAJI *et al.* 2000).

3. Viele Conotoxine werden posttranslational modifiziert, beispielsweise durch die Hydroxylierung von Prolin-Resten, der Sulfation von Tyrosin, der Carboxylierung von Glutamat-Resten oder der Bromierung von Tryptophan. Keine anderen bekannten Polypeptide

werden in solch mannigfaltiger Art modifiziert (JIMENEZ *et al.* 1997; CRAIG *et al.* 1997, 1999a; LOUGHNAN *et al.* 1998).

Aufgrund ihrer hohen Affinität zu bestimmten Ionenkanälen und Rezeptoren sind die Conotoxine wichtige Werkzeuge für die neurophysiologische Forschung. Wegen ihrer geringen Größe ist es möglich, sie ohne großen Aufwand künstlich zu synthetisieren. Durch die von ω -Conotoxinen verursachte selektive Inhibierung war es möglich, verschiedene Typen von Ca^{2+} -Kanälen an den präsynaptischen Endplatten zu identifizieren. α -Conotoxine sind wegen ihrer Diskriminierung zwischen verschiedenen nah verwandten nicotinergen Acetylcholin-Rezeptor-Isoformen von pharmakologischem Interesse. GVIA aus dem Gift von *C. geographus* ist das am häufigsten in der Neurophysiologie benutzte Conotoxin. Seine Verwendung ist in über 2000 wissenschaftlichen Veröffentlichungen belegt

Weiterhin zeigen einige dieser Toxine vielversprechende therapeutische Wirkungen, wodurch sie auch für den medizinischen Gebrauch interessant sind (siehe Tabelle 1.1), z.B. hat sich κ -PVIIA, ein K^+ -Kanal Blocker im Tierversuch als effektives Mittel gegen Herzinfarkt herausgestellt. Von den ersten identifizierten Conotoxinen befinden sich ca. 10% mindestens in Phase I der klinischen Erprobung, wie Conantokin-G als Mittel gegen Epilepsie und Schmerz. MVIIA, ein ω -Conotoxin aus dem Gift von *Conus magus*, wird mittlerweile unter dem Handelsnamen „Zirkontid“ als Schmerzmittel vertrieben. Es dient zur Schmerzunterdrückung, da es an den N-Typ der Ca^{2+} -Kanäle (CaV2.2) von Synapsen im Rückenmark angreift. Es gibt weitere Conotoxine die sich in der Erprobungsphase zum analgetischen Gebrauch befinden. Die Wirkungsweise unterliegt dabei fünf unterschiedlichen Mechanismen, von denen keines Opioid-basiert ist. Die Anzahl an Analgesika in Tabelle 1.1 zeigt eine weitere wichtige Bedeutung dieser Conopeptide: Die Identifizierung neuer pharmakologischer Mechanismen. Zum Beispiel war der N-typ Ca^{2+} -Kanal zuvor als Wirkort für Schmerzmittel unbekannt. Dies zeigt, dass selbst Conotoxine, die nicht direkt für den therapeutischen Gebrauch synthetisiert wurden, sehr wichtig zur Identifizierung bisher unbekannter Wirkorte für potentielle neue Heilmittel sind. (MYERS *et al.* 1993; HEADING, 1999; HU *et al.* 1999; JONES & BULAJ, 2000; MCINTOSH & JONES, 2001; OLIVERA & CRUZ, 2001; PUTZIER & FRINGS, 2002; ZHANG *et al.* 2003; TERLAU & OLIVERA, 2004; LUBBERS *et al.* 2005).

Tabelle. 1.1: Conotoxine im medizinischen Gebrauch

Wirkort	<i>Conus</i> Peptid	Therapeutischer Einsatz	Status der Entwicklung (Stand Okt. 2006; USA)
N-typ. Ca^{2+} -Kanal	ω -MVIIA ω -CVID	Schmerz	Zugelassen Dezember.2004
Neurotensin Rezeptor	Contulakin-G	Schmerz	Phase I
Norepinephrin Transporter	χ -MrIA	Schmerz	Phase I
Nicotinerge Rezeptor	α -Vc1.1	Schmerz	Phase I
NMDA- Rezeptor	Conantokin-G	Epilepsie, Schmerz	Phase I
K^+ -Kanal	κ -PVIIA	Myocard-Infarkt	Vorklinische Phase
Na^+ -Kanal	μ O-MrVIB	Schmerz	Vorklinische Phase

Die drei verschiedenen Bereiche (Signalregion, Proregion und Toxinregion) der Conotoxin-Precursor divergieren in unterschiedlichen Raten. Anhand des Vergleichs von synonymen (Austausch eines Nucleotides ohne eine Änderung der Aminosäure zur Folge zu haben) und nicht-synonymen (Nucleotid-Austausch, der eine Änderung der Aminosäure bewirkt) Substitutionsraten der verschiedenen Regionen eines Präpropeptides wird vermutet, dass die Mutationshäufigkeit innerhalb der verschiedenen Regionen variiert. Die Signalregion besitzt die niedrigste, die Toxinregion die höchste Mutationsrate. Die drei Bereiche der Präpropeptide werden durch Introns voneinander getrennt. Das führte zur Vermutung, dass voneinander durch Introns getrennte Exons das Potential besitzen, unterschiedliche Mutationsraten zu entwickeln (HILLYARD, *et al.* 1989; OLIVERA *et al.* 1990, 1999; WALKER *et al.* 1999).

Für Phylogenie-Analysen ergibt sich aus diesen unterschiedlichen Divergenzraten, dass die Toxinregion wegen ihrer Hypervariabilität ungeeignet ist. Die besten Ergebnisse erhält man hier durch Vergleiche der Signalregionen, evtl. in Kombination mit den Pro-Regionen.

1.3. Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die von RÖCKEL *et al.* (1995) eingeführten Gehäuse-morphologischen Indices ausreichend bei der Artdetermination sind, was anhand einer in sich geschlossenen Gruppe (*C. marmoreus*-Gruppe) überprüft wurde.

Eine weitere Fragestellung war, in welchem verwandschaftlichen Verhältnis die atlantischen Vertreter der Conidae zueinander stehen und ob sich die Gattung *Conus* in eine west-atlantische/ost-pazifische und eine indo-pazifische Radiation aufspalten lässt. Dazu wurde eine molekulare Phylogenie-Analyse unter Verwendung eines Abschnittes des 16S rRNA-Gens durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mit Sequenzen aus einer Datenbank ergänzt. Daraus sollten Modelle für die systematische Einteilung der Gattung *Conus* gefunden werden. Basierend auf den molekular-phylogenetischen Daten sollte überprüft werden, ob eine Charakterisierung der Arten einer Gruppe aufgrund von Übereinstimmungen des äußeren Erscheinungsbildes möglich ist.

Durch einem Vergleich der Prepro-Regionen der Toxine der A-Superfamilie mit den Daten der molekularen Phylogenie, basierend auf dem Abschnitt des 16S rRNA-Gens, sollte überprüft werden, ob sich die phylogenetische Stellung einzelner Arten auch in ihren Toxin-Zusammensetzungen widerspiegelt.

Bei ausgewählten west-atlantischen/ost-pazifischen Arten wurde zur besseren Charakterisierung einzelner Toxin-Superfamilien gezielt nach der Nukleotid-Sequenz ihrer Precursor gesucht

Weiterhin wurde untersucht, ob durch den direkten Vergleich der Sequenzen der Prepro-Regionen verschiedener Toxin-Superfamilien eine Aussage nach der phylogenetischen Evolution der Toxine ableitbar ist.

2. Material & Methoden

2.1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von der Firma Merck, Darmstadt, bzw. von den Firmen AppliChem, Darmstadt, Roth, Karlsruhe sowie ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim bezogen.

2.2. Stammlösungen und Puffer

2.2.1 Puffer

Lysis-Puffer

10 mM TRIS
10 mM EDTA
100 mM NaCl
2 % SDS

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid
Zur Verwendung bei Gelen 1: 10 verdünnen
lichtgeschützt bei 4 °C lagern

TAE-Puffer (50x-Stammlösung)

242 g TRIS,
100 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0)
57,1 ml Eisessig
mit H₂O dest auf 1 l auffüllen

Agarosegel (2%)

1 g Agarose
in 50 ml 1x TAE-Puffer aufkochen
nach Abkühlung auf ca. 52 °C 2,5 µl
Ethidiumbromid hinzugeben

2x CTAB-Puffer

100mM Tris-HCl, pH 8,0
1,4M NaCl
20mM EDTA
2% CTAB

2.2.2 Kulturplatten und Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium (1 Liter)

5 g Bacto Yeast Extract (Firma Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA)

10 g Trypton (Firma Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA)

10 g NaCl (Firma Merck, Darmstadt)

mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

Ampicilin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicilin in H₂O dest.

bei 4°C lagern

LB-Amp-Medium

LB-Medium mit 0,02 % Ampicilin

X-Gal Stammlösung

40 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyl-β-D-Galactopyranosid)

in DMSO lösen

lichtgeschützt bei 4°C lagern

IPTG-Stammlösung

24 mg/ml IPTG (Isopropyl-β-D-thio-Galactopyranosid) in H₂O lösen

bei 4°C lagern

LB-IPTG/X-Gal/Amp-Platten

LB-Amp-Medium mit 1,5 % Bacto Agar

(Firma Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA)

40 µl X-Gal und 60 µl IPTG

2.3. Probenmaterial

Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Gewebeteile verschiedener *Conus*-Arten stammten aus der Karibik, dem atlantischen Ozean, Südafrika sowie dem östlichen Indopazifik. Die verschiedenen indo-pazifischen *Conus*-Arten wurden nach RÖCKEL *et al.*

(1995) bestimmt: *Conus ammiralis* LINNÉ 1758, *C. anemone* LAMARCK 1810, *C. arenatus* LIGHTFOOT 1786, *C. aristophanes* SOWERBY II 1857, *C. aurisiacus* LINNÉ 1758, *C. bandanus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. boeticus* REEVE 1844, *C. capitaneus* LINNÉ 1758, *C. carinatus* SWAINSON 1822, *C. circumcisis* BORN 1778, *C. coffeae* GMELIN 1791, *C. distans* LIGHTFOOT 1786, *C. dorreensis* PÉRON 1807, *C. eburneus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. flavidus* LAMARCK 1810, *C. frigidus* REEVE 1848, *C. generalis* LINNÉ 1767, *C. geographus* LINNÉ 1758, *C. glans* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. imperialis* RÖDING 1798, *C. legatus* LAMARCK 1810, *C. litoglyphus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. litteratus* LINNÉ 1758, *C. magus* RÖDING 1798, *C. marmoreus* LINNÉ 1758, *C. miles* LINNÉ 1758, *C. mitratus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. moluccensis* DILLWYN 1817, *C. mucronatus* REEVE 1843, *C. muriculatus* SOWERBY I & II 1833, *C. musicus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. mustulinus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. nanus* SOWERBY I & II 1833, *C. nocturnus* LIGHTFOOT 1786, *C. obscurus* SOWERBY I & II 1833, *C. omaria* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. pennaceus* BORN 1778, *C. pertusus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. planorbis* BORN 1778, *C. quercinus* LIGHTFOOT 1786, *C. radiatus* GMELIN 1791, *C. rattus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. sanguinolentus* QUOY & GAIMARD 1834, *C. striatellus* LINK 1807, *C. striatus* LINNÉ 1758, *C. tessulatus* BORN 1778, *C. textile* LINNÉ 1758, *C. varius* LINNÉ 1758, *C. vexillum* GMELIN 1791, *C. victoriae* REEVE 1843, *C. vidua* REEVE 1843, *C. virgo* LINNÉ 1758 und *C. vulpinus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792.

Aus Südafrika, dem west-atlantischen und ost-pazifischen Ozean wurden weiterhin folgende Arten in die Untersuchung mit einbezogen: *C. archon* BRODERIP 1833, *C. bartschi* HANNA & STRONG 1949, *C. beddomei* SOWERBY III 1901, *C. brunneus* WOOD 1828, *C. burryae* CLENCH 1942, *C. cargilei* COLTRO 2004, *C. caribaeus* CLENCH 1942, *C. cedonulli* LINNÉ 1767, *C. cingulatus* SOWERBY I 1825, *C. dalli* STEARNS 1873, *C. daucus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. delessertii* RÉCLUZ 1843, *C. donnae* (PETUCH 1998), *C. ermineus* BORN 1778, *C. flavescens* SOWERBY I & II 1834, *C. fontonae* ROLÁN & TROVÃO 1990, *C. gladiator* BRODERIP 1833, *C. gradatulus* WEINKAUFF 1875, *C. infrenatus* REEVE 1848, *C. jaspideus* GMELIN 1791, *C. lindae* PETUCH 1987, *C. mahogani* REEVE 1843, *C. mindanus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. mus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. nux* BRODERIP 1833, *C. patricius* HINDS 1843, *C. poormani* BERRY 1968, *C. princeps* LINNÉ 1758, *C. purpurascens* SOWERBY I & II 1833, *C. richardbinghami* PETUCH 1993, *C. sanderi* WILS & MOOLENBEEK 1979, *C. scopulorum* VAN MOL, TURSCH & KEMPF 1971, *C. spurius* RÖDING 1798, *C. stimpsoni* DALL 1902, *C. tinianus* HWASS IN BRUGUÉRE 1792, *C. vanhyningi* REHDER 1944 und *C. villepini* FISCHER & BERNARDI 1857 wurden zur Untersuchung des 16S rRNA-Genabschnitts

verwendet. Diese Daten wurden für die Phylogenie-Analyse des 16S rRNA-Gens durch Sequenzen aus der NCBI-Datenbank erweitert.

Bei *C. villepinii* wurden die Gene der F-Superfamilie, sowie einer bis dahin unbeschriebenen Stoffgruppe aus Kegelschnecken-Gift untersucht. Bei *C. ermineus*, *C. jaspideus*, *C. nux*, *C. purpurascens*, und *C. villepinii* auch die Gene der A-Superfamilie. Weiterhin fand bei *C. regius* auch eine Analyse der Gene der I-Superfamilie statt. Für die Phylogenie-Analysen der Precursor-Sequenzen wurde der Datensatz durch Sequenzen aus der NCBI-Datenbank vergrößert.

2.4. DNA-Extraktion

Um DNA aus Geweben zu extrahieren wurden im Laufe der Arbeit verschiedene Techniken erprobt.

2.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Aus den Geweben der Kegelschnecken kann die DNA nach einem Proteinase K-Verdau, einer Phenol/Chloroform-Extraktion, und anschließender Ethanol Präzipitation gewonnen werden. Durch die Phenol/Chloroform-Extraktion wird die DNA (in der oberen, wäßrigen Phase) von Proteinen und unpolaren Verbindungen (in der unteren phenolischen Phase) getrennt. Zur Unterstützung der sich daran anschließenden Ethanol-Fällung wurde Glasmilch eingesetzt.

Zur Extraktion wurden Gewebeproben der Kegelschnecken, welche in Ethanol, bzw. Isopropanol gelagert wurden, verwendet.

Durchführung:

- Zugabe von 500 µl Lysis-Puffer und 20 µl Proteinase K (20µg/µl)
- Inkubation der Proben über Nacht im Wasserbad bei 56 °C
- mit 1 Volumen Roti[®]-Phenol/Chloroform (Carl Roth GmbH & Co, mit TE-Puffer gesättigt, pH 7,5-8,0) versetzen und schütteln
- Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm
- Überführen der oberen Phase in ein neues Gefäß

- mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzen und schütteln
- Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm
- Überführen der oberen Phase in ein neues Gefäß
- Zugabe von 1 Volumen Isopropanol, 1/100 Volumen (5 µl) 3M Natriumacetat und 3 µl Glasmilch (Fa. Mo Bio, Solana Beach, USA)
- Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm
- Überstand verwerfen, waschen des Pellets mit 1 ml Ethanol (70%)
- Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm
- Überstand verwerfen und Trocknen des Pellets bei 56 °C im Heizblock
- Hinzugabe von 60-100 µl Milli-Q-H₂O..
- Resuspension des Pellets über Nacht bei 4 °C

Von dem erhaltenen Überstand wurden Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) in die PCR eingesetzt.

2.4.2 CTAB-Extraktion

Die Extraktion mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) ähnelt der unter 2.4.1 beschriebenen Methode. Der Unterschied zu dieser besteht in der Wahl des Lösungspuffers. und der Proteinase K-Menge.

- Zugabe von 500 µl CTAB-Puffer und 50 µl Proteinase K (20 µg/µl)
- Inkubation der Proben über Nacht rotierend bei 56 °C
- Danach wie unter 2.4.1 weiterverfahren

2.4.3. Extraktion nach SOKOLOV (2000)

- Zugabe von 1 ml Lysis-Puffer und 20 µl Proteinase K (20µg/µl)
- 2-6 Stunden bei 56 °C inkubieren
- Zugabe von 100 µl 30% KCL-Lösung
- 5 Minuten auf Eis inkubieren
- 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in 2 ml-Tube überführen
- Zugabe von 50 µl 3M NaAcetat und eiskaltem 100% Ethanol

- Über Nacht bei -20 °C DNA fällen
- 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand mit 200 µl 70% Ethanol waschen
- 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren
- Ethanol abnehmen
- Pellet bei 56 °C trocknen
- Hinzugabe von 60-100 µl Milli-Q-H₂O
- Resuspension des Pellets über Nacht bei 4 °C

2.4.4 DNAzol-Extraktion

- Zugabe von 1 µl DNAzol (MRC, Cincinnati, USA) und 20 µl Proteinase K (20 µg/µl)
- Inkubation der Proben über Nacht rotierend bei 56 °C
- 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugieren
- Zugabe von 500 µl eiskaltem 100% Ethanol
- Proben 3-6x wenden
- über Nacht bei +4 °C inkubieren
- 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 70% Ethanol waschen
- 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugieren
- Pellet erneut mit 70% Ethanol waschen
- 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugieren
- Pellet bei 56 °C trocknen
- Hinzugabe von 60-100 µl Milli-Q-H₂O
- Resuspension des Pellets über Nacht bei 4 °C

2.5. RNA-Extraktion

Zur Analyse der Toxin-Gene war es nötig RNA aus den Giftschläuchen zu extrahieren, da die Gene im Genom von langen Introns unterbrochen sind. Um die Giftschläuche zu erhalten wurden die Tiere auf Eis runtergekühlt und aus dem Gehäuse präpariert. Die aus den Tieren entnommenen Giftschläuche wurden bis zur weiteren Verwendung in RNAlater (Ambion, Austin, USA) bei -20°C aufbewahrt. Die Extraktion der RNA aus den Giftschläuchen der Tiere

erfolgte mittels des RNeasy Kit von Qiagen (Hilden). Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.6. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS, 1986, 1990) wird dazu verwendet, bestimmte DNA-Bereiche *in vitro* zu vervielfältigen. Ihre Entwicklung führte zu einer Beschleunigung der DNA-Sequenzierung (SIMONE *et al.*, 1994), und hat den Vorteil, daß lediglich geringe Mengen an DNA benötigt werden. In sukzessiven Zyklen wird die doppelsträngige DNA durch Hitze aufgetrennt (denaturiert), anschließend lagern sich die Oligonukleotidprimer (kurze einzelsträngige DNA-Abschnitte) an das DNA-Template (annealing) an. Die Primer sind komplementär zu den Enden der Zielsequenz. (PINGOUD & URBANKE, 1997) Je nach ihrer Basenabfolge sind unterschiedliche optimale Anlagerungstemperaturen notwendig. Im dritten Schritt wird mit Hilfe der hitzestabilen *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (SAIKI *et al.*, 1988) und dNTP's, der zum Template komplementäre DNA-Strang synthetisiert (extension). Zur erneuten Synthese werden die gesamten Schritte im nächsten Zyklus wiederholt. Somit kommt es zu einem exponentiellen Anreichern der Zielsequenz.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Thermocycler-Modelle Peqlab cyclone gradient, Peqlab cyclone 25 sowie Eppendorf Mastercycler personal benutzt.

2.6.1. PCR des 16S rRNA-Genabschnittes

Bei der Durchführung wurde die DNA vorgelegt und der fertige Reaktionsmix hinzugegeben.

Bei der PCR der 16S rRNA-Genabschnittes wurde die DNA in unterschiedlichen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) verwendet. Folgende Primer wurden eingesetzt (PALUMBI 1996):

16Sar: 5' CGCCTGTTTATCAAAAAACAT -'3

16Sbr: 5' ACGTGATCTGAGTTCAGACCGG -'3

PCR-Ansatz:

1 µl Primer 16Sar (10 pmol), Fa. MWG, Ebersberg

1 µl Primer 16Sbr (10 pmol), Fa. MWG, Ebersberg
 2 µl dNTPs (je 200 µmol), Fa. NEB, Ipswich
 3 µl 10x PCR-Puffer, Fa. NEB, Ipswich
 2,4 µl MgCl₂ (25 mmol), Fa. NEB, Ipswich
 0,2-0,5 µl *Taq*-Polymerase Fa. NEB, Ipswich
 20 µl H₂O dest.

PCR-Bedingungen:

Initialer Denaturierschritt: 120 s bei 94°C

PCR-Zyklus (30-40x):

Denaturierung: 60 s bei 94°C

Annealing: 60 s bei 50°C – 56°C

Extension: 60 s bei 72°C

Additional Extension: 300 s bei 72°C

Die PCR-Produkte wurden auf ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetragen, und sofern sie die erwartete Länge hatten, sequenziert. Um die Länge der erhaltenen Banden zu überprüfen, wurde auf jedes Gel ein Fragment-Längen Standard Marker (Fa. Hybaid-AGS, Heidelberg) mitaufgetragen (100 bp length).

2.7. RACE-PCR

Bei der RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), oder auch einseitigen PCR handelt es sich um eine verankerte PCR. Hierbei wird ein kleiner bekannter Sequenzabschnitt innerhalb eines Gens ausgenutzt, um die unbekanntes 3'- und 5'-Enden einer cDNA zu amplifizieren. Von diesem bekannten Abschnitt aus beginnt die Synthese in Richtung des unbekanntes 3'- oder 5'-Endes der cDNA. Die Verlängerung der cDNA vom unbekanntes zum bekannten Ende wird durch die Verwendung eines Primers erreicht, der an den existierenden PolyA-Schwanz bindet, oder an einen angehängten Homopolymer-Schwanz (FROHMAN, 1988). Die 3'- und 5'-Enden der cDNA werden in zwei getrennten Schritten isoliert. Bei der cDNA-Synthese nach Frohman wird an die RNA Matrize ein Oligo (dT) Primer, auch bekannt als Frohman Primer, ligiert (siehe Abschnitt 2.6.1.1).

2.7.1 3'-cDNA-Synthese

2.7.1.1 cDNA-Synthese nach FROHMAN et al. (1988)

Mit dieser Methode kann die Genexpression auf der Stufe der RNA untersucht werden. Hierzu wird an die RNA Matrize ein Primer hybridisiert und mittels der reversen Transkriptase und einer anschließenden PCR eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um ein Enzym aus dem Mäuse-Leukämie-Virus (MuL-RT), einem Retrovirus. Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen, bei denen der genetische Informationsfluß von der RNA zur DNA verläuft, also umgekehrt als auf dem normalen Wege. Mit einer Reversen Transkriptase kann prinzipiell die komplette zelluläre RNA umgeschrieben werden. Es ist aber auch möglich nur mRNA zu verwenden. Bei den meisten eukaryontischen Zellen ist die mRNA an ihrem 3' Ende polyadenyliert. Diese Eigenschaft wird bei einer RACE des 3'-Endes ausgenutzt. Hier wird die Synthese des ersten Stranges mit einer reversen Transkription an einem komplementären Oligo (dT)-Primer, bzw. dem Frohman-Primer begonnen (NEWTON & GRAHAM, 1994). Der Primer besitzt eine zusätzliche Adaptersequenz an der in der nachfolgenden PCR ein einzelner oder sogar zwei verschachtelte Primer binden können. Die Synthese erfolgte mit dem Qiagen Omniscript RT-Kit.

In der vorliegenden Arbeit wurden 3–4 µg Gesamt-RNA der jeweiligen *Conus* Art eingesetzt.

Frohman-Primer:

5' –GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT- 3'

Reaktionsansatz:

	Volumen
Buffer RT	2 µl
dNTP-Mix, je 10 mM, (Fa. NEB, Ipswich)	2 µl
Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1 µl
Frohman-Primer 100 µM, (Fa. BioSpring, Frankfurt)	2 µl
RNase Inhibitor, 20 U/µl,	1 µl
RNA	3 µl
mit depc – H ₂ O auf 20 µl auffüllen	

Anschließend wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert und für die Dauer von 60 Minuten bei 42°C im Thermocycler inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.7.1.2 3'-cDNA-Synthese mit dem SMART RACE cDNA Amplification Kit

Diese Methode funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip wie die bereits erwähnte, hat jedoch den Vorteil, dass man eine größere Menge, reinerer cDNA erhält. Auch hierbei wird beim cDNA-Synthesevorgang ein Adapterprimer an das unbekannte Ende der zu synthetisierenden cDNA ligiert.

Reaktionsansatz und Durchführung:

RNA	3 µl
3'-CDS-Primer A	1 µl
H ₂ O	1 µl

- 2 Minuten bei 70°C inkubieren
- 2 Minuten auf Eis runterkühlen
- kurz abzentrifugieren

Zugabe von:

5x First-Strand Buffer	2 µl
DTT (20mM)	1 µl
dNTP-Mix (je 10mM)	1 µl
PowerScript Reverse Transkriptase	1 µl

- kurz abzentrifugieren
- 90 Minuten bei 42°C inkubieren
- Zugabe von 20-100 µl Tricine-EDTA-Buffer
- 7 Minuten bei 70°C inkubieren
- Aufbewahrung bei -20°C

2.7.1.3 3'-RACE-PCR des Genabschnittes der Toxine der I-Superfamilie

Als Template wurden jeweils 0,1 µl, 1 µl und 2 µl cDNA vorgelegt.

Zur Steigerung der Anreicherung wurde mit diesen PCR-Produkten eine Reamplifikation durchgeführt. Die Produkte wurden 1:10 bzw. 1:5 verdünnt, und erneut in die PCR eingesetzt.

Signal 2: 5'- ATGATGTTTCGATTGACGTCAGTCAGC -'3

Anker: 5'- CCAGTGAGCAGAGTGACG -'3

Reaktionsansatz:

0,5 µl Primer Signal 2, 10 pmol, (Fa. MWG, Eberstadt)

0,5 µl Primer Anker, 10 pmol, (Fa. MWG, Eberstadt)

2 µl dNTPs, je 200 µmol, (Fa. NEB, Ipswich, USA)

5 µl 10x PCR-Puffer, 25 mmol, (Fa. NEB, Ipswich, USA)

0,5 µl *Taq* Polymerase 5 U, (Fa. NEB, Ipswich, USA)

mit H₂O dest. auf 50 µl auffüllen.

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung: 10 min bei 95°C

PCR-Zyklus (40x):

Denaturierung: 60 s bei 95°C

Annealing: 60 s bei 48°C

Extension: 60 s bei 72°C

Additional extension: 7 min bei 72°C

2.7.1.4 3'-RACE-PCR des Genabschnittes der Toxine der A-Superfamilie

Als Template wurden jeweils 0,1 µl, 1 µl und 2 µl cDNA vorgelegt.

Zur Steigerung der Anreicherung wurde mit diesen PCR-Produkten z.T. eine Reamplifikation durchgeführt. Die Produkte wurden 1:10 bzw. 1:50 verdünnt, und erneut in die PCR eingesetzt.

Als Primer dienten der Alpha-Primer (WANG *et al.* 2003) und der Q_A-Primer, (Anker-Primer) mit folgender Sequenz:

Alpha: 5'- ATGGGCATGCGGATGATGTTC -'3

Anker: 5'- GACTCGAGTCGACATCGA -'3

Reaktionsansatz:

0,5 µl Primer Signal 2, 10 pmol, (Fa. MWG, Eberstadt)

0,5 µl Primer Anker, 10 pmol, (Fa. MWG, Eberstadt)

2 µl dNTPs, je 200 µmol, (Fa. NEB, Ipswich, USA)

5 µl 10x PCR-Puffer, 25 mmol, (Fa. NEB, Ipswich, USA)

0,5 µl *Taq* Polymerase 5 U, (Fa. NEB, Ipswich, USA)

mit H₂O dest. auf 50 µl auffüllen.

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung: 10 min bei 95°C

PCR-Zyklus (40x):

Denaturierung: 60 s bei 95°C

Annealing: 60 s bei 51-53°C

Extension: 60 s bei 72°C

Additional extension: 7 min bei 72°C

2.7.2 5'-cDNA-Synthese

Die 5'-cDNA-Synthese erfolgte ausschließlich mit Hilfe des SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech, Heidelberg). Die Synthese ist identisch mit der unter 2.6.1.2. beschriebenen. Der einzige Unterschied besteht in den Komponenten, aus denen der anfängliche Ansatz besteht.

Reaktionsansatz und Durchführung:

RNA 3 µl

5'-CDS-Primer A 1 µl

SMART II A Oligo 1 µl

Weitere Vorgehensweise wie unter 2.6.1.2 beschrieben.

Verwendete 5'-Primer:

Vil1293: 5'-RTT RTA NCC RAA NSW RTT RCA RAA NGG-3'

Vil 14a: 5'-TAR CAC ATN GTY TTR CAY TGD ATR AA-3'

Reaktionsansatz:

0,5 µl Primer Universal Primer Mix, (Clontech, Mountain View)

0,5 µl genspezifischer Primer, (Fa. MWG, Eberstadt)

0,5 µl dNTPs, je 200 µmol, (Clontech, Mountain View)

2,5 µl 10x Advantage 2 PCR-Puffer, (Clontech, Mountain View)

0,5 µl 50x Advantage 2 Polymerase Mix, (Clontech, Mountain View)

mit H₂O dest. auf 25 µl auffüllen.

PCR-Bedingungen:

PCR-Zyklus (5x):

Denaturierung: 60 s bei 94°C

Annealing + Extension: 60 s bei 72°C

PCR-Zyklus (5x):

Denaturierung: 30 s bei 94°C

Annealing: 30 s bei 68-70°C

Extension: 120 s bei 72°C

PCR-Zyklus (20-25x):

Denaturierung: 30 s bei 94°C

Annealing: 30 s bei 66-68°C

Extension: 120 s bei 72°C

Additional extension: 180 s bei 72°C

2.7.3 Nested PCR (Verschachtelte PCR)

Mittels einer nested PCR wird die Empfindlichkeit und Spezifität der ersten PCR gesteigert, Hierbei wird ein, bei der ersten PCR verwendeter Primer, durch einen anderen, eingeschobenen Primer ersetzt. Dieser eingeschobene Primer wird so gewählt, dass er innerhalb des in der ersten PCR synthetisierten DNA-Abschnittes bindet.

Bei der 5'-RACE-PCR der Conotoxine der F-Superfamilie und des Toxins v1293a wurde der am 5'-Ende bindende Universal Primer Mix (Clontech, Mountain View) durch den eingeschobenen Universal Nested Primer (Clontech, Mountain View) ersetzt.

PCR-Bedingungen:

PCR-Zyklus (15-20x):

Denaturierung:	30 s bei 94 °C
Annealing:	30 s bei 68-70 °C
Extension:	120 s bei 72 °C
Additional Extension:	180 s bei 72 °C

Nach Erhalt des 5'-Endes (Signalregion) wurden genspezifische Primer designed, um die Ergebnisse zu verifizieren und mögliche Isotoxine zu identifizieren.

Mit Hilfe dieser nested PCR konnten im 5'-terminalen Genabschnitt (Signalregion) konservierte Bereiche identifiziert werden, die zur Erstellung genspezifischer Primer (Signal 3) Verwendung fanden. Diese Primer wurden zusammen mit dem jeweiligen Anker-Primer in die 3'-RACE-PCR eingesetzt.

vil 1293fw: 5'-ATG TTG TCC CAG ATC TCC CTG CCC TCC TCC TCC-3'

vil 14a fw: 5'-ATG GGA TTC AGA GTG TTG GTC TTG GTC GTC ATG-3'

2.8. Klonierungstechniken

Bei den erhaltenen PCR-Produkten der Toxingene handelte es sich um Mischsequenzen. Aus diesem Grund wurden die Produkte mittels eines geeigneten Vektors zur Vereinzelung in kompetente Zellen transformiert, um einzelne Sequenzen isolieren zu können.

2.8.1 Ligation

Oft ist es vor der Ligation nötig überhängende Enden an das PCR-Produkt zu koppeln. Dabei werden Poly A-Fragmente an das 3'-Ende der PCR-Produkte über die Transferase Aktivität der *Taq*-Polymerase, angehängt (Tailing). Nachdem am Vektor ebenfalls ein Tailing (allerdings ein Poly T-Tailing) erfolgt ist, ist es so möglich, diese beiden komplementären

Enden miteinander zu hybridisieren. Diese Verknüpfung (Ligation) erfolgt z.B. mit der T4 DNA Ligase. Sie katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5' Phosphat- und freien 3'-Hydroxy-Gruppen.

Zur Klonierung wurde der pGEM-T[®] bzw. der pGEM-Teasy[®]-Vektor (Firma Promega, Madison, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Ligationsansatz:

Der Ansatz wurde auf Eis pipetiert.

3 µl PCR-Produkt

5 µl 2 X Rapid Ligation-Puffer

1 µl pGem[®]-T Vektor bzw. pGem[®]-Teasy Vektor

1 µl T4 DNA Ligase (3 U/µl)

Der Ansatz wurde kurz gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.8.2 Transformation der Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

Da der benutzte Vektor eine Ampicillinresistenz zeigt, wurden für eine Selektion plasmidtragender Bakterienzellen LB-Platten mit Ampicillin verwendet. Eine Überprüfung, ob die Übertragung des Inserts in den Vektor erfolgreich war, erfolgt über die α -Komplementierung, da die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme nicht mehr in der Lage sind, das *lacZ α* -Gen zu exprimieren und deshalb keine β -Galaktosidaseaktivität besitzen. Bei diesen *E. coli* - Zellen kann aber eine Komplementierung durch den Vektor erfolgen. Der Polylinker des Vektors ist jedoch so konstruiert, daß bei erfolgter Insertion der Fremd-DNA eine Expression des α -Peptids der β -Galaktosidase unterbunden wird. Auf LB-AMP-Platten, die IPTG (den Induktor des *lac*-Operons) sowie als Substrat den Farbstoff X-Gal tragen, bilden rekombinante Bakterien weiße Kolonien, nicht rekombinante Kolonien dagegen blaue, da sie das Substrat X-Gal nicht hydrolysieren können. Auf diese Weise kann eine Selektion erfolgen. Bei der Transformation wurden alpha-5 Competent Cells der Firma NEB, verwendet.

Durchführung:

- 25 µl kompetenter Bakterien-Zellen auf Eis auftauen
- Zugabe des Ligationsansatzes
- Ansatz kurz mischen und anschließend für 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock: 30 s bei 42°C

- Inkubation: 2 Minuten auf Eis
- 900 µl SOC – Medium dazugeben
- 40 µl X–Gal und 40 µl IPTG auf LB–AMP–Platten ausstreichen
- Platten bei 37 °C vorwärmen
- Ansatz 45 Minuten bei 37°C und ca. 200 rpm schütteln
- kurz abzentrifugieren
- 735 µl Medium abziehen und das Bakterienpellet in den restlichen 200µl auflösen
- je 50 µl und 150 µl auf die LB–AMP–Platten ausstreichen
- über Nacht bei 37°C inkubieren

2.8.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden das QIAprep Spin Miniprep-Kit (Fa. Qiagen, Hilden) und das Fast Plasmid Mini Kit (Eppendorf) verwendet. Bei beiden Kits wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.8.4 Restriktionsspaltung

Restriktionsenzyme erkennen spezifische palindrome Sequenzen in doppelsträngiger DNA. Verwendung finden meist Enzyme des Typs II, da diese kein ATP zur Spaltung benötigen. Sie können dazu dienen isolierte Plasmid–DNA an verschiedenen Stellen aus dem Vektor zu schneiden. Dieses Produkt wird gelelektrophoretisch aufgetrennt, wodurch eine Bestimmung der Insertgröße erfolgen kann. Auf diese Weise kann bestimmt werden, ob die Klonierung erfolgreich war. Die Erkennungssequenz von *EcoRI* des in dieser Arbeit verwendeten Enzyms ist: (G↓AATTC). Diese Restriktionsenzyme wurden von der die Firma Amersham Pharmacia, Freiburg bezogen.

Verdauungsansatz:

1 µl 10X Puffer (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg)

2 µl *EcoRI* 1U,

5 µl DNA

2µl H₂O dest.

Der Ansatz wurde für 90 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit 2 µl Ladepuffer gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.8.5 Clon-check PCR

Die clon-check PCR stellt eine weitere Möglichkeit dar, zu überprüfen ob die Bakterienkolonien das Insert aufgenommen haben. Als Template dient hierbei 0,1 µl der isolierten Plasmid-DNA.

M13 forward: 5'- GTAAAACGACGGCCAG -3'

M13 reverse: 5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3'

Reaktionsansatz:

0,1,25 µl M13 forward, 100 µmol, (Fa. MWG, Eberstadt)

0,1,25 µl M13 reverse, 100 µmol, (Fa. MWG, Eberstadt)

0,625 µl dNTPs, je 200 µmol, (Fa. NEB, Ipswich, USA)

2,5 µl 10x PCR-Puffer (Fa. NEB, Ipswich, USA)

0,2 µl *Taq* Polymerase 5 U (Fa. NEB, Ipswich, USA)

21,425 µl H₂O dest.

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung: 10 min bei 95°C

PCR-Zyklus (40x):

Denaturierung: 60 s bei 95°C

Annealing: 60 s bei 50°C

Extension: 60-120 s bei 72°C

Additional extension: 180 s bei 72°C

2.9. Molekulare Taxonomie und Phylogenie-Analyse

Die molekulare Taxonomie dient, ebenso wie die morphologische Taxonomie dazu, Unklarheiten in den Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Organismen zueinander aufzuklären. So lassen sich diese Organismen in ein phylogenetisches System einordnen. Die molekulare Taxonomie gewinnt vor allem bei solchen Arten an Bedeutung, wo aufgrund der morphologischen Unterschiede keine exakte Charakterisierung möglich ist, weil die Vertreter der einzelnen Arten sehr ähnlich sind, und eine genaue morphologische Unterscheidung sehr schwierig ist. Die molekulare Taxonomie ist somit ein weiteres Werkzeug zur

Artcharakterisierung. Auch lassen sich aufgrund der Größe des Sequenzunterschiedes des für die jeweilige Untersuchung verwendeten Genes, wie bei morphologischen Differenzen, die Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Arten zueinander ermitteln, und so eine phylogenetische Analyse durchführen. Da diese phylogenetische Analyse auf anderen Merkmalen als denen der morphologischen Klassifizierung basiert, kann dadurch eine Überprüfung der Einteilung nach morphologischen Kriterien erfolgen. Auf diese Weise ist es möglich das bis dahin gültige System zu verifizieren oder es zu revidieren und ein neues System aufzustellen.

2.9.1 Sequenzvergleich

Die nach dem Sequenziervorgang erhaltenen Rohdaten wurden mit den Programmen BioEdit und MEGA 4.1 weiter bearbeitet. Die bereits automatisch ausgewerteten Rohdaten wurden dabei am Bildschirm überprüft und Lesefehler des Gerätes gegebenenfalls per Hand berichtigt. Danach wurde die Rücksequenz revers komplementär umgeschrieben und, nach erfolgter Alinierung, mit den anderen Sequenzen verglichen. Nach Abgleich beider Stränge wurde der überhängende Bereich, d.h. der Bereich in welchem keine komplementäre Sequenz mehr vorlag, abgeschnitten. Bei den sequenzierten Klonen wurden zudem noch die Primersequenzen entfernt. Abschließend wurden alle Sequenzen miteinander verglichen, sowie die einzelnen Basenunterschiede anhand der Elektropherogramme am Bildschirm verifiziert, um sicherzustellen, daß es sich nicht um Lesefehler handelt, die das Ergebnis verfälschen würden. Bei den Sequenzen des 16S rRNA-Gens wurden Deletionen mit bzw Insertionen mit gaps aufgefüllt. Die endgültige Länge betrug 453 Nukleotide. Beim Genabschnitt der α -Conotoxine wurden für die Analyse der Signalregion lediglich die ersten 26-45 Aminosäuren (108-135 Nukleotide) verwendet, bei der Analyse der Conotoxine verschiedener Familien wurden 72-264 Basenpaare verwendet.

2.9.2 Distanzwertberechnung

Als einfachstes Distanzmaß zwischen zwei Arten gilt deren prozentuale Divergenz zueinander, die durch 100 dividiert, als Distanz zwischen 0,0 und 1,0 angegeben wird. Hierbei erfolgt eine Gleichbehandlung aller Positionen. Unterschiedliche Substitutionsraten an den verschiedenen Positionen der verschiedenen Codons bei proteincodierender DNA werden vernachlässigt.

Von den eingesetzten DNA-Sequenzen wurden unkorrigierte paarweise Distanzmatrizen mit dem Computerprogramm PAUP* 4.0 beta 10 (SWOFFORD *et al.* 1996) erstellt. Gaps in den Sequenzen wurden bei der Berechnung nach Möglichkeit als 5. *character* bewertet.

2.9.3 Maximum–Parsimony Analyse

Bei der Maximum–Parsimony Analyse wird jede Einzelbase der DNA als ein Merkmal angesehen, das in vier verschiedenen Merkmalszuständen vorliegen kann (A, G, C, T).

Unter informativen Parsimonie–Kriterien, versteht man eine Position innerhalb eines Datensatzes, wenn an dieser Position mindestens zwei verschiedene Nukleotide vorhanden sind, die wenigstens zweimal vorkommen.

Bei der Maximum–Parsimonie Methode wird die Stammbaum Hypothese bevorzugt, die die wenigsten Mutationsschritte in sich birgt. Nachteilig wirkt sich hierbei aus, daß unabhängig voneinander entstandene identische Sequenzen (Homoplasien) zusammen gruppiert werden. Während der Evolution nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, daß bei zwei Arten gleichzeitig eine Mutation erfolgt. Genauso wie es mit zunehmender Dauer häufiger zu Rückmutationen kommen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Parsimonie–Kriterium nach FITCH (1971) verwendet, bei dem eine direkte Umwandlung eines Merkmalszustandes in einen anderen möglich ist. Hierbei gilt jede Transformationsänderung als gleich wahrscheinlich.

Um die optimalen Stammbäume unter den Parsimonie–Kriterien zu finden, können unterschiedliche Algorithmen Verwendung finden. Wegen des hohen Rechenaufwandes konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings kein genauer Algorithmus benutzt werden, sondern lediglich die heuristische Suchfunktion mit „*stepwise addition*“ von PAUP*. Hierbei handelt es sich um einen Algorithmus, der näherungsweise Berechnungen durchführt. Nachteilig ist hierbei allerdings, daß nicht gewährleistet ist, ob alle optimalen Stammbäume gefunden werden. Bei dieser Methode werden zunächst drei Taxa aus dem Datensatz für den anfänglichen Stammbaum ausgewählt. Anschließend wird ein weiteres, zufällig gewähltes Taxon zu den Ästen des vorhandenen Stammbaumes hinzugefügt, und der Stammbaum, welcher die optimale Länge aufweist, wird für die nächste Berechnung gespeichert. Im weiteren Verlauf tritt eine Wiederholung des beschriebenen Vorgangs auf, bis alle Taxa im Stammbaum enthalten sind. Wichtig ist, daß ein zufälliges Hinzufügen der Taxa gegeben ist. Somit wird verhindert, daß die Reihenfolge der Taxa in der Datenmatrix Einfluß auf das endgültige Ergebnis des Stammbaumes ausübt. Für das 16S rRNA-Gen Suche wurden 1000

zusätzliche bootstrap-Wiederholungen durchgeführt, bei den Toxingenen 100. Für sämtliche Datensätze wurde die „*stepwise addition*“ verwendet. Bei der Maximum-Parsimony Analyse kommt es oft zur Erstellung mehrerer gleichlanger Stammbäume, was auch für diese Arbeit zutrifft. Von den so erhaltenen Stammbäume wurden sowohl Strict Consensus Stammbäume als auch Majority-Rule Consensus Stammbäume erzeugt. Bei dem Strict Consensus Befehl von PAUP* wird aus allen vorhanden Bäumen ein einziger Baum erzeugt. Dabei werden alle Abzweigungen, die sich widersprechen, durch Polytomien ersetzt. Bei dem Majority-Rule Consensus Befehl wird dieses Problem gelöst, indem bei sich widersprechenden Abzweigungen diejenigen ausgewählt werden, die in mehr als 50 % aller Bäume vorhanden sind (FUTUYMA, 1996).

2.9.4 Neighbor joining Analyse

Die Neighbor-joining Analyse basiert meist auf dem Kriterium der „Minimum Evolution“, jedoch finden auch andere Modelle hierbei Verwendung. Dabei wird zu Beginn der Analyse von einem sternförmigen Baum ausgegangen. Anschliessend werden die beiden Taxa mit den ähnlichsten Sequenzen ausgewählt und zu einem Ast des Baumes vereinigt. Von den im ursprünglichen Baum verbliebenen Sequenzen werden erneut die Distanzen verglichen und wieder die beiden ähnlichsten zu einem Ast zusammengefügt. Dies wiederholt sich bis alle Taxa eingefügt worden sind (SAITOU & NEI 1987, STUDIER & KEPPLER 1988).

Die Berechnung der Stammbäume erfolgte mit PAUP* 4.0 beta 10 (SWOFFORD *et al.* 1996) nachdem zuvor mit Modeltest 3.7 (POSADA & CRANDALL 1998) das am besten für den jeweiligen Datensatz geeignete Evolutionsmodell mit seinen dazugehörigen Parametern bestimmt wurde.

2.9.5 Maximum Likelihood Analyse

Analog zur Neighbor joining Analyse finden auch bei der Maximum-Likelihood Analyse verschiedene Evolutionsmodelle Beachtung. Ausgehend von einem vorgegebenen Stammbaum wird für jede Position innerhalb des Alignments evaluiert wie die Wahrscheinlichkeit dafür ist, dass der Stammbaum diese Daten hervorgebracht hat. Die Gesamtwahrscheinlichkeit des Datensatzes ergibt sich dabei aus dem Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten aller Positionen im Alignment. Dabei wird nicht der wahrscheinlichste Stammbaum gesucht, sondern der, der die maximale Wahrscheinlichkeit zeigt, dass sich alle Gendaten aus ihm ableiten lassen.

Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen zwei Methoden erfolgte die Berechnung der Maximum Likelihood Stammbäume mit Treefinder (JOBBA *et al.* 2004). Zuvor wurde für jeden Datensatz mit Modeltest 3.7 (POSADA & CRANDALL 1998) das am besten geeignete Evolutionsmodell mit seinen dazugehörigen Parametern ermittelt.

2.9.6 Auswahl der Outgroups (Außengruppen)

Das Auswählen einer Outgroup dient dazu, dem Stammbaum eine phylogenetische Richtung zu verleihen („rooting“). Dies ist oft schwierig, da es nicht immer leicht ist, eine geeignete Gruppe zu finden, deren Evolutionslinien nicht weit von denen der Innengruppe entfernt sind. Wird eine Gruppe als Outgroup definiert, die sich evolutionär bereits zu weit von der Innengruppe entfernt hat, da mittlerweile zu viele Substitutionen (bzw. Insertionen oder Deletionen) stattgefunden haben, kann dies dazu führen, daß eine zufällige Anordnung der Sequenzen der Innengruppe erfolgt.

Empfehlenswert ist es, mehr als ein Taxon als Outgroup zu verwenden, damit eine Monophylie der Innengruppe überprüft werden kann (SWOFFORD *et al.* 1996). Trennt nur ein einziger Ast die Outgroup von der Innengruppe, ist die Hypothese einer vorliegenden Monophylie bei der Innengruppe richtig. Andernfalls ist hiermit diese Vermutung zurückgewiesen (SWOFFORD *et al.* 1996).

Bei den Stammbäumen des 16S-rRNA Gens wurden als Outgroup für Stammbäume mit den Datensätzen, welche der Datenbank entstammten, wie auch für den Stammbaum mit den selbst ermittelten Sequenzen die Arten *Terebra crenulata* und *Terebra subulata* ausgewählt. Hierbei handelt es sich um marine Schnecken der Familie Terebridae, einer Schwesterngruppe der Conidae innerhalb der Superfamilie Conoidea (auch bekannt als Toxoglossa). Weiterhin wurde zusätzlich noch eine Berechnung mit einer in den vorherigen Analysen sehr basal resultierenden Gruppe der Conidae als Outgroup erstellt. Außer den beiden Sequenzen von *Terebra* sp. waren keine weiteren Sequenzen für mögliche nah verwandte Arten aus der Datenbank zu erhalten.

2.9.7 Datierung einer molekularen Divergenz

Die Datierung einer molekularen Uhr erfolgt mit Fossilien, die möglichst nah mit Vertretern des Datensatzes verwandt sind. Dazu wurde das Programm PATHd8 (BRITTON *et al.* 2007) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Generalisierung der *mean path length*

(MPL) Methode (BREMER & GUSTAFSSON 1997, BRITTON *et al.* 2002) Die Methodik bei PATHd8 basiert auf dem Prinzip, dass das relative Alter eines Knotenpunktes durch die durchschnittliche Distanz dieses Knotens zu allen Ästen, verglichen mit der durchschnittlichen Distanz der Wurzel zu allen Ästen, abgeschwächt wird.

2.10. Morphologie-Analysen

Zur Untersuchung der Morphologie wurden die Vertreter der *C. marmoreus*-Gruppe ausgewählt, da diese anhand der Zeichnung gut voneinander zu unterscheiden sind und eine große Probenmenge der Arten *C. araneosus*, *C. bandanus*, *C. marmoreus*, *C. nicobarius*, *C. nigrescens*, *C. nocturnus* und *C. vidua* vorlag.

Die Schalen der Tiere wurden mit einer Nikon CoolPix 990 Kamera fotografiert, sowie Gewicht und Länge manuell vermessen.

Die weiteren Distanzen die zur Ermittlung der Indices von RÖCKEL *et al.* (1995) wurden anhand der Fotografien mit dem Programm AnalySIS durchgeführt.

Folgende Indices wurden ermittelt:

W = Gewicht (weight), in g

L = Länge (length), in mm

MD = Maximaler Durchmesser (maximum diameter) in mm

AH= Höhe der Öffnung (aperture height), in mm

HMD = Höhe des maximalen Durchmessers (height of maximum diameter), in mm

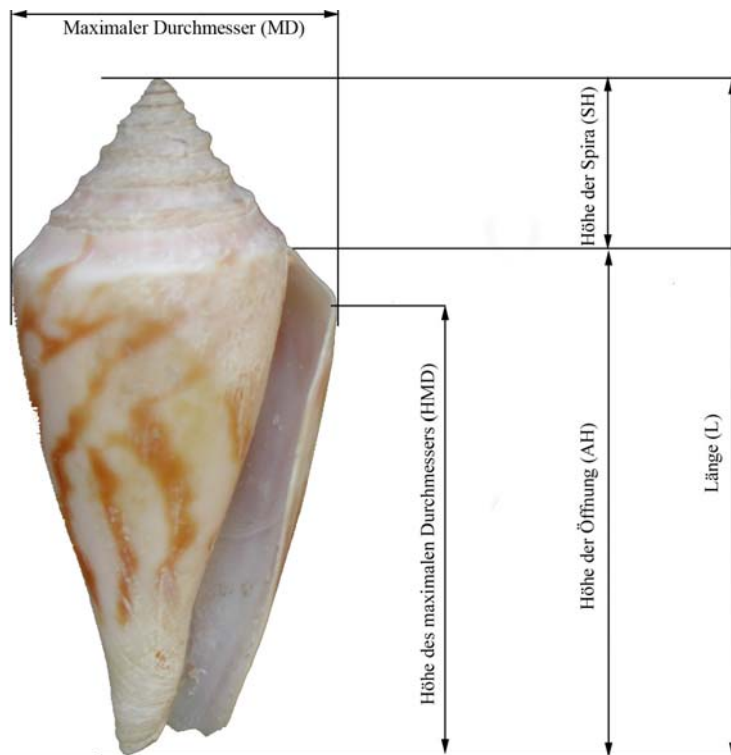


Abb. 2.1: Illustration der Gehäuse-morphologischen Indices am Beispiel von *C. gradatulus*

$$\text{Relatives Gewicht (RW)} = RW = \frac{W}{L}$$

$$\text{Relativer Durchmesser der letzten Windung (RD)} = \frac{MD}{AH}$$

$$\text{Position des maximalen Durchmessers (PMD)} = \frac{HMD}{AH}$$

$$\text{Relative Höhe der Spira (RSH)} = \frac{L - AH}{L}$$

3. Ergebnisse

3.1. Morphologie

Von RÖCKEL *et al.* (1995) wurden Indices eingeführt, die zur Artcharakterisierung herangezogen werden. Diese Indices leiten sich aus Messungen verschiedener Parameter der Gehäuse her (u.a. Gewicht, Länge). Am Beispiel der *C. marmoreus*-Gruppe wurde die innerartliche Variabilität dieser Indices bestimmt und ihre Anwendbarkeit zur Artunterscheidung bei nahverwandten Arten überprüft. Sämtliche Mitglieder dieser Gruppe sind bereits im 18. bzw. 19. Jahrhundert beschrieben worden. Dabei handelt es sich um mittlere bis große indo-pazifische Arten, die ein helles tent-mark Muster auf dunklem Grund aufweisen und eine konisch-geformte Schale ausbilden (Abb. 3.1, 3.2).

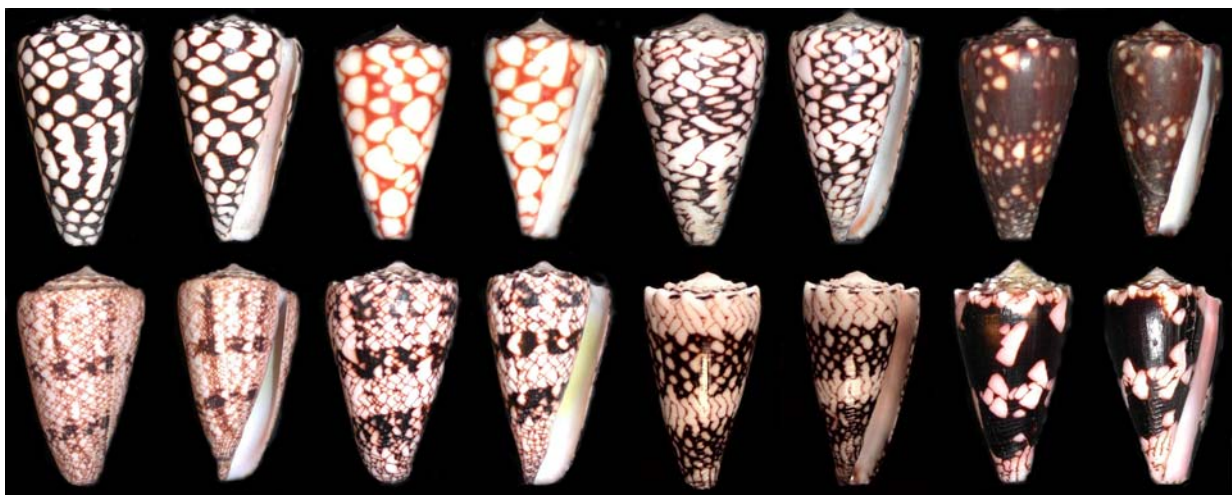


Abbildung 3.1 Arten der *C. marmoreus*-Gruppe. Oben von links nach rechts: *C. marmoreus*, *C. marmoreus* (rote Form), *C. bandanus*, *C. nigrescens*. Unten von links nach rechts: *C. araneosus*, *C. nicobaricus*, *C. vidua*, *C. nocturnus*.

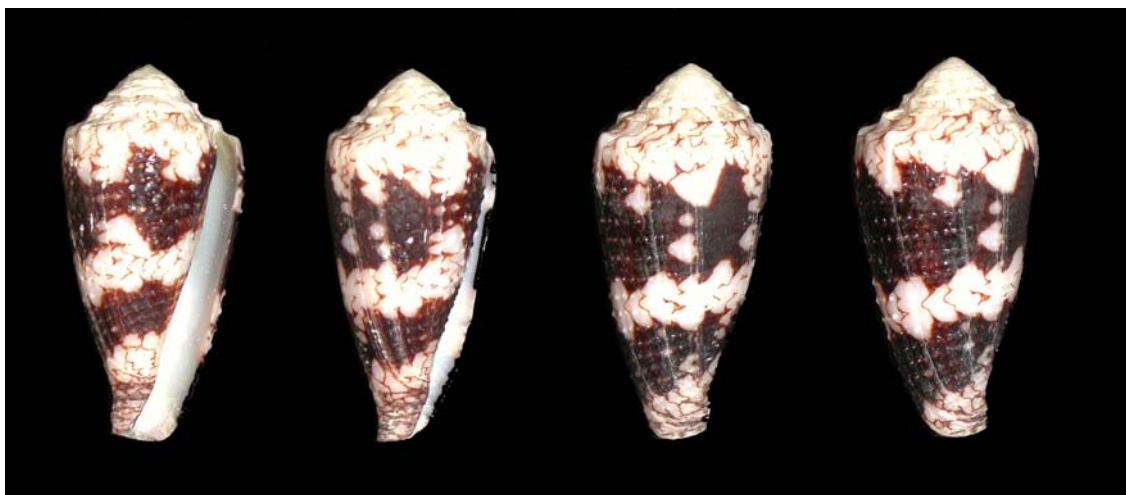


Abb. 3.2 *Conus nocturnus deburghiae*. Gehäuse mit unterschiedlichen Strukturen der Oberfläche.

Die Tabelle 3.1. vergleicht die während der Studie ermittelten Indices mit den Literaturwerten. Vor allem die Werte bei *Conus nocturnus* weichen voneinander ab. *C. nigrescens* und *C. vidua* werden von RÖCKEL *et al.* (1995) zu *C. bandanus* gestellt, ebenso wie *C. nicobaricus* zu *C. araneosus*. Deswegen stehen für diese Arten nicht bei allen Indices Literaturwerte zur Verfügung. Die ermittelten Werte entsprechen bei *C. bandanus* und *C. vidua* (mit Ausnahme des maximalen relativen Durchmessers (RD)) denen in der Literatur, bei *C. nigrescens* wird der Maximalwert des RSH mit 0,12 im Vergleich zu 0,11 leicht nach oben erweitert. Der gemessene maximale RD von *C. nicobaricus* ist mit 0,65 im Vergleich zum Literaturwert (0,63) leicht erhöht, bei *C. araneosus* weicht der maximale PMD leicht nach oben ab (0,95 im Vergleich zu 0,94). Von *C. nocturnus* liegen nur beim minimalen RSH die Werte innerhalb der Literaturangaben, alle anderen weichen sowohl bezüglich der Minimal-, als auch der Maximalwerte ab. Somit konnte der Varianzbereich bei *C. nocturnus* deutlich vergrößert werden.

Tabelle 3.1: Vergleich der Indices der Messungen während dieser Arbeit mit den Literaturwerten. RW = Relative Weight, RD = Relative Diameter, PMD = Position of Maximum Diameter, RSH= Relative Spire Height

	RW min	RW max	RD min	RD max	PMD min	PMD max	RSH min	RSH max
<i>araneosus</i>								
eig. Messung	0,56	1,07	0,63	0,67	0,88	0,95	0,09	0,13
nach RÖCKEL <i>et al.</i> 1995	0,4	1,5	0,61	0,7	0,86	0,94	0,09	0,15
<i>bandanus</i>								
eig. Messung	0,44	0,97	0,61	0,65	0,86	0,94	0,06	0,16
nach RÖCKEL <i>et al.</i> 1995	0,08	1,9	0,53	0,63	0,82	0,94	0,03	0,2
<i>marmoreus</i>								
eig. Messung	0,20	1,05	0,60	0,66	0,86	0,93	0,07	0,14
nach RÖCKEL <i>et al.</i> 1995	0,45	1,95	0,56	0,65	0,85	0,94	0,05	0,15
<i>nicobaricus</i>								
eig. Messung	0,62	0,91	0,61	0,65	0,88	0,91	0,11	0,14
nach RÖCKEL <i>et al.</i> 1995			0,54	0,63			0,04	0,09
<i>nigrescens</i>								
eig. Messung	0,11	0,12	0,63	0,63	0,87	0,88	0,11	0,12
nach RÖCKEL <i>et al.</i> 1995			0,58	0,66			0,07	0,11
<i>nocturnus</i>								
eig. Messung	0,098	0,44	0,55	0,64	0,85	0,98	0,11	0,21
nach RÖCKEL <i>et al.</i> 1995	0,19	0,4	0,55	0,6	0,8	0,93	0,09	0,2
<i>vidua</i>								
eig. Messung	0,14	1,13	0,58	0,64	0,88	0,93	0,04	0,16
nach RÖCKEL <i>et al.</i> 1995			0,57	0,63			0,03	0,1

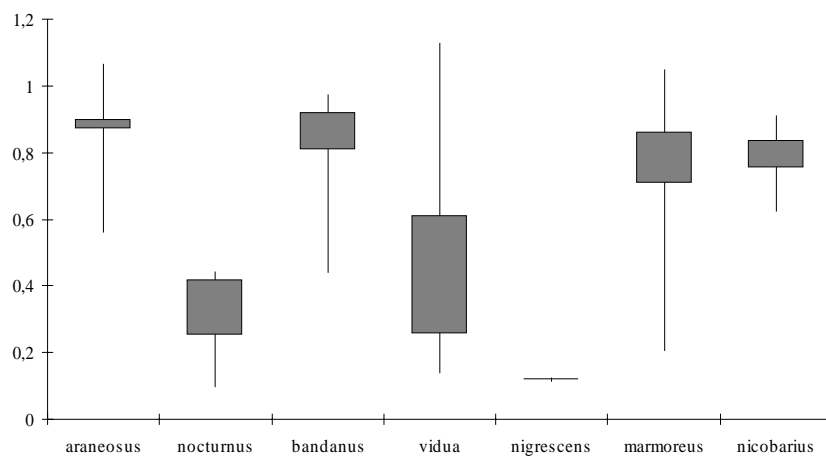


Abbildung 3.3: Vergleich des relativen Gewichtes (RW) bei den untersuchten Arten der *Conus marmoreus*-Gruppe $n_{\text{gesamt}}=46$.

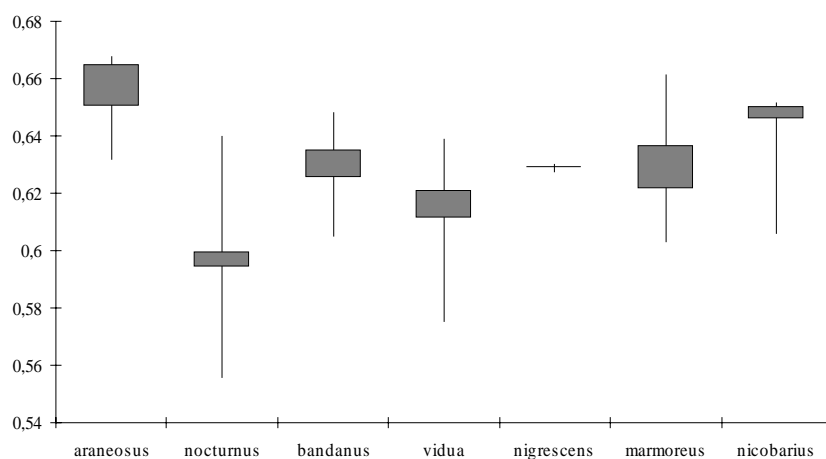


Abbildung 3.4: Vergleich der relativen Durchmessers (RD) bei den untersuchten Arten der *Conus marmoreus*-Gruppe $n_{\text{gesamt}}=46$.

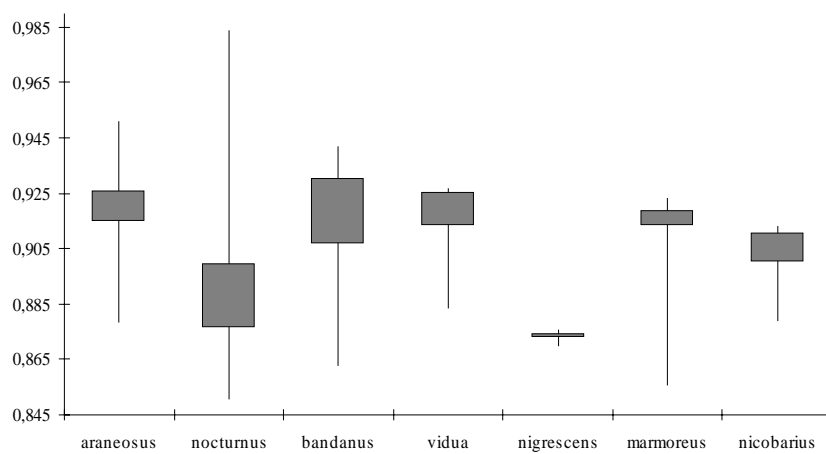


Abbildung 3.5: Vergleich der Position des maximalen Durchmessers (PMD) bei den untersuchten Arten der *Conus marmoreus*-Gruppe $n_{\text{gesamt}}=46$.

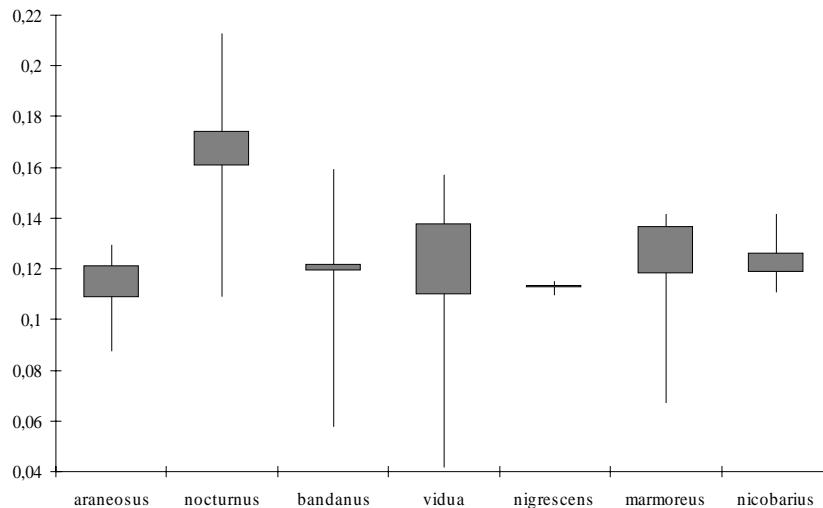


Abbildung 3.6: Vergleich der relativen Höhe der Spira (RSH) bei den untersuchten Arten der *Conus marmoreus*-Gruppe $n_{\text{gesamt}}=46$.

Die Abbildungen 3.3. bis 3.6. zeigen die intraspezifische Variabilität der einzelnen Indices. Anhand der Rechtecke in den Diagrammen ist die Hauptverteilung der gemessenen Werte zu erkennen. Durch den direkten Vergleich mit den Messreihen der anderen Arten lässt sich weiterhin die interspezifische Varianz erkennen. Dabei ist festzuhalten, dass es bei sämtlichen Indices sehr große interspezifische Überlappungen gibt, sowohl bezüglich der Gesamtheit der Werte, als auch bei deren Hauptverteilung. Am deutlichsten ist dieses beim RW (Abb. 3.3) der Arten *C. araneosus*, *C. bandanus*, *C. marmoreus* und *C. nicobaricus* ersichtlich. Die Werte dieser vier Arten überlappen sich komplett, mit der größten Variabilität bei *C. marmoreus*. Die Hauptverteilung hier liegt im gleichen Bereich (0,7-0,91).

Beim RD gibt es ebenfalls Überlappungen bei den Werten sämtlicher Arten (Abb. 3.4). So sind bei allen Arten Werte im Bereich von 0,60 bis 0,63 gemessen worden. *C. araneosus* und *C. nicobaricus* zeigen sehr ähnliche Werte, die alle bis auf den Maximalwert von *C. nicobaricus* innerhalb der Literaturwerte liegen. Die Variabilität ist bei *C. araneosus* größer, jedoch liegen die bei *C. nicobaricus* gemessenen Werte konzentriert im oberen Bereich. Die Werte von *C. bandanus* und *C. vidua* liegen ungefähr im gleichen Bereich, jedoch zeigt *C. bandanus* sowohl den höheren Minimal- (0,61), als auch den höheren Maximalwert (0,65) und liegt im Diagramm im gleichen Wertbereich wie *C. marmoreus* (0,60-0,66).

Beim PMD (Abb. 3.5) besitzt *C. nocturnus* die höchste (0,85-0,98), *C. nicobaricus* mit 0,88 bis 0,91 (Medianwert 0,88) die niedrigste Variabilität (abgesehen von der Messreihe für *C. nigrescens*, die nur zwei Individuen beinhaltete). Insgesamt liegt die Mehrheit der Werte aller Arten im Bereich von 0,88 bis 0,93, mit einem Medianwert von 0,9-0,91.

Abbildung 3.6 zeigt die Variabilität des RSH bei den verschiedenen Arten. Die Medianwerte liegen im Bereich von 0,11-0,12, die einzige Ausnahme hierbei stellt *C. nocturnus* mit einem Medianwert von 0,16 dar. Die variabelste Art bezüglich des RSH-Wertes ist *C. vidua* (0,12), bei dieser Art ist auch die Diskrepanz zwischen dem gemessenen maximalen Wert und dem maximalen Literaturwert mit 0,06 am größten. Die geringste Variabilität zeigt *C. nicobaricus* mit einer Differenz von 0,03 zwischen dem Minimal- und dem Maximalwert (Literatur 0,05). Die Messreihen von *C. araneosus*, *C. bandanus* und *C. marmoreus* zeigen eine geringere Variationsbreite als die Literaturdaten, während die Messreihe von *C. nocturnus* mit 0,1 fast identisch mit dem Literaturwert von 0,11 ist.

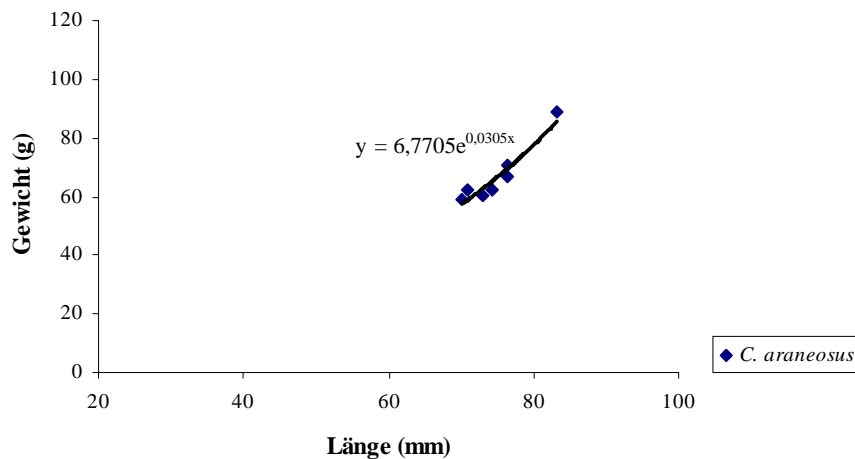


Abbildung 3.7.1: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei *Conus araneosus*. Die Formel der Funktion steht oberhalb des Graphen. n=7

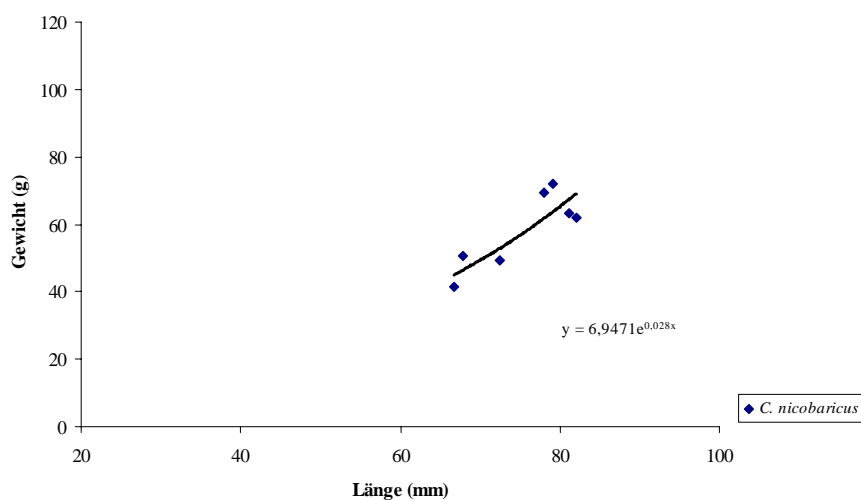


Abbildung 3.7.2: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei *C. nicobaricus*. Die Formel der Funktion steht unterhalb des Graphen. n=7

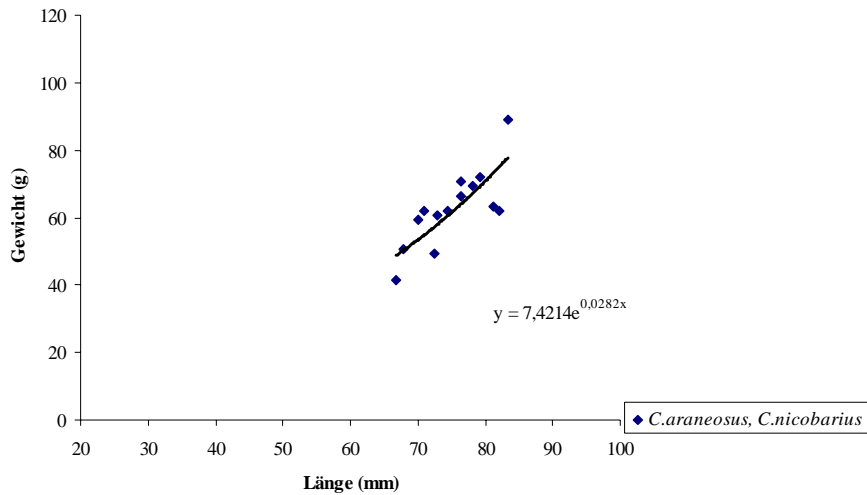


Abbildung 3.7.3: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei *Conus araneosus* und *C. nicobarius* in einem kombinierten Graphen. Die Formel der Funktion steht unterhalb des Graphen. n=14

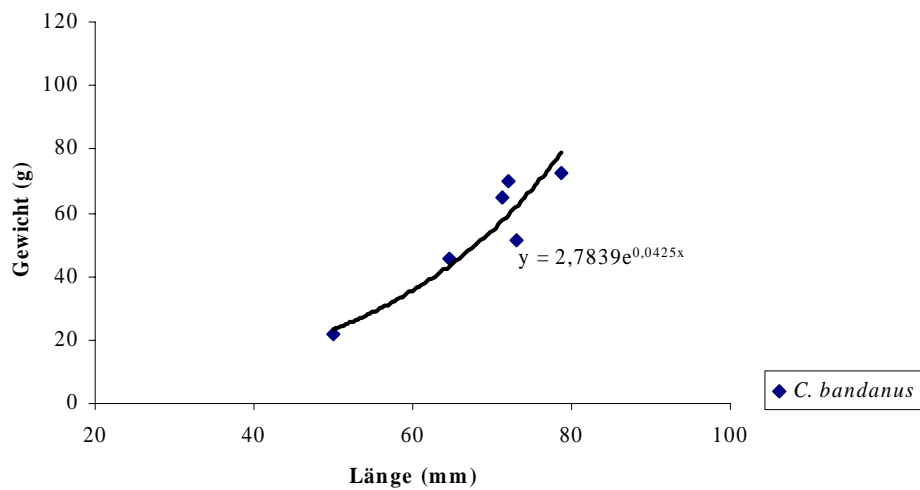


Abbildung 3.8.1: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei *Conus bandanus*. Die Formel der Funktion steht rechts vom Graphen. n=6

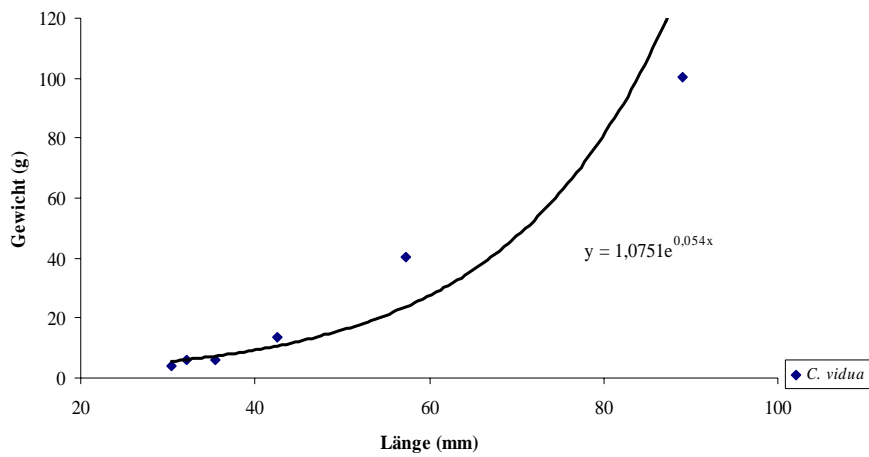


Abbildung 3.8.2: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei *C. vidua*. Die Formel der Funktion steht unterhalb Graphen. n=6

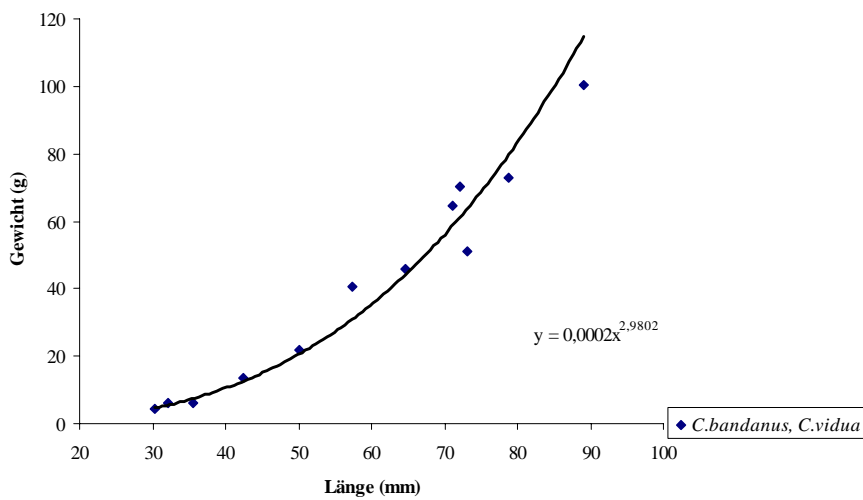


Abbildung 3.8.3: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei *Conus bandanus* und *C. vidua* in einem kombinierten Graphen. Die Formel der Funktion steht unterhalb des Graphen. n=12

A

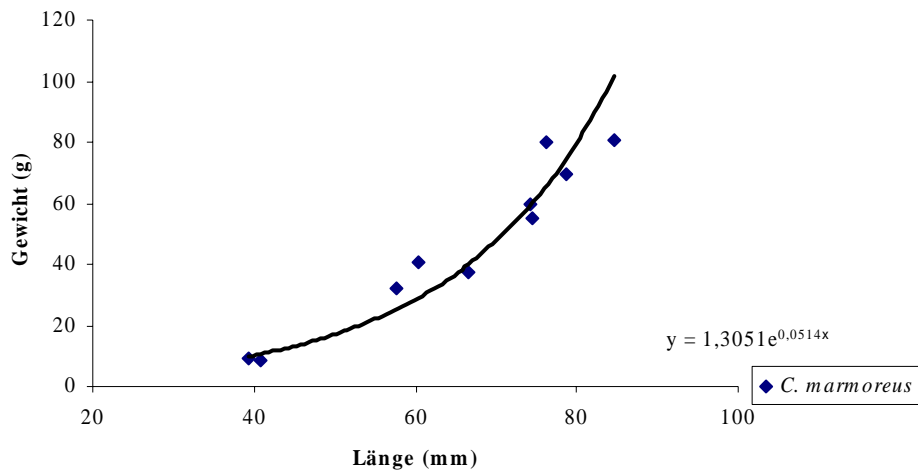


Abbildung 3.9: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei *Conus marmoreus*. Die Formel der Funktion steht unterhalb Graphen. n=10

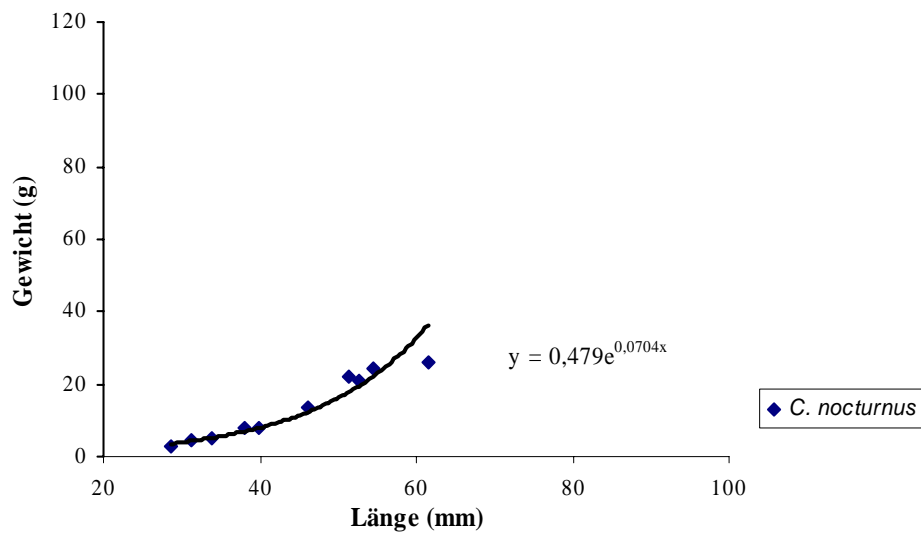


Abbildung 3.10: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei *Conus nocturnus*. Die Formel der Funktion steht rechts vom Graphen. n=10

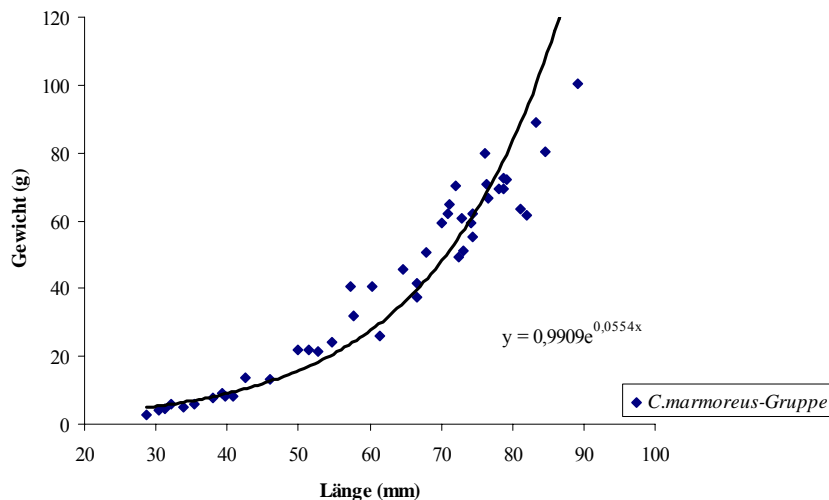


Abbildung 3.11: Verhältnis der Gewichtszunahme in Relation zum Größenwachstum (RW) bei sämtlichen untersuchten Arten der *Conus marmoreus*-Gruppe in einem kombinierten Graphen. Die Formel der Funktion steht unterhalb des Graphen. n=46

Die Abbildungen 3.7.1-3.11 zeigen die graphische Darstellung des Gewichts gegen die Länge (RW). Daraus ergibt sich bei sämtlichen Arten eine exponentielle Abhängigkeit des Gewichts zur Länge. Bei fortschreitendem Längenwachstum vervielfacht sich das Gewicht und folgt über das gesamte Größenspektrum keinem linearen Verhältnis. Besonders deutlich zeigen das die Graphen von *C. marmoreus* (Abb. 3.9), *C. nocturnus* (Abb. 3.10) und *C. vidua* (Abb. 3.8.2), die alle aus einer anfänglichen stationären Phase rasch ansteigen. Bei *C. bandanus* ist dieser Trend ebenfalls zu beobachten (Abb. 3.8.1). Allerdings liegen hier sämtliche Messpunkte in einem relativ engen Bereich, da lediglich verhältnismäßig große Gehäuse in die Untersuchung eingebunden werden konnten. Gleiches trifft auf die Messreihen von *C. araneosus* und *C. nicobaricus* (Abb. 3.7.1 bis 3.7.3) zu, auch hier sind ausschließlich große Gehäuse für die Analyse verwendet worden. Das Diagramm in Abbildung 3.11 zeigt alle 46 in der Analyse vermessenen Gehäuse in der *C. marmoreus*-Gruppe auf. Durch den erweiterten Datensatz wird der bei den einzelnen Arten beobachtete exponentielle Verlauf weiter gestützt. Hierdurch zeigt sich, dass dem exponentiellen Wachstum eine stationäre Phase folgt. Lineares Wachstum über die gesamte Messreihe liegt nicht vor.

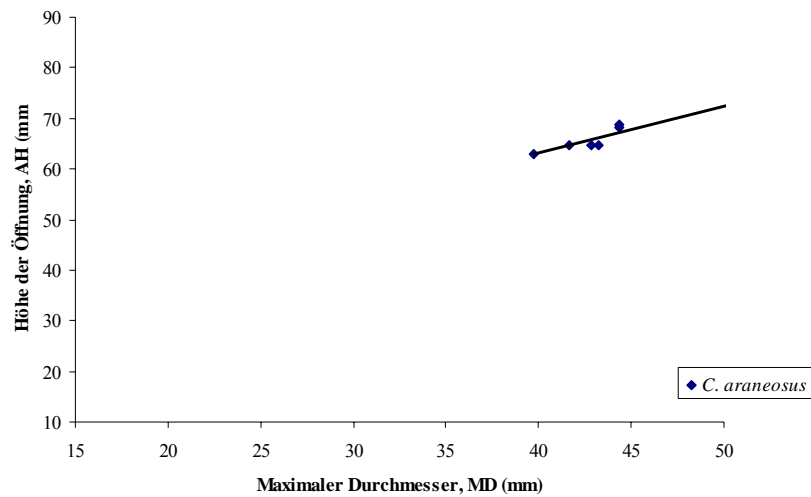


Abbildung 3.12.1: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei *Conus araneosus*. n=7

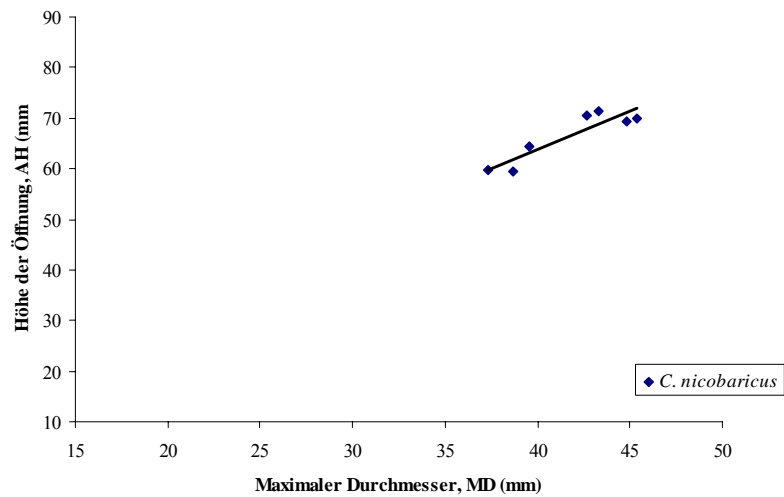


Abbildung 3.12.2: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei *Conus nicobaricus*. n=7

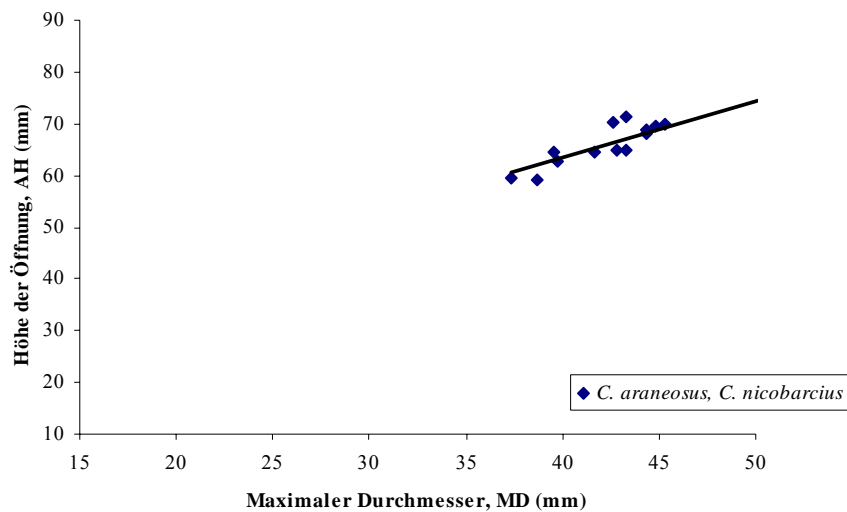


Abbildung 3.12.3: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei *Conus araneosus* und *C. nicobaricus* in einem kombinierten Graphen. n=14

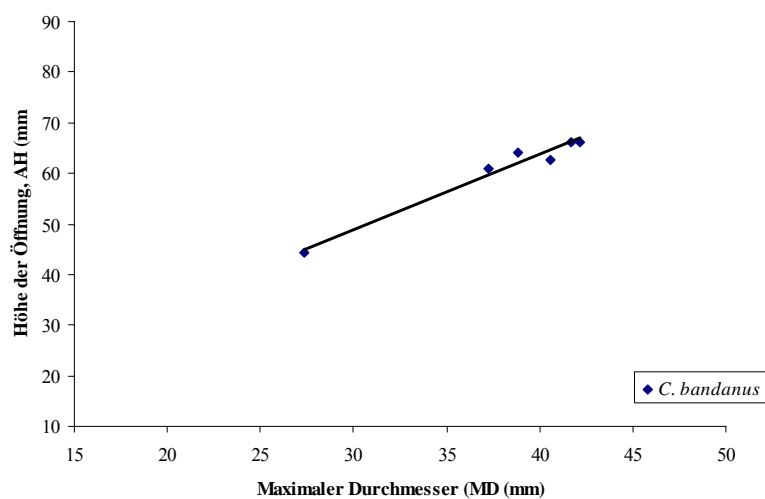


Abbildung 3.13.1: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei *Conus bandanus*. n=6

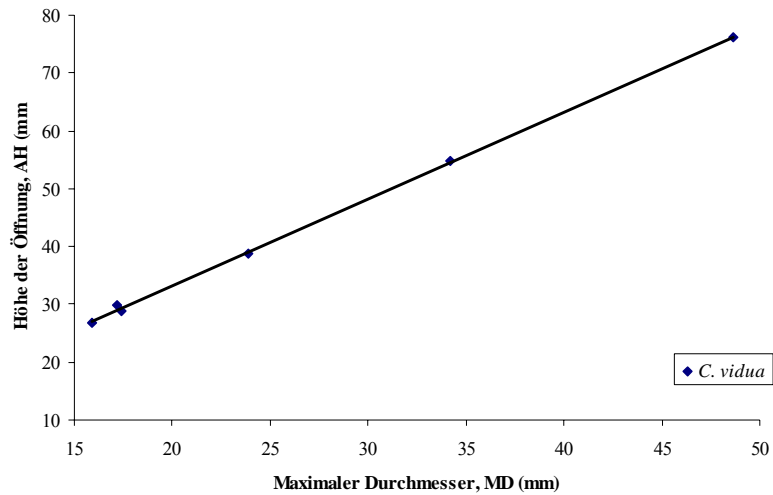


Abbildung 3.13.2: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei *Conus vidua*. n=6

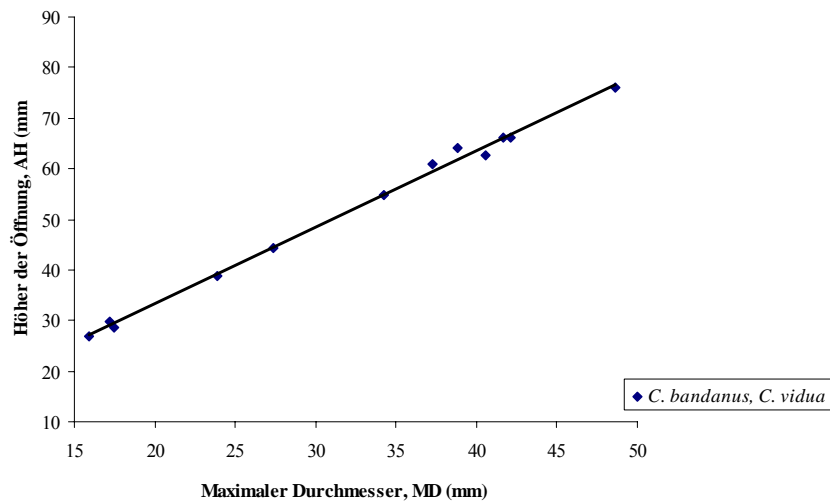


Abbildung 3.13.3: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei *Conus bandanus* und *C. vidua* in einem kombinierten Graphen. n=12

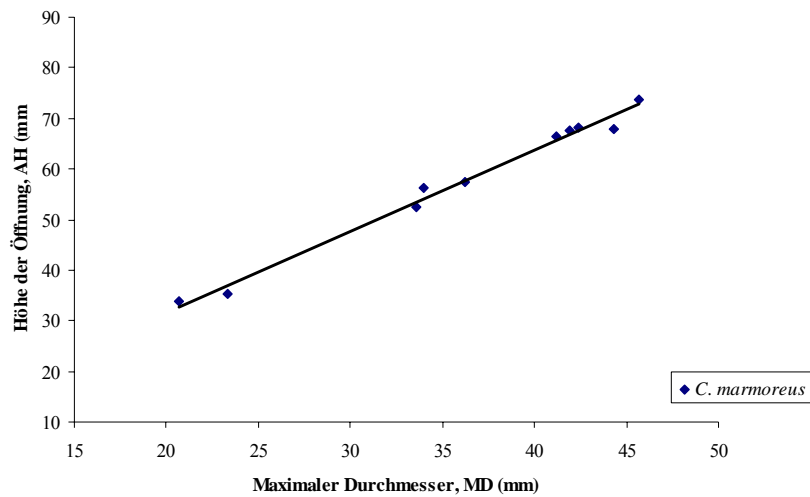


Abbildung 3.14: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei *Conus marmoreus*. n=10

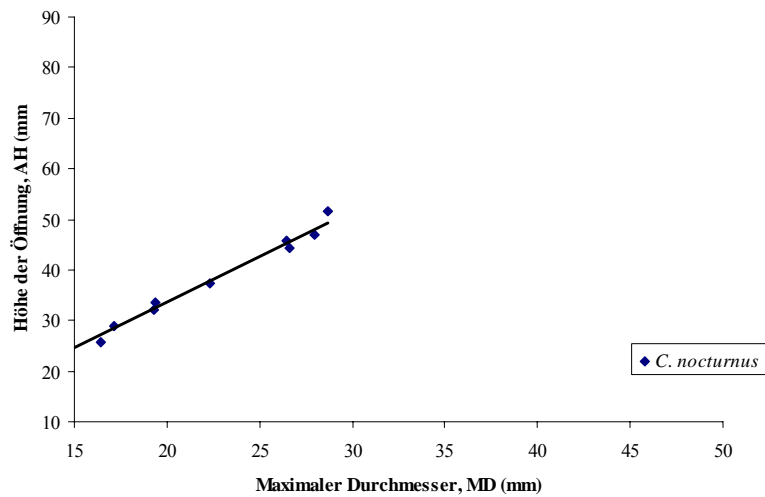


Abbildung 3.15: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei *Conus nocturnus*. n=10

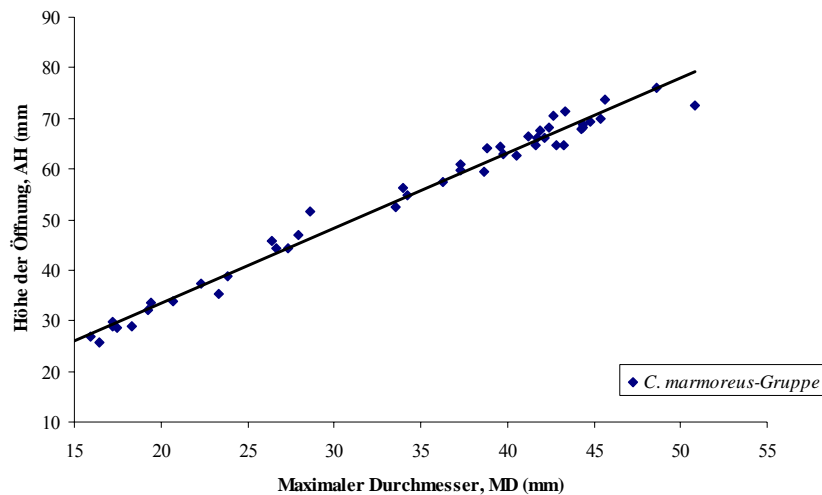


Abbildung 3.16: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zum maximalen Durchmesser (RD) bei sämtlichen untersuchten Arten der *Conus marmoreus*-Gruppe in einem kombinierten Graphen n=46

Die graphische Darstellung des relativen Durchmessers (RD) zeigt bei sämtlichen untersuchten Arten ein lineares Verhältnis der Öffnungshöhe zum maximalen Durchmesser. Die Steigungen der Regressionsgeraden variieren zwischen 0,91 (*C. araneosus*) bis 1,80 (*C. nocturnus*), wobei die Mehrzahl der Steigungswerte bei ca. 1,50 liegt. So zeigt die Steigung bei *C. bandanus* (Abb. 3.13.1) einen Wert von 1,48, bei *C. vidua* (Abb. 3.13.2) einen Wert von 1,50, genauso wie bei *C. nicobaricus* (Abb. 3.12.2). Bei einem kombinierten Graphen aus *C. bandanus* und *C. vidua* zeigt die Regressionsgerade ebenfalls einen Wert von 1,50. Die Regressionsgerade der Kombination aus *C. araneosus* und *C. nicobaricus* hat wegen der deutlich niedrigeren Steigung von *C. araneosus* einen Steigungswert von 1,06. Die Steigungen von *C. marmoreus* (1,60; Abb. 3.16) und *C. nocturnus* (1,80; Abb. 3.15) verlaufen hingegen steiler, was sich in den höheren Steigungswerten bemerkbar macht. Das Diagramm in Abbildung 3.16 enthält die Daten der gesamten *C. marmoreus*-Gruppe. Die Steigung der Regressionsgeraden (Steigungswert 1,49) hat einen ähnlichen Wert wie die Regressionsgerade von *C. bandanus*, *C. vidua* und *C. nicobaricus*.

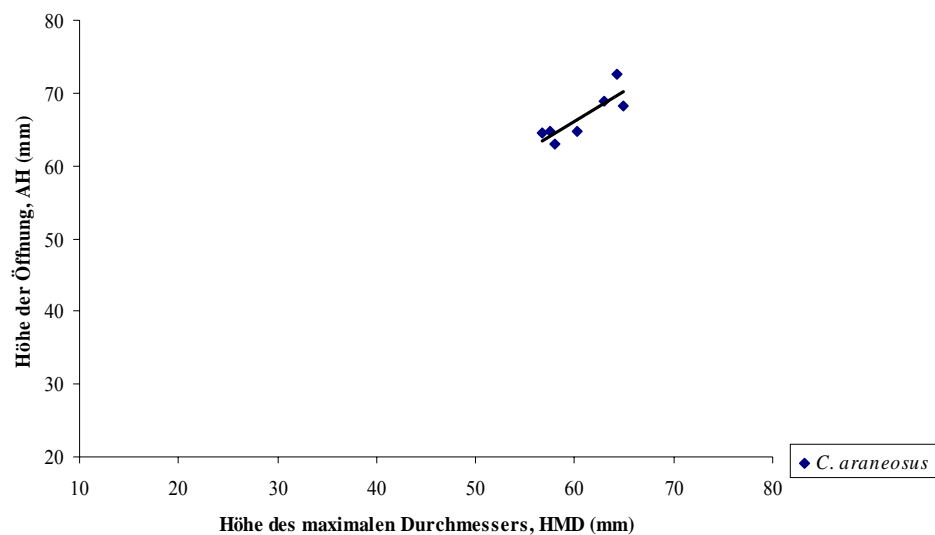


Abbildung 3.17.1: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei *Conus araneosus*. n=7

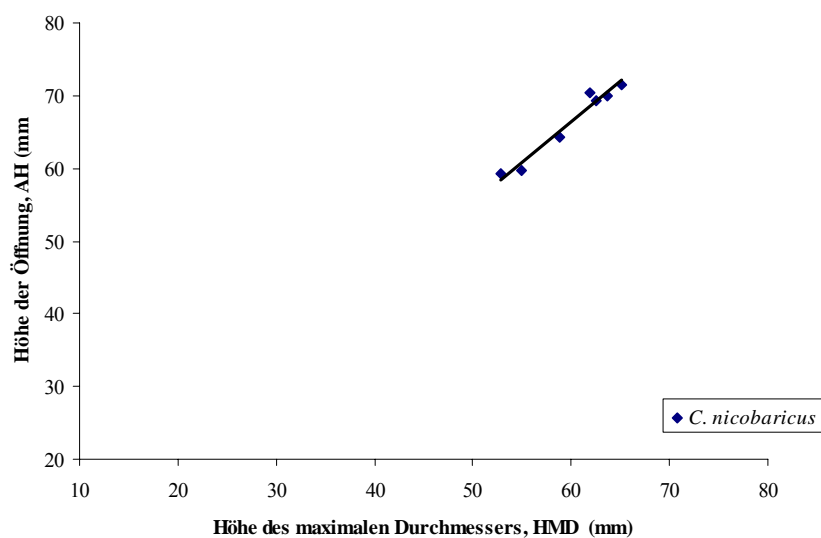


Abbildung 3.17.2: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei *Conus nicobaricus*. n=7

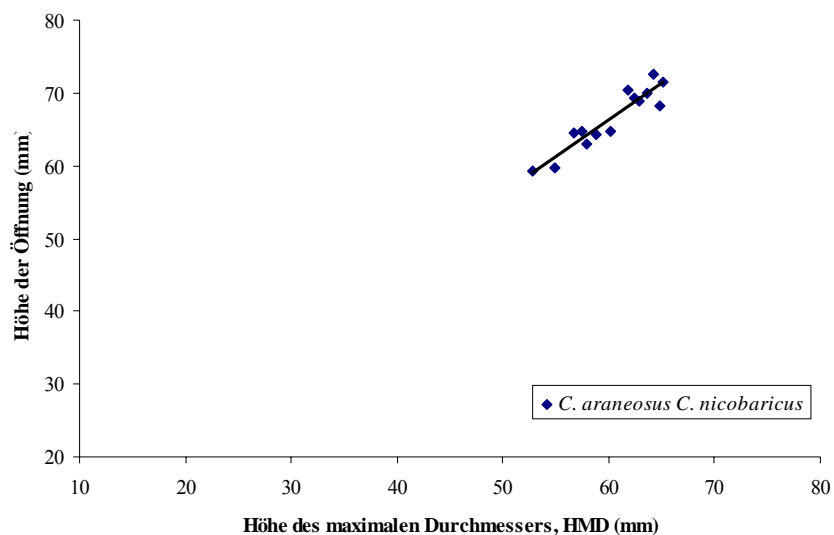


Abbildung 3.17.3: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei *C. araneosus* und *Conus nicobaricus*. n=14

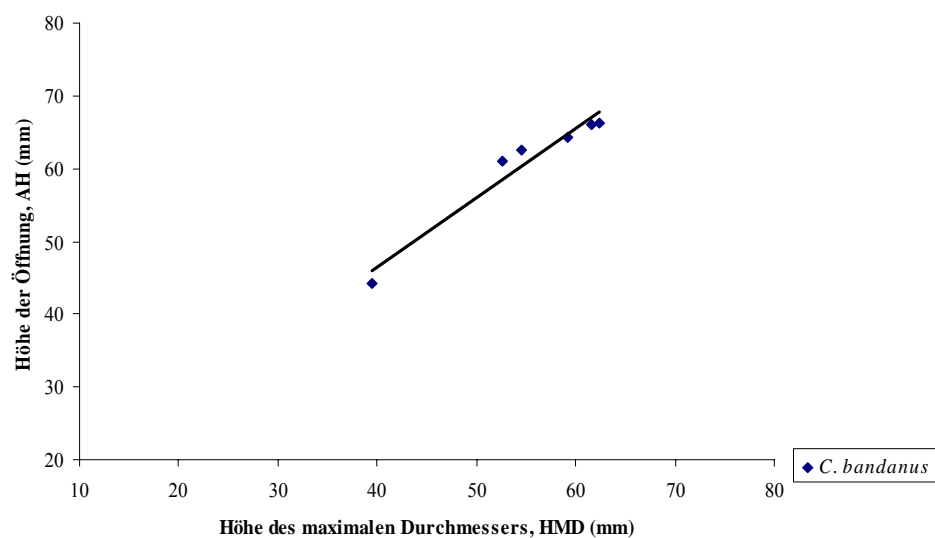


Abbildung 3.18.1: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei *C. bandanus*. n=6

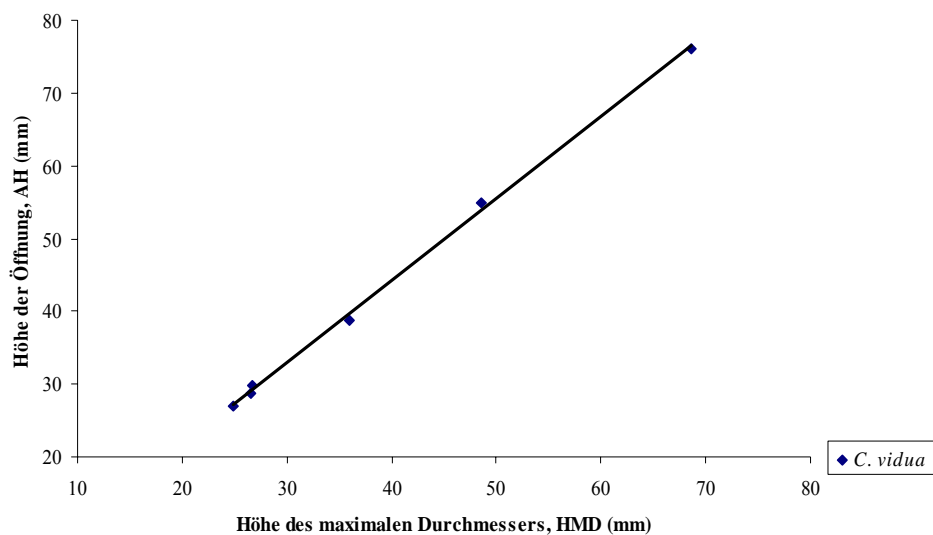


Abbildung 3.18.2: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei *C. vidua*. n=6

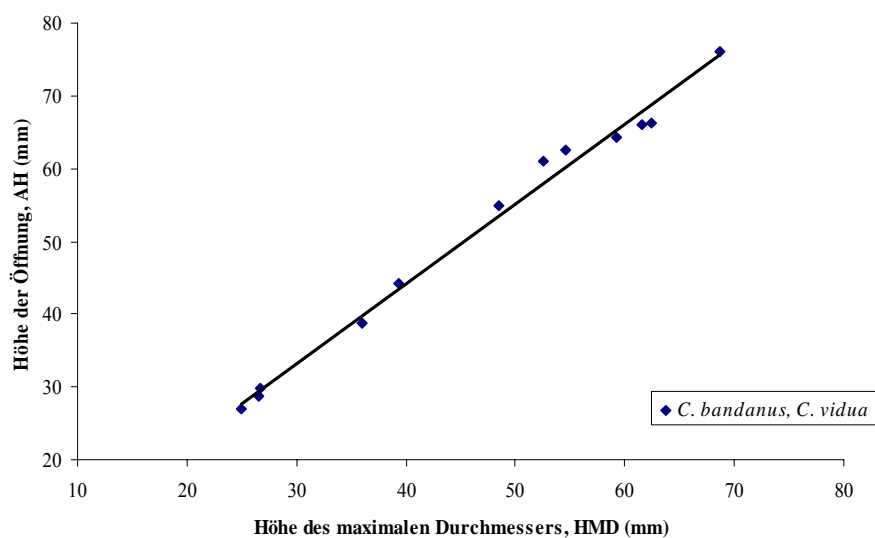


Abbildung 3.18.3: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei *C. bandanus* und *C. vidua*. n=12

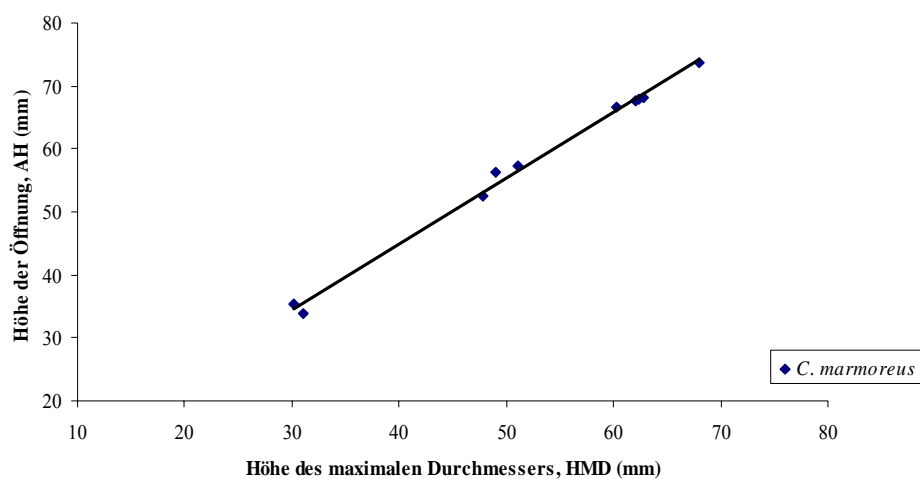


Abbildung 3.19: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei *C. marmoreus*. n=10

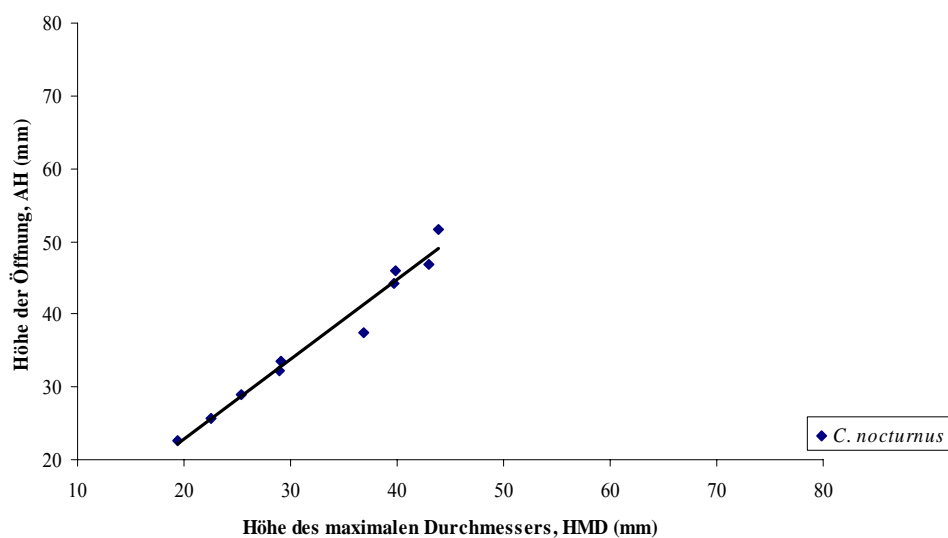


Abbildung 3.20: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei *C. nocturnus*. n=10

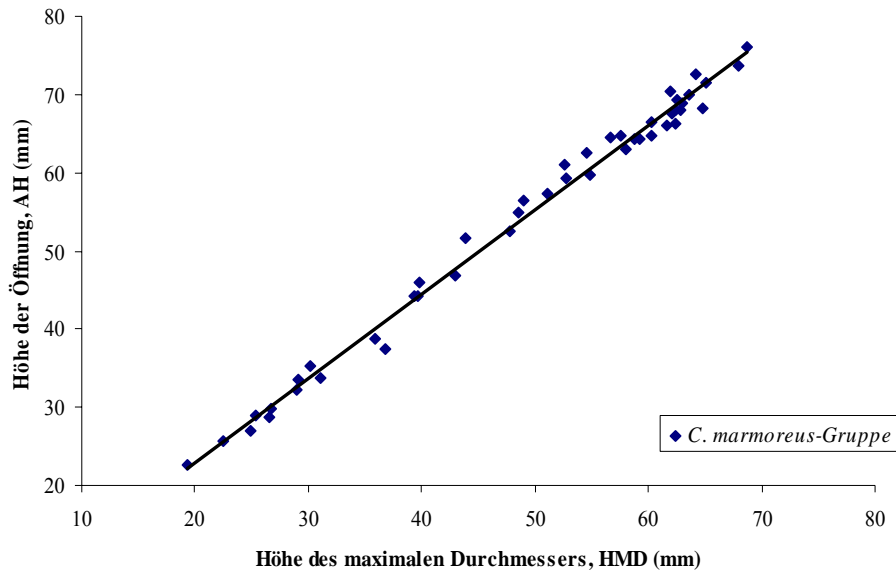


Abbildung 3.21: Verhältnis der Öffnungshöhe in Relation zur Höhe des maximalen Durchmessers (PMD) bei sämtlichen untersuchten Arten der *Conus marmoreus*-Gruppe in einem kombinierten Graphen. n=46

Analog zum relativen Durchmesser (RD) liegt auch bei der Position des maximalen Durchmessers ein lineares Verhältnis der Gleichungskomponenten (Höhe der Öffnung und Höhe des maximalen Durchmessers) vor. Jedoch liegen hier die Steigungswerte der Regressionsgeraden im Bereich 0,84-1,13, mit dem niedrigsten Wert bei *C. araneosus* (Abb. 3.17.1) und dem höchsten bei *C. vidua* (Abb. 3.18.2). Im Gegensatz zum hohen Wert von *C. vidua* und der Wertübereinstimmung beim relativen Durchmesser besitzt die Steigung der Regressionsgeraden bei *C. bandanus* (Abb. 3.18.1) mit 0,95 den zweitniedrigsten Wert. Die Steigung im kombinierten Datensatz dieser beiden Arten liegt bei 1,09. In einem ähnlichen Bereich mit 1,10 liegen auch die Werte von *C. nocturnus* (Abb. 3.20) und *C. nicobaricus* (Abb. 3.17.2). Beim kombinierten Datensatz von *C. nicobaricus* und *C. araneosus* (Abb. 3.17.3) beträgt die Steigung der Regressionsgeraden, beeinflusst durch die niedrigeren Werte der letztgenannten Art, den Wert 1,01. Der PMD ist bei *C. marmoreus*, im Gegensatz zum RD, mit einer Steigung von 1,05, im unteren Bereich der Messreihe angeordnet (Abb. 3.19). Die Steigung der Regressionsgeraden ist ebenfalls niedriger als im Graphen der gesamten *C. marmoreus*-Gruppe (1,08; Abb. 3.21).

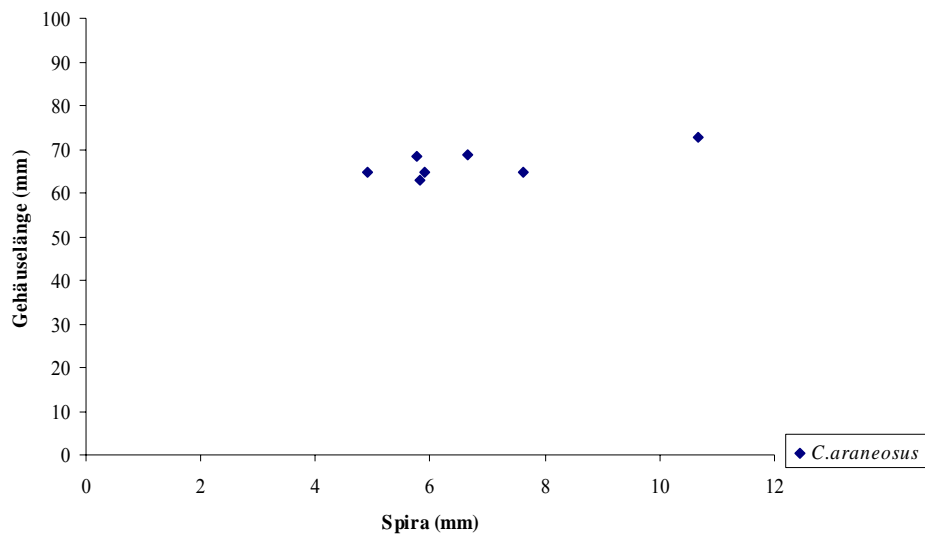


Abbildung 3.22.1: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei *C. araneosus*. n=7

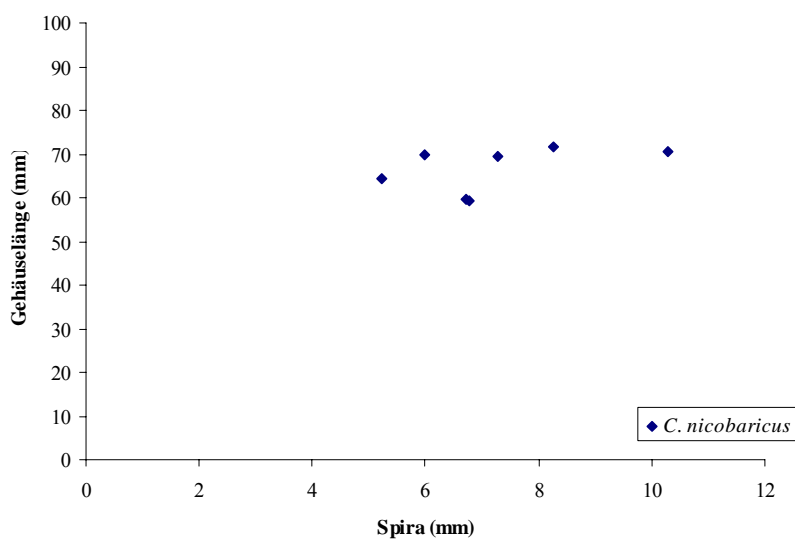


Abbildung 3.22.2: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei *C. nicobaricus*. n=7

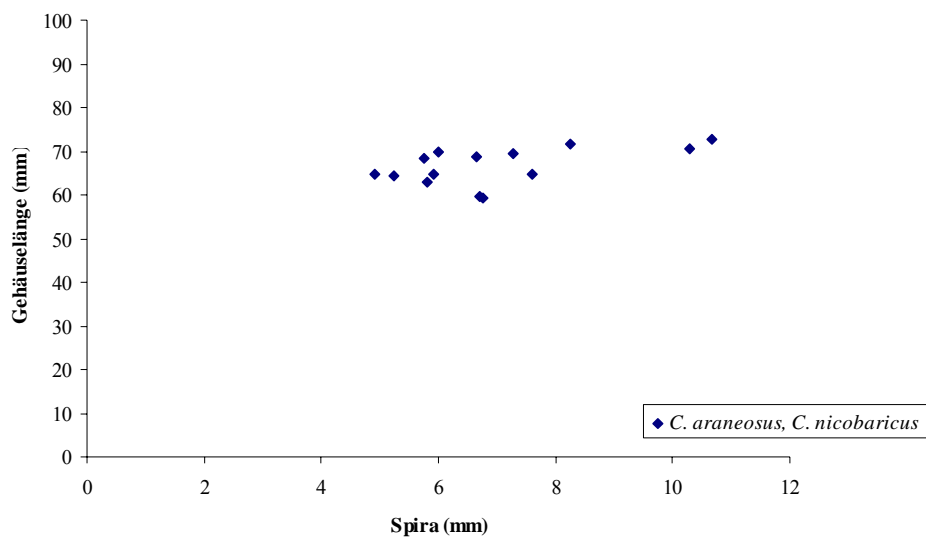


Abbildung 3.22.3: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei *C. araneosus* und *C. nicobaricus*. n=14

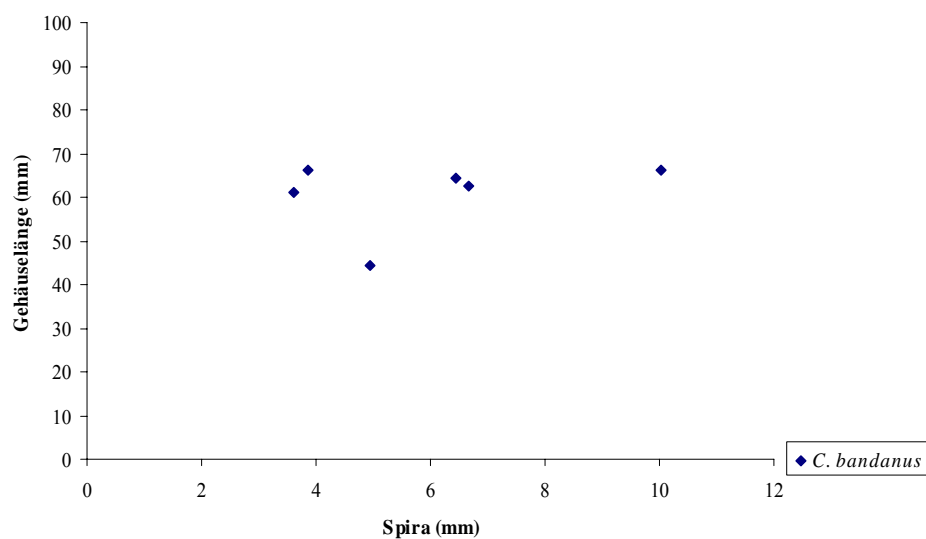


Abbildung 3.23.1: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei *C. bandanus*. n=6

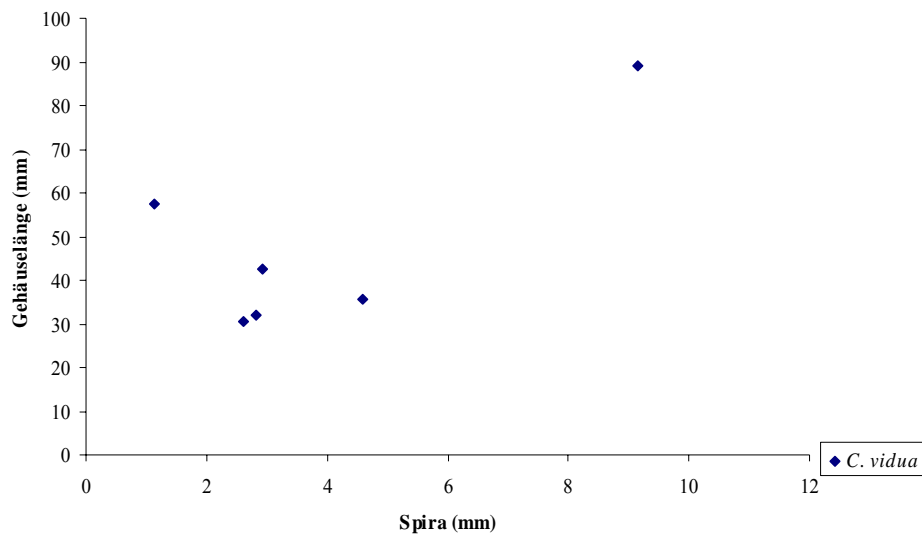


Abbildung 3.23.2: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei *C. vidua*. n=6

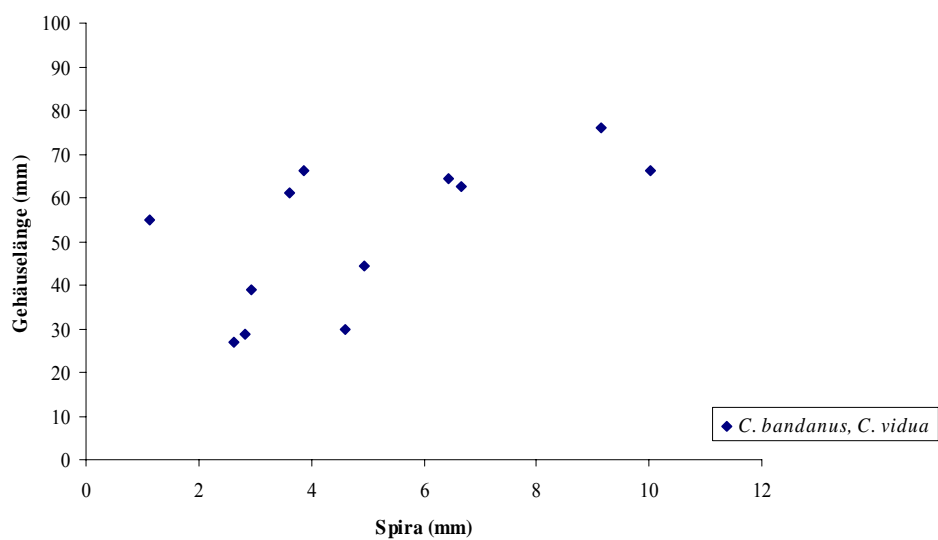


Abbildung 3.23.3: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei *C. bandanus* und *C. vidua*. n=12

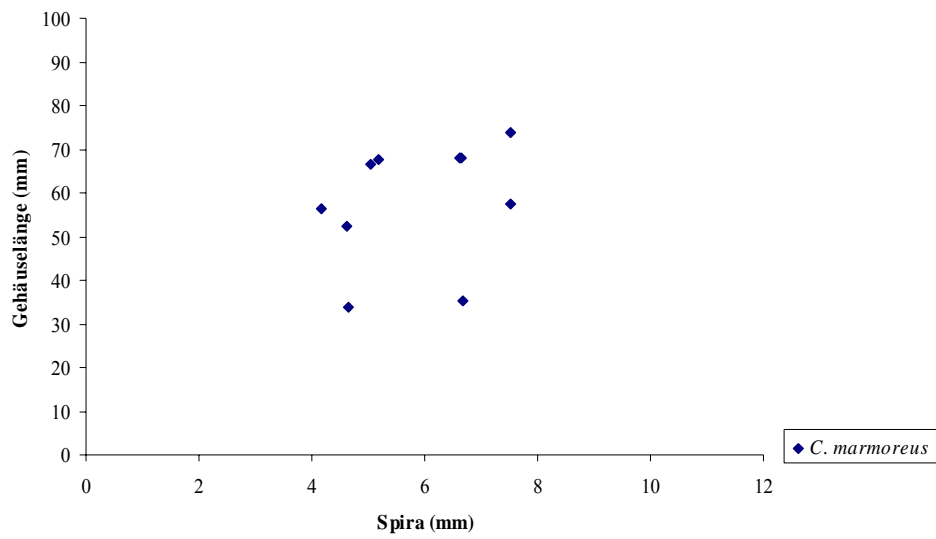


Abbildung 3.24: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei *C. marmoreus*. n=10

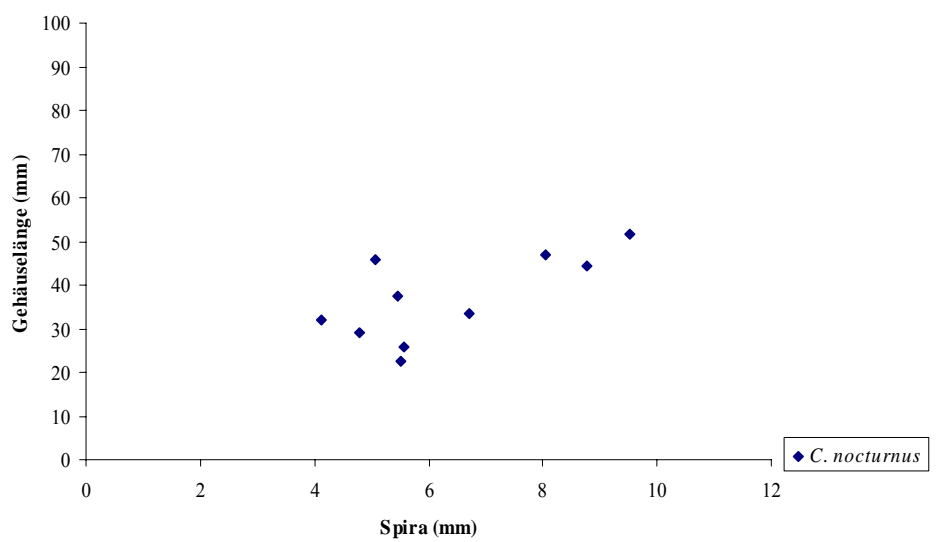


Abbildung 3.25: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei *C. nocturnus*. n=10

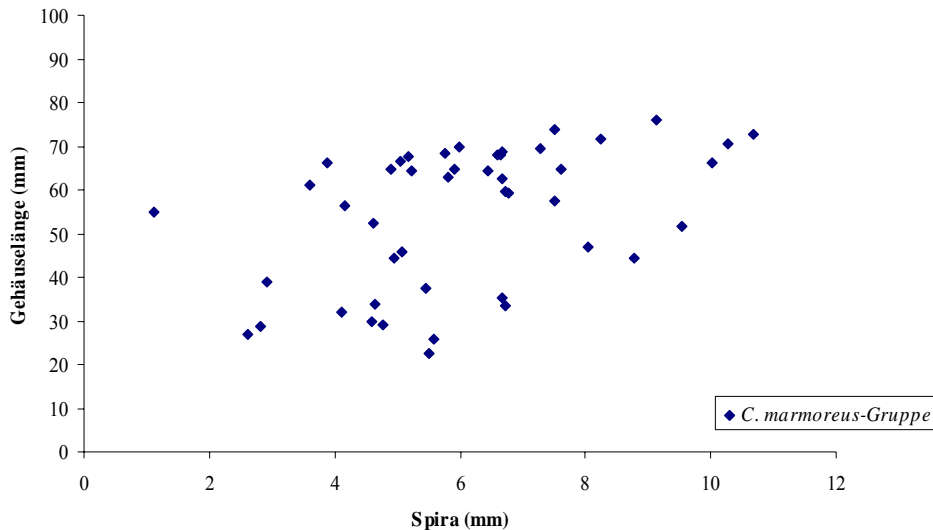


Abbildung 3.26: Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Höhe der Spira (RSH) bei sämtlichen untersuchten Arten der *Conus marmoreus*-Gruppe in einem kombinierten Graphen n=46

Die Abbildungen 3.22 bis 3.26 zeigen die graphische Darstellung der relativen Spirahöhe (RSH). Die Werte dieser Messreihen fallen durch ihre hohe Variabilität und Inkontinuität auf. Bei keiner der Messreihen war ein exponentieller, logarithmischer oder linearer Verlauf zu erkennen, so dass keine Regressionslinie errechnet werden konnte.

3.1. Molekulare Phylogenie

In sämtlichen berechneten Stammbäumen (Abbildungen 3.29-3.31, 3.34-3.36 und 3.40-3.42) werden die Terebridae als Outgroup unterstützt. Eine Ausnahme stellen die Berechnungen dar, in denen eine basale Gruppe der Gattung *Conus* als Outgroup verwendet wurde. Die drei einzelnen *Terebra*-Arten haben zueinander einen Sequenzunterschied von 11,59 %–14,39 % (p-Distanzen). *T. horasei* und *C. brunneus* zeigen mit 14,93 % den niedrigsten intergenerischen Distanzunterschied. Der größte Distanzunterschied zwischen Outgroup und Ingroup findet sich zwischen *T. subulata* und *C. boeticus* mit 28,50 %. Innerhalb den Kegelschnecken haben die Arten *C. boeticus* und *C. delessertii* den größten Sequenzunterschied zueinander, der geringste findet sich mit 0,24 % zwischen *C. villipinii* und *C. simpsoni*, *C. lindae* und *C. cingulatus*, *C. litteratus* und *C. eburneus*, *C. emaciatus* und *C. virgo* sowie zwischen *C. sponsalis* und *C. nux*. Diese Arten unterscheiden sich bezüglich ihrer Sequenz genauso sehr voneinander wie die beiden Exemplare von *C. nocturnus* sowie *C. anemone* und *C. compressus*, die oft als Unterart der gleichen Art betrachtet werden.

Tabelle 3.2: p-Distanzwerte innerhalb der *C. marmoreus*-Gruppe im untersuchten Abschnitt des 16S rRNA-Gens.

	<i>araneosus</i>	<i>bandanus</i>	<i>marmoreus</i>	<i>nigrescens</i>	<i>nocturnus 1</i>	<i>nocturnus 2</i>	<i>vidua</i>
<i>araneosus</i>	-						
<i>bandanus</i>	4,09%	-					
<i>marmoreus</i>	3,61%	1,43%	-				
<i>nigrescens</i>	4,32%	1,19%	1,19%	-			
<i>nocturnus 1</i>	3,85%	1,19%	1,19%	0,95%	-		
<i>nocturnus 2</i>	3,61%	1,43%	0,95%	1,19%	0,24%	-	
<i>vidua</i>	4,33%	2,14%	0,71%	1,43%	1,90%	1,67%	-

Innerhalb der *C. marmoreus*-Gruppe variiert der interspezifische Sequenzunterschied zwischen 0,71% und 4,33%. Während bei *C. marmoreus* und *C. bandanus* die Sequenzen sämtlicher untersuchter Individuen (drei bzw. vier) identisch sind, unterscheiden sich bei *C. nocturnus* die zwei Sequenzen um 0,24%. Ein drittes Individuum ist sequenzidentisch mit *C. nocturnus 2* und wurde deshalb, genauso wie die weiteren Individuen von *C. bandanus* und *C. marmoreus*, nicht in die Analyse integriert. Individuum 1 von *C. nocturnus* zeigt die größte interspezifische Sequenzähnlichkeit mit *C. nigrescens*, Individuum 2 dagegen mit *C. marmoreus* (jeweils 0,95%). *C. araneosus* hat mit 3,97% (3,61-4,33%) die höchste durchschnittliche Distanz zu den restlichen Mitgliedern der Gruppe. Der Sequenzabschnitt bei *C. bandanus* unterscheidet sich um 2,14% von dem bei *C. vidua*, der Art, die mit Ausnahme von *C. araneosus*, somit die innerhalb der Gruppe am weitesten von *C. bandanus* entfernteste Art darstellt. Von *C. nicobaricus* liegt als einzigem Vertreter der Gruppe keine Sequenz vor.

Tabelle 3.3: p-Distanzwerte innerhalb der basalen Gruppe im untersuchten Abschnitt des 16S rRNA-Gens.

	<i>arcuatus</i>	<i>californicus</i>	<i>delessertii</i>	<i>jaspideus</i>	<i>mahogani</i>	<i>memiae</i>	<i>mindanus</i>	<i>perplexus</i>	<i>puncticulatus</i>	<i>vanhyngaei</i>	<i>verrucosus</i>	<i>ximenes</i>
<i>arcuatus</i>	-											
<i>californicus</i>	11,46%	-										
<i>delessertii</i>	9,91%	18,28%	-									
<i>jaspideus</i>	6,62%	12,48%	10,45%	-								
<i>mahogani</i>	5,29%	10,67%	9,39%	5,71%	-							
<i>memiae</i>	5,70%	10,82%	7,62%	3,80%	2,74%	-						
<i>mindanus</i>	5,84%	12,73%	9,01%	4,04%	4,77%	3,80%	-					
<i>perplexus</i>	5,49%	12,95%	9,40%	5,99%	4,46%	4,47%	5,49%	-				
<i>puncticulatus</i>	7,26%	13,41%	9,87%	7,00%	5,69%	5,48%	6,75%	4,43%	-			
<i>vanhyngaei</i>	5,78%	12,87%	9,15%	2,49%	4,94%	4,03%	2,50%	4,46%	5,98%	-		
<i>verrucosus</i>	6,77%	12,49%	9,44%	3,73%	5,71%	4,73%	2,75%	5,42%	5,43%	2,96%	-	
<i>ximenes</i>	5,49%	11,49%	9,69%	5,26%	2,48%	3,22%	4,28%	3,69%	4,92%	3,98%	4,43%	-

Tabelle 3.3. zeigt die Distanzwerte der Arten, die in den Abbildungen 3.29 bis 3.31 sowie 3.34 bis 3.36 basal zu den restlichen Kegelschnecken stehen und die für die Stammbäume in den

Abbildungen 3.40 bis 3.42 als Outgroup gedient haben. Dabei handelt es sich um sieben westatlantische, vier ost-pazifische und eine indo-pazifische Art aus der Tiefsee (*Conus memiae*). Die Genabschnitte differieren um 2,48% (*C. mahogani* und *C. ximenes*) bis 18,28% zwischen *C. californicus* und *C. delessertii*, mit einer durchschnittlichen Varianz von 6,82%. Sämtliche Arten weisen zu *C. californicus* den größten Sequenzunterschied auf, wobei der durchschnittliche Differenzwert bei 12,71% liegt. Der kleinste Unterschied besteht zu *C. mahogani* (10,67%). *Conus memiae*, die einzige indo-pazifische Art innerhalb dieser Klade, zeigt ebenfalls die größte Ähnlichkeit mit *C. mahogani* (2,74% Sequenzunterschied) auf.

Die Stammbäume in den Abbildungen 3.29 bis 3.31, sowie 3.34 bis 3.36 und 3.40 bis 3.42 wurden mit Neighbor-joining-, Maximum Likelihood-, sowie Maximum Parsimony-Methoden erstellt. Bei den letzten beiden Methoden werden Äste, die weniger als 50 % bootstrap support haben, kollabiert.

Die Abbildungen 3.29 bis 3.31 beinhalten den kompletten Datensatz, bestehend aus den Sequenzen von 149 *Conus*-Individuen aus 145 Arten und drei *Terebra*-Arten (*T. crenulata*, *T. horasei* und *T. subulata*) als Outgroup. Diese Outgroup wird in sämtlichen berechneten Stammbäumen unterstützt. Die Aufspaltung der Vertreter der Gattung *Conus* erfolgt bei sämtlichen Stammbäumen polytom, wobei bei den Maximum Likelihood, Neighbor-joining und dem Maximum Parsimony majority rule Stammbäumen eine basale Gruppe innerhalb der Kegelschnecken das Schwestertaxon zur restlichen Gattung bildet. Bei dieser Gruppe handelt es sich mit Ausnahme von *C. memiae* ausschließlich um westatlantische Arten, bzw. Arten von der Westküste Nord- und Mittelamerikas (*C. arcuatus*, *C. californicus*, *C. mahogani*, *C. ximenes*). Die 16 verschiedenen Äste, welche sich mindestens in drei Abzweigungen aufspalten, beinhalten in diesen vier Stammbäumen die gleichen Arten. In drei Fällen (die Kladen der *C. daucus*-, *C. musicus*- (HG1a) und der *C. vexillum*-Gruppe (HG1j, Abbildung 3.33) wird jedoch der Ast durch eine weitere Art ergänzt und dementsprechend höher aufgelöst. Weiterhin werden 22 Arten innerhalb von elf Zweierästen eingeordnet. Diese Äste sind bei den Stammbäumen in den Abbildungen 3.29 und 3.30 vorhanden. Im Maximum Parsimony majority rule Stammbaum (Abb. 3.31) werden diese Artpaare ebenfalls zusammen dargestellt, jedoch werden sieben davon als weitere Aufspaltung in anderen Ästen eingeordnet.

Innerhalb der *C. marmoreus*-Gruppe (HG1h) ist stets *C. araneosus* die basalste Art. In den Maximum Parsimony majority rule Stammbäumen (Abb. 3.31, 3.42) stellt HG1h das Schwestertaxon zu den restlichen molluscivoren Arten der *C. textile*- und der *C. pennaceus*-

Gruppe dar. HG1h steht in naher Verwandtschaft zu den *C. textile* (HG1f) und *C. pennaceus*-Gruppen HG1g).



Abbildung 3.27: Die Mitglieder der basalen *Conus*-Gruppe. Oben von links nach rechts: *C. californicus*, *C. arcuatus*, *C. delessertii*, *C. perplexus*, *C. mindanus*, *C. puncticulatus*, Unten von links nach rechts: *C. jaspideus*, *C. vanhyningi*, *C. verrucosus*, *C. mahogani*, *C. ximenes*, *C. memiae*



Abbildung 3.28: Lokalformen der *C. pennaceus*-Gruppe: Oben von links nach rechts: *C. corbieri*, *C. behelokensis*, *C. tsarai*, *C. vezoi* (alle Madagaskar), Unten von links nach rechts: *C. bazarutensis*, *C. racemosus*, *C. praelatus*, *C. pennaceus*-Form von Hawaii

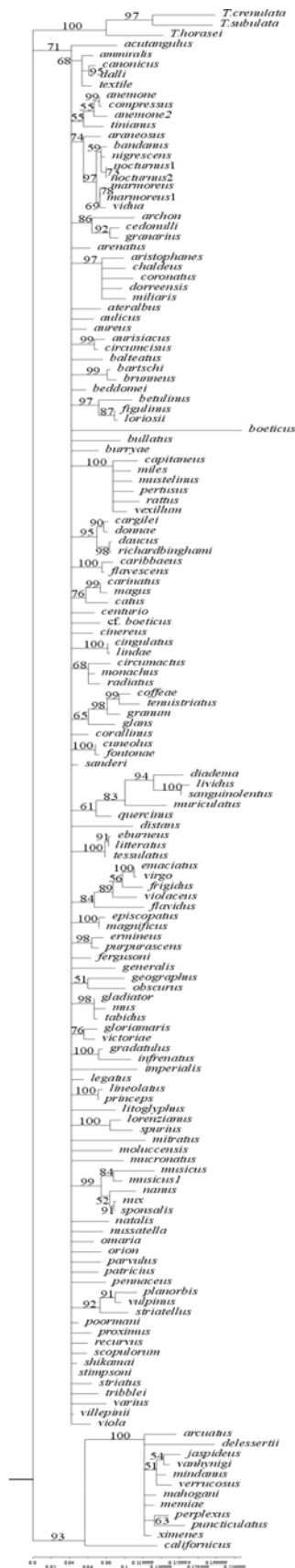


Abb. 3.29: Maximum likelihood-Stammbaum mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. Die Einstellungen entsprechen dem GTR Modell (Basen Häufigkeiten: A=0,349, C=0,1513, G=0,1971, T=0,3031. Substitutionsratenmatrix: A-C=0,082, A-G=0,3357, A-T=0,082, C-G=0,082, C-T=0,3357, G-T=0,082). Gamma Verteilung mit shape parameter α von 1,0487, Verhältnis der invariablen Stellen 0. Der Stammbaum ist auf die drei Outgroup Taxa *T. crenulata*, *T. horasei* und *T. subulata* gewurzelt.

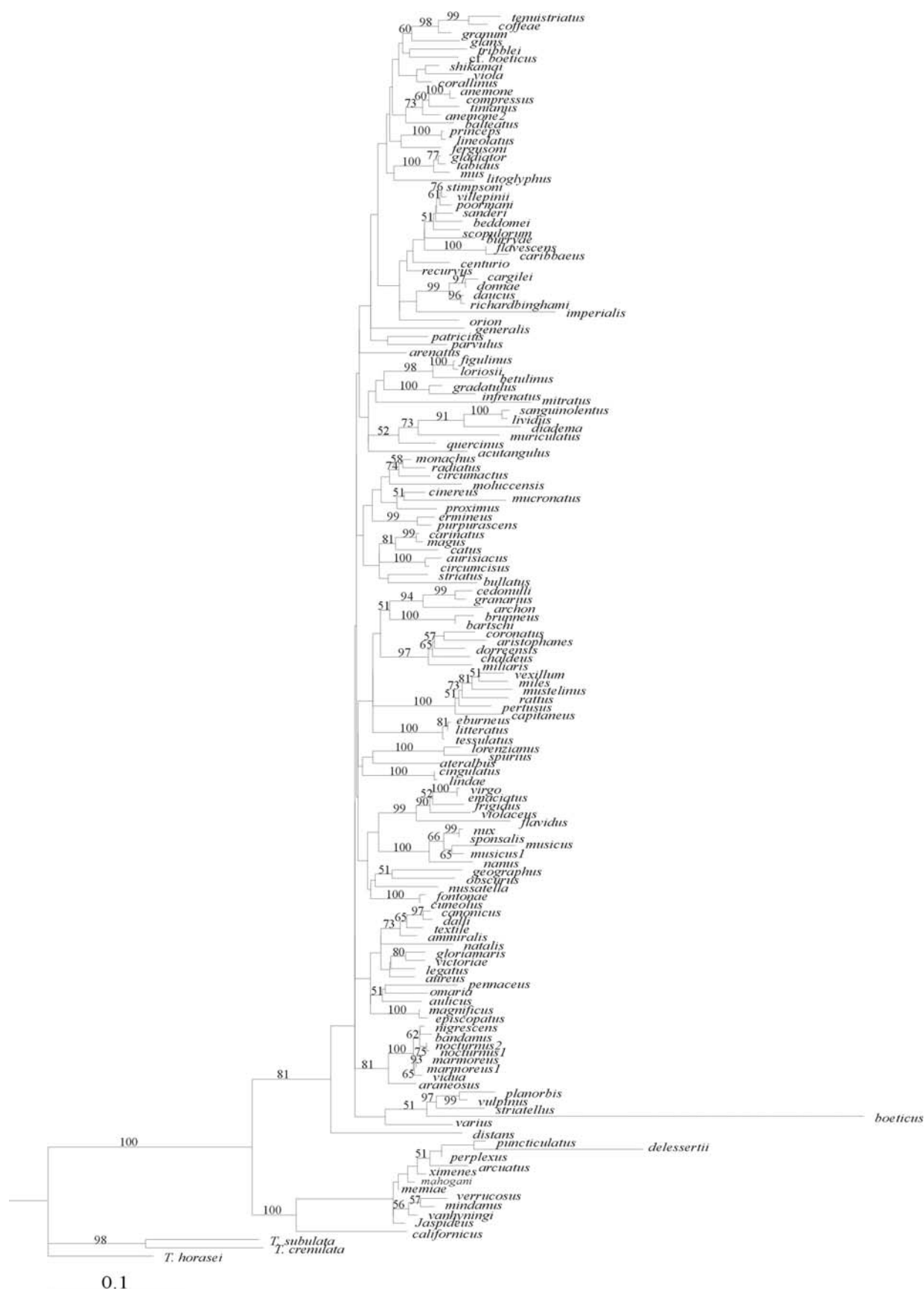


Abb. 3.30: Neighbor joining-Stammbaum mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. Die Einstellungen entsprechen dem GTR Modell (Basen Häufigkeiten: A=0,349, C=0,1513, G=0,1971, T=0,3031. Substitutionsratenmatrix: A-C=0,082, A-G=0,3357, A-T=0,082, C-G=0,082, C-T=0,3357, G-T=0,082). Gamma Verteilung mit shape parameter α von 1,0487, Verhältnis der invariablen Stellen 0. Der Stammbaum ist auf die drei Outgroup Taxa *T. crenulata*, *T. horasei* und *T. subulata* gewurzelt.

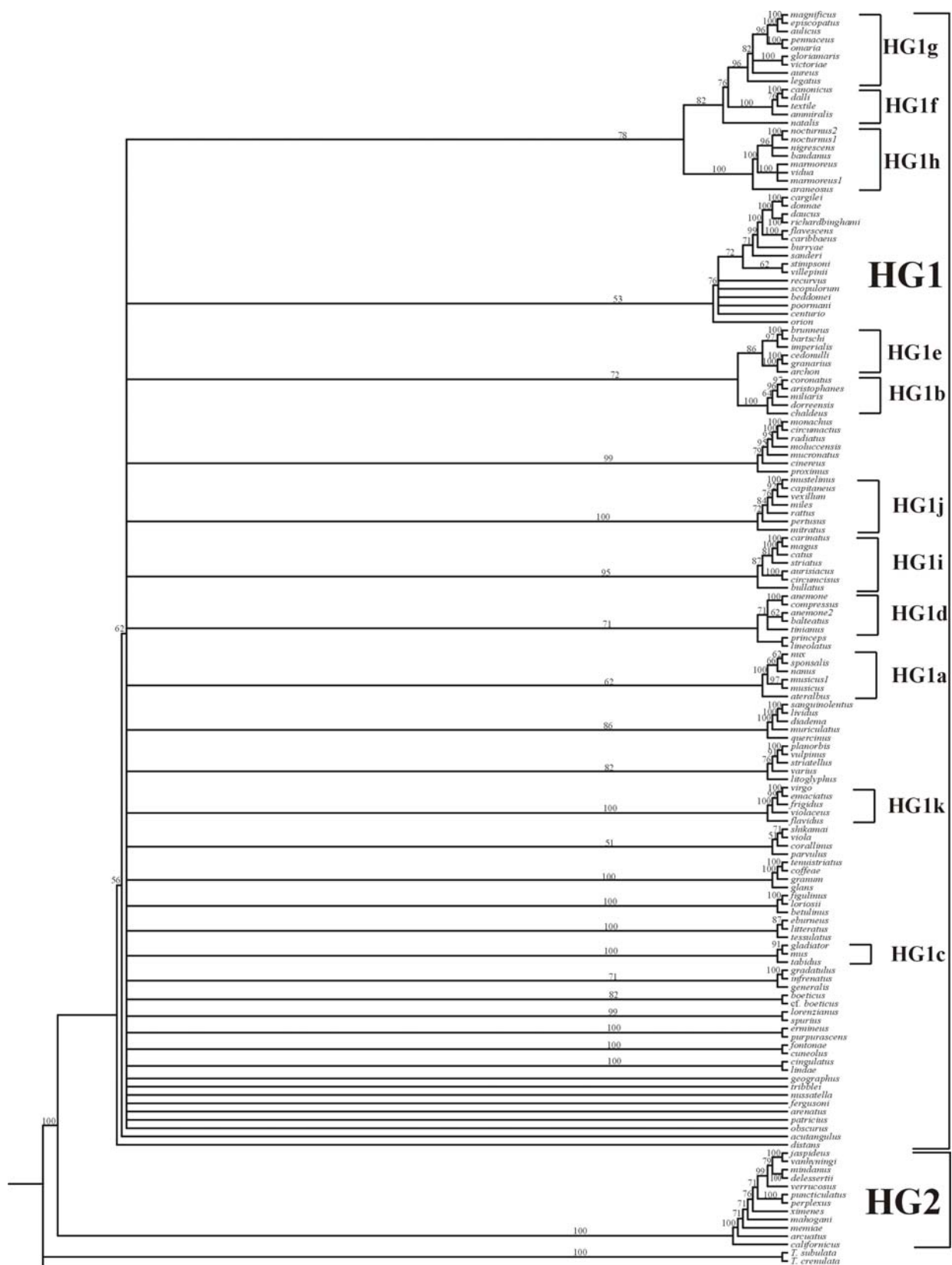


Abb. 3.31: Maximum Parsimony majority rule Stammbaum aus 1398 errechneten Stammbäumen mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. 209 Positionen sind Parsimonie-informativ. Gaps gelten als 5. character. Der Stammbaum ist auf die drei Outgroup Taxa *T. crenulata*, *T. horasei* und *T. subulata* gewurzelt.



Abbildung 3.32: Arten der *C. virgo*-Gruppe: Von links nach rechts: *C. virgo*, *C. emaciatius*, *C. flavidus*, *C. frigidus*



Abbildung 3.33: Arten der *C. vexillum*-Gruppe: Von links nach rechts: *C. vexillum*, *C. capitaneus*, *C. mustelinus*, *C. rattusi*, *C. pertusus*, *C. miles*.

Den Stammbäumen in den Abbildungen 3.34 bis 3.36 liegt ein Datensatz aus 68 *Conus*- und drei *Terebra*-Arten als Outgroup zugrunde. Die *Conus*-Arten gliedern sich in elf Arten aus dem Indo-Pazifik, 52 westatlantischen und ostpazifischen sowie fünf ostatlantischen Arten auf. Auch bei diesem Datensatz wird die gleiche Gruppe wie in den Abbildungen 3.29-3.31 basal als Schwestertaxon zu den restlichen Kegelschnecken gestellt. Weiterhin finden sich in allen Stammbäumen vier Kladen mit 3 bis 5 Arten, die einzige Ausnahme ist der Maximum Likelihood Stammbaum. Hier werden diese Zuordnungen nicht aufgelöst und die Gruppen geteilt. Manche dieser Arten werden komplett isoliert dargestellt (*C. legatus*, *C. omaria*, *C. victoriae*). Sieben Kladen, die sich jeweils in zwei Arten aufspalten, finden sich in allen vier Stammbäumen. Zusätzlich noch zwei weitere Artenpaare (*C. anemone* & *C. tinianus* sowie *C. lineolatus* & *C. princeps*), die im Neighbor joining und Maximum Likelihood Stammbaum als eigener Ast stehen, im Maximum Parsimony majority rule consensus Stammbaum aber die jeweilige Schwestergruppe zueinander bilden. Im Maximum Likelihood Stammbaum findet sich weiterhin eine Gruppe aus 15 Arten, deren genaue Verwandtschaftsverhältnisse zueinander nicht weiter aufgegliedert werden und die Bootstrap-unterstützung nur bei 50 liegt.

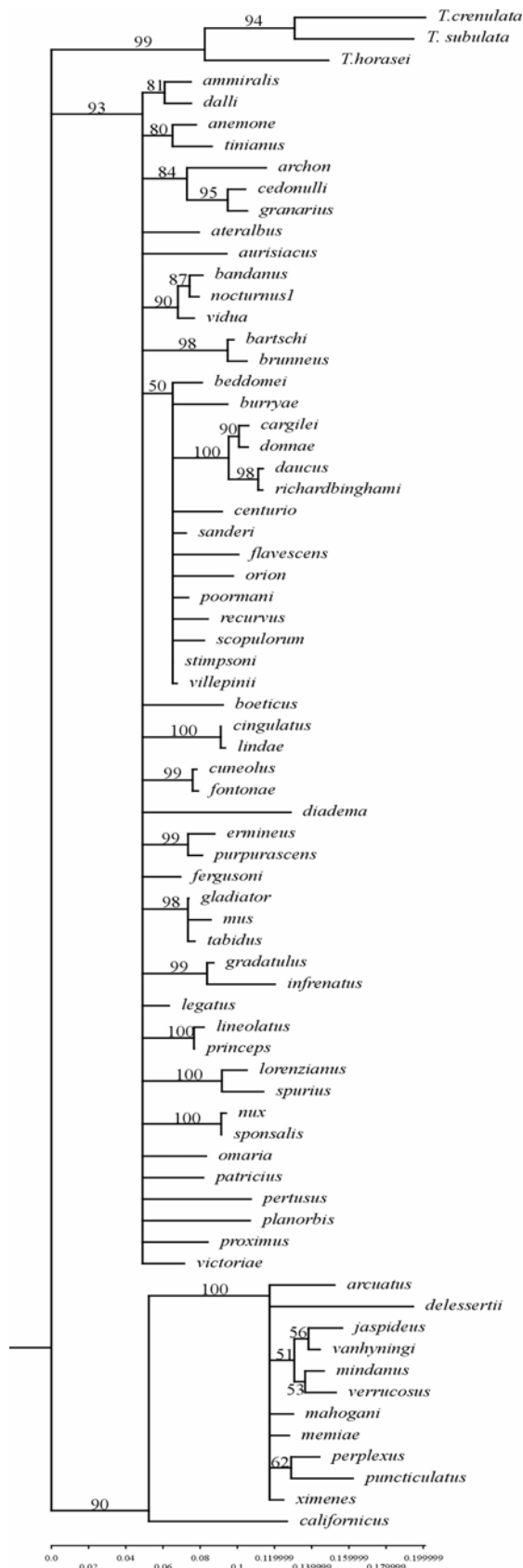


Abb. 3.34: Maximum likelihood-Stammbaum mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. Die Einstellungen entsprechen dem GTR Modell (Basen Häufigkeiten: A=0,3513, C=0,1494, G=0,1957, T=0,3636. Substitutionsratenmatrix: A-C=0,080, A-G=0,340, A-T=0,080, C-G=0,080, C-T=0,340, G-T=0,080). Gamma Verteilung mit shape parameter α von 1,0487, Verhältnis der invariablen Stellen 0,5988. Der Stammbaum ist auf die drei Outgroup Taxa *T. crenulata*, *T. horasei* und *T. subulata* gewurzelt.



Abb. 3.35: Neighbor joining-Stammbaum mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. Die Einstellungen entsprechen dem GTR Modell (Basen Häufigkeiten: A=0,3513, C=0,1494, G=0,1957, T=0,3636. Substitutionsratenmatrix: A-C=0,080, A-G=0,340, A-T=0,080, C-G=0,080, C-T=0,340, G-T=0,080). Gamma Verteilung mit shape parameter α von 1,0487, Verhältnis der invariablen Stellen 0,5988. Der Stammbaum ist auf die drei Outgroup Taxa *T. crenulata*, *T. horasei* und *T. subulata* gewurzelt.

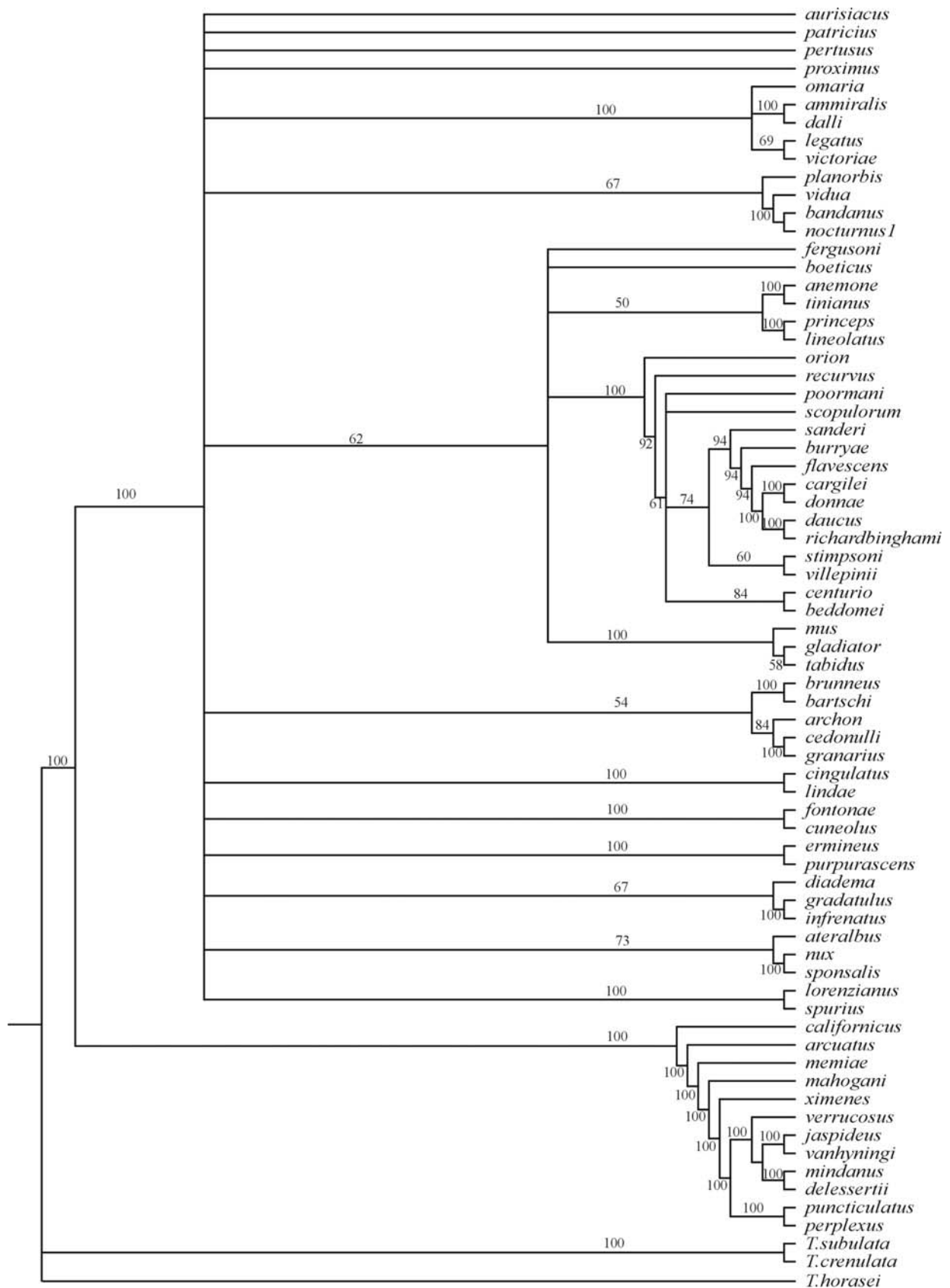


Abb. 3.36: Maximum Parsimony majority rule Stammbaum aus 1398 errechneten Stammbäumen mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. 179 Positionen sind Parsimonie-informativ. Gaps gelten als 5. character. Der Stammbaum ist auf die drei Outgroup Taxa *T. crenulata*, *T. horasei* und *T. subulata* gewurzelt.

Den Stammbäumen in den Abbildungen 3.40 bis 3.42 liegt der gleiche Datensatz zugrunde wie den Stammbäumen in den Abbildungen 3.29-3.31. Der Unterschied besteht in den drei *Terebra*-Arten, die hier aus der Analyse herausgenommen wurden. Anstelle der Terebridae wurde die basale *Conus*-Gruppe mit *C. arcuatus*, *C. californicus*, *C. delessertii*, *C. jaspideus*, *C. mahogani*, *C. memiae*, *C. mindanus*, *C. perplexus*, *C. puncticulatus*, *C. vanhyningi*, *C. verrucosus* und *C. ximenes* (Abbildung 3.27) als Outgroup eingesetzt. Der Maximum Likelihood-Stammbaum entspricht dem mit den Terebridae (Abbildung 3.29) bis auf eine Abweichung. Die Arten *C. geographus* und *C. obscurus* (Abbildung 3.37) stehen nicht in einem gemeinsamen Ast. Wie zuvor stehen diese Arten nicht in direkter Nähe der *C. magus*-Gruppe (HG1i Abbildung 3.38) oder von *C. purpurascens* und *C. ermineus*. Auch die Neighbor joining Stammbäume (Abbildungen 3.29 und 3.41) weisen kaum Unterschiede zueinander auf. Ohne die Terebridae werden *C. cinereus* und *C. mucronatus* zusammengestellt.

Die *C. virgo*-Gruppe (HG1k, Abbildung 3.32) wird in sämtlichen Stammbäumen deutlich aufgelöst. Der Ast mit *C. cargilei*, *C. daucus*, *C. donnae* und *C. richardbinghami* wird hier durch die drei Arten *C. burryae*, *C. caribbaeus* und *C. flavescens* ergänzt, ähnlich der Zuordnung in Abbildung 3.36 bei der der verkleinerte Datensatz zugrunde liegt.

Die meisten Unterschiede mit diesem Datensatz finden sich im Maximum Parsimony majority rule Stammbaum (Abb. 3.42). Die oben erwähnte Gruppe um *C. cargilei* beinhaltet in Abbildung 3.39 die gleichen Arten wie in der Abbildung 3.34, wird aber zusätzlich durch einen Ast aus drei weiteren Arten ergänzt. Ein großer Teil dieser Arten wird auch in Abbildung 3.34 dazugestellt, jedoch nicht in gleichem Maße aufgelöst. Weiterhin stehen hier, im Gegensatz zu allen anderen errechneten Stammbäumen, die Arten *C. tribblei* sowie das vermutliche Exemplar von *C. boeticus* in der Gruppe von *C. coffeae*. Ansonsten besitzt der Stammbaum vier Äste, bei denen im Vergleich zu dem Stammbaum mit den Terebridae einzelne Arten fehlen. Die molluscivoren Arten stehen erneut auf einem gemeinsamen Ast, der sich in drei Untergruppen teilt.



Abbildung 3.37: Piscivore Conus Arten: Oben von links nach rechts: *C. bullatus*, *C. striatus*, *C. geographus*, *C. obscurus* Unten von links nach rechts: *C. circumcissus*, *C. ermineus*, *C. purpurascens* (Perlas Is., Panama), *C. purpurascens* (Sonora, Mexiko)



Abbildung 3.38: Lokalformen von *C. magus*: Oben von links nach rechts: Sechs Exemplare von *C. magus* von unterschiedlichen Fundorten, ganz rechts: *C. carinatus*

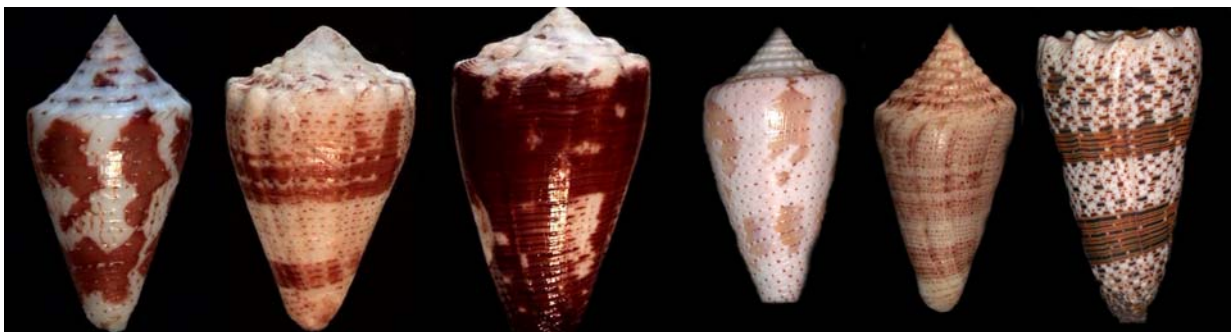


Abbildung 3.39: Amphinomidae-fressende Kegelschnecken-Arten: Von links nach rechts: *C. archon*, *C. bartschi*, *C. brunneus*, *C. cedonulli*, *C. granarius*, *C. imperialis*

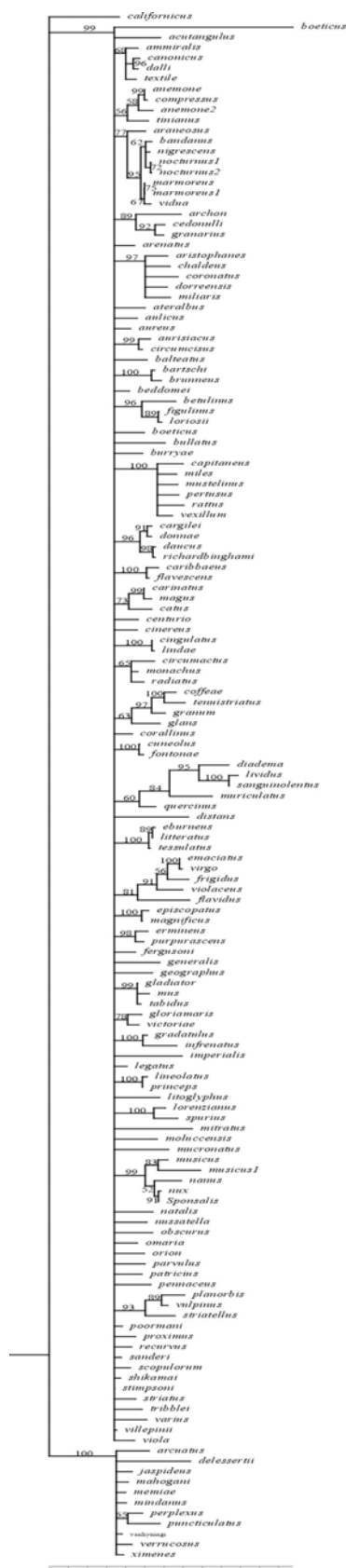
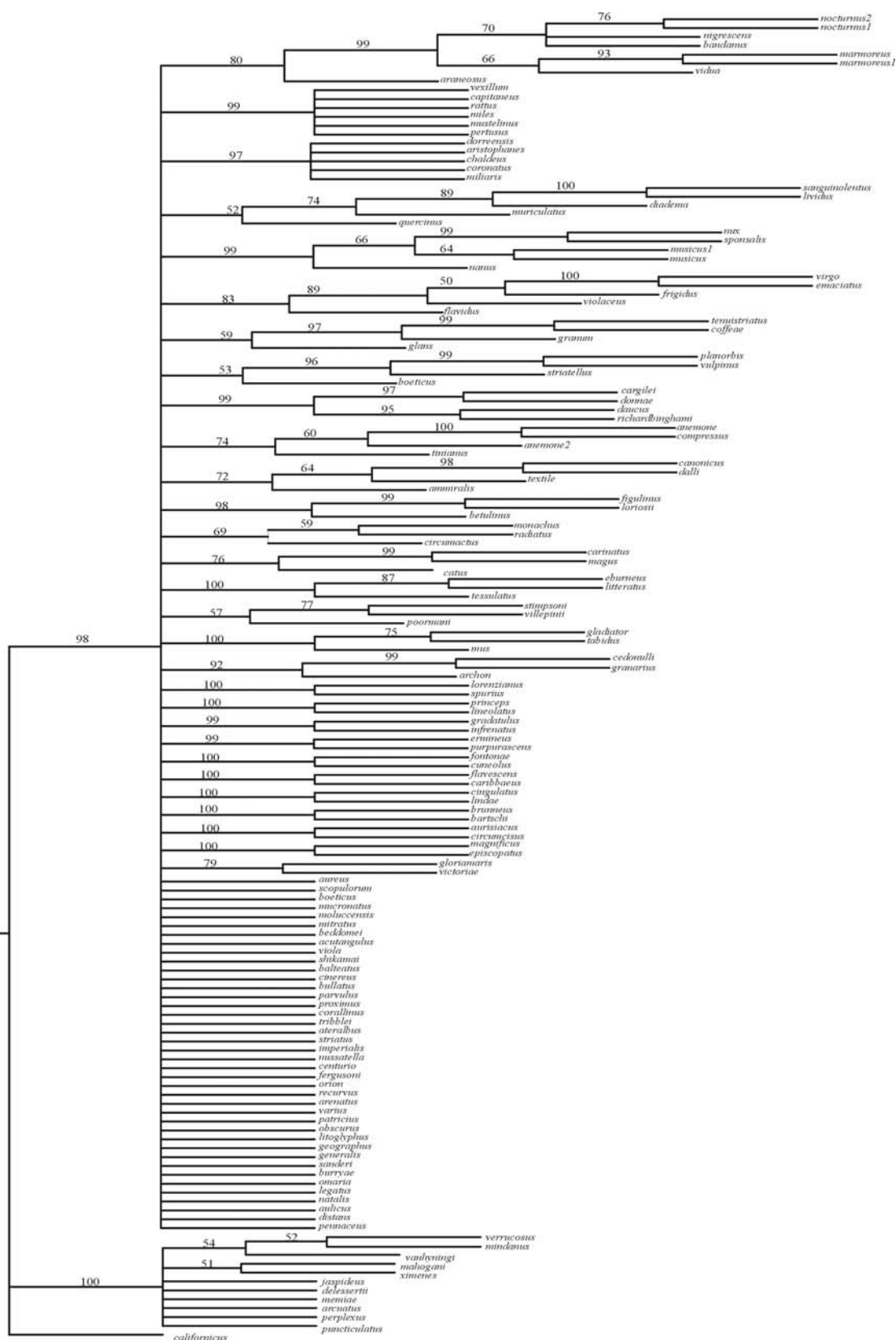


Abb. 3.40: Maximum Likelihood-Stammbaum mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. Die Einstellungen entsprechen dem GTR Modell (Basen Häufigkeiten: A=0,3491, C=0,1516, G=0,1964, T=0,3027. Substitutionsratenmatrix: A-C=0,081, A-G=0,337, A-T=0,081, C-G=0,081, C-T=0,337, G-T=0,081). Gamma Verteilung mit shape parameter α von 0,418, Verhältnis der invariablen Stellen 0,3101. Der Stammbaum ist auf die Outgroup Taxa *C. arcuatus*, *C. californicus*, *C. delessertii*, *C. jaspideus*, *C. mahogani*, *C. memiae*, *C. mindanus*, *C. perplexus*, *C. puncticulatus*, *C. vanhyningi*, *C. verrucosus* und *C. ximenes* gewurzelt.



10

Abb. 3.41: Neighbor joining-Stammbaum mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. Die Einstellungen entsprechen dem GTR Modell (Basen Häufigkeiten: A=0,3491, C=0,1516, G=0,1964, T=0,3027. Substitutionsratenmatrix: A-C=0,081, A-G=0,337, A-T=0,081, C-G=0,081, C-T=0,337, G-T=0,081). Gamma Verteilung mit shape parameter α von 0,418, Verhältnis der invariablen Stellen 0,3101. Der Stammbaum ist auf die Outgroup Taxa *C. arcuatus*, *C. californicus*, *C. delessertii*, *C. jaspideus*, *C. mahogani*, *C. memiae*, *C. mindanus*, *C. perplexus*, *C. puncticulatus*, *C. vanhyningi*, *C. verrucosus* und *C. ximenes* gewurzelt.

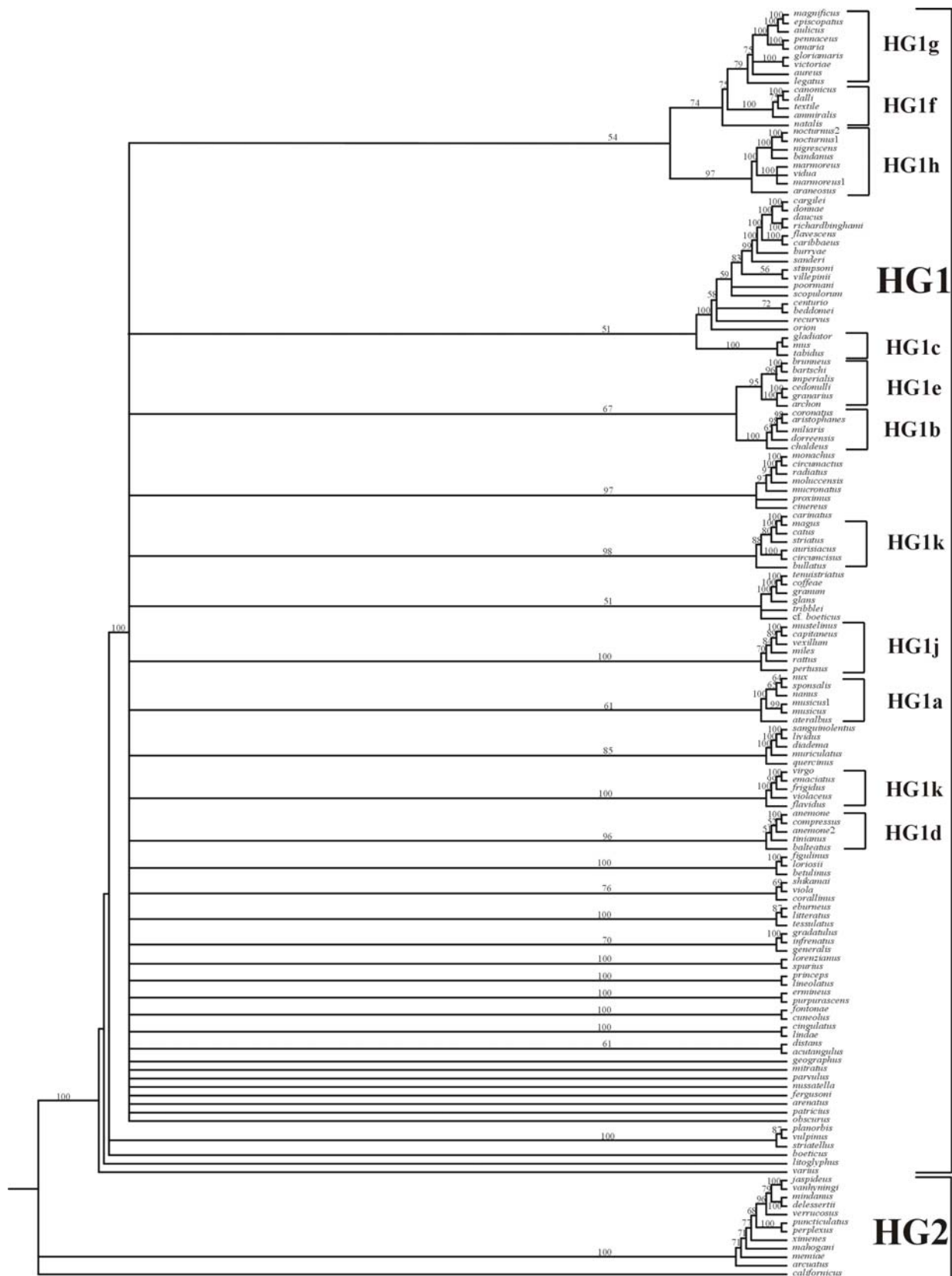


Abb. 3.42: Maximum Parsimony majority rule Stammbaum aus 2758 errechneten Stammbäumen mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens mit 1000 bootstrap Wiederholungen. Bootstrap Wiederholungen mit einem support von über 50 % stehen an den Knoten. 207 Positionen sind Parsimonie-informativ. Gaps gelten als 5. *character*. Der Stammbaum ist auf die Outgroup Taxa *C. arcuatus*, *C. californicus*, *C. delessertii*, *C. jaspideus*, *C. mahogani*, *C. memiae*, *C. mindanus*, *C. perplexus*, *C. puncticulatus*, *C. vanhyningi*, *C. verrucosus* und *C. ximenes* gewurzelt.

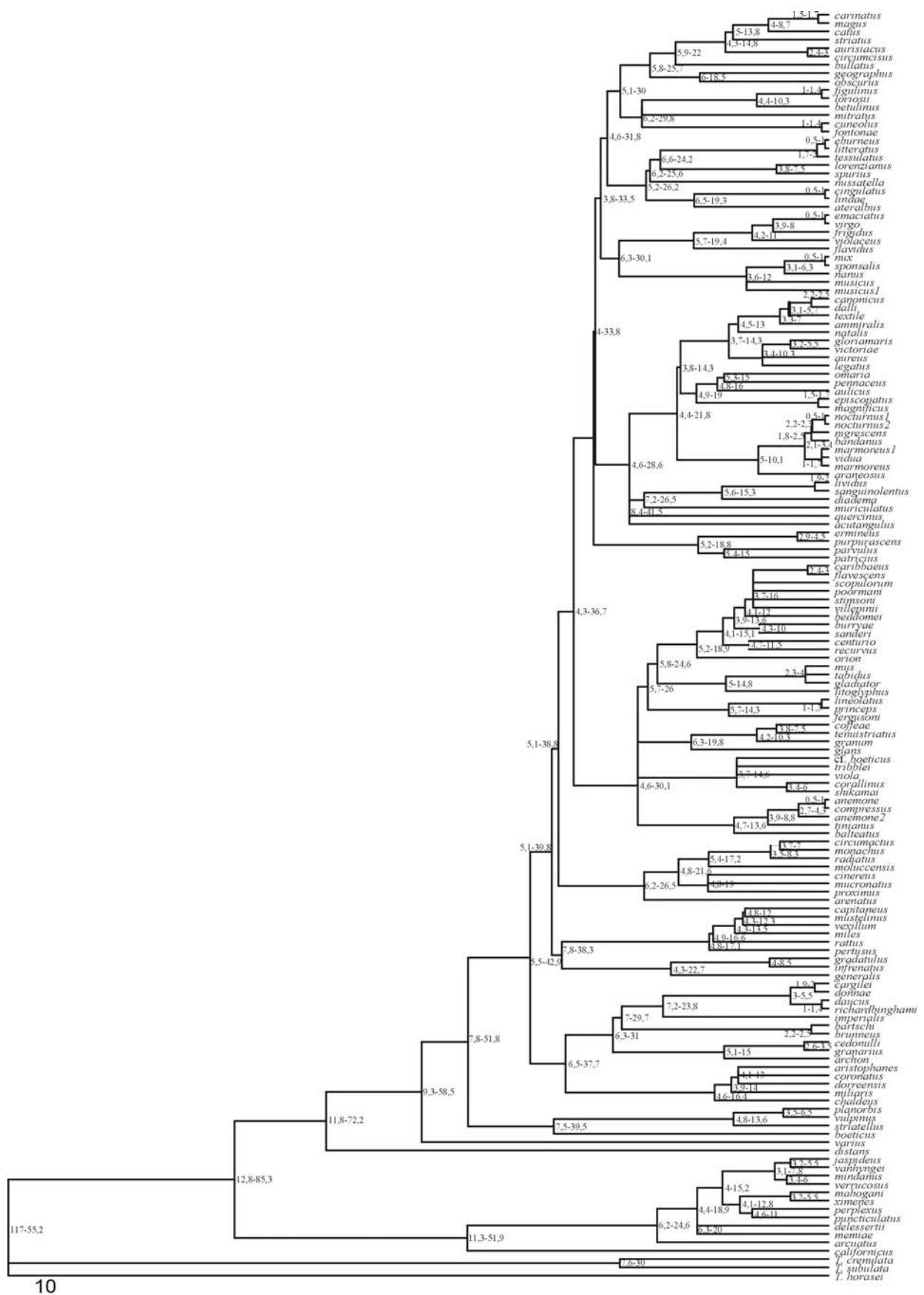


Abb. 3.43: Maximum likelihood-Stammbaum mit einem 453 Nukleotid Fragment des 16S rRNA Gens. Die Einstellungen entsprechen dem GTR Modell. Die Zeit-Kalibrierung über PATHd8 erfolgte auf die Artabspaltung von *C. lividus* und *C. quercinus* von einander und wurde mit 11 Millionen Jahren oder älter gesetzt.

Abbildung 3.43 zeigt die mit PATHd8 berechneten molekularen Divergenzen. Die Zeitskala wurde analog zu DUDA & KOHN (2005) nach der Aufspaltung von *C. lividus* und *C. quercinus* kalibriert. Die ältesten bekannten Fossilien von *C. lividus* sind aus dem Vigo Schiefer der Philippinen aus dem mittleren oder oberen Miozän bekannt und werden auf 5,2-12 Millionen Jahre datiert (DICKERSON 1921, SHUTO 1975). Die ältesten bekannten Fossilienfunde von *C. quercinus* stammen aus der Tjilang Formation auf Java. Diese werden auf 11 Millionen Jahre datiert (VAN DER CLERK 1931). Deswegen wurde für die Berechnung der Alterswerte der Zeitpunkt der Abspaltung dieser beiden Arten auf 11 Millionen Jahre oder mehr gesetzt. Aus dieser ungenauen Datierung resultieren die Differenzen für die Abspaltungen der einzelnen Äste.

3.3. Toxinologie

Um Informationen über die interspezifische Toxinzusammensetzung zu erhalten wurde bei *C. ermineus*, *C. jaspideus*, *C. nux*, *C. purpurascens*, *C. regius* und *C. villipinii* (Abbildung 3.44) über 3'- und 5'-RACE-PCR nach den Precursoren verschiedener Toxin-Superfamilien gesucht.



Abbildung 3.44: Conus-Arten, die bei den Toxin-Analysen verwendet wurden. Von links nach rechts: *C. ermineus*, *C. jaspideus*, *C. nux*, *C. purpurascens*, *C. regius*, *C. villipinii*

3.3.1 A-Superfamilie

Die A-Superfamilie der Conotoxine lässt sich weiter in die Familien der α -Conotoxine, α A-Conotoxine und κ A-Conotoxine aufspalten. α -Conotoxine waren die ersten Toxine, die aus dem Gift der Kegelschnecken isoliert werden konnten. Anhand des Toxins GI, welches aus dem Gift von *Conus geographus* stammt (GRAY *et al.* 1981) konnte man erkennen, dass das charakteristische Cystein-Motiv dieser Toxine CC-C-C ist. Diese Toxine sind aus vermivoren, molluscivoren sowie piscivoren Arten bekannt. Weiterhin unterteilt werden die α -Conotoxine in

$\alpha 3/5$ -, $\alpha 4/7$ -, $\alpha 4/4$ und $\alpha 4/3$ Toxine (die letzten beiden Gruppen sind nur durch jeweils ein Toxin bzw. zwei Isoformen bekannt), in Anlehnung an die Anzahl der Aminosäurereste zwischen den Cysteinen. Die bisher bekannten κA -Conotoxine zeigen in der Toxinregion allesamt das Muster $XCC(X_7)C(X_2)C(X_1)C(X_3)C$, die αA -Conotoxine haben die Struktur $XCC(X_{6-7})C(X_2)C(X_1)C(X_{3-7})C$. (SANTOS *et al.* 2004). Ein weiterer Unterschied liegt in der physiologischen Aktivität. Während die αA -Conotoxine genau wie die $\alpha 3/5$ - und $\alpha 4/7$ -Conotoxine mit den nicotinergeren Ach-Rezeptoren von Muskeln und Nerven interagieren, binden die κA -Toxine an K^+ -Kanäle (CRAIG *et al.* 1998b, NEVIN *et al.* 2007).

Um eventuelle Aussagen über die Evolution der α -Conotoxine treffen zu können wurden die Prepro-Regionen von 61 Toxinen aus der A-Superfamilie einer phylogenetischen Analyse mittels Maximum Parsimony-Methoden unterzogen. Dabei handelte es sich um 65 α -Conotoxine, 1 κA -Conotoxin und 1 αA -Conotoxin. Es wurden Toxine von insgesamt 27 Arten verwendet, die sich aus 11 piscivoren, 10 vermivoren und 6 molluscivoren zusammensetzen.

Bei der Analyse des Maximum Parsimony majority rule Stammbaumes (Abbildung 3.45) wurden die zunächst als Outgroup designierten Sequenzen der κA -/ αA -Conotoxin Prepro-Regionen innerhalb des Baumes eingruppiert und vier Toxine von *C. jaspideus* als Outgroup eingesetzt. Die κA / αA -Conotoxine-Prepro-Regionen bilden bei dieser Eingruppierung jeweils eigene Äste und zeigen auch zueinander keine höhere Verwandtschaft. Die Aufstellung der *C. jaspideus* Precursor als Outgroup wird mit einem Bootstrap-Wert von 95 unterstützt. Die Äste der Ingroup kollabieren jedoch zu einer Polytomie so, dass über deren Stellung zueinander keine Aussage möglich ist.

Eine große Klade, die sich zu 10 Enden verzweigt, besteht einzig aus Precursoren piscivorer Arten (*C. bullatus*, *C. circumcisis*, *C. consors*, *C. magus*, *C. monachus*, *C. stercusmuscarum* und *C. striatus*), ebenso wie ein kleinerer Ast der sich in Prepro-Regionen aus *C. bullatus*, *C. magus* sowie *C. stercusmuscarum* aufgliedert. Weiterhin beinhaltet der Stammbaum auch zwei Äste, die mit *C. bandanus* und *C. marmoreus* bzw. *C. aulicus* und *C. episcopatus* lediglich molluscivore Precursor enthalten. Weiterhin gibt es drei weitere Kladen, die sowohl Sequenzen von piscivoren und vermivoren bzw. molluscivoren und vermivoren Arten enthalten. Die einzigen Äste, die sich lediglich in die Precursor-Sequenzen vermivorer Arten aufspalten, beinhalten jeweils zwei Sequenzen von *C. regius*.

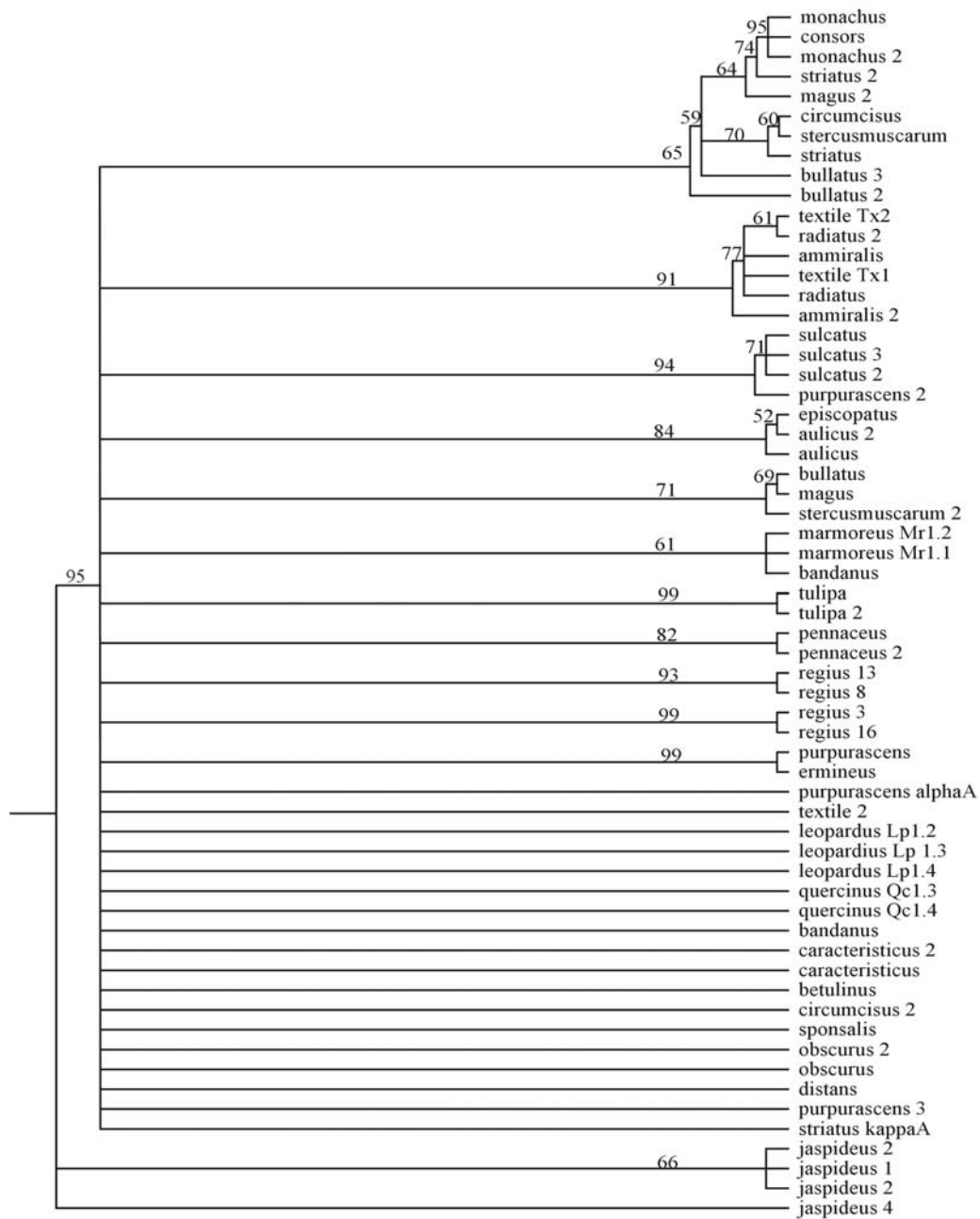


Abb. 3.45: Maximum Parsimony majority rule Stammbaum aus 851 errechneten Stammbäumen mit Prepropeptiden der A-Superfamilie mit 100 bootstrap Wiederholungen. Die Sequenzen hatten eine Länge von 156 Nukleotiden von denen 153 Positionen Parsimonie-informativ sind. Bootstrap Werte mit einem support von über 50 % stehen auf den Ästen die zu den Knoten hinführen. Der Stammbaum ist auf die Outgroup gewurzelt, die von den Prepropeptiden jaspideus 1-4 gebildet wird

Die über eine 3'RACE-PCR erhaltenen Produkte wurden in einen Vektor ligiert und in kompetente Zellen transformiert. Die Vorgehensweise der cDNA-Synthese war deshalb von Bedeutung, weil in der genomischen DNA die Toxine durch kleine Exons codiert werden, die voneinander von großen Introns separiert werden (OLIVERA *et al.*, 1999, YUAN *et al.*, 2007). Aus diesen Klonen wurde anschließend die Nukleotid-Sequenz für die einzelnen Toxine identifiziert. Dabei wurden von *C. jaspideus* Sequenzen aus 17 Klonen erhalten, die auf Nukleotidebene fünf verschiedene Isoformen eines Toxins repräsentierten, auf Aminosäureebene sich aber nur an zwei Positionen unterscheiden, so dass hier lediglich drei Isoformen beschrieben werden. Zusätzlich wurde ein weiteres Toxin gefunden, welches in seiner Sequenz deutlich von den anderen abweicht (jaspideus 4). Von *C. nux* wurden nur zwei identische Klone mit einer α -Conotoxin-Sequenz erhalten (Abbildung 3.46), von *C. ermineus* hingegen sieben Stück, die alle auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene verschiedene α -Conotoxin-Isoformen repräsentieren (Abbildung 3.47). Die DNA-Abschnitte der sequenzierten Toxine weisen eine Länge von 195–210 Nukleotiden auf.

```
jaspideus 1: MGMRMMFTVFLLVVLATTVVSDRASDRKNRRASNRNTWMIRTIACCENPQCYQTNRDECIREASE
jaspideus 2: MGMRMMFTVFLLVVLATTVVSDRASNRKNRRASNWNTWMIRTIACCENPQCYQTNRDECIREASE
jaspideus 3: MGMRMMFTVFLLVVLATTVVSDRASDRKNRRASNWNTWMIRTIACCENPQCYQTNRDECIREASE
nux 2:      MGMRMMFTVFLLVVLATTVVSDRASDRKNRRASNWNTWMIRTIACCENPQCYQTNRDECIREASE
```

Abb. 3.46: Aminosäure-Sequenzen der α -Conotoxine von *C. jaspideus* und *C. nux*. Aminosäure-Substitutionen sind rot dargestellt. Die Cystein-Anordnung ist gelb umrandet. Die letzten beiden Sequenzen zeigen auch eine übereinstimmende Nukleotidsequenz, obwohl sie aus verschiedenen Arten stammen.

```
ermineus 1: MGMRMMFIVFLLVVLATTVGSFTLDRVLGLASEGRNAAAIDNALDQRDPKRQTPGCCWNPACVKNRCGRR
ermineus 2: MGMRMMFIVAFLLVVLATTVGSFTLDRVLGLASEGRNAAAIDNALDQRDPKRQTPGCCWNPACVKNRCGRR
ermineus 3: MGMRMMFIVFLLVVLATTVVSFTLDHVLGLASEGRNAKAIDNALDQRDPKRQTPGCCWHPACGKNRCGRR
ermineus 4: MGMRMMFIVFLLVVLATTVGSFTSDRVLGLASEGRNAKAIDNALDQRDPKRQTPGCCWNPACVKNRCGRR
ermineus 5: MGMRMMFIVFLLVVLATTVVSFTLDRVLGLASEGRNAKAIDNALDQRDPKRQTPGCCWHPACGKNRCGRR
ermineus 6: MGMRMMFIVFLLVVLATTVGSFTLDRVLGLASEGRNAKAIDNALDQRDPKRQTPGCCWNPACVKNRCGRR
ermineus 7: MGMRMMFIVFLLVVLATTVGSFTLDRVLGLASEGRNAKAIDNALDQRDPKRQTPGCCWNLACVKNRCGRR
jaspideus 4: MGMRMMFIVFLLVVLATTVGSFTLDRVLGLASEGRNAKAIDNALDQRDPKRQTPGCCWNLACVKNRCGRR
```

Abb. 3.45: Aminosäure-Sequenzen der α -Conotoxine von *C. ermineus* und *C. jaspideus*. Aminosäure-Substitutionen sind rot dargestellt. Die Cystein-Anordnung ist gelb umrandet. Die letzten beiden Sequenzen zeigen auch eine übereinstimmende Nukleotidsequenz, obwohl sie aus verschiedenen Arten stammen.

Neben diesen Sequenzen ergab die Analyse der α -Conotoxin-Klone noch zwei weitere identische Sequenzen aus dem Genom von *C. jaspideus* und eine weitere aus *C. nux*, die ebenfalls zu 100% identisch waren. Obwohl mit den gleichen Primern gearbeitet wurde, wie bei den zuvor beschriebenen, handelt es sich aufgrund des Cystein-Motivs jedoch um einen Vertreter der O-Superfamilie, welcher aufgrund der, für diese Superfamilie, untypischen Preproregion gefunden werden konnte (Abbildung 3.48).

nux 1: MGMRMMFLTAWTFVTADDSRNLGNLFLKASHEMKDSELNKRNDDCIAGGVFCGLPKIGYCCSGICLFVCT
 jaspideus5:MGMRMMFLTAWTFVTADDSRNLGNLFLKASHEMKDSELNKRNDDCIAGGVFCGLPKIGYCCSGICLFVCT

Abb. 3.48: Aminosäure-Sequenzen der Toxine der O-Superfamilie von *C. nux* und *C. jaspideus*. Die Cystein-Anordnung ist gelb umrandet. Die beiden Sequenzen zeigen auch eine übereinstimmende Nukleotidsequenz, obwohl sie aus verschiedenen Arten stammen.

Mit lediglich 213 Nukleotiden gehören diese Sequenzen zu den kürzeren innerhalb der O-Superfamilie, da diese ansonsten eine Kettenlänge von bis zu 240 Nukleotiden aufweisen können.

Aus *C. purpurascens* konnte kein α -Conotoxin identifiziert werden. Über die angewandten Methoden wurde hier jedoch ein αA -/ κA -Conotoxin erhalten, das auf Nukleotidbasis in zwei verschiedenen Isoformen mit einer Substitution vorliegt (Abb. 3.49). Die Kettenlänge dieses Precursors beträgt 86 Aminosäuren (258 bp).

Pur1A: MGMRMMFIVFLVALATTVGSTPDHASDGRNAAVNDKASPLIAKVIRDCCGVVMEECHQCLCTQTCKNKGKKELWEMMTATDKRN

Abb. 3.49: Aminosäure-Sequenz des αA -/ κA -Conotoxins von *C. purpurascens*. Die Cystein-Anordnung ist gelb umrandet.

3.3.2 F-Superfamilie

MÖLLER *et al.* haben 2005 drei neue Toxine beschrieben, die sie im Gift von *C. floridanus* und *C. villepini* nachweisen konnten. Diese Toxine zeichnen sich durch eine verhältnismäßig kurze Aminosäuresequenz und ihrer Homologie zu Skorpiontoxinen aus (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Aminosäure-Sequenz der von MÖLLER *et al.* 2005 beschriebenen Toxine und Referenzsequenzen (abgeändert nach MÖLLER *et al.* 2005)

Peptid	Sequenz	Organismus	Referenz
ffl4a	WDVND C IHF C LIGV V ERSY T EC H TM C T	<i>Conus floridanus floridanus</i>	MÖLLER <i>et al.</i> 2005
ffl4b	WDVND C IHF C LIGV V GRSY T EC H TM C T	<i>Conus floridanus floridanus</i>	MÖLLER <i>et al.</i> 2005
ffl4c	WDAYD C I Q FCMRPE M RHTYA Q CL S I C T	<i>Conus floridanus floridanus</i>	MÖLLER <i>et al.</i> 2005
vill4a	GGLGR C I Y NC M NSGG L S F I Q CK T MC Y	<i>Conus viliepinii</i>	MÖLLER <i>et al.</i> 2005
κ-Hefutoxin 1	G--H A C Y R N C W R E --G N D E E T C K E R C	<i>Heterometrus fulvipes</i> (Skorpion)	SRINIVASAN <i>et al.</i> 2002
κ-Hefutoxin 2	G--H A C Y R N C W R E --G N D E E T C K E R C G	<i>Heterometrus fulvipes</i> (Skorpion)	SRINIVASAN <i>et al.</i> 2002
κ-KTx1.3	G--F -C Y R S C W K A--G H D E E T C K E K S	<i>Heterometrus spinifer</i> (Skorpion)	NIRTHANAN <i>et al.</i> 2005
OmTx1	---D P C Y E V C L Q H G N V--K E C E E A C K H P V E	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (Skorpion)	CHAGOT <i>et al.</i> 2005
OmTx2	---D P C Y E V C L Q H G N V--K E C E E A C K H P V E Y	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (Skorpion)	CHAGOT <i>et al.</i> 2005
OmTx3	N--D P C Y E V C L Q H T G N V --K A C E E A C Q	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (Skorpion)	CHAGOT <i>et al.</i> 2005
OmTx4	---D P C Y E V C L Q H G N V--K E C E E A C K H P	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i> (Skorpion)	CHAGOT <i>et al.</i> 2005

Um nähere Informationen über die Nukleotidsequenz, mögliche Isoformen und die Prepro-Region zu erhalten wurde mit Hilfe verschiedener degenerierter und konservierter Primer über cDNA zunächst ein 5'RACE-PCR und anschließend eine 3'RACE-PCR vorgenommen.

```

vill4a:                                     GGLGRCIYNCMNSGGLSFIQCKTMCY
Klon1 :                                     EMRRPEVRRPEVRQPEFAETPVGQKRGGLGRCIYNCMNSGGLSFIQCKTMCY
Klon2 : MGFRVLVLMVMTTSALPFTFSEEPGRSPFRPALRSEEAQALRHGLTLLARRADGQPPDMRQPEMRRPEVR QPEFAESVGRRDVDQCMYCLTGVVGYSYTECTMCT
Klon3 : MGFRVLVLMVMTTSALPFTFSEEPGRSPFRPALRSEEAQALRHGLTLLARRADGQPPDMRQPEMRRPEVR QPEFAESVGRRDVDQCMYCLTGVVGYSYTECTMCT
Klon4 : MGFRVLVLMVMTTSALPFTFSEEPGRSPFRPALRSEEAQALRHGLTLLARRADGQPPDMRQPEMRRPEVR QLEFAESVGRRDVDQCMYCLTGVVGYSYTECTMCT
Klon5 : MGFRVLVLMVMTTSALPFTFSEEPGRSPFRPALRSEEAQALRHGLTLLARRADGQPPDMRQPEMRRPEVR QLEFAESVGRRDVDQCMYCLTGVVGYSYTECTMCT
Klon6 : MGFRVLVLMVMTTSALPFTFSEEPGRSPFRPALRSEEAQALRHGLTLLARRADGQPPDMRQPEMRRPERRRPEVRQPEFAESVGRRDVDQCMYCLTGVVGYSYTECTMCT
Klon7 : MGFRVLVLMVMTTSALPFTFSEEPGRSPFRPALRSEEAQALRHGLTLLARRADGQPPDMRQPEMRRPERRRPEVRQPEFAESVGRRDVDQCMYCLTGVVGYSYTECTMCT
Klon8 : MGFRVLVLMVMTTSALPFTFSEEPGRSPFRPALRSEEAQALRHGLTLLARRADGQPPDMRQPEMRRPERRRPEVRQPEFAESVGRRDVDQCMYCLTGVVGYSYTECTMCT

```

Abbildung 3.50: Aminosäure-Sequenzen der Conotoxine der F-Superfamilie von *C. viliepinii*. Als Referenzsequenz gilt die von MÖLLER *et al.* 2005 beschriebene Sequenz aus dem Rohgift (vill4a). Die Cystein-Anordnung ist gelb umrandet. Aminosäure-Substitutionen in der Toxin-Region sind blau unterlegt, in der Signal-Region grau, in der Pro-Region rot.

Über eine 5'RACE-PCR wurden mit Hilfe eines degenerierten Primers, der an das 3'-Ende des Toxins bindet, zwei Precursor (Klon1 und 2) erhalten, die in ihrer Aminosäuresequenz identisch mit dem Referenzmaterial sind. Nach Konstruktion eines konservierten Primers für die 3'RACE-PCR wurden zwei weitere Toxine mit je drei Isoformen erhalten. Auf Nukleotidebene finden sich insgesamt pro Toxin 1-5 Basenaustausche, bezogen auf die jeweiligen Isoformen. Auf Ebene der Aminosäuren zeigen sich innerhalb der Isoformen in der Pre-Region maximal zwei Substitutionen, in der Proregion bis zu fünf. Bei den Sequenzen der Klone 3, 4 und 5 konnten auch innerhalb der Toxinregion Substitutionen nachgewiesen werden. Bei diesen Klonen kommt eine Deletion in der Pro-Region hinzu, die fünf Aminosäuren umfasst. Innerhalb der Toxin-Region zeigen sich mit Ausnahme des Cystein-Motivs lediglich fünf Aminosäurereste konserviert (jeweils Tyrosin, Glycin, Serin, Threonin und Methionin).

3.3.3 I-Superfamilie

Die I-Superfamilie wird in die I₁- und die I₂-Familien unterteilt. Während die Mitglieder der I₁-Familie aktivierend auf Nerven und Muskeln wirken, blockieren die Mitglieder der I₂-Familien K⁺-Kanäle, wie z. B. das ViTx aus *C. virgo* oder BTx aus *C. betulinus*. Die Signal-Region ist bei Toxinen der ersten Familie kürzer, als bei den I₂-Toxinen (FAN *et al.* 2003, KAUFERSTEIN *et al.* 2003, BUCZEK *et al.* 2005). Allerdings besitzen die Toxine der I₂-Gruppe keine Proregion, hier wird beim reifen Toxin ein Teil des C-Terminus abgespalten. Weiterhin zeigen manche Mitglieder der ersten Familie Post-translationale Isomerisationen von L- zu D-Aminosäuren, die nicht durch Standardverfahren wie dem Edman-Abbau oder der Massenspektrometrie ermittelt werden können. Während das von *C. radiatus* synthetisierte Peptid r11a ein D-Phenylalanin an Position 44 enthält, findet bei r11c eine Isomerisation eines L-Leucins an der korrespondierenden Stelle statt. Anhand dieser Isomerisationen werden sie in die Gruppe A und B unterteilt. Die Superfamilie ist aufgrund ihres Cystein-Motivs aus C-C-CC-CC-C-C charakterisiert worden. Die Länge der Abschnitte zwischen den Cysteinen ist variabel und ein weiteres Merkmal an dem die I₁- und die I₂-Familien voneinander abgegrenzt werden. Das Muster bei der I₁-Familie ist C(X₆)C(X₅)CC(X₁₋₃)CC(X₄₋₇)C(X₆₋₁₀)C, während es bei der I₂-Familie C(X₆)C(X₅)CC(X₃)CC(X₂₋₃)C(X₃)C ist.

Aus dem Gift von *C. regius* wurden 2 Conotoxine der I-Superfamilie isoliert, von dem anhand der Preproregion zwei Isoformen unterschieden werden konnten (Abbildung 3.51). Anhand der Nukleotidsequenz, wurde von dem Toxin reg2 eine weitere Isoform charakterisiert.

```
reg1: MMFRLTSVSCILLVIVLLNLLVLLADACHHHHEGWPCNDPWGCCGLGCCDKKCSRNCPRTEERRRSVSVFRVFGQR
reg2: MMFRLTSVSCILLVIVLLNLLVLLTDACHHHHEGWPCNDPWGCCGLGCCDKKCSRNCPRTEERRRSVSVFRVFGQR
```

Abbildung 3.51: Aminosäure-Sequenzen von reg1 und reg2, zwei Conotoxinen der I-Superfamilie aus *C. regius*. Das charakteristische Cystein-Motiv ist gelb umrandet, die Aminosäuresubstitution blau.

Tabelle 3.5: Aminosäure-Sequenz einer Auswahl der derzeit bekannten Toxine der I-Superfamilie

Organismus	Aminosäure-Sequenz	Referenz
Gruppe I		
A (Präsenz einer D-Aminosäure nachgewiesen oder vermutet)		
<i>C. radiatus</i>	G-P-S-F-C-K-A-D-E-K-P-C-E-Y-H-A-D-C-C-N- C-C-L-S-G-I - C-A-P-S-T-N-W-I-L-P-G-C-S-T-S-S-F-F-K-I	JIMENEZ <i>et al.</i> 2003
	G-O-S-F-C-K-A-D-E-K-O-C-E-Y-H-A-D-C-C-N- C-C-L-S-G-I - C-A-O-S-T-N-W-I-L-P-G-C-S-T-S-S-F-F-K-I	JIMENEZ <i>et al.</i> 2003
<i>C. radiatus</i> -	G-P-S-F-C-K-A-N-G-K-P-C-S-Y-H-A-D-C-C-N- C-C-L-S-G-I - C-K-P-S-T-N-V-I-L-P-G-C-S-T-S-S-F-F-R-I	JIMENEZ <i>et al.</i> 2003
	G-O-S-F-C-K-A-N-G-K-O-C-S-Y-H-A-D-C-C-N- C-C-L-S-G-I - C-K-O-S-T-N-V-I-L-P-G-C-S-T-S-S-F-F-R-I	JIMENEZ <i>et al.</i> 2003
<i>C. radiatus</i> -	G-P-S-F-C-K-A-D-E-K-P-C-K-Y-H-A-D-C-C-N- C-C-L-G-G-I - C-K-P-S-T-S-W-I - G-C-S-T-N-V-F-L-T-R	JIMENEZ <i>et al.</i> 2003
	G-O-S-F-C-K-A-D-E-K-O-C-K-Y-H-A-D-C-C-N- C-C-L-G-G-I - C-K-O-S-T-S-W-I - G-C-S-T-N-V-F-L-T	JIMENEZ <i>et al.</i> 2003
<i>C. figulinus</i> -	G-H-V-S-C-G-K-D-G-R-A-C-D-Y-H-A-D-C-C-N- C-C-L-G-G-I - C-K-P-S-T-S-W-I - G-C-S-T-N-V-F-L-T-R	BUCZEK <i>et al.</i> 2005a,b
<i>C. magus</i> -	G-A-V-P-C-G-K-D-G-R-Q-C-R-N-H-A-D-C-C-N- C-C-P-I-G-T - C-A-P-S-T-N-W-I-L-P-G-C-S-T-G-Q-F-M-T-R	BUCZEK <i>et al.</i> 2005 a,b
<i>C. striatus</i> -	G- C-K-K-D-R-K-P-C-S-Y-Q-A-D-C-C-N - C-C-P-I-G-T - C-A-P-S-T-N-W-I-L-P-G-C-S-T-G-P-F-M-A-R	BUCZEK <i>et al.</i> 2005 a,b
B-(Präsenz einer D-Aminosäure unwahrscheinlich)		
<i>C. radiatus</i> -	G- P-R-C-W-V-Y-G-R-V-H-C-T-Y-H-K-D-C-C-P-S-V - C-C-F-K-G-R - C-K-P-Q-S-W-G - C-W-S-G-P-T	JIMENEZ <i>et al.</i> 2003
<i>C. betulinus</i> -	- M-C-L-S-L-G-Q-R-C-E-R-H-S-N-C-C-G-Y-L - C-C-F-Y-D-K - C-V-V-T-A-I-G - C-G-H-Y	BUCZEK <i>et al.</i> 2005 a,b
<i>C. episcopatius</i> -	G-D-W-G-M-C-S-G-I-G-Q-G-C-G-D-S-N-C-C-G-D-M- C-C-Y-G-Q-I - C-A-M-T-F-A-A - C-G-P	BUCZEK <i>et al.</i> 2005 a,b
<i>C. regius regilla</i>	- C-Q-A-Y-G-E-S-C-S-A-V-V-R-C-C-D-P-N-A-V-C-C-Q-Y-P-E-D-A-V-C-V-T-R-G-Y - C-R-P-P-A-T-V-L-I-T	BRAGA <i>et al.</i> 2005
Gruppe II		
C		
<i>C. betulinus</i> BtX/BtX	- C-R-A-E-G-T-Y-C-E-N-D-S-Q-C-C-L-N-E - C-W-G-G - C-G-H-P - C-R-H-P-G-K-R-S-K-L-Q-E-F-F-R-Q-R	FAN <i>et al.</i> 2003
	- C-R-A-Y-G-T-Y-C-Y-N-D-S-Q-C-C-L-N-G - C-W-G-G - C-G-H-O - C-R-H-P	FAN <i>et al.</i> 2003
<i>C. virgo</i> -VITx-/VITx-	- S-R-C-F-P-P-G-I-Y-C-T-S-Y-L-P-C-C-W-G-I - C-C-S-T - C-R-N-V - C-H-L-R-I-G-K-R-A-T-F-Q-E	KAUFERSTEIN <i>et al.</i> 2003
	- S-R-C-F-P-P-G-I-Y-C-T-S-Y-L-P-C-C-W-G-I - C-C-S-T - C-R-N-V - C-H-L-R-I-G-K	KAUFERSTEIN <i>et al.</i> 2003
<i>C. emaciatius</i> -	- C-F-P-P-G-I-Y-C-T-P-Y-L-P-C-C-W-G-I - C-C-G-T - C-R-N-V - C-H-L-R-I-G-K-R-A-T-F-Q-E	BUCZEK <i>et al.</i> 2005 a,b
<i>C. figulinus</i> -	- C-H-E-G-L-P-C-T-S-G-D-C-C-G-M-E - C-C-G-G-V - C-S-S-H - C-G-N-G-R-R-R-Q-V-P-L-K-S-F-G-Q-R	BUCZEK <i>et al.</i> 2005 a,b
<i>C. episcopatius</i> -	- C-L-S-E-G-S-P-C-S-M-S-G-S-C-C-H-K-S - C-C-R-S-T - C-T-F-P - C-L-I-P-G-K-R-A-K-L-R-E-F-F-R-Q-R	BUCZEK <i>et al.</i> 2005 a,b
<i>C. striolatus</i> -	- C-R-A-E-G-T-Y-C-E-N-D-S-Q-C-C-L-N-E - C-W-G-G - C-G-H-P - C-R-H-P-G-K-R-S-K-L-Q-E-F-F-R-Q-R	BUCZEK <i>et al.</i> 2005 a,b
<i>C. spurius</i>	- C-R-T-E-G-M-S-C-Y-N-Q-Q-C-C-W-R-S - C-C-R-G-E - C-E-A-P - C-R-F-G-P	AGUILAR <i>et al.</i> 2007
<i>C. vexillum</i>	- S-R-C-F-P-P-G-I-Y-C-T-P-Y-L-P-C-C-W-G-I - C-C-D-T - C-R-N-V - C-H-L-R-I-G-K	KAUFERSTEIN <i>et al.</i> 2004
<i>C. striatus</i>	- R-R-C-V-P-P-S-R-Y-C-T-R-H-R-P-C-C-R-G-T - C-C-S-G-L - C-R-P-M - C-N-L-M-Y-G-K	KAUFERSTEIN <i>et al.</i> 2004
<i>C. capitaneus</i>	- R-R-C-F-P-P-G-V-Y-C-T-R-H-L-P-C-C-R-G-R - C-C-S-G-W - C-R-P-R - C-F-P-R-Y-G-K	KAUFERSTEIN <i>et al.</i> 2004
<i>C. imperialis</i>	- N-A-C-T-S-E-G-Y-S-C-S-S-D-S-N-C-C-K-N-V - C-C-W-N-V - C-E-S-H - C-G-H-H-G-K	KAUFERSTEIN <i>et al.</i> 2004
	- N-A-C-R-L-E-G-S-C-R-R-S-Y-Q-C-C-H-K-S - C-C-I-R-E - C-K-F-P - C-R-W-D-G-K	KAUFERSTEIN <i>et al.</i> 2004
	- N-A-C-L-R-D-G-Q-S-C-G-Y-D-S-D-C-C-R-Y-S - C-C-W-G-Y - C-D-L-T - C-L-I-N-G-K	KAUFERSTEIN <i>et al.</i> 2004

3.3.4 vil1293

Beim sogenannten vil1293 handelt es sich um ein Oligopeptid, welches aus dem Gift von *C. villepini* in der Arbeitsgruppe von Prof. MARÍ isoliert werden konnte. Es hat lediglich eine Länge von 10 Aminosäuren und weist eine Disulfidbrückenbindung auf, an der die Cysteinreste auf Position 3 und 8 beteiligt sind. Sowohl die Funktion als auch der Wirkungsort sind bisher unbekannt, allerdings sind in letzter Zeit zunehmend kleine Peptide aus dem Gift von Kegelschnecken isoliert worden, wie z.B. die Conophane, Contryphane und das Conomarphin (PISAREWICZ *et al.* 2005, JIMENEZ *et al.* 1997, HAN *et al.* 2008). Über deren biologische Wirkung kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

vil1293a: MLSQISLPSSSRFEYDDNDVSKRVFCNGFTGCGGRHRDRSRQERYGKRLIPVLAKR**PFCNSFGCYN**GKRSLSGAGPALSTPVDPSRNNKAQC�KNFQK

vil1293b: MLSQISLPSSSRFEYDDNDVSKRVFCNGFTGCGGRHRDRSRQERYGKRLIPVLAKR**PFCNSFGCYN**GKRSLSGAGPALSTPVDPSRNNKARTMARMLDAAAFCPA

Abbildung 3.52: Aminosäure-Sequenzen des vil1293-Oligopeptids von *C. villepini*. Die Sequenz des im Rohgift gefundenen Peptides ist rot geschrieben. Vil1293a und vil1293b stellen aufgrund ihres unterschiedlichen Anhangs am C-Terminus Isoformen dar.

Analog zu den Toxinen der F-Superfamilie wurde auch bei der Suche nach diesem Oligopeptid zunächst eine 5'RACE-PCR mit einem degenerierten Primer angewandt. Hier ging der Primer jedoch über die fast komplette Länge des Toxins und diente zur Identifikation des Precursors. Nach dessen Erhalt wurde ein konservierter Primer konstruiert, der an das 5'Ende des Prepropeptids bindet und für die 3'RACE-PCR verwendet.

Dadurch zeigte sich, dass vil1293 trotz seiner geringen Länge von nur 30 Nukleotiden mit einem langen Precursor von 171 Nukleotiden exprimiert wird. Weiterhin befindet sich dahinter ein weiterer Bereich mit 96 Nukleotiden der bei der Aktivierung des Peptids abgespalten wird. Anhand dieses Anhangs am C-Terminus wurde eine weitere Isoform identifiziert, bei der dieser Bereich mit 117 Nukleotiden länger ist und C-terminal von der kürzeren Sequenz bezüglich der Aminosäurereste abweicht. Aufgrund der zeitlichen Reihenfolge ihrer Entdeckung wurden die beiden Isoformen mit den Zusätzen „a“ und „b“ unterschieden (Abbildung 3.52).

3.3.5 purpur X

Dieses mögliche Peptid aus *C. purpurascens* ist bisher lediglich anhand der Nukleotidsequenz nachgewiesen worden. Betrachtet man das Cystein-Muster (C-C-C-C-C-C) können Ähnlichkeiten mit Toxinen der P-Superfamilie verzeichnet werden. Zu dieser Superfamilie gehören auch die *spasmodic peptides* (Abbildungen 3.53.1 & 3.53.2).

purpur X:
 MGRMFMFDGMVLPWFVKRRQRASSLKKALPQPLEKRYRKRRTGGGHTACSSPHLSHLKLSQTDQCPGTDSDQTPPHLLOSPSFEAWSQTIWPSPYEVQEKLWGPAGGRGGLLITSPHLTHRTEDLAWLRDAKERKNTATWEHHHPAHNH
Abbildung 3.53.2: Aminosäure-Sequenzen inkl. des Precursors von purpusacens X, einem potentiellen Angehörigen der P-Superfamilie. Das Cystein-Motiv ist gelb hervorgehoben, die potentielle Spaltstelle der Toxinregion vom Precursor ist mit einem Pfeil markiert.

textile AF193510	G	N	N	S	C	Q	E	H	S	D	C	E	S	H	C	I	C	T	F	R	G	C	G	A	V	N	G												
gloriamaris AF193511	G	N	N	S	C	Q	E	H	S	D	C	E	S	H	C	I	C	T	F	R	G	C	G	A	V	N	G												
regius AY144359	S	P	L	V	K	G	A	F	C	G	Q	A	C	S	S	V	K	C	P	K	C	F	C	H	P	E	E	K	V	C	Y	R	E	M	R	T	K	E	R
litteratus DQ345386	I	W	F	C	A	S	R	T	C	S	A	P	A	D	C	N	P	C	T	C	E	S	G	V	C	V	D	W	L										

Abbildung 3.53.1: Aminosäure-Sequenzen der Toxin-Region von Toxinen der P-Superfamilie. Das Cystein-Motiv ist gelb hervorgehoben. Die Toxine aus dem Gift von *C. textile* und *C. gloriamaris* sind auch als *spasmodic peptides* bekannt.

Bei purpur X kann eine Länge von 453 Nukleotiden (inkl. Prepro-Region) verzeichnet werden. Es handelt sich dabei um eines der längeren Conopeptide. Die Prepro-Region hingegen hat mit 126 Basenpaaren eine durchschnittliche Länge und entspricht auch den beschriebenen der P-Superfamilie (LIRAZAN *et al.* 2000). Analog zu den beiden Isoformen von vil1293 (siehe 3.3.4) und den Toxinen der I-Superfamilie (siehe 3.3.3) suggeriert die lange, dem Cystein-Motiv folgende Kette, dass bei Aktivierung auch hier dieser Teil enzymatisch abgespalten wird.

3.3.6 Toxin-Phylogenie

Bei den Precursoren der Conotoxine zeigen sich erhebliche Unterschiede bezüglich der Variabilität ihrer einzelnen Regionen. Während die Toxin-Region bei den Conotoxinen hochvariabel ist, sind die aus Signal- und Pro-Region bestehenden Prepro-Peptide relativ konserviert. Dabei ist die Proregion variabler als die Signalregion (CONTICELLO *et al.* 2000, 2001).

Um Aufschluss zu erhalten, wie manifestiert die einzelnen Prepro-Peptide innerhalb einer Toxin-Superfamilie sind, wurde mit den Prepro-Regionen von 99 Conotoxinen aus 9 Superfamilien eine phylogenetische Analyse unter Maximum Parsimony-Methoden durchgeführt (Abbildung 3.54). Diese Conotoxine stammen von 37 Arten, von denen 19 vermivor, neun piscivor, acht molluscivor und eine (*C. californicus*) omnivor sind. Dabei wurde nicht nach Signal- und Pro-Region unterschieden. Hingegen wurden beide Bereiche in die Analyse mit einbezogen. Als Outgroup wurden die Prepro-Regionen von zwei Contulakinen, da diese die einzigen Peptide im Datensatz ohne Disulfidbrückenbindungen sind. Die Contulakine werden bei der Analyse als Außengruppe bestätigt. Contryphan It wird zusammen mit vier Prepro-Regionen von Conotoxinen der T-Superfamilie und fünf aus der O-Superfamilie, in die nähere Verwandtschaft der M-Superfamilie eingeordnet. Die basalsten Prepro-Regionen der Innengruppe sind die der F-Superfamilie von *C. villepini*, und die von vil1293a & b. Abgesehen von den erwähnten Prepro-Regionen der O- bzw. T-Superfamilie zeigen sich keine weiteren Aufsplittungen der Toxingruppen in unterschiedliche Kladen. Fast jeder Ast trägt geschlossen sämtliche Mitglieder einer Superfamilie. In einem Ast mit einem bootstrap support-Wert von 94 stellt die I-Superfamilie das Schwestertaxon zu einer Gruppe von Prepro-Regionen aus *C. ferrugineus* und *C. planorbis* (J-Superfamilie) dar. Die J-Superfamilie hat ein ähnliches Cystein-Motiv wie die aus *C. villepini* beschriebene F-Superfamilie. Die $\alpha A/\kappa A$ -Conotoxine werden erneut innerhalb der restlichen Prepro-Regionen der A-Superfamilie einsortiert, während die aus *C. jaspideus* stammenden Sequenzen (wie in Abbildung 3.45), die basalsten der Gruppe darstellen. Die Prepro-Region des O-Superfamilien-Toxins von *C. californicus* nimmt isoliert den äußersten Zweig dieser Klade ein.

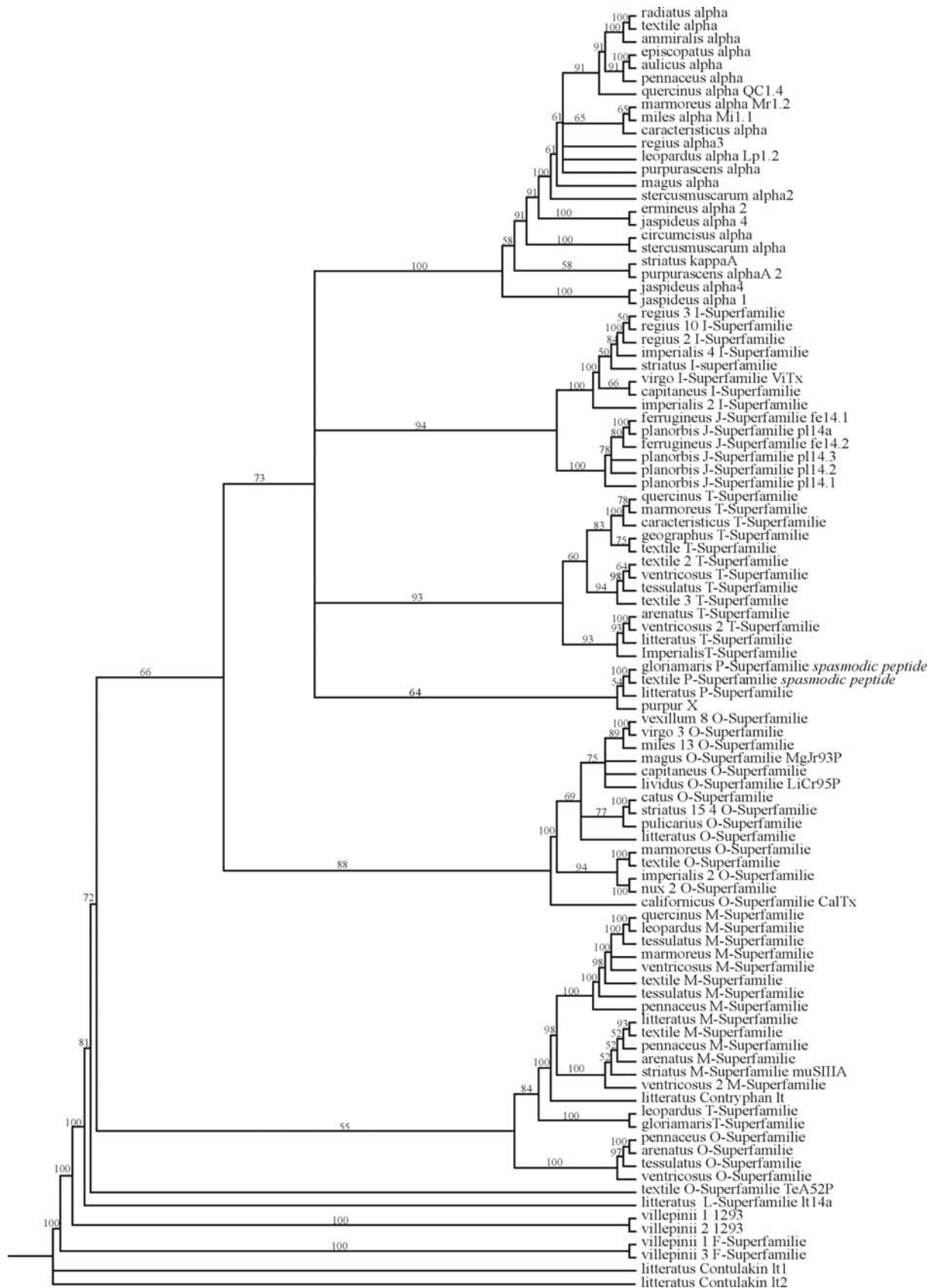


Abb. 3.54: Maximum Parsimony majority rule Stammbaum aus 3860 errechneten Stammbäumen mit Prepropeptiden verschiedener Toxin-Superfamilien mit 100 bootstrap Wiederholungen. Die Sequenzen hatten eine Länge von 306 Nukleotiden von denen 303 Positionen Parsimonie-informativ sind. Bootstrap Werte mit einem support von über 50 % stehen auf den Ästen die zu den Knoten hinführen. Der Stammbaum ist auf die Outgroup gewurzelt, die von zwei Contulakinen gebildet wird.

4. Diskussion

Basierend auf Gehäuse-morphologischen, molekular-phylogenetischen und toxinologischen Untersuchungen wurde die Systematik der Familie Conidae betrachtet. Die derzeitige Taxonomie der Conidae basiert auf Gehäuse-morphologischen Merkmalen. Zu deren Überprüfung wurde exemplarisch Material *C. marmoreus*-Gruppe, einer in sich geschlossenen Einheit vermessen. Von dieser wurden sogenannte Gehäuse-Indices bestimmt und mit den Literaturwerten verglichen.

Anhand von phylogenetischen Analysen, basierend auf einem Abschnitt des 16S rRNA-Gens, wurde untersucht, ob die westatlantischen und ostpazifischen Conidae aus einer Radiation stammen oder dieses Gebiet in mehreren, voneinander unabhängigen Schritten besiedelt worden ist. Stammbäume wurden erstellt und mit einer Phylogenie verglichen, der die Prepropeptide der Conotoxine der A-Superfamilie zugrunde lagen.

Letztlich wurde durch den direkten Vergleich der Precursor-Sequenzen verschiedener Toxin-Superfamilien nach Aussagen zur der phylogenetischen Evolution der Toxine gesucht.

4.1 Morphologie

Frühere Einteilungen der Conidae beruhten lediglich auf morphologischen Merkmalen. Mit Ausnahme einiger anatomischer Untersuchungen (BERGH 1895), stützt sich die systematisch-taxonomische Bearbeitung der Familie Conidae auf Gehäuse-morphologische Kriterien wie Spira, Wölbung, Oberfläche und Färbung. Zum Teil liegt das auch an der Verfügbarkeit, da die Gehäuse der Kegelschnecken begehrte Sammelobjekte waren und sind, liegen Belegexemplare von Conidae meist nur als Gehäuse vor. Viele Arten wurden von Liebhabern anhand von Gehäusen beschrieben.

Auch frühere Aufspaltungen der Gattung *Conus* wurden bisher ausschließlich anhand der Gehäuse durchgeführt. MOTTA (1991a, b) führte eine Revision der Gattung *Conus* basierend auf der Gehäuse-Silhouette durch. Hier wurden die Arten unabhängig ihrer biologischen Gruppen-Zugehörigkeit scheinbar wahllos in verschiedene Gattungen eingeteilt. Diese systematische Revision fand keine verbreitete Anerkennung, da sie aufgrund der innerartlichen Variabilität der Gehäuse-Silhouette infolge ökologischer Adaption nicht nachvollziehbar ist.

Von RÖCKEL *et al.* (1995) wurden Indices eingeführt, die zur Definition und zum objektiveren Vergleich der Arten untereinander dienen sollten. Basierend auf ihren neu-eingeführten Methoden haben RÖCKEL *et al.* (1995) zahlreiche etablierte Taxa zu Synonymen

erklärt, da diese nicht durch ihre Indices unterschieden werden konnten. Diese Indices (RW, RD, PMD, RSH) wurden in der vorliegenden Arbeit exemplarisch für die *C. marmoreus*-Gruppe berechnet und überprüft.

Der RW (relative weight) gibt Auskunft über das relative Gewicht im Verhältnis zur Gehäuselänge. Die Graphen (Abbildungen 3.5.1-3.9) haben einen exponentiellen Verlauf, der belegt, dass die Gehäuse mit fortschreitendem Wachstum nicht, wie man vermuten könnte linear, sondern exponentiell schwerer werden. Dies ist auch von einer Reihe anderer Tiere bekannt. Beispielsweise vergrößert sich bei Klapperschlangen (*Crotalus* sp.) der Körperumfang, bei Verdoppelung der Körperlänge um das Vierfache, während das Gewicht sich verzehnfacht (KLAUBER 1972). Die Graphen mit den Werten von *Conus araneosus*, *C. nicobaricus* und *C. bandanus* (Abbildungen 3.5.1, 3.5.2, 3.6.1, 3.6.2) zeigen zwar einen relativ linearen Verlauf, jedoch hängt dies damit zusammen, dass von diesen Arten nur verhältnismäßig große Gehäuse für die Untersuchung zur Verfügung standen. Der wahrscheinlichste Grund für den Anstieg des relativen Gewichtes (RW) ist, dass die Tiere mit fortschreitendem Wachstum ein dickerwandiges Gehäuse ausbilden: Ein dickwandiges Gehäuse bietet besseren Schutz vor Fressfeinden, Erosion und Zersetzung (beispielsweise durch Bohrschwämme) als ein dünnwandiges. Offenbar rechtfertigen die selektiven Vorteile eines dickwandigen Gehäuses v.a. bei Arten aus flacheren Riffbereichen den erhöhten Aufwand zu dessen Bildung, als bei Arten aus größeren Tiefen, die auch im Adultstadium sehr dünnwandig sein können (z.B. *C. profundorum*, *C. teramachi*). Die Aussagekraft der relativen Gewichte (RW) in der Taxonomie wird zusätzlich durch das Auflösen der inneren Gehäusewindungen durch die Tiere vermindert. Zu früheren Zeiten (COSSMANN 1896) wurde das Ausmaß der Resorption innerer Windungen zur Klassifikation der Familie und von Arten verwendet. Mittlerweile ist man davon abgekommen, da auch hier große individuelle Schwankungen vorliegen (KOHN *et al.* 1979).

Der relative Durchmesser (RD) gibt das Größenverhältnis der Öffnungshöhe zum maximalen Durchmesser wieder. Wie in den Abbildungen 3.10.1 bis 3.14 zu sehen, ist bei sämtlichen untersuchten Arten die Abhängigkeit dieser beiden Werte von einem linearen Verhältnis geprägt, woraus folgt, dass die Form der Schale konstant bleibt. Nach der Umwandlung aus dem Larvenstadium kommt es zu keinem messbaren Formwechsel des Gehäuses.

Analog zum RD ist auch beim PMD (der Öffnungshöhe in Relation zur Position des maximalen Durchmessers) ein lineares Verhältnis zu beobachten (Abbildungen 3.15.1-3.19). Dies hängt damit zusammen, dass der maximale Durchmesser im Verlauf des Wachstums seine

Position kaum verändert, da es zu keinen wesentlichen morphologischen Umwandlungen am Gehäuse kommt.

Die Abbildungen 3.20.1 bis 3.24 geben das Verhältnis der Gehäuselänge in Relation zur Spirahöhe wieder. Es besteht weder ein intra- noch interspezifischer Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen, was sich an der zufälligen Verteilung in den Graphen zeigt. Unterschiedliche Erosion der Spira kann das Ergebnis beeinflussen; letztlich liegt aber nahe, dass ein Geschlechtsdimorphismus vorliegt, der von einigen *Conus*-Arten (*C. coronatus*, *C. ebraeus*, *C. emaciatus*, *C. frigidus*) bekannt ist. Bei diesen Arten werden weibliche Exemplare größer als die männlichen (KOHN & NYBAKKEN 1975, NYBAKKEN & PERRON 1988). Hierbei könnte die Größe und Form der jeweiligen Gonaden, und der damit zusammenhängende unterschiedliche Reproduktionsaufwand, Einfluss auf die Ausbildung der Spira haben. WILLIAMS (1966) und GADGIL & BOSSERT (1970) konnten zeigen, dass mit zunehmendem Alter ein größerer Reproduktionsaufwand betrieben wird, da die potenziellen zukünftigen Reproduktionskosten abnehmen. Bei Kegelschnecken sind sowohl Arten bekannt für die dies zutrifft, als auch Vertreter, bei denen das Gegenteil der Fall ist (PERRON 1982). Insofern kann nicht mit Gewissheit gesagt werden, dass ab einem gewissen Alter aufgrund des betriebenen Reproduktionsaufwandes mehr Raum im Gehäuse zur Verfügung gestellt werden muss, und somit die Form des Gehäuses dadurch beeinflusst wird. Ein weiterer möglicher Grund für die innerartliche Variabilität der Spira-Ausbildung ist der Lebensraum der Tiere. Es ist auffällig, dass die meisten Tiefwasserarten (z.B. *C. comatosa*, *C. neotorquatus*) eine deutlich höhere Spira und ein dünnerwandiges Gehäuse ausbilden, als Tiere aus dem Flachwasser. Ob die Verbindung mit einem dünnwandigen Gehäuse mechanische Vorteile erbringt, ist nicht untersucht worden.

Der interspezifische Vergleich der vier Indices (Abbildungen 3.3-3.6) zeigt, dass die Werte der *C. marmoreus*-Gruppe allesamt im gleichen Bereich liegen sowie auch deren Hauptverteilung. Die einzige Art, die bezüglich der Hauptverteilung herausfällt, ist *C. nocturnus*. Allerdings ist auch bei dieser Art die Variationsbreite groß und überschneidet sich mit den Werten der anderen Arten. Im Vergleich zu RÖCKEL *et al.* (1995) wurden hier die Maximal- bzw. Minimalwerte für die meisten Indices erweitert, da für die vorliegende Analyse eine größere Anzahl an Gehäusen zur Verfügung stand.

Die exemplarisch an der *C. marmoreus*-Gruppe ermittelten Indices sind zur Artdetermination und Artdefinition ungeeignet. Vielmehr ist es so, dass die sieben Arten der *C. marmoreus*-Gruppe durch die charakteristischen Zeichnungselemente unterschieden werden können, was für Gehäuse-Indices nicht zutrifft. Die molekulare Phylogenie bestätigt, dass

Elementen der Zeichnung höchste taxonomische Bedeutung zukommt (siehe Abschnitt 4.2.9). Die interspezifische Variabilität ist zu groß, die intraspezifische jedoch zu gering. Unterschiedliche Kurvenverläufe innerhalb verschiedener Wachstumsstufen verzerren des weiteren den RW. Die Möglichkeit, diesen Index vergleichend heranzuziehen z.B. bei Tieren, die sich in der gleichen Wachstumsperiode befinden ist vage, da die Wachstumsrate bei verschiedenen Arten unterschiedlich hoch ist (FRANK 1969). Sie ist stark vom Nahrungsangebot abhängig, da Kegelschnecken sehr große Beute bewältigen können, die bis zu 49% des eigenen Gewichts wiegen. Nach großen Mahlzeiten findet ein verstärktes Wachstum statt (KANTOR 2007). Schließlich bilden Individuen vieler Arten aus der Gezeitenzone zum Schutz vor Verletzungen dickere Schalenwände aus, als die Tiere der gleichen Art, die in 20-40m Tiefe leben.

Folglich müssen die Kriterien zur Artbestimmung anders gewichtet werden, als von RÖCKEL *et al.* (1995) gefordert. Wie deren Indices ist bei Arten der *C. marmoreus*-Gruppe auch die Struktur der Gehäuseoberfläche nicht geeignet. Sie ist von bisher unbekanntem Faktoren abhängig. Dabei könnte es sich um bestimmte, im Wasser gelöste Substanzen oder die Wassertemperatur handeln. Auch die Art und Angebot der Nahrung wäre eine Möglichkeit für das Auftreten von z.B. auffälliger Granulierung:

Von *Conus nocturnus* ist eine granuliert Form bekannt (*C. deburghiae* SOWERBY II). Diese hat bei manchen Autoren einen Unterartstatus. In die vorliegende Analyse wurde ein Gehäuse einbezogen, auf dem sich glatte und granuliert Bereiche abwechseln (Abb. 3.2). Dies zeigt, dass die Tiere aufgrund eines Faktors bei der Ausbildung des Gehäuses zwischen diesen beiden Eigenschaften umschalten können. Es wird empfohlen, den Namen *C. n. deburghiae* nicht mehr zu verwenden.

Das herausragendste und offensichtlichste Merkmal, das in Zukunft bei der Artdetermination wieder verstärkt berücksichtigt werden sollte, ist die Gehäusezeichnung, welche verhältnismäßig konstant ist und einer vergleichsweise niedrigen intraspezifischen Variabilität unterliegt. Das wird durch die Ergebnisse der molekularen Phylogenie bestätigt (siehe 4.2).

4.2 Molekulare Phylogenie

Der Atlantik und der Pazifische Ozean waren im Pliozän zwischen dem Nord- und Südamerikanischen Kontinent verbunden. Die Schließung des Isthmus von Panama vor ca. 3,1-

3,5 Millionen Jahren bewirkte eine Unterbindung des Genflusses zwischen den beiden Ozeanen (SAITO 1976).

Fossile Mollusken und Foraminiferen deuten auf Unterschiede innerhalb der ozeanographischen Verhältnisse hin, die bereits einen früheren Wandel der Lebensbedingungen belegen (KEIGWIN 1978). Durch das Aneinanderrücken der Süd- und Nordamerikanischen Subkontinente kam es zu einer Veränderung der Meeresströmungen, die bereits vor 10 Millionen Jahren begann und vor ca. 4,6 Millionen Jahren zur endgültigen Umleitung des aus dem Atlantik kommenden, heutigen Karibischen Stromes geführt hat (COLLINS *et al.* 1996, HAUG & TIEDEMANN 1998). Anstatt in den östlichen Pazifik zu dringen, floss er entlang der Ostküste Mittelamerikas nach Norden durch die Karibik. Eine Folge davon war eine Anreicherung von Tiefseesedimenten im östlichen Atlantik, was zu veränderten Lebensbedingungen führte, die u.a. ein Kollabieren der planktonischen Produktion zur Folge hatte (ALLMON 2001, KIRBY & JACKSON 2005). Mit dieser Zeit ist eine globale Erderkaltung korreliert, die in der karibischen Region ebenfalls zum Wechsel der Strömungen beigetragen hat sowie zu einem Abkühlen des Oberflächenwassers und einem Wechsel des Auftriebes des Tiefenwassers (ZACHOS *et al.* 2001, JOHNSON *et al.* 2007). Das alles hat zu unterschiedlichen Lebensbedingungen im westlichen Atlantik (verglichen mit dem östlichen Pazifik) geführt, die in einem heutzutage hochproduktiven östlichen Pazifik und einem oligotrophen westatlantischen Ozean resultieren. Auf der (pazifischen) Ostseite Panamas wird der Ozean durch zwei Erscheinungen beeinflusst: Durch Wind verursachter saisonaler Auftrieb des Tiefenwassers sowie durch das Naturphänomen El Niño. Der Auftrieb verdrängt dabei das Oberflächenwasser und ersetzt es durch kühleres, salineres und nährstoffreicheres Wasser (SMAYDA 1966, FORSBERGH 1969). Auf der atlantischen Seite des Isthmus herrschen stabilere Verhältnisse. Der Tidenhub ist, verglichen mit der pazifischen Seite, gering, und die Wassermassen der Oberfläche ähneln in der Karibik denen des äquatorialen Atlantiks. Die obersten 200m sind durch sonnenerwärmtes, salines Wasser charakterisiert (STALKUP & METCALF 1972, D'CROZ & ROBERTSON 1997). Diese Faktoren haben dazu geführt, dass der östliche Pazifik und der westliche Atlantik heutzutage zwei grundverschiedene Ökosysteme darstellen, deren Faunen sich weitgehend unterscheiden. Weiterhin wird der tropische und subtropische westliche Atlantik zusätzlich in zwei biogeographische Provinzen unterteilt, zwischen denen ein Artenfluss nur schwach ausgeprägt ist.

Es ist schon im Miozän zu einer Migration von Norden nach Süden gekommen, die sich im Pliozän in entgegen gesetzter Richtung wiederholt hat (PETUCH 1982, VERMEIJ 2005).

Die in dieser Arbeit erzielten phylogenetischen Ergebnisse müssen unter dem Aspekt diskutiert werden, dass zwei unterschiedliche grundlegende Hypothesen zur Besiedelung des Atlantiks durch Mollusken vorliegen: Die erste Hypothese nach STANLEY (1986) besagt, dass die Diversität während des späten Pliozän bzw. frühen Pleistozän stark angestiegen ist, es im mittleren Pleistozän zu einem starken Absinken der Artenvielfalt kam, bevor es zu einem erneuten Anstieg im späten Pleistozän kam. Nach diesem Anstieg blieb die Mollusken-Diversität jedoch niedriger, als die rezente. Die zweite Theorie (ALLMON *et al.* 1993) besagt, dass die Artenvielfalt während dieser Zeit relativ konstant war. Ausgestorbene Arten wurden durch neu rekrutierte abgelöst, die sich aus hinzugewanderten und neuevolvierten Arten zusammengesetzt haben.

4.2.1 Zwei unterschiedliche Gruppen innerhalb der west-atlantischen/ost-pazifischen Conidae (HG1 und HG2)

Bilden sämtliche west-atlantischen bzw. ost-pazifischen *Conus*-Arten eine monophyletische Gruppe oder ist die Besiedelung dieser Lebensräume mehrmals erfolgt? Fast sämtliche Stammbäume die aus Analysen des Fragmentes des 16S rRNA Genes erstellt wurden zeigen eine Zweiteilung der Gattung *Conus*: In eine große Gruppe mit polytomer Aufspaltung (im folgenden HG1 genannt) und eine kleinere basale Gruppe (HG2). Innerhalb von HG2 befinden sich, mit Ausnahme von der indo-pazifischen *C. memiae*, nur je fünf west-atlantische und ost-pazifischen Arten. *C. californicus* wird dabei nach Maximum Likelihood- sowie nach Neighbor joining-Methoden aus dieser Gruppe ausgeschlossen und bildet eine dritte monotypische Gruppe. HG1 hingegen enthält Arten aus sämtlichen Verbreitungsgebieten. Diese Zweiteilung deutet darauf hin, dass zwischen dem Indo-Pazifik und dem östlichen Pazifik/westlichen Atlantik die Ausbreitung erschwert war, weil sonst mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr Mitglieder von HG2 im Indo-Pazifik zu finden wären, wobei es trotz allem zu einer geringen Migration gekommen ist. Ob diese erschwerten Ausbreitungsbedingungen auf eine Blockierung des Tethys Seeweges oder eine Blockierung zwischen dem westlichen und östlichen Atlantik zurückzuführen sind kann jedoch nicht gesagt werden, da anhand der datierten Phylogenie beide Varianten möglich sind und, weil nicht ausreichend Vertreter aus dem Ost-Atlantik in die Analyse einbezogen werden konnten.

Die ältesten bekannten Kegelschnecken-Fossilien stammen aus dem unteren Eozän in England und Frankreich. Im mittleren Eozän kam es zu der ersten Radiation der Conidae. Fossile Funde aus jener Zeitepoche sind sowohl aus dem heutigen west-atlantischen wie auch

vereinzelt aus dem indo-pazifischen Raum bekannt. Diese frühen Fossilien sind aus den feinen Sedimenten der Kontinentalschelfe und größerer Tiefen beschrieben worden (analog zu den frühen Turridae). Es ist also wahrscheinlich, dass HG2 in den Stammbäumen auf Nachfahren dieser ersten Radiation zurückzuführen ist. Dafür spricht, dass die meisten Fossilien aus dem Eozän, aus dem heutigen Atlantik beschrieben wurden (KOHN, 1990). Vom oberen Eozän bis zum oberen Oligozän hatten die Conidae ihre größte Artenvielfalt im indo-australischen sowie eurasischen Raum, wobei nach PICCOLI (1984) die europäische, marine Molluskenfauna jener Epoche der des Indo-Pazifiks entsprochen hat. In diese Zeit fallen auch die Ursprünge der großen Radiationen im Miozän. Es ist möglich, dass es davon ausgehend zu einer weiteren Besiedelung des Atlantiks und des Indo-Pazifiks kam. Die Theorie von VERMEIJ & ROSENBERG (1993) besagt jedenfalls, dass rezente indo-pazifische marine Flachwasser-Organismen ihren Ursprung im Atlantik hatten und nach Osten migriert sind.

Während HG2 aus einer frühen Radiation stammen muss, hat sich HG1 zu einem späteren Zeitpunkt entwickelt und dabei sowohl den Atlantik, als auch den Indo-Pazifik besiedelt. Aufgrund der Polytomie in den Stammbäumen ist keine Aussage darüber möglich, ob diese Radiationen, die zur Artenfülle von HG1 geführt haben, gleichzeitig oder zeitlich voneinander getrennt erfolgten. Die Zweiteilung in zwei Hauptgruppen wird jedoch durch Fossilfunde bestätigt, die auf eine plötzliche starke Artenausbildung hindeuten.

Die west-atlantischen/ost-pazifischen Conidae stellen keine monophyletische Gruppe dar, weil sie sich aus den Nachfahren unterschiedlicher Radiationen zusammensetzen. Während HG2 wahrscheinlich über Vorfahren aus Europa/Eurasien eingewandert ist, ist bei den Arten innerhalb von HG1 keine Aussage über die geographische Herkunft möglich.

Die Aussagen, die anhand von Fossilien über die Kegelschnecken-Diversität im West-Atlantik/Ost-Pazifik gemacht wurde, basieren auf den Funden in den Pinecrest-, Caloosahatchee- und Bernont-Formationen in Florida. Anhand dieser Fossilien wurde die steigende und sinkende Artenzahl im Pliozän und Pleistozän auf ein großes Mollusken-Massensterben an der Wende des Pliozäns zum Pleistozän begründet, wobei lediglich die Conidae in der Gegenwart mehr Formen ausgebildet haben, als zu irgendeinem früheren Zeitpunkt (STANLEY & CAMPBELL 1981, STANLEY 1984, PETUCH, 1995). Die Stammbäume zeigen, dass die westatlantischen bzw. ostpazifischen Kegelschnecken keine monophyletische Gruppe darstellen, da sie in beiden Kladen des Stammbaumes vertreten sind. Ausgehend von der konservativen Betrachtungsweise, dass eine Polytomie ein einziges Divergenzereignis darstellt, deuten die Stammbäume auf eine explosionsartige Artenvermehrung im späten Miozän bzw. Pliozän hin, was auch durch die Fossildaten unterstützt wird. (KOHN 1990)

4.2.2 Die *Conus musicus*-Gruppe (HG1a) und die *Conus chaldeus*-Gruppe (HG1b)

Da die Conidae des westlichen Atlantiks bzw. östlichen Pazifiks keine monophyletische Einheit bilden, stellt sich die Frage, ob sie über den Pazifik eingewandert sind. Hierbei muss zwischen den beiden Hauptgruppen unterschieden werden. In HG1 fällt auf, dass z.B. die ost-pazifische *C. nux* eng mit den indo-pazifischen *C. sponsalis*, *C. musicus* und *C. nanus* verwandt ist (HG1a). Dabei handelt es sich um Arten, die ostwärts bis nach Australien und den Salomonen vordringen. Als basalstes Mitglied dieser Gruppe (in manchen Stammbäumen [Abb. 3.31 und 3.41]), besiedelt *C. ateralbus* hingegen die Kapverdischen Inseln. Obwohl diese Art dort endemisch ist, bildet sie keine monophyletische Gruppe mit *C. fontonae* und *C. cuneolus*, zwei Vertretern der sehr jungen Kapverdischen Radiation (CUNHA *et al.* 2005, DUDA & ROLÁN 2005), was auf einen anderen Ursprung von *C. ateralbus* hindeutet. Das errechnete Abstammungsalter von *C. nux* zu den anderen Mitgliedern dieser Klade (0,98-10 Millionen Jahre) liegt im Zeitraum der veränderten Meeresbedingungen im westlichen Atlantik, bzw. nach der Schließung des Isthmus. Die kapverdischen Arten zeigen nur geringe Unterschiede innerhalb des Cytochrom Oxidase I (COI) Fragmentes, was durch die noch jungen Speziationsereignisse erklärt wurde (DUDA & ROLÁN 2005). Ein ähnliches Phänomen mit jungen und teilweise kryptischen Arten tritt innerhalb der indopazifischen *C. musicus*-Gruppe auf. *C. musicus* gilt als hochvariabel, teilweise sehen die Individuen Vertretern nahe verwandter Arten ähnlicher, als konspezifischen Exemplaren aus anderen Verbreitungsgebieten, was den Sequenzunterschied anhand der p-Distanzen von 4,8 % zwischen den beiden untersuchten Exemplaren dieser Art erklärt. Der Sequenzunterschied innerhalb der Gruppe reicht von 0,24-8,12 %. Dabei zeigt die ost-pazifische *C. nux* den geringsten Unterschied zu *C. sponsalis* (0,24 %). Das zeigt, dass sich diese beiden Arten vor ca. 0,5-0,9 Millionen Jahren voneinander getrennt haben. Kombiniert mit dem restlichen Alter der Gruppe (3,1-12 Millionen Jahre) zeigt dieses Ergebnis, dass diese Arten ihren Ursprung im Indo-Pazifik haben und die Vorfahren von *C. nux* nach Osten gewandert sind. Das Gleiche könnte für die indo-pazifischen Arten *C. chaldeus* und *C. tessulatus* gelten, zwei Arten die ebenfalls im Ost-Pazifik vorkommen, im Indo-Pazifik jedoch ebenfalls weit verbreitet sind. Für die *C. chaldeus*-Gruppe (UG2) gibt VALLEJO (2005) die Möglichkeit einer sympatrischen Speziation an. Die meisten der Arten von UG2 erfüllen mit ihrer weiten Verbreitung und ihrer Habitat-Spezifität einen Teil der Kriterien für eine sympatrische Speziation. Bedingt trifft das auch auf die Mitglieder von HG1a zu. *C. nux* zeigt kein so großes Verbreitungsgebiet ist aber in der Anpassung auf Fels-Littoral sehr Habitat-spezifisch (WILLIS & CORTÉS 2001).

Diese beiden Gruppen zeigen, dass bei der Artenausbreitung die *Eastern Pacific Barrier*, überwunden worden ist, eine marine, 4000-7000 km breite, Barriere, die ohne Inseln den östlichen vom zentralen Pazifik trennt. LESSIOS & ROBERTSON (2006) konnten das bereits für Riffische nachweisen. Auch für verschiedene Seeigel-Gattungen konnte eine Passage dokumentiert werden (LESSIOS *et al.* 1996, 1998, 2003). Obwohl es ein ungewöhnliches Ereignis darstellt, ist es dennoch auch für Invertebraten und somit für Mollusken möglich. Weiterführend ergibt sich, dass nicht bei jeder Kegelschnecken-Art die im östlichen Pazifischen Ozean vorkommt davon ausgegangen werden kann, dass sie näher mit westatlantischen/karibischen Arten verwandt ist. Aufgrund der Polytomie ist bei den meisten Arten keine genaue Prognose möglich. Dennoch gibt es nur wenige Artengruppen, die sich aus indo-pazifischen und ost-pazifischen/west-atlantischen Arten zusammensetzen. Es liegt nahe, dass die *Eastern Pacific Barrier* nur selten überwunden wurde. Ansonsten bestünde hinsichtlich der Ursprungsgebiete eine größere Heterogenität bei den Verzweigungen der Stammbäume.

4.2.3 *Conus spurius*

Die ältesten Fossilien einer rezenten ost-pazifischen/west-atlantischen Art sind von *C. spurius* bekannt. Fossilien sind von der Atlantikseite Costa Ricas (OLSSON 1922) und der Pazifikseite Panamas beschrieben worden (WOODRING 1970). Aufgrund dieser Funde und der Tatsache, dass *C. spurius* heutzutage auf den westlichen Atlantik beschränkt ist, datierte DUQUE-CARO (1990) die Schließung des Isthmus vor, *C. spurius* steht mit seiner Schwesterart *C. lorenzianus* in sämtlichen Stammbäumen mit bootstrap-Unterstützung isoliert, was eine Aussage über die verwandtschaftlichen Beziehungen bzw. den Ursprung dieser Geschwisterarten nicht ermöglicht. Das errechnete Alter (3,8-7,5 Millionen Jahre) belegt, dass beide Arten bereits seit längerem im westlichen Atlantik beheimatet sind. Mit Veränderung der Lebensbedingungen nach der Isthmus-Schließung ist die pazifische Linie von *C. spurius* ausgestorben. *C. tessulatus* aus der Cortéz-See ist zwar Gehäuse-morphologisch sehr ähnlich, doch kann das Verhältnis dieser Arten zueinander aus den Stammbäumen nicht ermittelt werden. Gleichwohl zeigt das Altersdiagramm, dass *C. spurius* und *C. lorenzianus* nah mit *C. tessulatus*, *C. litteratus* und *C. eburneus* verwandt sind, wobei die Datierung auf Grundlage des zur Verfügung stehenden Materials vage ist. Demnach haben sich diese beiden Äste irgendwann vor 6,6-24,2 Millionen Jahren voneinander abgespalten. Bei *C. spurius* könnte eine sehr zeitige Anpassung an die frühen Bedingungswechsel stattgefunden haben, die mit der Entstehung des Isthmus einhergingen. Nach der Schließung des Isthmus herrschten auf beiden

Seiten Mittelamerikas unterschiedliche Umweltbedingungen, die dazu führten, dass auf beiden Seiten an abweichende Parameter angepasste Organismen ausgestorben sind (O'DEA *et al.* 2007). Die Konkurrenz verschiedener Arten zueinander spielt dabei eine untergeordnete Rolle: Untersuchungen (KOHN 1967, 1968) haben gezeigt, dass unterschiedliche Fressverhalten, Substratheterogenität und unterschiedliche Wassertiefen ausreichen, damit mehrere Arten in derselben geographischen Region bestehen können, ohne in direkter Konkurrenz zu stehen. Dies bestätigt auch das Konkurrenz-Ausschluss-Prinzip von HARDIN (1960), wonach die potentiell limitierenden Umweltressourcen messbar differieren müssen, damit Populationen trophisch-ähnlicher Arten im Gleichgewicht bleiben. Im Hinblick auf die phylogenetische Analyse fällt dabei auf, dass jene Arten, die von NYBAKKEN (1979) an der Westküste Mexikos untersucht wurden und gemeinsam in einem Habitat vorkommen, keine näheren Verwandtschaftsbeziehungen zueinander aufzeigen: Ein weiteres Indiz für die unterschiedlichen Ursprünge der einzelnen Arten. In der Folge könnte eine Spezialisierung auf eine bestimmte Beute erfolgt sein, wobei eine ökologische Nische bei der Ankunft der neuen Art bereits durch eine Eingesessene belegt gewesen wäre. Ein Ausweichen auf eine andere Ressource ist bei einer hoch-spezialisierten Art eher unwahrscheinlich, da mit dem Grad der Anpassung auf eine Bedingung auch die Empfindlichkeit gegenüber Störungen steigt.

4.2.4 Transisthmische Schwesterarten

Die zwei Schwesterarten *C. ermineus* und *C. purpurascens* kommen auf beiden Seiten des Isthmus vor. Der Sequenzunterschied zwischen diesen liegt bei 2,15 % und das errechnete Alter für die Speziation liegt zwischen 3 und 4,5 Millionen Jahren. Durch diese Datierung ist das Aufspaltungsereignis unmittelbar mit der Entstehung des Isthmus korreliert. Die sehr ähnliche Biologie der beiden Arten belegt eine Speziation, die lediglich durch eine räumliche Trennung verursacht wurde (Vikarianz). Das Gleiche trifft auch auf die west-atlantischen Arten *C. villipinii* und *C. simpsoni* im Vergleich zur ost-pazifischen *C. poormani* zu. Der geringe Sequenzunterschied von 1-1,2 % zwischen den transisthmischen Arten lässt sich nur darauf zurückführen, dass es nach dem Wegfall der Austauschmöglichkeit zwischen den beiden Ozeanen zu einer Speziation gekommen ist, da sich auch die west-atlantische Stammart erneut aufgespalten hat. Das Verhältnis von *C. perplexus* und *C. puncticulatus* wird im Abschnitt 4.2.9 diskutiert. Sämtliche dieser Verwandtschaftsverhältnisse entsprechen den von VERMEIJ (1978) postulierten.

4.2.5 Die *Conus gladiator*-Gruppe (HG1c)

Das Verhältnis von *C. mus*, *C. gladiator* und *C. tabidus* (HG1c) zueinander erscheint komplex. Die Speziation von *C. mus* auf der west-atlantischen und *C. gladiator* auf der ost-pazifischen Seite ist ebenfalls durch die Aufwölbung des Isthmus hervorgerufen worden. Hier liegt demnach ebenfalls Artbildung bedingt durch Vikarianz vor. Ob der Ursprung dieser Artengruppe im Indo-Pazifik oder Atlantik liegt ist ungewiss. *C. mus* und *C. gladiator* sollten aufgrund des Sequenzunterschiedes näher mit der ost-atlantischen *C. tabidus*, als miteinander verwandt sein. Eine Erklärung dafür ist, dass diese Art der aus dem Ost-Atlantik eingewanderten Stammart weitestgehend entspricht und *C. mus* und *C. gladiator* im Laufe der Evolution in entgegengesetzte Richtungen divergiert sind. Auf diese Weise hätten sie sich genetisch weiter voneinander, als von der Ursprungsart entfernt. Es bleibt offen, ob *C. tabidus* aus der Karibik zurück in den östlichen Atlantik gewandert ist oder ob die Vorfahren von *C. mus* und *C. gladiator* über den Atlantik migrierten, während sich *C. tabidus* dort ausgebildet hat.

4.2.6 Die südafrikanische Radiation und die *C. tinianus*-Gruppe (HG1d)

Wie von MELAUN *et al.* (2004) vermutet, ist die südafrikanische Art *C. tinianus* am nächsten mit *C. anemone* und *C. compressus* aus Süd- und West- Australien verwandt, was aufgrund der ähnlichen Gehäuse postuliert wurde. Eine ähnliche Beziehung findet sich bei den Cypraeidae der Gattungen *Cypraeovula* und *Barycypraea* aus Südafrika und den australischen *Notocypraea* und *Zoila* (MEYER 2003, 2004). Auch hier bilden die südafrikanischen Vertreter das Schwestertaxon zu den australischen Gattungen, gestützt sowohl durch Gehäuse-Morphologie, als auch molekular-pylogenetische Untersuchungen. In der phylogenetischen Analyse sind mit *Conus natalis*, *C. infrenatus* und *C. gradatulus* weitere endemische südafrikanische Taxa enthalten, die jedoch keine nähere Verwandtschaft zu den Mitgliedern von HG1d aufweisen. Der Sequenzunterschied zwischen *C. tinianus* und *C. infrenatus* beträgt 10,34 %, der zu *C. gradatulus* 7,69 % und zu *C. natalis* 10,03 %. Dagegen beträgt die Distanz von *C. tinianus* zu *C. anemone* 4,52 % bzw. 3,33 %, zu *C. compressus* 3,6 %. Die Sequenz von *C. compressus* stammt aus einer Datenbank. Es ist möglich, dass hier ein Bestimmungsfehler vorliegt, der den niedrigen Sequenzunterschied zu dem einen Individuum von *C. anemone* erklärt, zumal diese Art oft nur als Unterart oder Form von *C. anemone* angesehen wird. Die DNA-Sequenzen der beiden Individuen von *C. anemone* stammen hingegen von eindeutig

identifizierten Exemplaren aus verschiedenen geographischen Gebieten (Abrolhos Isl. in Westaustralien und Tasmanien im Südosten Australiens).

C. tinianus und *C. anemone* besiedeln den gleichen Lebensraum: Kalkstein-Formationen im Watt die mehr oder weniger von Sand umhüllt sind und teilweise bei Ebbe freiliegen (BARTSCH 1915, SEMENIUK *et al.* 1982). Weiterhin sind beide Arten Direktentwickler, deren Veliger sich intrakapsulär entwickeln und als Pediveliger schlüpfen (KILBURN & RIPPEY 1982, KOHN 2003). Dies trifft auch auf die Cypraeidae der Gattungen *Cypraeovula*, *Barycypraea*, *Notocypraea* und *Zoila* zu (LORENZ 2002), die das gleiche geographische Verbreitungs-Phänomen zeigen. Da in beiden Gebieten (innerhalb beider Familien) auch andere Arten bekannt sind, die ebenfalls kein planktonisches Veligerstadium besitzen (LILTVED & MILLARD 1989, COOMANS & FILMER 1985), ist dies als eine konvergente Adaption an ähnliche Habitatbedingungen zu sehen. Aufgrund der geographischen Distanz ist es unwahrscheinlich, dass bereits die Stammart diesen Entwicklungsmodus entwickelt hatte, da es unter diesen Umständen nicht zu solchen Dispersionen kommen kann.

C. anemone und *C. tinianus* haben infolge ihrer Variabilität, in der Vergangenheit für reichlich taxonomische Verwirrung gesorgt, die sich in der langen Synonymieliste beider Arten äußert. Der hohe Sequenzunterschied zwischen den Individuen von *C. anemone* könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich hierbei um einen Artkomplex handelt, der einer genaueren Untersuchung bedarf. Das Gleiche trifft auf *C. tinianus* zu. Auch diese Art ist sowohl in Farbe, Zeichnung, als auch Form sehr variabel. Die Cypraeidae-Gattung *Barycypraea* ist aus Südafrika und dem Oman bekannt und stellt die nächste Verwandte der australischen Gattung *Zoila* dar (MEYER 2003). Analog dazu gibt es mit *C. ardisiaceus* und *C. cuvieri* zwei omanische Kegelschnecken-Arten die anhand ihrer Gehäuse-Morphologie und Zeichnung *C. tinianus* und *C. anemone* nahe stehen. Zukünftige molekular-phylogenetische Analysen werden zeigen, ob auch hier das gleiche Ausbreitungsmuster wie bei den Cypraeidae vorliegt.

Die Herkunft von *C. infrenatus* und *C. gradatulus* bleibt unklar, obgleich sie aus derselben Stammart hervorgegangen sind. Während *C. infrenatus* vorwiegend in Wassertiefen zwischen 10-40 m beheimatet ist, stellt *C. gradatulus* eine reine Tiefwasserart aus 100-250 m dar. Anhand dieser beiden Schwesterarten kann man die adaptive Anpassung der Gehäuse an unterschiedliche Lebensräume erkennen. Das Gehäuse von *C. infrenatus* ist breit, solide mit flacher Spira, das Gehäuse von *C. gradatulus* ist hingegen dünnchalig, länglicher, mit spitz ausgezogener Spira (Abb. 2.1). Ein weiterer Beleg warum die Gehäusesilhouetten zur Einteilung von Arten ungeeignet sind.

4.2.7 Amphinomidae als Nahrung-Die *C. cedonulli*-Gruppe (HG1e)

Eine sehr wichtige Rolle bei der Besiedelung neuer Gebiete und der Entstehung neuer Arten spielt die Verfügbarkeit der benötigten Nahrung. KOHN & ORIAN (1962) konnten in ihrer Untersuchung zweier vermivorer Generalisten vor Hawaii zeigen, dass sich *C. ebraeus* dort fast ausschließlich vom Polychaeten *Perinereis helleri* ernährt, während *C. chaldeus* im gleichen Biotop vornehmlich die verwandte Art *Platynereis dumerilii* erbeutet. Andere vermivore Arten haben sich auf Amphinomidae (*Fire worms*) spezialisiert, Polychaeten die lange hohle Borsten (Setae) besitzen, welche bei Berührung leicht abbrechen. Diese Tiere werden von den meisten Räufern inkl. den meisten Conidae, verschmäht und stellen eine selten genutzte Nahrungsressource dar.

Von *C. imperialis*, *C. brunneus* und *C. bartschi* weiß man, dass sie auf Amphinomidae angepasste Nahrungsspezialisten sind, deren Radulae stark von denen anderer vermivorer Conidae abweichen. Ebenso wie die Radula von *C. cedonulli*, von dem ebenfalls bekannt ist, dass Amphinomidae zumindest zu seinem erweiterten Beutespektrum gehören (NYBAKKEN, 1970a, KOHN *et al.* 1972, ROLÁN 1993, KOHN & HUNTER 2001).

Die beiden ostpazifischen *C. brunneus* und *C. bartschi* sind Schwesterarten, die in Anlehnung an die Maximum Parsimony Majority Rule Stammbäume, am engsten mit *C. imperialis* aus dem Indo-Pazifik Art, verwandt sind. Diese drei Taxa stellen dabei die Schwestergruppe zu *C. cedonulli*, *C. granarius* und *C. archon* dar, zwei westatlantischen und einer ostpazifischen Art. Von *C. granarius* ist die Nahrungspräferenz unbekannt, *C. archon* besitzt den gleichen Radula-Typ wie *C. imperialis* und *C. brunneus* (NYBAKKEN 1970a, DUDA *et al.* 2001) was auf denselben Beutetyp (Amphinomidae) schließen lässt. Das aufgrund der molekularen Phylogenie rekonstruierte Verwandtschaftsverhältnis all dieser Arten deutet auf eine nahe Verwandtschaft aller auf Amphinomidae spezialisierten Conidae hin, die den West-Atlantik, den Ost-Pazifik und den Indo-Pazifik besiedeln. Bei dieser Gruppe findet sich ein Gegensatz zu DUDA & KOHN (2005), die *C. imperialis* in der verwandtschaftlichen Nähe von *C. archon*, jedoch nicht von *C. brunneus* und *C. bartschi* sehen. Die molekulare Datierung sagt lediglich aus, dass es zu einer Zweiteilung der Gruppe vor 6,3-31 Millionen Jahren gekommen ist. *C. archon*, *C. cedonulli* und *C. granarius* sind aus einem Ast hervorgegangen, *C. imperialis*, *C. brunneus* und *C. bartschi* aus dem zweiten. Die Abspaltung von *C. imperialis* von *C. bartschi* und *C. brunneus* ist mit 7-29,7 Millionen Jahren auf die Zeit vor der Entstehung des Isthmus datiert. *C. archon* hat sich vor 5,1-15 Millionen Jahren von seinen beiden westatlantischen Schwesterarten abgespalten (Sequenzunterschied 5,8-6,8 %). Die

Speziationsereignisse von *C. cedonulli* und *C. granarius* im West-Atlantik, sowie von *C. bartschi* und *C. brunneus* auf ost-pazifischer Seite erfolgten den errechneten Altern nach, erst nach der Schließung der Meerenge. Basal zu HG1e steht die *C. chaldeus*-Gruppe (HG1b) was darauf hindeutet, dass die abgeleiteten, auf Amphinomidae spezialisierten Taxa ursprünglich aus dem Indo-Pazifik stammen und eine Migration ostwärts, in Richtung der amerikanischen Kontinente, durchlaufen haben. In der Folge ist es dort zur Ausbildung neuer Arten gekommen. Zu welchem Zeitpunkt die Nahrungsspezialisierung stattgefunden hat ist unbekannt. Denkbar ist, dass *C. imperialis* sich bereits im Indo-Pazifik von den übrigen Arten abgespalten hat. Eine andere Möglichkeit ist eine sekundäre rückläufige Migration der Vorfahren dieser Art. Mit *C. zonatus* wird ein weiterer rezenter Amphinomidae-Jäger anhand von Gehäuse- sowie Radula-Morphologie in die nähere Verwandtschaft von *C. imperialis* gestellt, wobei anzumerken ist, dass *C. zonatus* auf ein relativ begrenztes Gebiet im Indischen Ozean beschränkt ist.

Aus dem Atlantik ist mit *C. regius* eine weitere Art bekannt, die an diese Nahrung adaptiert ist. Von DUDA *et al.* 2001 wird er in die unmittelbare Verwandtschaft von *C. brunneus* und *C. imperialis* gestellt. Sollten sich die Gehäuse- und Radula-morphologischen Klassifizierungen bestätigen, stellen die Amphinomidae-Jäger ein hochspezialisiertes Monophylum innerhalb der Conidae dar.

Die größte Artenfülle dieser Gruppe findet sich im West-Atlantik/Ost-Pazifik, was dafür spricht, dass Amphinomidae als Beutetiere zu nutzen eine evolutive Neuheit darstellt, sich also erst dort ausgebildet hat. Ansonsten sollten auch innerhalb der *C. chaldeus*-Gruppe Arten existieren, die auf diese Beute spezialisiert sind. Die größte Artenfülle der Amphinomidae-Fresser findet sich im West-Atlantik/Ost-Pazifik, ein Indiz, dass die Besetzung dieser ökologischen Nische im frühen West-Atlantik/Ost-Pazifik besonders erfolgreich war.

Dass diese Nahrungsquelle im Indo-Pazifik kaum genutzt wird, kann die Ursache sein, dass *C. imperialis* hier offensichtlich radiert, was durch Sequenzunterschiede von bis zu 4,92% bei Individuen der gleichen Inselgruppe (MELAUN 2003, KAUFERSTEIN *et al.* 2005) sowie einer großen Gehäuse-morphologischen Variabilität belegt ist, die zur Benennung von zahlreichen Lokalformen (z.B. *C. queckettii*, *C. dautzenbergi*, *C. fuscatus*) geführt hat.

Diese mögliche Ausbreitung von *C. imperialis* und *C. memiae* (siehe 4.2.10) über die *Eastern Pacific Barrier* hinweg, wären die erste für Mollusken beschriebene Migration, von Osten nach Westen in den Indo-Pazifik.

4.2.8 Molluscivore Conidae -Die *C. textile*- (HG1f), *C. pennaceus*- (HG1g) und *C. marmoreus*-Gruppe (HG1h)

Eine andere Gruppe von Nahrungsspezialisten stellen die molluscivoren Arten dar, zu denen auch die *C. marmoreus*-Gruppe gehört. In den Maximum Parsimony Majority Rule Stammbäumen erscheint auch diese Gruppe als ein Monophylum, was belegt, dass sich analog zu den Amphinomidae-Spezialisten diese Adaption evolutionär nur einmal entwickelt hat. Bis auf zwei Vertreter sind alle molluscivoren Arten im Indo-Pazifik beheimatet. *C. natalis* ist endemisch vor der Küste Südafrikas und *C. dalli* ist die einzige ost-pazifische Art. Während die genaue Stellung von *C. natalis* innerhalb der Klade unklar ist, bildet *C. dalli* stets mit ihrer Schwesterart *C. canonicus* eine Gruppe mit *C. ammiralis* und *C. textile*. Als relativ junge Art (2,2-2,5 Millionen Jahre), die erst nach der Schließung des Isthmus entstanden ist, muss auch bei *C. dalli* (analog zu *C. nux*) ein Migrationsereignis aus dem Indo-Pazifik nach Osten über die *Eastern Pacific Barrier* an die Westküste Amerikas stattgefunden haben.

Die molluscivore Gruppe kann man in zwei Haupt-Kladen, die *C. marmoreus*-Gruppe (HG1h), und die *C. textile*-Gruppe (HG1f) unterteilen. Von (HG1f) spaltet sich weiterhin die *C. pennaceus*-Gruppe ab (HG1g). *C. pennaceus* dringt östlich bis nach Hawaii und westlich bis Mosambik und in das Rote Meer vor, wo sie jeweils morphologisch unterschiedliche Gehäuse-Typen entwickelt hat. Obwohl es sich bei *C. pennaceus* um eine Art mit intrakapsulärer Entwicklung handelt (DUDA & PALUMBI 1999a), kann die Besiedelung dieses riesigen Gebietes anhand der Meeresströmungen erklärt werden. An der afrikanischen Ostküste verläuft vom Äquator der Mosambik-Strom Richtung Süden, wo er an der Südküste Madagaskars zusammen mit dem Ost Madagaskar-Strom in den Agulhas-Strom mündet und westlich weiter fließt (BRIGGS 1974). Von Cypraeidae der Gattung *Zoila* ist bekannt, dass sie ihre Eikapseln auf Schwämme kleben (LORENZ 2001). Durch Absetzen der Gelege an Substratstücken, die von der Strömung mitgetragen werden, ist es auch Arten mit intrakapsulärer Entwicklung möglich große Gebiete zu besiedeln. dieser Schwämme besiedeln die Tiere ein riesiges Gebiet entlang der australischen Küste.

Innerhalb von HG1f und HG1g reichen die errechneten Zeiten für die Artspeziation von 2,2-21,2 Millionen Jahre mit einem Sequenzunterschied von 1,2-8,37 %. Verglichen zu HG1h liegen Sequenzunterschiede von 5,76 %-8,89 % vor. Innerhalb beider Gruppen gibt es ähnlich hohe Sequenzunterschiede, die denen zu den Mitgliedern von HG1h entsprechen. Da die Arten von HG1f und HG1g zahlreiche Lokalformen ausgebildet haben, ist zu überprüfen, ob die Gruppen weitere, bisher nicht anerkannte Arten beinhalten. Der Entwicklungsmodus kann hier

einen Einfluß auf die stärker strukturierten Populationen haben, da der Genfluss über größere Distanzen erschwert wird.

NISHI & KOHN (1999) konnten anhand von Studien der Radulae diese Unterteilung in HG1f, HG1g und HG1h bestätigen. Der an die molluscivore Ernährung adaptierte Radula-Typ ist bei den Mitgliedern der jeweiligen Gruppen in unterschiedlichem Maße abgewandelt. Anhand der molekularphylogenetischen Daten von HG1h ist ersichtlich, dass *C. bandanus* am nächsten mit *C. nigrescens* und *C. nocturnus* verwandt ist, während *C. vidua* die Schwesterart von *C. marmoreus* ist. Auf morphologischen Daten basierend wird *C. vidua* als Unterart von *C. bandanus* betrachtet. Hier ist ersichtlich, dass eine sehr ähnliche Zeichnung nicht immer Aussagen über die tatsächlichen verwandtschaftlichen Beziehungen zulässt. *C. vidua* und *C. bandanus* sind als eigenständige Arten anzusprechen.

Die sehr ähnliche Zeichnung könnte aufgrund einer konvergenten Entwicklung entstanden sein. Wahrscheinlicher ist, dass sie das plesiomorphe Merkmal von HG1h darstellt, welches bei *C. vidua* und *C. bandanus* weniger stark abgewandelt wurde als bei den übrigen drei Arten.

4.2.9 Piscivore Conidae

Im Gegensatz zu den beiden zuvor erwähnten Gruppen von abgeleiteten Nahrungsspezialisten (siehe 4.2.7 und 4.2.8) sind die piscivoren Conidae keine monophyletische Gruppe. Das west-atlantische/ost-pazifische Schwesterartenpaar *C. ermineus* und *C. purpurascens* stehen in sämtlichen Stammbäumen isoliert, ebenso *C. geographus* und *C. obscurus* aus dem Indo-Pazifik. Beide Arten zeigen in den Stammbäumen auch keine nähere Verwandtschaft zu der *C. magus*-Gruppe (HG1i), lediglich im Altersdiagramm werden sie in deren Nähe eingeordnet. HG1i setzt sich in den Maximum Parsimony Analysen aus den Arten *C. magus*, *C. aurisiacus*, *C. bullatus*, *C. carinatus*, *C. circumcisis*, *C. striatus* und *C. catus* zusammen, die zueinander bei den p-Distanzen einen Sequenzunterschied von 0,72-9,39 % zeigen, zu *C. geographus* 7,95-9,86 % und zu *C. obscurus* 8,21-10,06 %. Auch die Sequenzunterschiede von *C. ermineus* und *C. purpurascens* (6,99-9,85 %) zu den anderen piscivoren Arten zeigen keine nähere Verwandtschaft, was auch von früheren Untersuchungen bestätigt wird (DUDA & PALUMBI 2003, KAUFERSTEIN *et al.* 2005). Die voneinander abweichende Zeichnung (Abb. 3.37) unterstreicht dieses Ergebnis.

Wie zuvor *C. imperialis* stellt auch *C. magus* einen Artkomplex dar, der sich in extremer Variabilität und einem Sequenzunterschied von 0,72 % zu *C. carinatus* äußert, der von manchen Autoren nur als Unterart oder Lokalform angesehen wird. Laut Altersdiagramm

haben sich diese Arten bereits vor 1,5-1,7 Millionen Jahren voneinander abgespalten. Die konstante Zeichnung von *C. carinatus* (Abbildung 3.38) bekräftigt die molekularphylogenetischen Ergebnisse.

Der piscivore Ernährungstyp hat sich zwei oder drei Mal im Laufe der Evolution entwickelt. Mit der *hook-and-line* (*C. magus*) und der Netzfangstrategie (*C. geographus*) haben sich zwei verschiedene Fangstrategien ausgebildet, die eine unterschiedliche Anatomie des Tierkörpers wie auch Wirkweise der Toxine erfordern. Dies bestätigt die molekularphylogenetischen Befunde, dass sich der piscivore Ernährungstyp im Indo-Pazifik mehrmals ausgebildet hat.

4.2.10 Die basale Gruppe der Conidae (HG2)

Ein weiteres transisthmisches Schwesterartenpaar sind *C. perplexus* und *C. puncticulatus*. Aufgrund der errechneten Divergenzzeit ergibt sich, dass auch sie vor 4,6-11 Millionen Jahren beim Auftreten der veränderten Meeresbedingungen durch die allmähliche Aufwölbung des Isthmus aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen sind. Der Sequenzunterschied zwischen den Mitgliedern von HG2 und HG1 liegt bei 12,9 %-29,48 %. Das ist ein Beweis dafür, dass sich diese Gruppe vor längerer Zeit von den übrigen Arten der Gattung abgespalten hat. Die Distanzen zwischen den Mitgliedern von HG2 sind mit 2,48 % bis 18,28 % sehr inhomogen und deuten an, dass manche der Speziationereignisse weit auseinander liegen. Demnach kam es sowohl zu weit zurückliegenden als auch jungen Artaufspaltungen. Die errechnete molekulare Divergenz gibt jedoch selbst für die „jungen Arten“ stets Altersdaten an, die auf die Zeit vor der Aufwölbung des Isthmus datieren. Offensichtlich fand bei diesen Arten schon vor dessen Schließung kein Genfluss zwischen Ost-Pazifik und West-Atlantik mehr statt, da beide Aufspaltungen die Dispersionsbewegungen zwischen dem Pazifik und Atlantik unterstützen, auf 4-12,7 Millionen Jahre datiert werden. Sowohl die rein ost-pazifische Aufspaltung von *C. mahogani* und *C. ximenes* (3,2-5,5 Millionen Jahre) ist jüngeren Datums, als auch die Artaufspaltung innerhalb des westlichen Atlantiks. *C. memiae* scheint in diesem Gebiet seinen Ursprung gehabt zu haben und hat sich nach Westen in den Indo-Pazifik ausgebreitet. Da die meisten frühen Fossilien aus größeren Tiefen beschrieben wurden, und auch *C. memiae* diese Lebensweise zeigt, ist anzunehmen, dass die Vorfahren von HG2 ursprünglich ebenfalls in der Tiefsee beheimatet waren (MELAUN & DORRESTEIJN 2007). Auch das dünne Gehäuse und die langausgezogene Spira bei den frühen Fossilien sind ein Indiz dafür, da diese Merkmale auch bei rezenten Tiefsee-Arten auftreten.

Aus dem Eozän sind weniger fossile Conidae beschrieben als aus dem Miozän oder Pliozän. Da HG2 jedoch von diesen alten Arten abzustammen scheint, wäre das eine Erklärung für die geringere Artenzahl dieser Gruppe. Zu dem Zeitpunkt als HG2 sich herausgebildet hat, kam es nicht zu einer vergleichbaren Artenexplosion wie bei der Ausbildung von HG1.

Untersuchungen an den Radulae geben die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der basalen Conidae teilweise wieder (NYBAKKEN 1970b). *C. ximenes* und *C. mahogani*, transisthmische Schwesterarten unterscheiden sich kaum, haben aber sehr ähnliche Radulae entwickelt. *C. ximenes* ist anhand von Gehäusemerkmalen und Färbung weiterhin kaum von *C. perplexus* zu unterscheiden (WOLFSON 1962), wohingegen die Radulae sich nicht ähneln. Die große Ähnlichkeit der Radula von *C. perplexus* zu der von *C. lucidus* suggeriert eine nahe Verwandtschaft, obgleich sich die Gehäuse stark unterscheiden. Die in der Analyse von DUDA & KOHN (2005) in dieser Gruppe enthaltene *C. tornatus* hat ebenfalls einen sehr ungewöhnlichen Radula-Typ. Unter Berücksichtigung der Radula-Morphologie sind *C. lucidus* und *C. tornatus* aller Voraussicht nach in HG2 einzuordnen.

4.2.11 Die Sonderstellung von *Conus californicus*

Die genaue taxonomische Stellung von *C. californicus* zu den übrigen Mitgliedern von HG2 ist wegen des großen Sequenzunterschiedes (10,82-18,28 %) unklar. Weiterhin bildet diese Art mit Maximum Likelihood- und Neighbor joining-Methoden eine dritte monotypische Gruppe. Das spricht für einen vergleichsweise geringen Verwandtschaftsgrad mit den restlichen Conidae. Die Radula unterscheidet sich sehr stark von der sämtlicher anderer Kegelschnecken (PEILE 1939, KOHN *et al.* 1999). *C. californicus* ist die Art der Familie mit dem umfassendsten Beutespektrum, welches aus Würmern, Mollusken, Fischen und sogar Aas besteht (SAUNDERS & WOLFSON 1962, KOHN 1966). Es ist die einzige Kegelschnecke die in gemäßigten Gewässern vorkommt (San Francisco Bay bis Cabo San Lukas), wo keine congenerische Konkurrenz auftritt. Beim Fischfang zeigt er sowohl die *hook-and-line* als auch die Netzfangstrategie. Vergleiche mit anderen Arten wie z.B. *C. purpurascens* und *C. geographus* zeigen, dass keine von beiden genannten Strategien so differenziert worden ist wie es bei den spezialisierten Arten der Fall ist. Den rein piscivoren Arten reicht ein Treffer um einen Fisch zu lähmen, während *C. californicus* einen Fisch mehrmals harpunieren muss, bevor er ihn verschlingen kann (STEWART & GILLY 2005). Das Gift befindet sich bei dieser Art in kleinen Kapseln direkt im Zahn. Ein Phänomen, welches bisher bei keiner anderen Art beschrieben worden ist. (MARSHALL *et al.* 2002). Diese Aspekte belegen, dass es sich bei

C. californicus um eine archaische Art handelt, die u.U. sogar von der Gattung abgespalten werden muss. Auch hinsichtlich der taxonomischen Stellung von HG2 müssen zukünftige molekular-phylogenetische Analysen mit weiteren genetischen Markern sowie morphologische Untersuchungen (nicht ausschließlich der Gehäuse) zeigen, ob die Gattung *Conus* in getrennte monophyletische Einheiten unterteilt werden kann.

4.2.12 Zeichnung und Gehäusecharakteristika

Die tent-mark Zeichnung ist ein Charakteristikum der molluscivoren Kegelschnecken-Arten. Nur diese Gruppe besitzt solch ein klar definiertes tent-mark Muster. Ähnliche Zeichnungsvarianten sind auch bei anderen Gruppen zu finden, wirken aber stets verschwommen und unsauber und sind aller Wahrscheinlichkeit nach konvergent. Die physiologischen Mechanismen, die der Bildung von Netzmustern (tent-mark Zeichnung) zugrunde liegen sind relativ einfach und können mehrfach entstanden sein (MEYNHARDT 2003). Bei den anderen Arten bilden diese Zeichnungselemente lediglich Zusatzmuster zu einer anders gearteten Grundlage. Bei den molluscivoren Conidae ist hingegen das klassische tent-mark Muster das hervorstechendste Merkmal der gesamten Zeichnung, bzw. sie besteht wie bei der *C. marmoreus*-Gruppe nur aus tent-marks in verschiedenen Ausprägungsvarianten. Ein Beleg dafür, dass die Stammart, aus der sich die molluscivoren Arten entwickelt haben, bereits dieses Muster entwickelt hatte und es bei den Nachfahren in verschiedenen Abwandlungen beibehalten wurde.

Generell kann die Zeichnung als konstantestes Merkmal der verschiedenen Kegelschneckengruppen angesehen werden. Jede der in den Stammbäumen dargestellten Kladen ist durch ein bestimmtes Zeichnungsmuster, bestehend aus Bändern, Linien, Punkten, Flecken etc. charakterisierbar. Wenn auch in Einzelfällen abgewandelt, zeigen sämtliche Mitglieder einer Klade stets dasselbe Grundmotiv, obwohl durch die Zeichnung kaum ein selektiver Vorteil ersichtlich ist: Bei vielen Arten ist sie bereits durch das Periostracum unkenntlich. Weiterhin ist das Gehäuse bei den meisten Individuen von Algenbewuchs bedeckt. Die Zeichnung stellt somit ein apomorphes Merkmal einer Artengruppe dar, beispielsweise besitzen die Mitglieder der *C. vexillum*-Gruppe (HG1j) ein zentrales Band mit wenigen weiteren Zeichnungselementen (siehe Abbildung 3.33). Alle Mitglieder der *C. virgo*-Gruppe (HG1k) besitzen eine bläulich-violett gefärbte Basis, die sich stark vom restlichen hellen, fast zeichnungslosen Gehäuse abhebt. Allen gemeinsam ist ein helles Band in der Gehäusemitte, das z.T. fast den gleichen Farbton aufweist wie die Grundfärbung (Abbildung

3.32). Die verwandtschaftliche Beziehung dieser Arten zueinander ist bereits frühen Malakologen aufgefallen, wie die Etymologie bei *C. virgo* und *C. frigidus* vermuten lässt. Wie bereits unter 4.2.9 erwähnt unterstreichen bei den piscivoren Kegelschnecken die unterschiedlichen Zeichnungselemente die molekular-phylogenetischen Daten, welche die fischfressenden Arten paraphyletisch darstellen.

Die Färbung hingegen scheint als Anpassung an den Lebensraum oder der Ernährung einer größeren Variabilität zu unterliegen. Das Gleiche trifft auf die Gehäuse-Form zu. Wie bereits erwähnt stellt sie eine Anpassung an den Lebensraum dar und kann selbst innerhalb einer Art variieren. So haben innerhalb der molluscivoren Conidae beispielsweise *C. gloriamaris*, *C. milneedwardsi* und *C. bengalensis* (Abbildung 1.1) eine langgestreckte Gehäuse-Form entwickelt, die bei sämtlichen Conidae aus tieferen Wasserregionen beobachtet werden kann. Die Tatsache, dass diese Gehäuseform bei den meisten frühen Fossilien dieser Gattung auftritt, ist ein weiteres Indiz für die Annahme, dass die Kegelschnecken in tieferen Meeresregionen ihren Ursprung haben.

Sowohl die auf Amphinomidae spezialisierten Conidae, als auch die molluscivoren und piscivoren Arten sind hinsichtlich ihrer Ernährungsweise als abgeleitet zu betrachten. Conidae stammen von vermivoren Vorfahren ab (KANTOR 1990, HARASEWYCH *et al.* 1997). Durch Selektionsdruck erfolgte bei manchen Arten eine Adaptation an andere, bisher ungenutzte Nahrungsressourcen, was zur Folge hatte, dass neue ökologische Nischen besetzt werden konnten. Die Artenvielfalt dieser Gruppen zeigt deren evolutiven Erfolg.

Die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse erweitern die von DUDA & KOHN (2005) gemachten Beobachtungen. Eine detailliertere Aufschlüsselung der Arten in den Stammbäumen würde neue Erkenntnisse bei der Frage nach der Besiedelung des westlichen Atlantischen sowie des östlichen Pazifischen Ozeans liefern. Eine höhere Auflösung könnte über die Wahl längerer Genabschnitte und kombinierten Datensätzen mit mehreren Genen erzielt werden. Durch die verhältnismäßig gute Auflösung scheint die Maximum Parsimony Methode am besten geeignet zu sein. Es wurde bei mehreren phylogenetischen Untersuchungen festgestellt, dass eine positive Korrelation zwischen der Länge des untersuchten Genabschnittes und dem Auflösungsvermögen von Maximum Parsimony Analysen besteht (CUMMINGS *et al.* 1995, HUELSENBECK 1995, KIM 1996, GRAYBEAL 1998, SOLTIS *et al.* 1998, GATESY *et al.* 1999, SPRINGER *et al.* 1999, 2001, QUEIROZ, *et al.* 2002). Bis zu einer gewissen Länge hat dies positive Auswirkungen auf die Auflösung im Stammbaum. Ebenso werden durch die erweiterte Sequenzinformation manche Gruppen besser definiert.

4.2.13 Die Diversität west-atlantischer und ost-pazifischer Conidae im Vergleich

Die Diversität der Conidae variiert stark entlang beider Seiten Amerikas. Während im West-Atlantik ca. 50 Arten beheimatet sind, kommen an der Westküste lediglich 22 Arten vor (DIAZ *et al.* 2005). Das wirkt widersprüchlich zu der Hypothese, dass die durch die Aufwölbung des Isthmus von Panama neu strukturierten ozeanischen Bedingungen zu einem Massensterben von Mollusken geführt haben, das im westlichen Atlantik weitreichender war als im Ost-Pazifik (JACKSON *et al.* 1993, DIETL *et al.* 2004). In der Karibik gibt es eine größere Anzahl besetzbarer ökologischer Nischen, als im Ost-Pazifik, da sie durch ein ausgedehntes Riff-System charakterisiert ist, welches typische tropische Riffmerkmale einschließlich einer hohen Diversität an riffbildenden Korallenarten aufweist (GLYNN, 1973, ROCHA *et al.* 2005).

Im Ost-Pazifik ist die Korallendiversität wesentlich geringer. Zudem behindern die Trübung des Wassers sowie eine flache fluktuierende Sprungschicht das Korallenwachstum. Die Riffe im östlichen Pazifik müssen weiterhin mit den saisonal aufsteigenden kalten und nährstoffreichen Tiefenwassermengen zurecht kommen, die das Wachstum zusätzlich behindern. Die Korallenriffe sind meist klein, isoliert und bestehen aus monotypischen Großkolonien von *Pocillopora* sp. oder *Porites*- bzw. *Pavona*-Kolonien (GLYNN 1977, HALLOCK & SCHLAGER 1986, GLYNN & COLGAN 1992).

Vergleicht man die Länge der Küstenlinie sowie der Inseln und Subprovinzen und bezieht die Wassertemperaturen sowie die Fläche der Riffsysteme mit ein, zeigt sich, dass der Ost-Pazifik eine um einen zweistelligen Faktor kleinere potentielle Besiedelungsfläche für Kegelschnecken bietet als der westliche Atlantik. Die Artenanzahl der Kegelschnecken ist dabei aber nur ungefähr halb so klein. Das bedeutet, dass die Conidae trotz der ungünstigen Bedingungen auch das Gebiet des östlichen Pazifiks sehr erfolgreich besiedelt haben, was dadurch unterstützt wird, dass sich bei Angleichung der Lebensbedingungen im südwestlichen Atlantik die Artenzahlen angleichen (DIAZ 1995). Nach der Schließung des Isthmus von Panama sind neue Arten entstanden und wurden durch rekrutierte indo-pazifische Arten ergänzt, wobei sogar die *Eastern Pacific Barrier* passiert wurde.

Ein großes Problem bei der Betrachtung der Conidae im West-Atlantik/Ost-Pazifik ist das Massensterben im Pliozän (VERMEIJ & PETUCH 1986). Wie erwähnt, beziehen sich alle Aussagen darüber auf die Funde aus den Pinecrest-, Caloosahatchee- und Bernont-Formationen in Florida. Abgesehen von den genannten Formationen liegen jedoch nur wenige Fossil-Funde aus dem Pliozän und Pleistozän sowohl entlang des West-Atlantiks, als auch des Ost-Pazifiks vor. Insofern kann dieses angebliche Massensterben auch auf ein lokales Ereignis, der

Verlandung der Okeechobee-See zurückgeführt werden und wäre damit nicht universell auf das gesamte Gebiet ausweitbar. Die Theorie von ALLMON *et al.* 1993 besagt ebenfalls, dass die Artenzahl zu jener Zeit relativ konstant war und kein Massensterben stattgefunden hat.

4.2.14 Die Problematik mit der Systematik

Die Conidae sind die artenreichste marine Gastropoden-Gattung. Sämtliche Versuche die Gattung aufzuspalten sind bisher gescheitert und die derzeitig verwendeten Untergattungen stellen keine monophyletischen Einheiten dar. Zahlreiche Arten stellen tatsächlich Artkomplexe dar und von vielen anderen Arten sind eine Reihe von Lokalformen beschrieben, allerdings nicht in den Artstatus erhoben worden. Weiterhin werden derzeit Arten anerkannt, deren Beschreibung lediglich auf minimale Abweichungen vom Durchschnitt der Gehäuse-Indices basiert.

Ähnlich verhielt es sich bei den Cypraeidae, die zu den am eingehendsten taxonomisch bearbeiteten Mollusken-Gruppen überhaupt gehören. Dort waren bis in die siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts etliche Gattungen eingeführt und zahllose Arten beschrieben und von Autoren in unterschiedlichem Umfang wieder abgelehnt worden. Erst in den neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts führte eine konsequente morphologische Bearbeitung zur Klärung der Systematik (LORENZ & HUBERT 1993) die mittlerweile molekular-phylogenetisch bestätigt worden ist (MEYER 2003, 2004).

RÖCKEL *et al.* (1995) haben versucht die Taxonomie der indo-pazifischen Conidae zu bearbeiten, sind dabei jedoch inkonsequent vorgegangen, da sie viele zweifelhafte Arten anerkannt haben, während sie bei anderen Arten, lediglich auf die Gehäuse-Indices basierend alle Lokalformen in die Synonymie gestellt haben. Der Artkomplex *C. magus* beispielsweise wurde von den genannten Autoren nicht weiterführend untersucht. Sämtliche Lokalformen, z.B. *C. carinatus* wurden zu *C. magus* gestellt, was dazu führte, dass die für diese Art angegebenen Gehäuse-Indices für fast jede andere Kegelschneckenart zutreffend sind. Ähnlich verhält es sich bei *C. textile* und *C. pennaceus*. Diese Art hat ebenfalls zahlreiche Lokalformen ausgebildet, die von RÖCKEL *et al.* (1995) aber lediglich als Zeichnungsvarianten anerkannt werden, ohne das zu begründen. Alleine von Madagaskar und Mosambik sind mit *C. behelokensis*, *C. corbieri*, *C. tsara*, *C. vezoi*, *C. praelatus*, *C. racemosus* und *C. bazarutensis* sieben verschiedene Lokalformen bekannt (Abb. 3.28), die sich z.T. sehr stark voneinander unterscheiden, von besagten Autoren aber nicht anerkannt werden.

Bei der vorliegenden Analyse konnte nur eine punktuelle Beleuchtung der Arten und Artkomplexe erfolgen. Eine Revision der kompletten Familie war weder durchführbar Ziel der Analyse. Die Familie Conidae muss, auch im Hinblick auf ihre Wichtigkeit in der Toxin-Forschung, taxonomisch gründlich revidiert werden.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass diese Bearbeitung nicht auf geographische Gebiete beschränkt werden sollte und molekulare wie auch Zeichnungs-morphologische Kriterien berücksichtigen muss, da sich diese Aspekte gegenseitig ergänzen.

4.3. Toxinologie

Die Giftzusammensetzung der Kegelschnecken ist sowohl großen inter- als auch intraspezifischen Variationen unterworfen. Diese Hypervariabilität bewirkt, dass jedes Tier ein einzigartiges Toxingemisch in seinem Gift enthält. Aufgrund dieser extremen Variabilität sind die Toxine für phylogenetische Analysen nur bedingt geeignet. Die Toxin-Precursor sind neben der Toxin-Region weiter in Pro- (Signal-) und Pre-Region unterteilt. Dabei sind sowohl die Pro- als auch die Pre-Region konservierter als die Toxin-Region.

4.3.1 Die A-Superfamilie

Die Toxin-Precursor der A-Superfamilie wurden über einen konservierten Primer der an die Signal-Region bindet erhalten. Dieser Primer hat nicht nur an den α -Conotoxin-Precursor gebunden, sondern ebenfalls an die Signal-Region einer weiteren Toxin-Klasse innerhalb der A-Superfamilie, den α A- bzw den κ A-Conotoxinen. Diese Toxine sind in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich und besitzen auch das gleiche Cystein-Motiv unterscheiden sich jedoch durch ihren physiologischen Bindungsort, sowie der Anzahl der Aminosäuren, die innerhalb des Cystein-Motivs liegen.

4.3.1.1 α A-Conotoxin

Aus *C. purpurascens* konnte ein neues Toxin (Pur1A) isoliert werden. Dabei handelt es sich aufgrund des Cystein-Motives und der Aminosäurereste eindeutig um ein α A-Conotoxin. Es zeigt jedoch keinerlei Ähnlichkeiten zu dem einzigen aus dieser Art bisher bekannten Toxin α A-PIVA. Ebenfalls liegt keine Ähnlichkeit zu dem fast identischen Toxin der Schwesterart *C. ermineus*, α A-EIVA vor (HOPKINS *et al.* 1995, JACOBSEN *et al.* 1997).

Bei α A-PIVA und α A-EIVA ist das Cystein-Motiv des Toxins $XCC(X_7)C(X_2)C(X_1)C(X_7)C$, während Pur1A das Muster $XCC(X_6)C(X_2)C(X_1)C(X_3)C$ aufweist. Das Muster von Pur1A entspricht exakt dem von α A-OIVA und α A-OIVAB aus *C. obscurus*, einer indo-pazifischen piscivoren Art. Von diesen Toxinen unterscheidet es sich stark hinsichtlich der Kettenlänge nach dem Cys⁶ am C-Terminus. Diese Aminosäure-Seitenkette ist an dieser Position die längste aller bekannten α A-Conotoxine. Aufgrund dieser speziellen Seitenkette ist eine genauere Zuordnung nicht einwandfrei möglich. Allerdings ist weder von α A-OIVA noch von α A-OIVB der Precursor bekannt, weswegen er nicht mit dem von Pur1A verglichen werden kann. Es ist möglich, dass auch hier am C-Terminus eine lange Kette ansetzt, die beim reifen Toxin enzymatisch abgespalten wird. Dieses Phänomen ist bisher für kein Toxin der A-Superfamilie nachgewiesen worden, durch die vielen Besonderheiten von α A-OIVA und α A-OIVB, jedoch möglich. α A-OIVA und α A-OIVB sind die einzigen bisher bekannten Conotoxine die an humane fötale nikotinerge ACh-Rezeptoren binden. Die Affinität für diesen Rezeptortyp ist um den Faktor 1800 höher als zu dem entsprechenden adulten Typus (TEICHERT *et al.* 2005b). Hierbei handelt es sich evtl. um eine Anpassung an die Erbeutung von Jungfischen. Beim Kugelfisch (*Fugu rubripes*) ist beispielsweise bekannt, dass Homologe von humanen nikotinergen ACh-Rezeptoren in Muskeln und den Kiemen exprimiert werden (JONES *et al.* 2003).

Fötale nikotinerge ACh-Rezeptoren werden in Rhabdomyosarkomen exprimiert. In diesen speziellen kindlichen Tumoren werden anstelle der adulten ACh-Rezeptoren die fötalen gebildet, was die Unterscheidung von anderen Tumoren ermöglicht. Die fötalen ACh-Rezeptoren werden auch als mögliche Angriffspunkte zur Behandlung jener Tumore angesehen (GATTENLOEHNER *et al.* 1998, 1999). Zusammen mit α A-OIVA und α A-OIVB könnte Pur1A demnach in Zukunft eine therapeutische Rolle übernehmen.

4.3.1.2 α -Conotoxine

Bei den α -Conotoxinen handelt es sich um sehr verbreitete, kurze (12-16 Aminosäuren) Toxine. Bisher wurde eine große Anzahl aus vermivoren, molluscivoren sowie piscivoren Arten isoliert. In Anlehnung an die Anzahl der Aminosäurereste zwischen den Cysteinen, werden die α -Conotoxine weiter in α 3/5-, α 4/7-, α 4/4- und α 4/3- Toxine unterteilt. Von den α 4/3-Toxinen sind zwei Isoformen (ImI und ImII) aus dem Gift von *C. imperialis* beschrieben (ELLISON *et al.* 2003, AZAM *et al.* 2005).

Die aus *C. nux* sowie *C. jaspideus* isolierten Toxin-Precursor (Klone jaspideus1-3, nux2; Abb. 3.44) entsprechen von der Anordnung des Cystein-Motivs den α 4/7-Toxinen. Während die Prepro-Region mit 41 Aminosäuren der Länge anderer α -Conotoxine entspricht, ist die Toxinregion mit einer Kettenlänge von mindestens 21 Aminosäuren die Längste aller bisher bekannten Toxine dieser Unterfamilie. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das Arginin an Position 41 des Prepropeptids die Schnittstelle für die Protease darstellt und die Toxinlänge damit 24 Aminosäuren beträgt. Ein enzymatisches Abspalten der C-terminalen Kette ist unwahrscheinlich. Diese Art der Modifikation ist bisher für kein α -Conotoxin-Precursor nachgewiesen worden. Sollten die Toxine sich in weiteren Untersuchungen als α 4/7-Toxine bestätigen, wären die Wirkungsorte/Bindungsstellen voraussichtlich die neuronalen nikotinergen ACh-Rezeptoren (MCINTOSH *et al.* 2002). Allerdings hat sich bei Conotoxinen gezeigt (GRAY *et al.* 1988), dass eine Verlängerung bzw. Verkürzung bestimmter Strukturen eine Veränderung der physiologischen Aktivität nach sich zieht. Wenn sich herausstellt, dass die aus *C. nux* und *C. jaspideus* isolierten Precursor eine andere physiologische Aktivität besitzen, würde das die Benennung einer neuen Toxin-Unterklasse notwendig machen. Physiologische Tests sollten in Zukunft Aufschluss über den Bindungsort dieser Toxine liefern.

Die Toxine der Klone ermineus 3-5 und jaspideus 4 stellen vier weitere Conotoxine der α 4/4-Toxine dar. Diese Gruppe ist bisher nur durch ein einziges Toxin (BuIA) aus *C. bullatus* einer indo-pazifischen piscivoren Art bekannt. Die Toxine zeigen mit 16 Aminosäuren die gleiche Kettenlänge wie BuIA, allerdings sind nur drei davon identisch (Gly₁, Arg₁₅, Arg₁₆). BuIA besitzt eine breite Spezifität bezüglich seiner Bindungsaffinität zu verschiedenen Subtypen nikotinerger ACh-Rezeptoren. Das könnte auch bei den hier beschriebenen Toxinen der Fall sein.

4.3.1.3 Phylogenetische Analyse der A-Superfamilien-Prepropeptide

Bei der phylogenetischen Analyse der A-Superfamilien-Prepropeptide ist aufgrund der Polytomie keine weitreichende Aussage zu der Evolution dieser Peptid-Gruppe möglich. Die Prepropeptid-Sequenzen eines α A- sowie eines κ A-Conotoxins auf eigenen Ästen in die Hauptgruppe des Stammbaumes einsortiert. Auffällig ist jedoch, dass die Ernährungsweise von großer Bedeutung zu sein scheint. Stets sind ausschließlich die Sequenzen von molluscivore oder piscivore Arten in Gruppen zusammengefasst. Im Laufe der Evolution erfolgte eine Anpassung der Toxine an die bevorzugte Beute. Auch die Prepro-Regionen scheinen diese

Entwicklung durchlaufen zu haben. Aufgrund der großen intraspezifischen Variabilität sind die Toxin-Regionen für phylogenetische Studien der Conidae ungeeignet. Die zuvor beschriebenen Sequenzen von *C. jaspideus* stellen die Outgroup dar (die dazu identischen Sequenzen von *C. ermineus* und *C. nux* sind im Datensatz nicht enthalten). Die Unterstützung der Outgroup bedeutet, dass analog zu den anhand von 16S rDNA-Fragmenten berechneten Stammbäumen auch bei den phylogenetischen Rekonstruktionen der α -Conotoxine die Sequenzen von *C. jaspideus* basal zu den übrigen untersuchten Taxa stehen.

Bisher sind im interspezifischen Vergleich zahlreiche funktionell homologe Toxine gefunden worden. Aufgrund der hypervariablen Regionen zwischen den Disulfidbrücken konnten jedoch bislang nur drei Toxine mit identischer Sequenz aus den Giften zwei verschiedener Arten identifiziert werden. Dabei handelt es sich zum einen um zwei Toxine der O-Superfamilie aus *C. vexillum* und *C. virgo*, zum anderen um das Contryphan-R, das von *C. radiatus* und *C. striatus* synthetisiert wird (MELAUN, 2003, KAUFERSTEIN *et al.* 2005, JAKUBOWSKI *et al.* 2005). Mit dem in dieser Arbeit identifizierten identischen Toxin aus *C. jaspideus* und *C. ermineus* bzw. *C. nux* wurde die bekannte Anzahl an interspezifisch identischen Toxinen verdoppelt. Bei den Toxinen der vermivoren *C. nux* und *C. jaspideus* könnte diese Sequenzhomologie auf konvergente Anpassung an eine ähnliche Nahrungsressource, begründet sein. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Arten aus verschiedenen Verbreitungsgebieten (Ostküste Floridas und Westküste Costa Ricas) die gleiche Nahrung bevorzugen, zumal unbekannt ist, ob die Polychaeten-Faunen dieser Gebiete, zumindest in Teilen, übereinstimmen. Die hohe Mutationsrate der Toxinregion und die Länge der sequenzidentischen Precursor von 195 bzw. 210 Nukleotiden sprechen ebenfalls gegen diese Theorie. Aufgrund der unterschiedlichen Nahrungspräferenz von *C. jaspideus* und *C. ermineus* scheidet hier die Möglichkeit der konvergenten Entwicklung aus, da *C. ermineus* eine piscivore Art ist. Eine Hybridisierung dieser Arten ist wegen des extremen Größenunterschieds (*C. jaspideus*, ca. 2 cm; *C. ermineus*, ca. 10 cm) nicht möglich. Ob sie aber zu diesem Zeitpunkt bereits geschlechtsreif sind, ist anzuzweifeln. Zudem sollten die Arten, falls es zu einem phylogenetisch sehr frühen Hybridisierungsereignis gekommen ist, in der auf 16S rRNA basierenden Phylogenie, eine nähere Verwandtschaftsbeziehung zeigen. Die Precursor wurden aus den gleichen Individuen isoliert, die auch für die phylogenetische Stammbaumrekonstruktion verwendet wurden. Tatsächlich zeigt *C. jaspideus* innerhalb des 16S rRNA Fragments einen Sequenzunterschied von 15,76 % zu *C. nux* und von 15,96 % zu *C. ermineus*. Von *C. jaspideus* wurde der 16S rRNA-Abschnitt zweier Individuen untersucht,

diese sind 100 % sequenzidentisch. Die Isoformen der Klone jaspideus 1 und 3 sind in beiden Individuen nachgewiesen worden.

Eine weitere Möglichkeit, die sequenzidentische Toxine in verschiedenen Arten erklären könnte ist ein horizontaler Gentransfer. Vermutlich erfolgte auch bei zwei *Drosophila*-Arten ein horizontaler Gentransfer. Hier fungierte die Milbe *Proctolaelaps regalis* als Vektor, welcher ein transponierbares Element aus einem früheren Wirt in sein Genom inkorporiert hatte. Dieses Transposon wurde dann erneut in das Genom des neuen Wirtes eingebaut. Es ist aber unklar ob DNA Fragmente in der Größe der Conotoxine mittels horizontalen Gentransfers übertragen werden können, da alle bisher beschriebenen Transposons kürzere DNA-Fragmente darstellen. (HOUCK *et al.* 1991). Allerdings sind bisher alle beschriebenen Transposons kleiner als die Conotoxine. Ob ein horizontaler Gentransfer auch mit Fragmenten dieser Größe möglich wäre ist bisher unbekannt.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die sequenzidentischen Toxine ist, dass es sich hierbei um eine Art von Toxin-Prototypen handelt, die bereits seit Jahrmillionen im Genom vorhanden sind. Das erklärt auch weswegen die Toxine sowohl bei einem sehr basalen west-atlantischen Vertreter und zwei Arten ohne nähere Verwandtschaft zueinander zu finden sind. Das ist ein kongruentes Ergebnis, das sowohl die basale Stellung von *C. jaspideus* und den plesiomorphen Zustand dieses Precursors zeigt. Das wird auch durch die basale Stellung dieser Toxine innerhalb der α -Conotoxine verdeutlicht. Die Evolution der Toxingene beruht auf Genduplikationen (DUDA & PALUMBI 1999b). Bei diesen Prototypen könnte es sein, dass die Gene nach einer Duplikation nicht weiter mutieren und unverändert im Genom verbleiben, während die Hypermutagenität hauptsächlich die übrigen Toxingene betroffen hat. Von *C. ermineus* ist bekannt, dass diese Toxine exprimiert werden (MARÍ pers. Mitteilung), was bedeutet, dass die Gene zumindest bei dieser Art noch aktiv sind. Eine Phylum-übergreifende Aktivität ist bei Conotoxinen bereits beschrieben worden (CRUZ *et al.* 1992), beispielsweise verursacht das Gift von *C. striatus* in Wirbeltieren eine Depolarisation zentraler Neuronen und verringert auf die Weise deren spontane Impuls-Aktivität (ENDEAN *et al.* 1976, HAHIN *et al.* 1981). Die gleichen Effekte treten auch nach einer Injektion des Giftes in *Aplysia californica* auf (CHESNUT *et al.* 1987). Insofern ist es möglich, dass ein bestimmtes Toxin gleichermaßen von Räubern mit unterschiedlichen Nahrungsspezialisierungen genutzt werden kann.

4.3.2 Die F-Superfamilie

Die F-Superfamilie stellt eine neue, bisher unbeschriebene Conotoxin-Superfamilie dar, von der über 5'- und 3' RACE-PCR sieben Precursor inkl. der kompletten Prepro-Region aus *C. villipinii* isoliert werden konnten. Während die Preproregion weitestgehend identisch ist, zeigen die Unterschiede innerhalb der Toxinregion, dass es sich um die Precursor zweier verschiedener Toxine handelt. Diese Toxine besitzen wie die Peptide der L- und der J-Superfamilie das Cystein-Motiv -C-C-C-C-. Bei gleichem Cystein-Motiv weisen die aus *C. planorbis* und *C. ferrugineus* (IMPERIAL *et al.* 2006) isolierten Toxine der J-Superfamilie jedoch eine gänzlich unterschiedliche Preproregion zu denen der F-Superfamilie auf. Das Cystein-Motiv ist im Falle der J-Superfamilie C(X₃)C(X₁₀)C(X₁), während das der F-Superfamilie C(X₃)C(X₁₁)C(X₃) ist. Die Toxinregion der J-Superfamilie ist demnach kürzer. Ein weiterer Unterschied liegt darin begründet, dass die J-Superfamilie Disulfidbrückenbindungen zwischen dem ersten (Cys¹) und dem dritten (Cys³) sowie dem zweiten (Cys²) und dem vierten Cystein (Cys⁴) ausbildet, wohingegen bei der F-Superfamilie Cys¹ und Cys⁴ sowie Cys² und Cys³ miteinander verbunden sind. Auch die Tertiärstruktur der Toxine unterscheidet sich bei diesen beiden Superfamilien. Die Toxine der J-Superfamilie bestehen aus einer α -Helix und zwei β -Faltblättern, die der F-Superfamilie bestehen aus zwei, durch zwei Disulfidbrückenbindungen stabilisierten α -Helices. Das Target der Toxine sind in beiden Fällen K⁺-Kanäle, jedoch binden sie an unterschiedliche Untereinheiten des Kaliumkanals.

Bei den Toxinen der L-Superfamilie sind die beiden, durch die Disulfidbrückenbindungen gebildeten, hinteren Loops kürzer als innerhalb der F-Superfamilie (C(X₃)C(X₈)C(X₂)). Außerdem entspricht die Ausbildung der Disulfidbrückenbindungen der Toxine der L-Superfamilie denen der J-Superfamilie. Desweiteren konnte gezeigt werden das Toxine der L-Superfamilie ab einer bestimmten Konzentration an nikotinerge ACh-Rezeptoren binden (PENG *et al.* 2006).

4.3.3 Die I-Superfamilie

Die Toxine der I-Superfamilie werden anhand der Signalregionen und dem Ort ihrer physiologischen Aktivität in die Gruppen I₁ und I₂ unterteilt. Bei Toxinen der I₁ Gruppe werden weiterhin die Untergruppen A und B unterschieden. Diese Unterteilung beruht darauf, ob im Toxin die isomerisierte Form einer L-Aminosäure vorliegt.

Der Precursor, der aus *C. regius* isoliert werden konnte, entspricht aufgrund der Signalregion den Toxinen der I₂-Familie. Zusätzlich zeichnet sich der Precursor durch einen Bereich aus 17 Aminosäuren am C-Terminus aus, der komplett oder zumindest teilweise bei der Aktivierung enzymatisch abgespalten wird.

Dieses Toxin entspricht mit seinem C(X₇)C(X₅)CC(X₃)CC(X₃)C(X₃)-Muster allerdings nicht den bisher bekannten Toxinen der I₂-Gruppe, da der Bereich zwischen Cys¹ und Cys² mit sieben Aminosäureresten länger ist, als bei jedem anderen bekannten Conotoxin der I-Superfamilie. Es zeigt auch keinerlei Sequenzhomologie mit den Toxinen von *C. imperialis*. Bei dieser Art dürfte es sich aufgrund vorheriger Studien und der vorliegenden Nahrungspräferenz auf Amphinomidae um einen nahen Verwandten von *C. regius* handeln (siehe Abschnitt 4.2.7). Da Gifte häufig an spezifische Beuteorganismen adaptiert sind, könnte die fehlende Sequenzhomologie der Toxine dieser Arten darin begründet sein, dass *C. imperialis* an die Amphinomidae des Indo-Pazifiks angepasst ist, während *C. regius* an die Polychaeten Arten des West-Atlantiks angepasst ist. Die K⁺-Kanäle der Amphinomidae dieser beiden Gebiete könnten sich im Evolutionsverlauf unterschiedlich entwickelt haben, weswegen auch die daran angreifenden Toxine eine andere Struktur aufweisen. Auch das von BRAGA *et al.* (2005) isolierte I₁-Conotoxin aus *C. regius* weist größere Unterschiede zu denen der indo-pazifischen Arten auf, was ein Indiz für diese Theorie ist. Es wäre von Interesse nach Conotoxinen in den nahe verwandten ost-pazifischen Arten *C. archon*, *C. bartschi* und *C. brunneus* sowie den westatlantischen *C. cedonulli* und *C. granarius* zu suchen, um zu überprüfen, ob sie eine höhere Übereinstimmung mit den Toxinen von *C. regius* aufweisen. Hierbei könnte sich zeigen, dass sich die I-Superfamilie im westlichen Atlantik/östlichen Pazifik anders weiterentwickelt als im Indo-Pazifik.

Abschließend ist zu sagen, dass derzeit noch relativ wenig über diese Toxin-Superfamilie bekannt ist und das Wissen ständig erweitert wird. So wurde von BUCZEK *et al.* (2008) die Gruppe B der I₁-Familie mit Toxinen ergänzt, deren Sequenzen zuvor nur aus der Gruppe A bekannt waren.

Da keine Isomerisation nachgewiesen werden konnte, müssen diese Toxine in die Gruppe B eingeordnet werden. Dies zeigt, dass das Potential an neuen Toxinen bei weitem nicht erschöpft ist und die Diversität der verschiedenen Toxine ständig und stetig steigt.

4.3.4 vil1293

Bei vil1293 handelt es sich um ein kurzes Oligopeptid aus dem Gift von *C. villipinii*, dessen Zuordnung schwierig ist. Es sind zahlreiche Oligopeptide aus Kegelschnecken-Giften isoliert worden, die allesamt Unterschiede zu vil1293 aufzeigen. Conantokine besitzen eine Kettenlänge von 17-21 Aminosäuren und sind damit z.T. doppelt so lang wie vil1293 (DAI *et al.* 2007). Die Preproregion zeigt weiterhin keine Homologien zu der von Conantokin-G auf. Aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung und der Stellung der Cysteine kann es nicht zu den Conantokinen gezählt werden (BANYOPADHYAY *et al.* 1997). Contryphane sind 7-9 Aminosäuren lange Oligopeptide, die bisher in indo-pazifischen molluscivoren und piscivoren Arten gefunden wurden, sowie in *C. ventricosus*, einer vermivoren Art aus dem Mittelmeer ([MASSILIA *et al.* 2001, 2003]) Im Gegensatz zu der Meinung dieser Autoren handelt es sich bei Contryphan-Vn jedoch nicht um das erste charakterisierte Peptid aus dem Gift einer vermivoren *Conus*-Art, da die Conotoxine ebenfalls Peptide sind und selbst Peptide ohne charakteristisches Cystein-Motiv bereits 1984 aus vermivoren Arten beschrieben wurden (MCINTOSH *et al.* 1984)). Contryphane sind dadurch gekennzeichnet, dass sie neben zwei Cysteinen an Position 3 oder 4 ein Tryptophan bzw. bei den Leu-Tryptophanen ein Leucin besitzen, wie Leu-Contryphan-Tx und Leu-Contryphan-P aus den Giften von *C. textile* und *C. purpurascens* (JACOBSEN *et al.* 1999, JIMENEZ *et al.* 2001). vil1293 enthält weder einen Leucin- noch ein Tryptophan-Rest, weswegen es nicht zu den Contryphanen gerechnet werden kann. Conorfamide-Sr1 und Conorfamide-Sr2, die einzigen bisher bekannten Mitglieder ihrer Stoffgruppe, sind jeweils 12 Aminosäuren lang und bilden keine Disulfidbrücken aus (MAILLO *et al.* 2002, AGUILAR *et al.* 2008). Während bei den beiden Conorfamiden der N-Terminus der Sequenz identisch ist, zeigt er keine Homologie zu dem von vil1293. Conopressine besitzen mit neun Aminosäuren ungefähr die gleiche Länge wie vil1293. Auch besitzen sie zwei Cysteine (DUTERTRE *et al.* 2008). Allerdings ist die Position der Cysteine bei diesen Vasopressin/Oxytocin Homologen anders arrangiert. Weiterhin besitzt vil1293 keine Strukturähnlichkeit zu den bekannten Conopressinen noch zu Vasopressin-Homologen. Der Contulakin-G-Precursor hat mit 50 Aminosäuren eine ähnliche Länge wie der von vil1293 (57 Aminosäuren), der C-terminale Anhang ist allerdings mit zehn Aminosäuren deutlich kürzer als der von vil1293, der eine Länge von 32 bzw. 39 Aminosäuren aufweist. Weiterhin ist die Sequenz vom aktivierten Contulakin-G länger, als die von vil1293 und besitzt keine Strukturhomologie damit.

Das hier charakterisierte Peptid vill293 lässt sich somit in keine bekannte Conopeptid-Gruppe einordnen. Da zudem ein Datenbankabgleich keine Ergebnisse brachte kann über den Ort der physiologischen Aktivität sowie über eventuelle weitere Funktionen dieses Oligopeptids keine Aussage getroffen werden. Es stellt somit das erste Mitglied einer neuen Klasse von Conopeptiden dar.

4.3.5 purpur X –ein potentiell neues Toxin aus der P-Superfamilie

Das Peptid purpur X wurde, wie der Name bereits andeutet, in *C. purpurascens* entdeckt. Es weist ein ähnliches Cystein-Motiv wie die Conotoxine der P-Superfamilie auf. Diese Toxine waren früher unter dem Namen *spasmodic peptides* bekannt. Nach der Injektion des Toxins haben sich normale Mäuse wie die Mutanten *spasmodic*- und *spastic mouse* verhalten (BECKER 1990, RYAN *et al.* 1994). Die P-Superfamilie besitzt ein Cystein-Motiv, welches C(X₃)C(X₅)C(X₃)C(X₁)C(X₄)C lautet (MILES *et al.* 2002, PI *et al.* 2006). Das Cystein-Motiv von purpur X ist C(X₁₅)C(X₁)C(X₁₃)C(X₇)C(X₂₀)C. Es ist somit länger und würde aller Voraussicht nach eine neue Unterfamilie repräsentieren. Die Preproregion entspricht in ihrer Länge von 42-49 Aminosäuren derjenigen der P-Superfamilie (50 Aminosäuren). Ein C-terminaler Anhang ist bei der P-Superfamilie nicht bekannt. Es ist jedoch denkbar, dass er analog zu den I₂-Toxinen enzymatisch abgespalten wird.

Eine sehr ähnliche Toxin-Familie sind die Pg-Toxine aus der Turriden-Gattung *Gemmula* (HERALDE III *et al.* 2008), der größten Familie innerhalb der Conoidea (BOUCHET *et al.* 2002), die eine nahe Verwandtschaft zu den Conidae zeigt. Die Pg-Toxine haben das Cystein-Motiv C(X₄)C(X₅)C(X₃)C(X₃)C(X₆)C. Diese gleichen Toxinfamilien können auf eine konvergente Entwicklung zurückzuführen sein. Da Conidae und Turridae nah miteinander verwandt sind ist es jedoch auch möglich, dass diese Toxine bereits von den gemeinsamen Vorfahren synthetisiert wurden und zumindest teilweise ohne größere Veränderungen im Laufe der Evolution erhalten geblieben sind.

Bei Analysen des Rohgiftes von *C. purpurascens* wurde bisher kein Toxin mit dem vermuteten Molekulargewicht identifiziert. Dabei wurden jedoch andere Individuen von *C. purpurascens* verwendet, die möglicherweise das Toxin nicht synthetisieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass purpur X starken posttranslationalen Modifikationen unterworfen ist, was eine Veränderung des Molekulargewichtes nach sich zieht und somit nicht bei der chromatographischen Auftrennung im erwarteten Größen-Bereich gefunden würde.

4.3.6 Toxin-Phylogenie

Die phylogenetische Untersuchung der Prepro-Regionen verschiedener Conotoxin-Superfamilien belegt, dass die jeweiligen Superfamilien charakteristische Precursor haben. Die zwei Contulakin-Prepro-Regionen wurden bei der durchgeführten Maximum Parsimony-Analyse als Outgroup bestätigt. Bis auf zwei Aufspaltungen bei der T-Superfamilie und der O-Superfamilie sind sämtliche Precursor innerhalb der jeweiligen Superfamilie monophyletisch dargestellt. Diese Gruppe scheint durch Einfaltung aus längeren Toxinen entstanden zu sein. Die Auflösung innerhalb der A-Superfamilie ist im Vergleich zu dem Stammbaum, dem ein reiner Datensatz aus dieser Superfamilie zugrunde gelegen hat, besser. Dies ist möglicherweise auf den insgesamt diverseren Datensatz und der kleineren Anzahl sehr ähnlicher Sequenzen zurückzuführen.

Analog zu dem Stammbaum der A-Superfamilie sind auch hier die Precursor des κ A-, sowie des α A-Conotoxins innerhalb der α -Conotoxine eingruppiert. Die basale Stellung der Toxine von *C. jaspideus* wird erneut verdeutlicht. Die Toxine sind hierbei nicht mehr so strikt nach der Nahrungspräferenz der jeweiligen Arten untergliedert wie zuvor, was ebenfalls auf die geringere Anzahl von Sequenzen in der Analyse zurückzuführen ist.

Ein Grund für die eindeutige Gruppierung innerhalb der I-Superfamilie könnte sein, dass hierbei nur Precursor aus der I₂-Familie verwendet wurden. Unter Berücksichtigung der I₁-Precursor wäre diese Klade vermutlich in zwei Gruppen aufgespalten worden, wie es auch bei der M-Superfamilie eingetreten ist.

Die Analyse zeigt, dass es sich bei der beschriebenen F-Superfamilie um eine andere, eigenständige Toxin-Gruppe handelt, die keine nähere Verbindung zu den L- und J-Superfamilien aufweist. Aufgrund der Länge ihrer Precursor sind die beiden Toxine der F-Superfamilie die basalsten der Innengruppe, während die J-Superfamilie die Schwestergruppe der I-Superfamilie (I₂-Familie) darstellt. Die Beziehungen beider Superfamilien zueinander, wäre unter Berücksichtigung der I₁-Familie von Interesse. Da die Preproregionen der I₁-Familie bezüglich der Sequenzlänge größere Ähnlichkeiten zu der J-Superfamilie aufweisen, ist zu vermuten, dass diese in einem näheren verwandtschaftlichen Verhältnis zueinander stehen und sich die I₂-Familie aus diesen entwickelt hat, da die Prepro-Regionen deutlich konservierter sind als die Toxinregionen und Änderungen im Gegensatz zu den Toxinen nur langsam ablaufen.

Durch Verkürzung des Cystein-Motivs bei einigen Toxinen unter Beibehaltung der physiologischen Aktivität, könnte im Verlauf der Evolution die J-Superfamilie entstanden sein.

Auffällig ist im Stammbaum, dass zwei Superfamilien die ein ähnliches *target* haben (K^+ -Kanäle, aber verschiedene Untereinheiten), einen gemeinsamen Ursprung besitzen. Durch Adaption an die verschiedenen Untereinheiten der Ionenkanäle könnte es bei diesen zwei Superfamilien zu den unterschiedlichen Spezifitäten und Cystein-Motiven gekommen sein. Unklar ist jedoch, ob eine zufällige Mutation des Cystein-Motivs die unterschiedlichen Spezifitäten hervorgebracht hat oder diese als langsame Anpassung an die anderen Bindungsorte geschehen sind, bei der die Toxinstrukturen immer weiter angepasst wurden. Da weder die F-, die M-Superfamilie, noch das κ A-Conotoxin in der engeren Verwandtschaft dieser Gruppe lokalisiert sind, müssen K^+ -Kanal-bindende Toxine mehrmals im Laufe der Evolution entstanden sein. Je nach ihrem Alter ist das eine Erklärung, weshalb manche Arten Toxine bestimmter Superfamilien gar nicht synthetisieren (OLIVERA 2002), da nur Arten die sich nach der Entwicklung der jeweiligen Toxingruppe herausgebildet haben, die genetischen Anlagen dazu besitzen. Auch könnte eine frühe Anlage für bestimmte Toxine im Laufe der Zeit verloren gegangen sein, da sie durch effektivere Formen ersetzt worden sind.

Eine Aufspaltung bezüglich unterschiedlicher Wirkungsorte scheint innerhalb der T-Superfamilie stattzufinden. Hier bilden die Toxine zwei Hauptgruppen. Weiterhin gibt es eine viel basaler gestellte Klade, die sich in nur zwei Toxine aufspaltet. Die Toxine lassen keine einheitlichen Merkmale erkennen nach denen sie unterteilt werden könnten. In allen Gruppen variiert die Anzahl der Aminosäurereste zwischen Cys^2 und Cys^3 . Diese Toxingruppe scheint relativ divers hinsichtlich ihrer Bindungsstellen zu sein. Analysen an zwei verschiedenen Toxinen haben zwei unterschiedliche physiologische Aktivitäten gezeigt. Ein Toxin aus *C. textile* hat den präsynaptischen Ca^{2+} -Fluss beeinträchtigt, wohingegen das andere aus *C. litteratus* an die Na^+ -Kanäle von Neuronen, jedoch nicht an die des Muskels gebunden hat (RIGBY *et al.* 1999, LIU *et al.* 2007). Außerdem sind diese Toxine sehr stark posttranslational modifiziert (HANSON *et al.* 2004, AGUILAR *et al.* 2006). Insofern ist es vorstellbar, dass bei der vorliegenden Analyse Preproregionen von Toxinen verwendet wurden, die unterschiedliche Wirkungsspektren haben und sich hinsichtlich bestimmter Erkennungssequenzen in der Signalregion unterscheiden. Auch belegt die Stellung der Preproregionen der Toxine von *C. leopardus* und *C. gloriamaris* an, dass die verschiedenen Klassen einen unterschiedlichen Ursprung haben.

Erwartungsgemäß findet sich purpur X, wie aufgrund der Länge der Preproregion sowie dem Cystein-Motiv postuliert, innerhalb der P-Superfamilie. Seine basale Stellung innerhalb der Gruppe deutet an, dass die Preproregion stärker abgewandelt ist, als bei den anderen Toxinen. Dies kann sekundär aufgetreten sein, wahrscheinlicher ist aber, dass es sich um ein

pleiomorphes Merkmal der P-Superfamilie handelt. Es ist möglich, dass bei diesem Toxin im Laufe der Evolution ein vermehrter Einbau von Aminosäureresten in die, durch die Disulfidbrückenbindungen erzeugten, Loops erfolgt ist. Auch das entgegengesetzte Modell ist möglich. Demnach wäre purpur X ein relativ altes Toxin und die Loops der weiteren Toxine sind durch Deletionen von Aminosäuren kleiner geworden. Beide Szenarien würden jedoch die adaptive Radiation einer Toxin-Superfamilie dokumentieren, die sich in bestimmten Maßen auch auf andere Stoffe und Organismen übertragen lässt, wie beispielsweise der Entwicklung von Antikörpern und weiteren Proteinen.

Die Toxine der O-Superfamilie werden aufgrund der Affinität zu bestimmten Ionenkanälen in κ - (K^+ -Kanäle), μO -, δ - (jeweils Na^+ -Kanal), und ω -Conotoxine (Ca^{2+} -Kanäle) unterteilt. Von den Toxinen die in diese Analyse einbezogen wurden, sind diese Unterteilungen mit Ausnahme des ω -Conotoxins von *C. catus* sowie PuIIA (aus *C. pulicarius*) nicht bekannt. Es können daher über die tatsächliche Zuordnung dieser Toxine nur Vermutungen angestellt werden. Ein Datenbankabgleich des Toxins von *C. nux* ergab eine hohe Ähnlichkeit zu den δ -Conotoxinen. Die Toxine dieser Superfamilie werden innerhalb des Stammbaumes in zwei Gruppen aufgespalten. Die größere Gruppe teilt sich wiederum in zwei Äste auf. Es ist möglich, dass die μO -, δ - und ω -Conotoxine zu der größeren, jüngeren Gruppe geordnet werden, κ -Toxine hingegen die kleinere Gruppe bilden. μO - und δ -Conotoxine binden beide an Na^+ -Kanäle, jedoch vermutlich an verschiedene Untereinheiten. TERLAU *et al.* (1996b) konnten zeigen, dass μO -Toxine nicht an die Untereinheit I des Na^+ -Kanals binden. δ -Conotoxine scheinen eine wichtige Rolle bei der Immobilisierung der Beute zu spielen und wirken sehr spezifisch gegen die jeweilige Beute. So erwiesen sich δ -TxVIA sowie δ -GmVIA aus den molluscivoren *C. textile* und *C. gloriamaris* als aktiv bei *Aplysia* und anderen Invertebraten, jedoch als nicht toxisch für Wirbeltiere. Das Toxin δ -PVIA der piscivoren Art *C. purpurascens* ruft hingegen bei Vertebraten Symptome hervor, ist bei Mollusken aber inaktiv (SHON *et al.* 1994, HASSON *et al.* 1995, TERLAU & OLIVERA 2004). Diese Wirkungsspektren zweier Toxinklassen, an verschiedene Untereinheiten des gleichen Ionen-Kanals, aus einer Superfamilie sprechen für ein nahes verwandtschaftliches Verhältnis der Toxinklassen.

Anhand des Giftes von *C. magus* konnte gezeigt werden, dass ω -Conotoxine an verschiedene Subtypen der Ca^{2+} -Kanäle binden und die Toxine Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (LIU *et al.* 1996). Da die Preproregionen jedoch weitestgehend identisch sind, sind keine weiteren Unterteilungen vorgenommen worden (HILLYARD *et al.* 1992). Die ω -Conotoxine stellen jedoch den Hauptbestandteil im Gift v.a. der piscivoren Arten dar. Aufgrund dieses zahlenmäßigen Übergewichtes ist davon auszugehen, dass sie einen

beträchtlichen Teil der Sequenzen des Datensatzes ausmachen, weswegen sie wahrscheinlich in der größeren Gruppe der O-Superfamilie zu finden sind, zumal dort mit dem Toxin von *C. catus* und PuIIA zwei bekannte ω -Conotoxine vertreten sind.

Zwei unterschiedliche Kompositionen der großen Gruppe wären am wahrscheinlichsten: Zum einen bilden die ω -Conotoxine die größte Klade dieser Gruppe, die sich in zwei kleinere verzweigt. Das könnte auf die Affinitäten bezüglich der verschiedenen Ca^{2+} -Kanal-Subtypen zurückzuführen sein. Der kleinere Ast der Hauptgruppe wird dabei aus κ -Conotoxinen gebildet.

Zum anderen ist es möglich, dass der kleinere Ast der Hauptgruppe sich aus μO - und δ -Conotoxinen zusammensetzt, die sich untereinander weiter aufspalten. Aufgrund der Sequenzhomologie der Preproregion von nux2 ist diese Variante die wahrscheinlichere. Weiterhin spricht die direkte Verwandtschaft der Na^+ -Kanal-bindenden Conotoxin-Gruppen dafür. Eine spezifische Bindung an Na^+ -Kanäle hätte sich demnach nur einmal innerhalb der O-Superfamilie entwickelt. Für die kleine Klade würde das bedeuten, dass sie aus κ -Conotoxinen besteht.

Eine Reihe von Toxinen anderer basaler Superfamilien bindet ebenfalls an K^+ -Kanäle. Dabei könnte es durch Insertionen zu einer Verlängerung der Toxine gekommen sein, die zur Ausbildung eines neuen Cystein-Motivs bei ähnlicher Wirksamkeit geführt hat. Da jedoch von der T-Superfamilie der Ort der physiologischen Aktivität nicht bekannt ist, bleibt dieser Aspekt rein spekulativ. Die Affinität eines dieser Toxine an einen Na^+ -Kanal eröffnet auch die Möglichkeit, dass sich die basale der beiden O-Superfamilien Gruppen aus δ - und μO -Conotoxinen zusammensetzt. Von κ -PVIIA aus *C. purpurascens* ist bekannt, dass Mutationen innerhalb der Loops zu Affinitätsänderungen bezüglich der Bindung führen (JACOBSEN *et al* 2000). Da auch innerhalb der M-Superfamilie K^+ -Kanal-bindende Toxine bekannt sind (κM -Conotoxine), ist es möglich, dass sich die M-Superfamilie durch Konformationsänderung aus frühen κ -Toxinen der O-Superfamilie entwickelt hat. Manche Toxine der O-Superfamilie hätten im späteren Evolutionsverlauf aufgrund der Hypervariabilität durch neugeartete Strukturen bei gleichem Cystein-Motiv zu neuen Wirksamkeiten geführt. Die basale Stellung des Toxins CalTx aus *C. californicus* lässt sich durch die Ursprünglichkeit dieser Art erklären.

Die M-Superfamilie scheint sich aus der basalen Gruppe der O-Superfamilie entwickelt zu haben. Das kann durch Insertionen, Deletionen und Substitutionen hervorgerufen worden sein, die im Laufe der Zeit zu einer Konformationsänderung geführt haben. Aus dieser Familie sind Toxine bekannt, die sowohl an die nikotinergen ACh-Rezeptoren (ψ -Conotoxine), an K^+ -Kanäle (κM -Conotoxine), als auch an Na^+ -Kanäle (μ -Conotoxine) binden (SHON *et al*.

1997, CHAHINE *et al.* 1998). Die derzeitige Unterteilung in vier Gruppen, den so genannten m-1 bis m-4 *branches*, ist provisorisch, da noch kein exaktes Muster für die Unterteilung bekannt ist (DU *et al.* 2007).

Die Toxine der m-1 und m-2 *branches* sind hauptsächlich im Gift von vermivoren und molluscivoren Arten gefunden worden. Von den bisher beschriebenen Toxinen des m-1 *branch* ist bekannt, dass die Preproregionen länger, als die der übrigen Toxin-Gruppen, sind. Die Toxinregion hingegen, ist zusammen mit derjenigen der m-2 Toxine, die kürzeste bisher beschriebene innerhalb der Superfamilie. Weiterhin sind m-2 Toxine durch ein Prolin/Hydroxyprolinrest in ihrem dritten Loop charakterisiert. Das Hauptunterscheidungsmerkmal dieser Gruppen besteht nach AL-SABI *et al.* (2004) in der Cystein-Konnektivität, (m-1: Cys¹-Cys⁵, Cys²-Cys⁴, Cys³-Cys⁶; m-2 und m-3: Cys¹-Cys⁶, Cys²-Cys⁴, Cys³-Cys⁵; m-4: Cys¹-Cys⁴, Cys²-Cys⁵, Cys³-Cys⁶). Die Mitglieder des m-2 *branch* werden weiter anhand der Anzahl der Aminosäurereste von denen des m-3 *branch* unterschieden. Erschwerend für die Einteilung ist, dass Toxine mit sämtlichen Wirkungsorten in jeder der vier Gruppen gefunden wurden (CORPUZ *et al.* 2005). Anhand der phylogenetischen Rekonstruktion werden die Toxine der M-Superfamilie in zwei Gruppen unterteilt. In der größeren stehen sämtliche m-1 Toxine, während die zweite Gruppe aus Toxinen der m-2 und m-4 *branches* besteht. Das bestätigt auch die Ergebnisse von WANG *et al.* (2008). Eine exaktere Unterteilung ist allerdings nicht möglich. Es scheint, als ob die M-Superfamilie sich in einer evolutionären Phase befindet, in der es zur Ausbildung neuer Bindungsaffinitäten und Änderungen in der Toxinlänge kommt.

Diese Ergebnisse deuten an, dass es bei der Entwicklung dieser Toxine zunächst zu Modifikationen in der Sekundärstruktur kommt. Anschließend Änderungen der Primärstruktur entwickeln sich demnach erst sekundär, nachdem die Wirksamkeit des räumlich neu-strukturierten Toxins etabliert ist. Dieser Verlauf findet sich in dem Maße bei keiner weiteren Conotoxin-Gruppe. Die Entwicklung der M-Superfamilie sowie der großen Gruppe der O-Superfamilie ist derjenigen entgegengesetzt, die man zwischen der I₂-Familie und der J-Superfamilie beobachten kann. Während es bei der letzteren Gruppe zu einer Struktur-, jedoch nicht zu einer Affinitätsänderung gekommen ist, zeigen die M- sowie die O-Superfamilie eine Spezifitätsänderung bei weitestgehend konstantem Bauplan.

Dabei stellt sich die Frage weswegen es zu dieser Hypervariabilität der Toxine gekommen ist. Möglicherweise kann durch die Toxin-Vielfalt eine bestimmte Beute langfristig als Ressource erschlossen werden. Auch das Ausweichen auf eine andere Beute wird durch die

Toxin-Vielfalt erleichtert. Analog zu den MHC Proteinen und den Geruchsrezeptoren (BUCK, 1992, NGAI *et al.* 1993, SULLIVAN *et al.* 1996) würden sich auch bei den Conotoxinen Genduplikationen vorteilhaft auswirken. Damit ständen die Produkte mehrerer Gene zur Verfügung. Würde ein Toxin wirkungslos werden könnte auf das nächste zurückgegriffen werden.

Damit assoziiert ist die Möglichkeit der *arms race*, einem Wettrüsten auf molekularer Ebene, die auf der einen Seite die Toxine betreffen würde und auf der anderen die Ionen-Kanäle und Rezeptoren der Beuteorganismen. Eine solche Coevolution von Räuber und Beute könnte eine ähnliche evolutionäre Variabilität zur Folge haben, wie sie bereits bei der Wirt-Pathogen Evolution beobachtet worden ist (RILEY 1993, ZHANG *et al.* 1998). Um dies zu verifizieren müssten die Mutationsraten der Kanäle und Rezeptoren der Beuteorganismen untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Kombination aus molekular-phylogenetischen Daten und Vergleich der Gehäuse-Zeichnung exakte Aussagen über die Verwandtschaftsbeziehungen der Arten zueinander erlaubt. Im Hinblick auf die große medizinische Bedeutung, der in großer Vielfalt vorliegenden Toxine, ist eine sehr präzise und umfassende systematisch-taxonomische Revision der Familie Conidae nötig, damit einerseits eine klare Zuordnung der Toxine zu ihren „Produzenten“ und andererseits das Auffinden der Tiere in der Natur durch exakte Bestimmung erfolgen kann. Auf der Grundlage unfundierter Indices ist es zu einer Vereinigung vieler Arten zu Artkomplexen gekommen. Eine unzureichende taxonomische Differenzierung von Artkomplexen führt zum Verlust potenziell medizinisch-relevanter Toxine, da ihre Träger nicht umfassend untersucht werden können.

Abgewandelte Ernährungsweisen geben gleichwohl Einblick in die verwandtschaftlichen Verhältnisse. Wie bei der Besiedelung unterschiedlicher Habitate und Gebiete, kann es hierdurch sowohl zur Artausbildung, als auch zur Entwicklung neuer Toxine gekommen sein, da die Hypervariabilität eine ökologische Anpassung darstellt.

Über das Studium des Toxinbildes basaler Arten können Aussagen über die Toxin-Evolution abgeleitet werden, welche die Adaption und Entstehung neuer Wirkmechanismen gleichermaßen abdecken.

Die Artenvielfalt und die damit verbundenen ökologischen Anpassungen haben bei den Kegelschnecken das größte bekannte Giftarsenal einer einzigen Familie entstehen lassen. Sie sind somit nicht nur die artenreichste marine Tiergattung, sondern auch die größten Toxin-Entwickler im Tierreich.

5. Zusammenfassung

Die Gattung *Conus* repräsentiert die artenreichste Gattung giftiger Tiere. Mit 600-1000 Arten gilt sie als die größte marine Invertebraten-Gattung. Die Artidentifizierung erfolgt üblicherweise anhand Gehäuse-morphologischer Merkmale.

Morphologische und Molekular-phylogenetische Daten (16S rRNA) beweisen, dass conchologische Gehäuse-Indices unter dem Einfluss unterschiedlicher Lebensbedingungen individuell stark variieren und für die Klärung verwandtschaftlicher Beziehungen ungeeignet sind. Dies macht eine Unterteilung der Gattung *Conus* auf der Grundlage der Gehäuse-Silhouette hinfällig und stellt die derzeit gebräuchliche Taxonomie auf Artebene in Frage.

Molekular-phylogenetische Analysen belegen, dass die Zeichnung ein konstantes Merkmal innerhalb einer Artengruppe ist. Hinsichtlich ihrer Zeichnungselemente ähnliche Arten bilden in den Stammbäumen geschlossene Gruppen.

Eine Zwei- bis Dreiteilung der Conidae beruht auf verschiedenen Radiationen, die älteren Gruppen bilden den taxonomisch kleineren Teil der Familie. Die genetischen Distanzen der Gruppen zueinander berechtigen eine taxonomische Unterteilung der Familie Conidae in unterschiedliche Gattungen. Die Mitglieder der alten Klade sind vor allem im westlichen Atlantik und Ost-Pazifik beheimatet, mit nur einer Art im Indo-Pazifik. Die Mitglieder der jüngeren Klade haben sich hingegen im Laufe der Evolution in allen wärmeren Meeren ausgebreitet.

Während sich die piscivore Ernährungsweise mehrmals entwickelt hat, stellen die molluscivoren Coniden eine monophyletische Gruppe dar, die sich durch ihre *tent-mark*-Zeichnung von allen anderen Gruppen abgrenzen läßt. Die Amphinomidae-Fresser bilden ebenfalls ein Monophylum, hervorgegangen aus einer indo-pazifischen Artengruppe. Vom Indo-Pazifik stammend haben sie ihre Beutespezifität im westlichen Atlantik bzw. östlichen Pazifik erworben, wo sie zudem die größte Diversität zeigen.

Den ersten Nachweis dafür, dass die *Eastern Pacific Barrier* von Mollusken auch von Osten nach Westen passiert worden ist, erbringt die sekundär in den Indo-Pazifik eingewanderte *C. imperialis*. Die Ergebnisse belegen, dass der West-Atlantik/Ost-Pazifik mehrmals besiedelt worden ist und dabei sowohl Migrationen aus dem östlichen Atlantik, als auch aus dem Indo-Pazifik stattfanden.

Aufgrund ihrer Hypervariabilität unterliegen die Conotoxine einer rasch ablaufenden Evolution. Abhängig vom jeweiligen Cystein-Motiv und der Anzahl der dazwischenliegenden

Aminosäurereste erfolgt die Klassifizierung in verschiedene Superfamilien. Die vorgestellten Mitglieder der A-Superfamilie gehören zu Gruppen, die bisher nur von vereinzelt Nachweisen belegt sind. Manche α -Conotoxin-Precursor werden in identischer Form von einander unverwandten Arten synthetisiert (*C. jaspideus* und *C. ermineus*), ebenso ein Toxin-Precursor aus der O-Superfamilie, der im Genom von *C. jaspideus* sowie *C. nux* enthalten ist. Obgleich identische Toxine selten sind, stellen solche Funde ein Novum dar, da sie archaische Prototypen der Conotoxine sein könnten. Die phylogenetische Analyse der Prepro-Regionen spiegelt die basale Stellung dieser Toxine wider.

Zwei aus *C. regius* identifizierte Precursor der I₂-Familie erscheinen eine weitere Unterteilung dieser Toxingruppe nötig zu machen. Sie unterscheiden sich durch die Anzahl ihrer Aminosäurereste von allen anderen bisher bekannten aus dieser Toxin-Superfamilie. Gleiches gilt für purpur X, einem möglichen Toxin-Precursor mit strukturellen Ähnlichkeiten zu den Toxinen aus der P-Superfamilie. Die Unterschiede sind hier so groß, dass dieser Precursor vermutlich den ersten Vertreter einer neuen Familie oder gar Superfamilie darstellt. Analog dazu lässt sich vil1293 aus *C. villipinii* in keine bekannte Conopeptid-Gruppe einordnen. Hierbei handelt es sich um ein Oligopeptid aus zehn Aminosäuren mit einer vermeintlichen Disulfidbrückenbindung.

Die Toxine der F-Superfamilie werden erstmalig mit ihrem kompletten Precursor beschrieben. Dabei zeigen sich auch in der Signalregion strukturelle Differenzen zu den ähnlichen J- sowie L-Conotoxinen, die die Einführung dieser neuen Superfamilie erfordern.

Der phylogenetische Vergleich der Preproregionen zeigt, dass die Toxine anhand dieses Bereiches klassifizierbar sind. Ob die Cystein-Motive der O- und T-Superfamilie zweimal durch Insertionen sowie Deletionen entstanden sind bleibt unklar. Die Verwandtschaft mancher Superfamilien zueinander belegt, dass bei Beibehaltung der physiologischen Aktivität sich durch Mutationen das Cystein-Motiv geändert hat, um eine größere Variabilität zu erzielen. Andere Toxin-Superfamilien zeigen hingegen den umgekehrten Verlauf. Unter Beibehaltung des Cysteinmotivs wurden allein durch die Variation der Aminosäuresubstituenten neue physiologische Aktivitäten entwickelt, die sich jedoch auf die Preproregion ausgewirkt haben. Während frühe Conotoxine K⁺-Kanal-Blocker waren, scheint die Affinität zu diesem Wirkort im Laufe der Evolution mehrmals entstanden zu sein, wobei Spezifikationen auf verschiedene Kanaluntereinheiten stattgefunden haben.

6. Literatur:

AGUILAR, M.B., LEZAMA-MONFIL, L., MAILLO, M., PEDRAZA-LARA, H., LOPEZ-VERA, E., HEIMER DE LA COTERA, E.P. (2006): A biologically active hydrophobic T-1-conotoxin from the venom of *Conus spurius*. *Peptides* **27**:500–505

AGUILAR M.B., LÓPEZ-VERA E., HEIMER DE LA COTERA E.P., FALCÓN A., OLIVERA B.M., MAILLO, M. (2007): I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: Peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides* **28**: 18-23

AGUILAR, M.B., LUNA-RAMÍREZ, K.S., ECHEVERRÍA, D., FALCÓN, A., OLIVERA, B.M., HEIMER DE LA COTERA, E.P., MAILLO, M. (2008): Conorfamide-Sr2, a gamma-carboxyglutamate-containing FMRFamide-related peptide from the venom of *Conus spurius* with activity in mice and mollusks. *Peptides* **29**: 186-195

ALLEN, J.W., HOFER, K., MCCUMBER, D., WAGSTAFF, J.D., LAYER, R.T., MCCABE, R.T., & YAKSH, T.L. (2007): An Assessment of the Antinociceptive Efficacy of Intrathecal and Epidural Contulakin-G in Rats and Dogs *Anesthesia & Analgesia* **104**: 1505-1513

ALLMON, W.D., ROSENBERG, G., PORTELL, R.W., & SCHINDLER, K.S. (1993): Diversity of Atlantic Coastal Plain Mollusks Since the Pliocene *Science* **260**: 1626-1629.

ALLMON, W.D. (2001): Nutrients, temperature, disturbance and evolution: a model for the late Cenozoic marine record of the western Atlantic. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology* **166**: 9-26

AL-SABI, A., LENNARTZ, D., FERBER, M., GULYAS, J., RIVIER, J.E., OLIVERA, B.M., CARLOMAGNO, T., TERLAU, H. (2004): κ -Mconotoxin RIIIK, structural and functional novelty in a K⁺ channel antagonist. *Biochemistry* **43**: 8625-8635

ARIAS, H.R. & BLANTON, M.P. (2000): α -Conotoxins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 1017-1028

AZAM, L., DOWELL, C., WATKINS, M., STITZEL, J.A., OLIVERA, B.M. & MCINTOSH J.M. (2005): α -Conotoxin BuIA, a Novel Peptide from *Conus bullatus*, Distinguishes among Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* **280**: 80-87

BALAJI, R.A., OHTAKE, A., SATO, K., GOPALAKRISHNAKONE, P., KINI, R.M., SEOW, K.T. & BAY, B.-H. (2000): λ -Conotoxins, a New Family of Conotoxins with Unique Disulfide Pattern and Protein Folding *J. Bio. Chem.*, **275**: 39516–39522

BANDYOPADHYAY, P.K., COLLEDGE, C.J., WALKER, C.S., ZHOU, L.-M., HILLYARD, D.R., OLIVERA, B.M. (1998): Conatokin-G precursor and its role in γ -carboxylation by a vitamin K-dependent carboxylase from a *Conus* snail. *J. Biol. Chem.*, **273**: 5447–5450

BARTSCH, P. (1915): Report on the Turton collection of South African marine mollusks, with additional notes on other South African shells contained in the United States National Museum. *Bull. U.S. Natl. Mus.* 91: 1-305

BECKER, C.M. (1990): Disorders of the inhibitory glycine receptor: the spastic mouse *FASEB J.* **4**: 2767-2774

BERGH, R. (1895): Beiträge zur Kenntnis der Coniden. *Nova acta der Ksl. Leop.-Carol. Deut. Akad. d. Naturforscher*, **65**: 67–214

BINGHAM, J.P., JONES, A., LEWIS, R.J., ANDREWS, P.R. & ALEWOOD, P.F. (1995): *Conus* venom peptides (Conopeptides): Inter-species, intra-species and within individual variation revealed by Ionspray Mass Spectrometry. *Proc. of the Eliat Conference on Interuniversity Institute of Marine Sciences Eliat, May 1995*, 13–27

BOUCHET, P., LOZOUET, P., MAESTRATI, P., HEROS, V. (2002): Assessing the magnitude of species richness in tropical marine environments: high numbers of molluscs at a New Caledonia site. *Biol. J. Linn. Soc. London*. **75**: 421-436

BUCZEK, O., YOSHIKAMI, D., WATKINS, M., BULAJ, G., JIMENEZ, E.C., & OLIVERA, B.M. (2005a): Characterization of D-amino-acid-containing excitatory conotoxins and redefinition of the I-conotoxin superfamily. *FEBS J.* **272**: 4178-4188

BUCZEK, O., M., BULAJ, G., OLIVERA, B.M. (2005b): Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cell. Mol. Sci.* **62**: 3067-3079

BUCZEK, O., YOSHIKAMI, D., BULAJ, G., JIMENEZ, E.C., & OLIVERA, B.M. (2005c): Posttranslational amino acid isomerisation: a functionally important D-amino acid in an excitatory peptide. *J. Biol. Chem.* **280**: 4247-4253

BUCZEK, O., JIMENEZ, E.C., YOSHIKAMIA, D., IMPERIAL, J.S., WATKINS, M., MORRISON, A., OLIVERA, B.M. (2008): I₁-superfamily conotoxins and prediction of single D-amino acid occurrence. *Toxicon* **51**: 218-229

BRAGA, M.C.V., KONNO, K., PORTARO, F.C.V., FREITAS, J.C. DE, YAMANE, T., OLIVERA, B.M., PIMENTA, D.C. (2005): Mass spectrometric and high performance liquid chromatography profiling of the venom of the Brazilian vermivorous mollusc *Conus regius*: feeding behavior and identification of one novel conotoxin. *Toxicon* **45**: 113-122

BRIGGS, J.C. (1974): Marine zoogeography. *McGraw-Hill series in population biology*, New York, 475 pp

BUCK, L. (1992): The olfactory multigene family. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**: 467–473

CARTIER, G.E., YOSHIKAMI, D., GRAY, W.R., LUO, S., OLIVERA, B.M., MCINTOSH, J.M. (1996): A new α -conotoxin which targets $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, **271**: 7522–7528

CHAGOT, B., PIMENTEL, C., DAI, L., PIL, J., TYTGAT, J., NAKAJIMA, T., CORZO, G., DARBON, H., AND FERRAT, G. (2005) An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, *Biochem. J.* **388**: 263-271.

CHAHINE, M., SIROIS, J., MARCOTTE, P., CHEN, L.-Q, & KALLEN, R.G. (1998): Extrapore Residues of the S5-S6 Loop of Domain 2 of the Voltage-Gated Skeletal Muscle Sodium Channel (rSkM1) Contribute to the μ -Conotoxin GIIIA Binding Site. *Biophys. J.* **75**: 236-246

- CHESNUT, T.J., CARPENTER, D.O. & STRICHARTZ, G.R. (1987): Effects of venom from *Conus striatus* on the delayed rectifier potassium current of molluscan neurons. *Toxicon*, **25**: 267–278
- COLLINS, L.S., BUDD, A.F. & COATES, A.G. (1996): Earliest evolution associated with closure of the Tropical American Seaway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 6069-6072
- CONTICELLO, S.G., PILPEL, Y., GLUSMAN, G. & FAINZILBER, M. (2000): Position-specific codon conservation in hypervariable gene families. *Trends in Genetics*. **16**: 57-59
- CONTICELLO, GILA, Y., AVIDAN, N., BEN-ASHER, E., LEVY, Z. & FAINZILBER, M. (2001): Mechanisms for evolving hypervariability : The case of conopeptides. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 120-131
- COOMANS, H.E. & FILMER, R.M. (1985): Studies on Conidae (Mollusca, Gastropoda) 3. Systematics and distribution of some australian species, including two new taxa. *Beaufortia* **35**: 1-14
- CORNEY, R.G. (1902): Poisonous molluscs. *Nature*, **65**: 198–199
- CORPUZ, G.P., JACOBSEN, R.B., JIMENEZ, E.C., WATKINS, M., WALKER, C., COLLEDGE, C., GARRETT, J.E., MCDUGAL, O., LI, W., GRAY, W.R., HILLYARD, D.R., RIVIER, J., MCINTOSH, J.M., CRUZ, L.J. & OLIVERA, B.M. (2005): Definition of the M-Conotoxin Superfamily: Characterization of Novel Peptides from Molluscivorous *Conus* Venoms. *Biochemistry* **44**: 8176-8136
- COSSMANN, M. (1896): Essais de Paleoconchologie Comparee. Volume 2. *Privately Published, Paris, France*, 179 S.
- CRAIG, A.G., JIMENEZ, E.C., DYKERT, J., NIELSEN, D.B., GULYAS, J., ABOGADIE, F.C., PORTER, J., RIVIER, J.E., CRUZ, L.J., OLIVERA, B.M., MCINTOSH, J.M. (1997): A novel post-translational modification involving bromination of tryptophan: identification of the residue, L-6-bromotryptophan, in peptides from *Conus imperialis* and *Conus radiatus* venom. *J. Biol. Chem.*, **272**: 4689–4698
- CRAIG, A.G., NORBERG, T., GRIFFIN, D., HOEGER, C., AKHTAR, M., SCHMIDT, K., DYKERT, J., RICHELSON, E., NAVARRO, V., MACELLA, J., WATKINS, M., HILLYARD, D., IMPERIAL, J., CRUZ, L.J., OLIVERA (1998a): Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. *J. Biol. Chem.*, **274**: 13752–13759
- CRAIG, A.G., ZAFARALLA, G., CRUZ, L.J., SANTOS, A.D., HILLYARD, D.R., DYKERT, J., RIVIER, J.E., GRAY, W.R., IMPERIAL, J., DE LA CRUZ, R.G., SPORNING, A., TERLAU, H., WEST, P.J., YOSHIKAMI, D. & OLIVERA, B.M. (1998b): An O-glycosylated neuroexcitatory *Conus* peptide. *Biochemistry* **37**: 16019–16025.
- CRAIG, A.G., BANDYOPADHYAY, P., OLIVERA, B.M. (1999a): Posttranslationally modified peptides from *Conus* venoms. *European J. Biochem.*, **264**: 691–699

- CRAIG, A.G., NORBERG, T., GRIFFIN, D., HOEGER, C., AKHTAR, M., SCHMIDT, K., LOW, W., DYKERT, J., RICHELSON, E., NAVARRO, V., MAZELLA, J., WATKINS, M., HILLYARD, D., IMPERIAL, J., CRUZ, L.J., & OLIVERA, B.M. (1999b): Contulakin-G, an O-Glycosylated Invertebrate Neurotensin. *J. Biol. Chem.*, **274**: 13752-13759.
- CRUZ, L.J., CORPUZ, G. & OLIVERA, B.M. (1976): A preliminary study of *Conus* venom protein. *Veliger*, **18**: 302–308
- CRUZ, L.J., GRAY, W.R., YOSCHIKAMI, D. & OLIVERA, B.M. (1985): *Conus* venoms: a rich source of neuroactive peptides. *J. Toxicol. Tox. Rev.*, **4**: 107–132
- CRUZ, L.J., JOHNSON, D.S. & OLIVERA, B.M. (1987a): A characterization of the ω -Conotoxin target. Evidence for tissue-specific heterogeneity in Ca²⁺ channel types. *Biochemistry*, **26**: 820–824
- CRUZ, L.J., SANTOS, V., DE., ZAFARELLA, G.C., RAMILO, C.A., ZEIKUS, R., GRAY, W.R. & OLIVERA, B.M. (1987b): Invertebrate Vasopressin/Oxytocin Homologs. *J. Biol. Chem.* **262**: 15821-15824
- CRUZ, L.J., RAMILO, C.A., CORPUZ, G. & OLIVERA, B.M. (1992): *Conus* peptides: phylogenetic range of biological activity. *Biol. Bull.*, **183**: 159–164
- CUMMINGS, M. P., OTTO, S. P., & WAKELEY, J. (1995): Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 814–822
- CUNHA, R.L., CASTILHO, R., RÜBER, L. & ZARDOYA, R. (2005) Patterns of Cladogenesis in the Venomous Marine Gastropod Genus *Conus* from the Cape Verde Islands. *Syst. Biol.* **54**: 634-650
- DAI, Q., SHENG, Z., GEIGER, J.H., CASTELLINO, F.J., & PROROK, M. (2007): Helix-Helix Interactions between Homo- and Heterodimeric γ -Carboxyglutamate-containing Conantokin Peptides and Their Derivatives. *J. Biol. Chem.* **282**: 12641-12649
- D’CROZ & ROBERTSON, D.R. (1997): Coastal oceanographic conditions affecting coral reefs on both sides of the Isthmus of Panama. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.* **2**: 2053-2058
- DIAZ, J.M., (1995): Zoogeography of Marine Gastropod in the Southern Caribbean: A new Look at Provinciality. *Carib. J. Sci.* **31**: 104-121
- DIAZ, J.M., GRACIA, A.M & CANTERA, J.R. (2005): Checklist of the Cone Shells (Mollusca: Gastropoda: Neogastropoda: Conidae) Of Colombia. *Biota Colombiana* **6**: 73-86
- DIETL, G.P., HERBERT, G.S., VERMAIJ, G.J. (2004): Reduced Competition and Altered Feeding Behavior Among Marine Snails After a Mass Extinction. *Science* **306**: 2229-2231
- DRAKAPOULOU, E., VIZZAVONA, J., NEYTON, J., ANIORT, V., BOUET, F., VIRELIZIER, H., MÉNEZ, A. & VITA, C. (1998): Consequence of the removal of evolutionary conserved disulfide bridges on the structure and function of Charybdotoxin and evidence that particular cysteine spacings govern specific disulfide bond formation. *Biochemistry*, **37**: 1292–1301

- DU, W.H., HAN, Y.H., HUANG, F.J., LI, J., CHI, C.W. & FANG, W.H. (2007): Solution structure of an M-1 conotoxin with a novel disulfide linkage. *FEBS J.* **274**: 2596-2602
- DUDA, T.F. JR & PALUMBI, S.R. (1999a): Developmental shifts and species selection in gastropods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10272-10277
- DUDA JR, T.F. & PALUMBI, S.R. (1999b): Molecular genetics of ecological diversification: Duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 6820–6823
- DUDA JR, T.F. & PALUMBI, S.R. (2003): Gene expression and feeding ecology: evolution of piscivory in the venomous gastropod genus *Conus*. *Proc. R. Soc. Lond.* **271**: 1165-1174
- DUDA, T.F. JR & ROLÁN, E. (2004): Explosive radiation of Cape verde *Conus*, a marine species flock. *Mol. Ecol.* **14**: 267-272
- DUDA, T.F. JR & KOHN, A.J. (2005): Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus *Conus*. *Mol. Phyl. Evol.* **34**: 257-272
- DUDA, T.F. JR, KOHN, A.J. & PALUMBI, S.R. (2001): Origins of diverse feeding ecologies within *Conus*, a genus of venomous marine gastropods. *Biol. J. Linn. Soc. London*, **73**: 391–409
- DUQUE-CARO, J.W. (1990): Neogene stratigraphy, paleoceanography and paleobiogeography in northwest South America and the evolution of the Panama seaway. *Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol.* **77**: 203-234
- DUNLAP, K, J. I. LUEBKE, AND T. J. TURNER (1995) Exocytotic Ca²⁺ Channels in Mammalian Central Neurons. *Trends Neurosci.*, **18**: 89–98
- DUTERTRE, S., CROKER, D., DALY, N.L., ANDERSSON, Å., MUTTENTHALER, M., LUMSDEN, N.G., CRAIK, D.J., ALEWOOD, P.F., GUILLON, G., & LEWIS, R.J. (2008): Conopressin-T from *Conus tulipa* Reveals an Antagonist Switch in Vasopressin-like Peptides. *J. Biol. Chem.* **283**: 7100-7108
- ELLISON, M., MCINTOSH, J.M. & OLIVERA, B.M. (2003): α -Conotoxins ImI and ImII. *J. Biol. Chem.* **278**: 757-764
- ENDEAN, R. & RUDKIN, C. (1963): Studies of the venoms of some Conidae. *Toxicon*, **1**: 49–64
- ENDEAN, R. & RUDKIN, C. (1965): Further studies of the venoms of the Conidae. *Toxicon*, **2**: 225–249
- ENDEAN, R., WILLIAMS, H., GYR, P. & SURRIDGE, J. (1976): Some effects on muscle and nerve of crude venom from the gastropod *Conus striatus*. *Toxicon*, **14**: 267–274
- ESPIRITU, D.J.D., WATKINS, M. DIA-MONJE, V. CARTIER, G.E., CRUZ, L.J., OLIVERA, B.M. (2001): Venomous cone snails: molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon*, **39**: 1899–1916.

- FAINZILBER, M., KOFMAN, O., ZLOTKIN, E., GORDON, D. (1994): A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by aconitoxin that affects sodium channel inactivation in molluscs, and acts as an antagonist in rat brain. *J. Biol. Chem.*, **269**: 2574–2580
- FAINZILBER, M., LODDER, J.C., KITS, K.S., KOFMAN, O., VINNITSKY, I., VAN RIETSCHOETEN, J., ZLOTKIN, E. & GORDON, D. (1995a): A new conotoxin affecting sodium current inactivation interacts with the δ -conotoxin receptor site. *J. Biol. Sci.*, **270**: 1123–1129
- FAINZILBER, M., NAKAMURA, T., GAATHON, A., LODDER, J.C., KITS, K.S., BURLINGAME, A.L. & ZLOTKIN, E. (1995b): A New Cysteine Framework in Sodium Channel Blocking Conotoxins. *Biochemistry*, **34**: 8649–8656
- FAN, C.H., CHEN, X.K., ZHANG, C., WANG, L.X., DUAN, K.L., HE, L.L. CAO, Y., LIU, S.Y., ZHONG, M.N., ULENS, C., TYTGAT, J., CHEN, J.S., CHI, C.W. & ZHOU, Z. (2003): A Novel Conotoxin from *Conus betulinus*, κ -BtX, unique in Cysteine Pattern and in Function as a Specific BK Channel Modulator. *J. Biol. Chem.* **278**: 12624-12633
- FITCH, W.M. (1971): Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, **20**: 406–416
- FLECKER, H. (1936): Cone shell mollusc poisoning, with report of a fatal case. *Med. J. Aust.*, **1**: 464–466
- FORSBERGH, E.D. (1969): On the climatology, oceanography and fisheries of the Panama Bight. *Inter-Amer. Trop. Tuna Comm.* **14**: 49-259
- FRANK, P.W. (1969): Growth Rates and Longevity of Some Gastropod Mollusks on the Coral Reef at Heron Island. *Oecologia* **2**: 232-250
- FROHMAN, M.A., DUSH, M.K. & MARTIN, G.R. (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 8998-9002
- FUTUYMA, D.J. (1996): Evolutionary Biology. *Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts, USA*.
- GADGIL, M. & BOSSERT, W. (1970): Life history consequences of natural selection. *Am. Nat.* **104**: 1-24
- GATESY, J., MILINKOVITCH, M., WADDELL, V., & STANHOPE, M. (1999): Stability of cladistic relationships between Cetacea and higher level artiodactyl taxa. *Syst. Biol.*, **48**: 6–20
- GATTENLOEHNER, S., VINCENT, A., LEUSCHNER, I., TZARTOS, S., MÜLLER-HERMELINK, H.K., KIRCHNER, T., MARX A. (1998) The fetal form of the acetylcholine receptor distinguished rhabdomyosarcomas from other childhood tumors. *Am. J. Pathol.* **152**:437–444.
- GATTENLOEHNER, S., DOCKHORN-DWORNICZAK, B., LEUSCHNER, I., VINCENT, A., MÜLLER-HERMELINK, H.K., MARX, A. (1999) A comparison of MyoD1 and fetal acetylcholine receptor expression in childhood tumors and normal tissues: implications for the molecular diagnosis of minimal disease in rhabdomyosarcomas. *J Mol Diagn* **1**:23–31.

- GLYNN, P.W. (1973): Ecology of a Caribbean Coral Reef. The *Porites* Reef-Flat Biotope: Part II. Plankton Community with Evidence for Depletion. *Mar. Biol.* **22**: 1-21
- GLYNN, P.W. (1977): Coral growth in upwelling and non-upwelling areas off the Pacific coast of Panama. *J. Mar. Res.* **35**: 567-587
- GLYNN, P.W. & COLGAN, M.W. (1992): Sporadic Disturbances in Fluctuating Coral Reef Environments: El Niño and Coral Reef Development in the Eastern Pacific. *Amer. Zool.* **32**: 707-718
- GRAY, W.R., LUQUE, A., OLIVERA, B.M., BARRETT, J. & CRUZ, L.J. (1981): Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *J. Biol. Chem.*, **256**: 4734-4740
- GRAY, W.R., OLIVERA, B.M. & CRUZ, L.J. (1988): Peptide toxins from venomous *Conus* snails. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**: 665-700
- GRAYBAEL, A. (1998): Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Syst. Biol.*, **47**: 9-17
- HAACK, J.A., RIVIER, J., PARKS, T.N., MENA, E.E., CRUZ, L.J. & OLIVERA, B.M. (1990): Conantokin-T. A γ -Carboxyglutamate containing peptide with N-Methyl-D-Aspartate antagonist activity. *J. Biol. Chem.*, **265**: 6025-6029
- HAHIN, R., WANG, G.K., STRICHARTZ, G.R., SCHMIDT, J. & SHAPIRO, B.I. (1981): Modification of sodium conductance kinetics by venom of the marine mollusc *Conus striatus*. *Biophys. J.*, **33**: 124a
- HALLOCK, P. & SCHLAGER, W. (1986): Nutrient excess and the demise of coral reefs and carbonate platforms. *Palaios* **1**: 389-398
- HAN, Y., HUANG, F., JIANG, H., LIU, L., WANG, Q., WANG, Y., SHAO, X., CHI, C., DU, W., & WANG, C. (2008): Purification and structural characterization of a D-amino acid-containing conopeptide, conomorphin, from *Conus marmoreus*. *FEBS Letters*, **275**: 1976-1987
- HANSSON, K., FURIE, B., FURIE, B.C., STENFLO, J. (2004) Isolation and characterization of three novel Gla-containing *Conus marmoreus* venom peptides, one with a novel cysteine pattern. *Biochem Biophys Res Commun* **319**:1081-1087
- HARASEWYCH, M.G., ADAMKEWICZ, S.L., BLAKE, J.A., SAUDEK, D., SPRIGGS, T. & BULT, C.J. (1997): Neogastropod phylogeny: A molecular perspective. *J. Moll. Stud.*, **63**: 327-351
- HARDIN, G. (1960): The competitive exclusion principle. *Science* **131**: 1292-1297
- HASSON, A., SHON, K.J., OLIVERA, B.M. & SPIRA, M.E. (1995): Alterations of voltage-activated sodium current by a novel conotoxin from the venom of *Conus gloriamaris*. *J. Neurophys.*, **73**: 1295-1302
- HAUG, G.H. & TIEDEMANN, R (1998): Effect of the formation of the Isthmus of Panama on Atlantic Ocean thermohaline circulation. *Nature* **393**: 673-676
- HEADING, C. (1999): Zirkontide. *Curr. Opin. CPNS Invest. Drugs.*, **1**: 153-166

- HERALDE III, F.M., IMPERIAL, J., BANDYOPADHYAY, P.K., OLIVERA, B.M., CONCEPCION, G.P., SANTOS, A.D. (2008): A rapidly diverging superfamily of peptide toxins in venomous *Gemmula* species. *Toxicon* **51**: 890-897
- HERMITTE, L.D.C. (1946): Venomous marine molluscs of the genus *Conus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **6**: 485–511
- HILLYARD, D.R., MONJE, V.D., MINTZ, I.M., BEAN, B.P., NADASDI, L., RAMACHANDRAN, J., MILJANICH, G., AZIMI-ZOONOOZ, A., MCINTOSH, J.M., CRUZ, L.J., IMPERIAL, J.S. & OLIVERA, B.M. (1992): A new *Conus* peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron* **9**: 69-77
- HOPKINS, C., GRILLEY, M., MILLER, C., SHON, K.J., CRUZ, L.J., GRAY, W.R., DYKERT, J., RIVIER, J., YOSHIKAMI, D. AND OLIVERA, B.M. (1995) A new family of *Conus* peptides targeted to the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.*, **270**: 22361–22367
- HOUCK, M.A., CLARK, J.B., PETERSON, K.P, KIDWELL, M.G. (1991): Possible Horizontal Transfer of *Drosophila* Genes by the Mite *Proctolaelaps regalis*. *Science*, **253**: 1125-1129
- HU, L. Y., RYDER, T. R., RAFFERTY, M. F., FENG, M. R., LOTARSKI, S. M., ROCK, D. M., SINZ, M., STOEHR, S. J., TAYLOR, C. P., WEBER, M. L., BOWERSOX, S. S., MILJANICH, G. P., MILLERMAN, E., WANG, Y. X., & SZOKE, B. G. (1999) Synthesis of a Series of 4-Benzyloxylaniline Analogues as Neuronal N-Type Calcium Channel Blockers with Improved Anticonvulsant and Analgesic Properties. *J. Med.Chem.* **42**: 4239–4249
- HUELSENBECK, J. P. (1995): Performance of phylogenetic methods in simulation. *Syst. Biol.*, **44**: 17–48
- IMPERIAL, J. S., BANSAL, P. S., ALEWOOD, P. F., DALY, N. L., CRAIK, D. J., SPORNING, A., TERLAU, H., LOPEZ-VERA, E., BANDYOPADHYAY, P. K. & OLIVERA, B. M. (2006): A Novel Conotoxin Inhibitor of Kv1.6 Channel and nAChR Subtypes Defines a New Superfamily of Conotoxins. *Biochemistry* **45**: 8331-8340.
- JACKSON, J.B.C., JUNG, P., COATES, A.G., COLLINS, L.S. (1993): Diversity and Extinction of Tropical American Mollusks and Emergence of the Isthmus of Panama. *Science*. **260**: 1624-1626
- JACOBSEN, R., YOSHIKAMI, D., ELLISON, M., MARTINEZ, J., GRAY, W.R., CARTIER, G.E., SHON, K.J., GROEBE, D.R., ABRAMSON, S.N., OLIVERA, B.M., MCINTOSH, J.M. (1997): Differential targeting of nicotinic acetylcholine receptors by novel α A-conotoxins. *J. Biol. Chem.* **272**: 22531-22537
- JACOBSEN, R.B., JIMENEZ, E.C., DE LA CRUZ, R.G., GRAY, W.R., CRUZ, L.J., & OLIVERA, B.M. (1999) A novel D-leucinecontaining *Conus* peptide: diverse conformational dynamics in the contryphan family. *J. Pept. Res.* **54**, 93–99.
- JACOBSEN, R.B., KOCH, E.D., LANG-MALECKI, B., STOCKER, M., VERHEJ, J., VAN WAGONER R.M. VYAZOVKINA, A., OLIVERA, B. M. & TERLAU, H. (2000) Single amino acid substitutions in κ -conotoxin PVIIA disrupt interaction with the *Shaker* K⁺-channel. *J. Biol. Chem.* **275**: 24639-24644

- JAKUBOWSKI, J.A., KELLEY, W.P, SWEEDLER, J.V., GILLY, W.F.& SCHULZ, J.R. (2005): Intraspecific variation of venom injected by fish-hunting *Conus* snails. *Journal of Experimental Biology* **208**, 2873-2883
- JIMENEZ, E.C., OLIVERA B.M. & CRUZ L.J. (1983): Localization of enzymes and possible toxin precursors in granules from *Conus striatus* venom. *Toxicon Suppl.*, **3**: 199–202
- JIMENEZ, E.C., OLIVERA B.M., GRAY, W.R. & CRUZ L.J. (1996): Contryphan is a D-Tryptophan containing *Conus* peptide. *J Biol Chem.*, **271**: 28002–28005
- JIMENEZ, E.C., CRAIG, A., WATKINS, M., HILLYARD, D.R., GRAY, W.R., GULYAS, J., RIVIER, J.E., CRUZ, L.J. & OLIVERA, B.M. (1997): Bromocontryphan: post-translational bromination of tryptophan. *Biochemistry*, **36**: 989–994
- JIMENEZ, E. C., WATKINS, M., JUSZCZAK, L. J., CRUZ, L. J., & OLIVERA, B. M. (2001) Contryphans from *Conus textile* venom ducts. *Toxicon* **39**, 803–808.
- JIMENEZ, E.C., SHETTY, R.P., LIRAZAN, M., RIVIER, J., WALKER, C., ABOGADIE, F.C., YOSHIKAMI, D., CRUZ, L.J. & OLIVERA, B.M. (2003): Novel excitatory *Conus* peptides define a new conotoxin superfamily. *J Neurochem* **85**, 610–621.
- JOBB, G., VON HAESSELER, A., & STRIMMER, K. (2004). TREEFINDER: A powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol.***4**: 18
- JOHNSON, C.R. & STABLUM, E. (1971): Observations of the feeding behavior of *Conus geographus* (Gastropoda: Toxoglossa). *Pacif. Sci.*, **25**: 109–111
- JOHNSON, K.G., TODD, J.A. & JACKSON, J.B.C. (2007): Coral reef development drives molluscan diversity increase at local and regional scales in the late Neogene and Quaternary of the southwestern Caribbean. *Paleobiology* **33**: 24-52
- JONES, A.K. ELGAR, G., SATTELE, D.B. (2003): The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish *Fugu rubripes*. *Genomics* **82**: 441-451
- KANTOR, Y.I. (1990): Anatomical basis for the origin and evolution of the toxoglossan mode of feeding. *Malacologia*, **32**: 3–18
- KANTOR, Y.I. (2007): How much can *Conus* swallow? Observations on molluscivorous species. *J. Moll. Stud.* **73**: 123-127
- KAUFERSTEIN, S., HUYS, I., LAMTHANH, H., STÖCKLIN, R., SOTTO, F., MENEZ, A., TYTGAT, J., & MEBS, D. (2003): A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels *Toxicon* **42**: 43-52
- KAUFERSTEIN, S., HUYS, I., KUCH, U., MELAUN, C., JAN TYTGAT, J., & MEBS (2004): Novel conopeptides of the I-superfamily occur in several clades of cone snails *Toxicon* **44**: 539-548
- KAUFERSTEIN, S., MELAUN, C., J., & MEBS (2005): Direct cDNA cloning of novel conopeptide precursors of the O-superfamily. *Peptides*. **26**: 361-367.

- KEIGWIN, L.D. JR. (1978): Pliocene closing of the Isthmus of Panama, based on biostratigraphic evidence from nearby Pacific Ocean and Caribbean Sea cores. *Geology*, **6**: 630-634
- KERN, S.E., ALLEN, J., WAGSTAFF, J., SHAFER, S.L., & YAKSH, T. (2007): The Pharmacokinetics of the Conopeptide Contulakin-G (CGX-1160) After Intrathecal Administration: An Analysis of Data from Studies in Beagles *Anesthesia & Analgesia* **104**: 1514-1520
- KILBURN, R. & RIPPEY, E. (1982): Sea Shells of Southern Africa. *Macmillan South Africa, Johannesburg*. 249 S.
- KIM, J. (1996): General inconsistency conditions for maximum parsimony: Effects of branch length an increasing number of taxa. *Syst. Biol.*, **47**: 43–60
- KIM, J.I., TAKAHASHI, M., OGURA, A., KOHNO, T., KUDO, Y. & SATO, K (1994): Hydroxyl group of Tyr13 is essential for the activity of w-conotoxin GVIA, a peptide toxin for N-type calcium channel. *J. Biol. Chem.*, **269**: 23876–23878
- KIRBY, M.J. & JACKSON, J.B.C. (2005): Extinction of a fast-growing oyster and changing ocean circulation in Pliocene tropical America. *Geology*. **32**: 1025-1028
- KLAUBER, L.M. (1968): Rattlesnakes: Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind. *University of California Press, Berkeley*. 1–1533
- KOHN, A.J. (1956): Piscivorous gastropods of the genus *Conus*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **42**: 168–171
- KOHN, A.J. (1959a): The Hawaiian species of *Conus* (Mollusca: Gastropoda). *Pacif. Sci.*, **13**: 368–401
- KOHN, A.J. (1959b): The ecology of *Conus* in Hawaii. *Ecol. Monogr.*, **29**: 47–90
- KOHN, A.J. (1967): Environmental complexity and species diversity in the gastropod genus *Conus* on Indo-West Pacific reef platforms. *Am. Nat.* **101**: 251-259
- KOHN, A.J. (1966): Food specialization in *Conus* in Hawaii and California. *Ecology* **47**: 1041-1043
- KOHN, A.J. (1968): Microhabitats, abundance and food of *Conus* on atoll reefs in the Maldiva and Chagos Islands. *Ecology* **49**: 1046-1061
- KOHN, A.J. (1983a): Microhabitat factors affecting abundance and diversity of *Conus* on coral reefs. *Oecologia*, **60**: 293–301
- KOHN, A.J. (1983b): Feeding biology of gastropods. *Mollusca*, **5**: 1–63
- KOHN, A.J. (1990): Tempo and mode of evolution in Conidae. *Malacologia*, **32**: 55–67
- KOHN, A.J. (1997): Why are coral reef communities so diverse? *In* Marine biodiversity. (ORMOND, R.F.G., GAGE, J.D., ANGEL, M.V. eds.) Cambridge University Press, Cambridge, pp 201–215

- KOHN, A.J. (2001): Maximal species richness in *Conus*: diversity, diet and habitat on reefs of northeast Papua New Guinea. *Coral Reefs*, **20**: 25–38
- KOHN, A.J. (2003): Biology of *Conus* on shores of the Dampier Archipelago, Northwestern Australia. in: WELLS, F.E., WALKER, D.I. & JONES, D.S. (eds) *The marine Flora and Fauna of Dampier, Western Australia*. S. 89-100
- KOHN, A.J. & HUNTER, C. (2001): The feeding process in *Conus imperialis*. *Veliger*, **44**: 232–234
- KOHN, A. J., NYBAKKEN, J. W. (1975). Ecology of *Conus* on eastern Indian Ocean fringing reefs, diversity of species, and resource utilization. *Mar. Biol.* **29**:211-234
- KOHN, A.J. & ORIAN, G.H. (1962): Ecological data in the classification of closely related species. *Syst. Zool.* **11**: 119-127
- KOHN, A.J. & PERRON, F.E. (1994): Life History and Biogeography. Patterns in *Conus*. Oxford Science Publications 106 pp
- KOHN, A.J., MYERS, E.R. & MEENAKSHI, V.R. (1979): Interior remodeling of the shell by a gastropod mollusc. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 3406-3410
- KOHN, A.J., NYBAKKEN, J.W. & MOOL, van, (1972): Radula tooth structure of the gastropod *Conus imperialis*. *Science* **176**: 49–51
- KOHN, A.J., NISHI, M. & PERNET, B. (1999): Snail spears and scimitars: A character analysis of *Conus* radular teeth. *J. Moll. Stud.* **65**: 461-481
- KORN, W. (1994): An attempt in SEM studies of *Conus* egg capsules. *Argonauta*, 8: 1–6
- LEGALL, F., FAVREAU, P., RICHARD, G., BENOIT, E., LETOURNEUX, Y. & MOLGO, J. (1999): Biodiversity of the genus *Conus* (Fleming, 1822): A rich source of bioactive peptides. *Belg. J. Zool.*, **129**: 17–42
- LESSIOS, H.A., KESSING, B.D., WELLINGTON, G.M., GRAYBEAL, A. (1996): Indo-Pacific echinoids in the tropical eastern Pacific. *Coral Reefs* **15**: 133-142
- LESSIOS, H.A., KESSING, B.D., ROBERTSON, D.R. (1998): Massive gene flow across the world's most potent marine biogeographic barrier. *Proc. R. Soc. London. Ser. B.* **265**: 583-588
- LESSIOS, H.A., KANE, J., ROBERTSON, D.R. (2003): Phylogeography of the pantropical sea urchin *Tripneustes*: contrasting patterns of population structure between oceans. *Evolution* **57**: 2026-2036
- LESSIOS, H.A. & ROBERTSON, D.R. (2006): Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the eastern Pacific barrier. *Proc. R. Soc. London. Ser. B.* **273**: 2201-2208
- LEW, M.J., FLINN, J.P., PALLAGHY, P.K., MURPHY, R., WHORLOW, S.L., WRIGHT, C.E., NORTON, R.S. & ANGUS, J.A. (1997): Structure–Function Relationships of ω -Conotoxin GVIA. *J. Biol. Chem.*, **272**: 12014 – 12023

- LEWIS, R.J., NIELSEN, K.J., CRAIK, D.J., LOUGHNAN, M.L., ADAMS, D.A., SHARPE, I.A., LUCHIAN, T., ADAMS, D.J., BOND, T., THOMAS, L., JONES, A., MATHESON, J.L., DRINKWATER, R., ANDREWS, P.R. & ALEWOOD, P.F. (2000): Novel ω -Conotoxins from *Conus catus* discriminate among neuronal calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.*, **275**: 35335 – 35344
- LILTVED, W.R. & MILLARD, V.G. (1982): Conidae of South Africa. *The Standloper* **225**: 1-12
- LIM, C.E., (1969): Identification of the feeding types of the genus *Conus* Linné. *Veliger*, **12**: 160–164
- LIRAZAN, M.B., HOOPER, D., CORPUZ, G.P., RAMILO, C.A., BANDYOPADHYAY, P., CRUZ, L.J., & OLIVERA B.M. (2000): The Spasmodic Peptide Defines a New Conotoxin Superfamily. *Biochemistry*, **39**: 1583-1588
- LIRAZAN, M., JIMENEZ, E.C., GREY CRAIG, A., OLIVERA, B.M., CRUZ, L.J. (2002): Conophysin-R, a *Conus radiatus* venom peptide belonging to the neurophysin family. *Toxicon*, **40**: 901–908
- LIU, H., DE WAARD, M. SCOTT, V.E.S. GURNETT, C.A., LENNON, V.A. & CAMPBELL, K.P. (1996): Identification of Three Subunits of the High Affinity ω -Conotoxin MVIIIC-sensitive Ca^{2+} Channel. *J. Biol. Chem.* **271**: 13804–13810
- LIU, J., WU, Q., PI, C., ZHAO, Y., ZHOU, M., WANG, L., CHEN, S., XU, A., (2007): Isolation and characterization of a T-superfamily conotoxin from *Conus litteratus* with targeting tetrodotoxin-sensitive sodium channels *Peptides* **28**: 2313-2319
- LORENZ, F. (2001): Monograph of the living *Zoila*. *ConchBooks, Hackenheim, Germany* 187 S
- LORENZ, F. (2002): New worldwide Cowries. *ConchBooks, Hackenheim, Germany* 291 S
- LORENZ, F. & HUBERT, A. (2000): A guide to worldwide Cowries. *ConchBooks, Hackenheim, Germany* 291 S
- LOUGHNAN, M., BOND, T., ATKINS, A., CUEVAS, J., ADAMS, D.J. BROXTON, N.M., LIVITT, B.G., DOWN, J.G., JONES, A., ALEWOOD, P.F. & LEWIS, R.J. (1998): α -Conotoxin EpI, a novel sulfated peptide from *Conus episcopatus* that selectively targets neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, **273**: 15667–15674
- LOUGHNAN, M, NICKE, A., JONES, A., SCHROEDER, C.I., NEVIN, S.T., ADAMS, D.J., ALEWOOD, P.F. LEWIS, R.J. (2006): Identification of a Novel Class of Nicotinic Receptor Antagonists. *J. Biol. Chem.*, **281**: 24745–24755
- LUBBERS, N. L., CAMPBELL, T. J., POLAKOWSKI, J. S., BULAJ, G., LAYER, R. T., MOORE, J., GROSS, G. J., & COX, B. F. (2005): Postischemic Administration of CGX-1051, a Peptide from Cone Snail Venom, Reduces Infarct Size in Both Rat and Dog Models of Myocardial Ischemia and Reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **46**, 141–146
- LUO, S., KULAK, J.M., CARTIER, G.E., JACOBSEN, R.B., YOSHIKAMI, D., OLIVERA, B.M., MCINTOSH, J.M. (1998): α -Conotoxin AuIB selectively blocks $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J. Neurosci.*, **18**: 8571–8579

- MAILLO, M., AGUILAR, M.B., LOPÉZ-VERA, E., CRAIG, A.G., BULAJ, G., OLIVERA, B.M., HEIMER DE LA COTERA, E.P. (2002): Conorfamide, a *Conus* venom peptide belonging to the RFamide family of Neuropeptides. *Toxicon* **40**: 401-407
- MASSILIA, G.R, SCHININA, M.E., ASCENZI, P. & POLITICELLI, F. (2001): Contryphan-Vn: A Novel Peptide from the Venom of the Mediterranean Snail *Conus ventricosus*. *Biochem Biophys Res Comm.* **288**: 908-913
- MASSILIA, G.R, ELISEO, T., GROLLEAU, F., LAPIED, B., BARBIER, J., BOURNAUD, R. MOLGÓ, J., CICERO, D.O., PACI, M. SCHININA, M.E. ASCENZI, P.A & POLITICELLI, F. (2003): Contryphan-Vn: a modulator of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Comm.* **303**: 238–246
- MARSCHALL, J, KELLEY, W.P., RUBAKHIN, S.S., BINGHAM, J.P., SWEEDLER, J.V. & GILLY, W.F. (2002): Anatomical Correlates of Venom Production in *Conus californicus*. *Biol. Bull.* **203**: 27-41
- MARTINEZ, J.S., OLIVERA, B.M., GRAY, W.R., GROBE, D.R., ABRAMSON, S.N. & MCINTOSH, J.M. (1995): α -Conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochemistry*, **34**: 14519–14526
- MCCLESKY, E.W., FOX, A.P., FELDMAN, D., CRUZ, L.J., OLIVERA, B.M., TSIEN, R.W. & YOSHIKAMI, D. (1987): Multiple types of calcium channels distinguished by a peptide toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 4327–4331
- MCINTOSH, J.M., CRUZ, L.J., HUNKAPILLER, M.W., GRAY, W.R. & OLIVERA, B.M. (1982): Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**: 329–334
- MCINTOSH, J.M., OLIVERA, B.M., CRUZ, L.J. & GRAY, W.R. (1984): γ -Carboxyglutamate in a Neuroactive Toxin. *J. Biol. Chem.*, **259**: 14343–14346
- MCINTOSH, J.M., OLIVERA, B.M. & CRUZ, L.J. (1999a): *Conus* Peptides as probes for Ion Channels. *Methods in Enzymology*, **294**: 605–624
- MCINTOSH, J.M., SANTOS, A.D. & OLIVERA, B.M. (1999b): *Conus* peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Ann. Rev. Biochem.*, **68**: 59–88
- MCINTOSH, J.M. & JONES, R.M. (2001): Cone venom—from accidental stings to deliberate injection. *Toxicon*, **39**: 1447–1451
- MCINTOSH, J.M., DOWELL, C., WATKINS, M., GARRETT, J.E., YOSHIKAMI, D. & OLIVERA, B.M. (2002): α -Conotoxin GIC from *Conus geographus*, a Novel Peptide Antagonist of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* **277**: 33610–33615
- MCMICHAEL, D.F. (1971): *In Venomous Animals and Their Venoms* (BÜCHERL, E., BUCKLEY, E. eds.) *Academic Press*, London
- MEBS, D. (1989): Gifte im Riff. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*
- MEBS, D. (2000): Gifttiere. 2te Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*

- MEINHARDT, H. (2003): The Algorithmic Beauty of Sea Shells. *Springer, Berlin* 248 S.
- MELAUN, C. (2003): Toxine bei Kegelschnecken der Gattung *Conus*. Hypervariabilität als ökologische Anpassung. *Diplomarbeit an der JLU-Giessen*.
- MELAUN, C. & DORRESTEIJN, A. (2007): The genus *Conus* (Mollusca, Gastropoda) in the Atlantic Ocean. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft. 2007, Köln*
- MELAUN, C., SAUER, J., LORENZ, F. (2004): Convergent or related? Considerations on certain Conidae (Gastropoda: Toxoglossa) from South Africa, Arabia and Australia. *La Conchiglia*. **310**: 27-32
- MEYER, C.P. (2003): Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. *Biol. J. Linn. Soc. London*, **79**: 401–459
- MEYER, C.P. (2004): Toward comprehensiveness: Increased molecular sampling within Cypraeidae and its phylogenetic implication. *Malacologia* **46**: 127-156
- MILES, L.A., DY, C.Y., NIELSEN, J., BARNHAM, K.J., HINDS, M.G., OLIVERA, B.M. BULAJ, G. & NORTON, R.S. (2002): Structure of a Novel P-superfamily Spasmodic Conotoxin Reveals an Inhibitory Cystine Knot Motif. *J. Biol. Chem.* **277**: 43033-43040
- MOCZYDLOWSKI, E., OLIVERA, B.M., GRAY, W.R. & STRICHARTZ, G.R. (1986): Discrimination of muscle and neuronal Na-channel subtypes by binding competition between [³H]saxitoxin and m-conotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**: 5321–5325
- MÖLLER, C. & MARÍ, F. (2007) A vasopressin/oxytocin-related conopeptide with gamma-carboxyglutamate at position 8. *Biochem J.*; **404**:413-419.
- MÖLLER, C., RAHMANKHAH, S., LAUER-FIELDS, J., BUBIS, J., FIELDS, G.B. & MARÍ, F. (2005): A Novel Conotoxin Framework with a Helix-Loop-Helix (Cs α/α) Fold. *Biochemistry*, **44**: 15986-15996
- MÖLLER, C., RAHMANKHAH-DOVELL, S., MELAUN, C., CASTILLO, C., HERNANDEZ, D., MARÍ, F., TYTGAT, J.: F-Superfamily: Structure and diversity of a new framework of conotoxins. *In Preperation*.
- MOTTA, A.J. DA, (1991a): A systematic classification of the gastropod family Conidae at the generic level, *La Conchiglia, Rom*, 44 pp
- MOTTA, A.J. DA, (1991b): A new genus and a new species (Gastropoda: Conidae). *La Conchiglia* **22** (258): 12-15.
- MULLIS, K.B. (1990): The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Birkhäuser, Boston
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.*, **51**: 263–73

- MYERS, R.A., ZAFARALLA, G.C., GRAY, W.R., ABBOTT, J., CRUZ, L.J. & OLIVERA, B.M. (1991): α -Conotoxins, Small Peptide Probes of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochemistry*, **30**: 9370–9377
- MYERS, R.A., CRUZ, L.J., RIVIER, J.E. & OLIVERA, B.M. (1993): *Conus* Peptides as Chemical Probes for Ion Receptors and Ion Channels. *Chem. Rev.*, **93**: 1923–1936
- NARANJO, D. (2002): Inhibition of Single *Shaker* K⁺ Channels by κ -Conotoxin-PVIIA. *Biophysical Journal* **82**: 3003–3011
- NARASIMHAN, L., SINGH, J., HUMBLET, C., GURUPRASAD, K & BLUNDELL, T. (1994): Snail and spider toxins share a similar tertiary structure and ‘cysteine motif’. *Nat. Struct. Biol.*, **1**: 850–852
- NEVIN, S. T., CLARK, R. J., KLIMIS, H., CHRISTIE, M. J., CRAIK, D. J. & ADAMS, D. J. (2007): Are $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptors a Pain Target for α -Conotoxins? *Mol. Pharmacol.* **72**: 1406–1410
- NEWTON, C.R. & GRAHAM, A. (1994): PCR, *Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland*
- NGAI, J., DOWLING, M.M., BUCK, L., AXEL, R. & CHESSE, A (1993): The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell*, **72**: 657–666
- NICKE, A., WONNACOTT, S. & LEWIS, R.J. (2004): α -Conotoxins as tools for the elucidation of structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Eur. J. Biochem.* **271**: 2305-2319
- NIELSEN, D.B., DYKERT, J., RIVIER, J.E. & MCINTOSH, J.M. (1994): Isolation of LYS-Conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail *Conus imperialis*. *Toxicon*, **32**: 845–848
- NIRTHANAN, S., PIL, J., ABDEL-MOTTALEB, Y., SUGAHARA, Y., GOPALAKRISHNAKONE, P., JOSEPH, J. S., SATO, K., AND TYTGAT, J. (2005): Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ -Ktx1.3, a non-toxic homologue of κ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom, *Biochem. Pharmacol.* **69**, 669-678.
- NISHI, M. & KOHN, A.J. (1999): Radular teeth of indo-pacific molluscivorous species of *Conus*: A comparative analysis. *J. Moll. Stud.* **65**: 483-497
- NYBAKKEN, J.W. (1970a): Correlation of radula tooth structure and food habits of three vermivorous species of *Conus*. *Veliger*, **12**: 316–318
- NYBAKKEN, J.W. (1970b): Radular Anatomy and Systematics of the West American Conidae (Mollusca, Gastropoda). *American Museum Novitates* **2414**: 1-30
- NYBAKKEN, J. (1979): Population characteristics and food resource utilization of *Conus* in the Sea of Cortez and West Mexico. *J. moll. Stud.* **45**: 82-97
- NYBAKKEN, J.W. (1990): Ontogenetic change in the *Conus* radula, its form, distribution among the radula types, and significance in systematics and ecology. *Malacologia*, **32**: 35–54

- NYBAKKEN, J. & PERRON, F (1988): Ontogenetic change in the radula of *Conus magus* (Gastropoda). *Mar. Biol.* **98**: 239-242
- O'DEA, A., JACKSON, J.B.C., FORTUNATO, H., SMITH, J.T., D'CROZ, JOHNSON, K.G. & TODD, J.A. (2007): Environmental change preceded Caribbean extinction by 2 million years. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 5501-5506
- OHIZUMI, Y., NAKAMURA, H., KOBAYASHI, J. & CATTERALL, W.A. (1986): Specific inhibition of [³H] saxitoxin binding to skeletal muscle sodium channels by geographutoxin II, a polypeptide channel blocker. *J. Biol. Chem.*, **261**: 6149–6152
- OLIVERA, B.M. (1997): E.E. Just Lecture, 1996. *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of Neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell.*, **8**: 2101–2109
- OLIVERA, B.M. (2002): *Conus* Venom Peptides: Reflections from the Biology of Clades and Species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **33**: 25-47
- OLIVERA, B.M. (2006): *Conus* Peptides: Biodiversity-based Discovery and Exogenomics *J. Biol. Chem.*, **281**: 31173–31177
- OLIVERA, B.M. & CRUZ, L.J. (2001): Conotoxins, in retrospect. *Toxicon*, **39**: 7–14
- OLIVERA, B.M., MCINTOSH, J.M., CRUZ, L.J., LUQUE, F.A. & GRAY, W.R. (1984): Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry*, **23**: 5087–5090
- OLIVERA, B.M., GRAY, W.R., ZEIKUS, R., MCINTOSH, J.M., VARGA, J., RIVIER, J., SANTOS, DE, V. & CRUZ, L.J., (1985a) Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*, **230**:1338-43.
- OLIVERA, B.M., MCINTOSH, J.M., CLARK, C., MIDDLEMAS, D., GRAY, W.R. & CRUZ, L.J., (1985b): A sleeper toxin from *Conus geographus* venom. *Toxicon*, **23**: 277–282
- OLIVERA, B.M., CRUZ, L.J., DE SANTOS, V., LECHÉMINANT, G.W., GRIFFIN, D., ZEIKUS, R., MCINTOSH, M., GALYEAN, R., VARGA, J., GRAY, W.R. & RIVIER, J (1987): Neuronal Calcium Channel Antagonists. Discrimination between Calcium Channel Subtypes Using ω -Conotoxin from *Conus magus* Venom. *Biochemistry*, **26**: 2086 – 2090
- OLIVERA, B.M., MILJANICH, G., RAMACHANDRAN, J. AND ADAMS, M.E. (1994): Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The δ -conotoxins and δ -agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**: 823–867
- OLIVERA, B.M., WALKER, C., CARTIER, G.E., HOOPER, D., SANTOS, A.D., SCHOENFELD, R., SHETTY, R., WATKINS, M., BANDYOPADHYAY, P., HILLYARD, D.R. (1999): Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides: potential evolutionary significance of introns. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA.*, **870**: 223–237
- OLSSON, A.A. (1922): The Miocene of Northern Costa Rica. *Bull. Am. Paleonol.* **9**: 1-168

- PALLAGHY, P.K., NIELSEN, K.J., CRAIK, D.J. & NORTON, R.S. (1994): A common structural motif incorporating a cysteine knot and triple-stranded β -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.*, **3**: 1833–1839
- PALUMBI, S.R. (1996). Nucleic Acids II: the polymerase chain reaction. In HILLIS, D. M., MORITZ, C., MABLE, B. K., editors, Molecular Systematics, second Edition. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts.
- PEILE, A.J. (1939): Radula notes, VIII. *Proc. Malac. Soc. London*, **23**: 348–355
- PENG, C., TANG, S., PI, C., LIU, J., WANG, F., WANG, L., ZHOU, W. & XU, A. (2006): Discovery of a novel class of conotoxin from *Conus litteratus*, lt14a, with a unique cysteine pattern. *Peptides* **27**: 2174-2181.
- PERRON, F.E. (1982): Inter- and intraspecific patterns of reproductive effort in four species of cone shells (*Conus* spp.). *Mar. Biol.* **68**: 161-167
- PETUCH, E.J. (1982): Geographical heterochrony: contemporaneous coexistence of Neogene and Recent molluscan faunas in the Americas. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*. **37**: 277-312
- PETUCH, E.J. (1995): Molluscan Diversity in the Late Neogene of Florida: Evidence for a Two-Stage Mass Extinction. *Science*, **270**: 275-277
- PI, C., LIU, J., PENG, C., LIU, Y., JIANG, X., ZHAO, Y., TANG, S., WANG, L., DONG, M., CHEN, S., XU, A. (2006): Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. *Genomics* **88**: 809-819
- PICCOLI, G. (1984): Paleoeology and Paleobiogeography: An example based on Paleogene shallow benthic molluscs from Venetian region (NE Italy). *Geobios. Mémoire Spécial*. **8**: 341-347
- PINGOUD, A. & URBANKE, C. (1997): Methoden der Biochemie, Walter de Gruyter & Co., Berlin
- PISAREWICZ K., MORA D., PFLUEGER F.C., FIELDS G.B. & MARÍ F. (2005) Polypeptide chains containing D-gammahydroxyvaline. *J Am Chem Soc.* **127**, 6207–6215.
- POSADA, D. & CRANDALL, K.A. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818
- PUTZIER, I. & FRINGS, S. (2002): Vom Jagdgift zur neuen Schmerztherapie: Tiergifte in der biomedizinischen Forschung. *Biologie in unserer Zeit*, **32**: 148–158
- QUEIROZ, DE, A., LAWSON, R., & LEMOS-ESPINAL J. A. (2002): Phylogenetic Relationships of North American Garter Snakes (*Thamnophis*) Based on Four Mitochondrial Genes: How Much DNA Sequence Is Enough? *Mol. Phyl. Evol.*, **22**: 315–329
- RICE, R.D. & HALSTEAD, B.W. (1968): Report of fatal cone shell sting by *Conus geographus* Linnaeus. *Toxicon*, **5**: 223–224

- RIGBY, A.C., LUCAS-MEUNIER, E., KALUME, D.E., CZERWIEC, E., HAMBE, B., DAHLQVIST, I., FOSSIER, P., BAUX, G., ROEPSTORFF, P., BALEJA, J.D., FURIE, B.C., FURIE, B. & STENLO, J. (1999): A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 5758–5763
- RILEY, M.A. (1993): Positive Selection for Colicin Diversity in Bacteria. *Mol. Biol. Evol.*, **10**: 1048–1059
- ROCHA, L.A., ROBERTSON, R.R., ROMAN, J. & BOWEN, B.W. (2005): Ecological speciation in tropical reef fishes. *Proc. R. Soc. B*. **272**: 573-579
- RÓLAN, E. (1993): A hypothesis on the evolution of the radula tooth in the family Conidae. *La Conchiglia*, **25** (269): 42–46
- RÖCKEL, D., KORN, W. KOHN, A.J., 1995: Manual of the living Conidae, Vol. I: Indo-Pacific Region, *Verlag Christa Hemmen, Wiesbaden, Deutschland*
- RYAN, S.G., BUCKWALTER, M.S., LYNCH, J.W., HANDFORD, C.A., SEGURA, L., SHIANG, R., WASMUTH, J.J., CAMPER, S.A., SCHOFIELD, P., O'CONNELL, P. (1994) A missense mutation in the gene encoding the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor in the spasmodic mouse. *Nat. Genet.* **7**:131-135.
- RIGBY, A.C., LUCAS-MEUNIER, E., KALUME, D.E., CZERWIEC, E., HAMBE, B., DAHLQVIST, I., FOSSIER, P., BAUX, G., ROEPSTORFF, P., BALEJA, J.D., FURIE, B.C., FURIE, B., & STENFLO, J. (1999): A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces pre-synaptic Ca²⁺ influx. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 5758–5763.
- SAIKI, R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A. & ARNHEIM N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350–1354
- SAIKI, R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A. & ARNHEIM N. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487–491
- SAITO, T. (1976): Geologic significance of coiling direction in the planktonic Foraminifera *Pullenatina*. *Geology*, **4**: 305-309
- SAITOU, N & NEI, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425
- SANTOS, A.D., MCINTOSH, J.M., HILLYARD, D.R., CRUZ, L.J. & OLIVERA, B.M. (2004): The A-superfamily of Conotoxins. Structural and functional divergence. *J. Biol. Chem.*, **279**: 17596–17606
- SATO, S., NAKAMURA, H., OHIZUMI, Y., KOBAYASHI, J. & HIRATA, Y. (1983): The amino acid sequences of homologous hydroxyproline containing myotoxins from the marine snail *Conus geographus* venom. *FEBS Lett.*, **155**: 277–280
- SAUNDERS, P.R. & WOLFSON, F.H. (1961): Food and feeding behaviour in *Conus californicus* Hinds 1844. *Veliger* **3**: 73-76

- SEMENIUK, V., CHALMER, P.N. & LEPROVOST, I. (1982): The marine environments of the Dampier Archipelago. *Jour. Roy. Soc W. Aus.* **65**: 97-114
- SIMONE, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H. & FLOOK, P. (1994): Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Ent. Soc. Am.*, **87**: 651–701
- SHON, K.J., HASSON, A., SPIRA, M.E., CRUZ, L.J., GRAY, W.R. & OLIVERA, B.M. (1994): δ -Conotoxin GmVIA, a novel Peptide from the Venom of *Conus gloriamaris*. *Biochemistry*, **33**: 11420–11425
- SHON, K.J., GRILLEY, M.M., MARSH, M., YOSHIKAMI, D., HALL, A.R., KURZ, B., GRAY, W.R., IMPERIAL, J.S., HILLYARD, D.R. & OLIVERA, B.M. (1995): Purification, Characterization, Synthesis, and Cloning of the Lockjaw Peptide from *Conus purpurascens* Venom. *Biochemistry*, **34**: 4913–4918
- SHON, K.J., OLIVERA, B.M., WATKINS, M., JACOBSEN, R., GRAY, W.R., FLORESCA, C.Z., CRUZ, L.J., HILLYARD, D.R., BRING, A., TERLAU, H., YOSHIKAMI, D. (1998a): μ -Conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na⁺ channel subtypes. *J. Neurosci.*, **18**: 4473–4481
- SHON, K.J., STOCKER, M., TERLAU, H., STÜHMER, W., JACOBSEN, R., WALKER, C., GRILLEY, M., HILLYARD, D.R., GRAY, W.R., OLIVERA, B.M. (1998b): κ -Conotoxin PVIIA: a peptide inhibiting the Shaker K⁺ channel. *J. Biol. Chem.*, **273**: 33–38
- SMAYDA, T.J. (1966): A quantitative analysis of the phytoplankton of the Gulf of Panama. III. General ecological conditions and the phytoplankton dynamics at 8° 45'N 79°23'W from November 1954 to May 1957. *Inter-Amer. Trop. Tuna Comm.* **11**: 353-612
- SOKOLOV, E.P. (2000): An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *J. Moll. Stud.* **66**: 573-575
- SPRINGER, M. S., AMRINE, H. M., BURK, A., & STANHOPE, M. J. (1999): Additional support for Afritheria and Peanungulata, the performance of mitochondrial versus nuclear genes, and the impact of data partitions with heterogeneous base composition. *Syst. Biol.*, **48**: 65–75
- SPRINGER, M. S., DEBRY, R. W., DOUADY, C., AMRINE, H. M., MADSEN, O., DE JONG, W. & STANHOPE, M. J. (2001). Mitochondrial Versus Nuclear Gene Sequences in Deep-Level Mammalian Phylogeny Reconstruction. *Mol. Biol. Evol.*, **18**: 132–143
- SRINIVASAN, K. N., SIVARAJA, V., HUYS, I., SASAKI, T., CHENG, B., KUMAR, T. K. S., SATO, K., TYTGAT, J., YU, C., SAN, B. C. C., RANGANATHAN, S., BOWIE, H. J., KINI, R. M., & GOPALAKRISHNAKONE, P. (2002): κ -Hefutoxin-1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function: Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J. Biol. Chem.* **277**, 30040-30047.
- STALCUP, M.G. & METCALF, W.G. (1972): Current measurement in the passage of the Lesser Antilles. *J. Geophys. Res.* **77**: 1032-1049
- STANLEY, S.M. (1984): Temperature and biotic crises in the marine realm. *Geology* **12**: 205-208

- STANLEY, S.M. (1986): Anatomy of a regional mass extinction; Plio-Pleistocene decimation of the western Atlantic bivalve fauna *Palaios* **1**: 17-36.
- STANLEY S.M. & CAMPBELL, L.D. (1981): Neogene mass extinction of western Atlantic mollusks. *Nature*, **293**:457-459
- STEWART, J & GILLY, W.F. (2005): Piscivorous Behaviour of a Temperate Cone Snail, *Conus californicus*. *Biol. Bull.* **209**: 146-153
- STUDIER, J.A. & KEPPLER, K.J. (1988): A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 729-731
- SULLIVAN, S.L., ADAMSON, M.C., RESSLER, K.J., KOZAK, C.A. & BUCK, L. (1996): The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 884–888
- SWOFFORD, D.L., OLSEN, G.J., WADDELL, P.J. & HILLIS, D.M. (1996): Phylogenetic Inference. In *Molecular Systematics* (HILLIS, D.M., MORITZ, C., MABY, B. eds), *Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts*.
- TEICHERT, R.W., RIVIER, J., DYKERT, J., CERVINI, L., GULYAS, J., BULAJ G., ELLISON, M., OLIVERA, B.M. (2004): α A-Conotoxin OIVA defines a new α A-conotoxin subfamily of nicotinic acetylcholine receptor inhibitors. *Toxicon* **44**: 207-214
- TEICHERT, R.W., JIMENEZ, E.C. & OLIVERA B.M. (2005a): α S-Conotoxin RVIIIa: A Structurally Unique Conotoxin That Broadly Targets Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochemistry* **44**: 7897-7902
- TEICHERT, R.W., RIVIER, J., TORRES, J., DYKERT, J., MILLER, C. & OLIVERA, B.M. (2005b): A uniquely selective inhibitor of the mammalian fetal neuromuscular nicotinic receptor. *J. Neurosci.* **25**: 732-736
- TERLAU, H. & OLIVERA, B.M. (2004): *Conus* Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiol. Rev.*, **84**: 41-68
- TERLAU, H., SHON, K.J., GRILLEY, M., STOCKER, M., STÜHMER, W. & OLIVERA, B.M. (1996a): Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature*, **381**: 148–151
- TERLAU, H., STOCKER, M., SHON, K.J., MCINTOSH, J.M. & OLIVERA, B.M. (1996b): μ O-Conotoxin MrVIA inhibits mammalian sodium channels but not through Site I. *J. Neurosci.* **76**: 1423-1429
- TODD, J.A., JACKSON, J.B.C., JOHNSON, K.G., FORTUNATO, H.M., HEITZ, A. ALVAREZ, M. & JUNG, P. (2001): The ecology of extinction: molluscan feeding and faunal turnover in the Caribbean Neogene. *Proc. R. Soc. Lond. B* **269**: 571-577
- VALLEJO, B.J. (2005): Inferring the mode of speciation in Indo-West Pacific *Conus* (Gastropoda: Conidae) *J. Biogeogr.* **32**: 1429-1439
- VERMEIJ, G.H. & PETUCH, E.J. (1986): Differential extinction in tropical American molluscs: endemism, architecture, and the Panama land bridge. *Malacologia* **27**: 29–41.

- VERMEIJ, G.J. & ROSENBERG, G. (1993): Giving and receiving: The tropical Atlantic as donor and recipient for invading species. *Amer. Malac. Bull.* **10**: 181-194
- VERMEIJ, G.J. (1978): Biogeography and Adaption. *in* Patterns of Marine Life. *Harvard University Press, Cambridge*. 332 S.
- VERMEIJ, G.J. (2005): One-way traffic in the western Atlantic: causes and consequences of Miocene to early Pleistocene molluscan invasions in Florida and the Caribbean. *Paleobiology*, **31**: 624-642
- WALKER, C., STEEL, D., JACOBSON, R.B., LIRAZAN, M.B., CRUZ, L.J., HOOPER, D., SHETTY, R., DE LA CRUZ, R.C., NIELSEN, J.S., ZHOU, L., BANDYOPADHYAY, P., CRAIG, A., OLIVERA, B.M. (1999): The T-superfamily of conotoxins. *J. Biol. Chem.*, **274**: 30664–30671
- WANG, Q., JIANG, H., HAN, Y.H., YUAN, D.D., CHI, C.W. (2008): Two different groups of signal sequence in M-superfamily conotoxins. *Toxicon* **51**: 813-822
- WILLIAMS, G.C. (1966): Natural selection, the costs of reproduction and a refinement of Lack's principle. *Am. Nat.* **100**: 687-690
- WILLIS, S & CORTÉS, J. (2001): Mollusks of Manuel Antonio National Park, Pacific Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **49**. Supl. 2: 25-36
- WOLFSON, F.H. (1962): Comparison of two similar species of *Conus* (Gastropoda) from the Gulf of California. Part I: A statistical analysis of some shell characters. *Veliger* **5**: 23-28
- WOODRING, W.P. (1970): Geology and paleontology of Canal Zone and adjoining parts of Panama: Description of Tertiary molluscs (Gastropods: Eulimidae, Marginellidae to Helminthoglyptidae). *US Geological Survey Professional Paper 306-D* 299-452
- WOODWARD, S.R., CRUZ, L.J., OLIVERA, B.M. & HILLYARD, D.R. (1990): Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO Journal*, **9**: 1015–1020
- YUAN, D.D., HAN, Y.H., WANG, C.G., CHI, C.W. (2007): From the identification of gene organization of a conotoxins to the cloning of novel toxins. *Toxicon* **49**: 1135–1149
- ZACHOS, J., PAGANI, M., SLOAN, L., THOMAS, E. & BILLUPS, K. (2001): Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *Science*, **292**: 686-693
- ZAFARALLA, G.C., RAMILO, C., GRAY, W.R., KARLSTROM, R., OLIVERA, B.M. & CRUZ, L.J. (1988): Phylogenetic Specificity of Cholinergic Ligands: α -Conotoxin SI. *Biochemistry*, **27**: 7102–7105
- ZHANG, J., ROSENBERG, H.F. & NEI, M. (1998): Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 3708–3713
- ZHANG, S. J., YANG, X. M., LIU, G. S., COHEN, M. V., PEMBERTON, K., & DOWNEY, J. M. (2003): CGX-1051, A Peptide from *Conus* Snail Venom, Attenuates Infarction in Rabbit Hearts When Administered at Reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **42**: 764–771

7. Abkürzungsverzeichnis

ACH-Rezeptoren	<u>A</u> cetylcholin- <u>R</u> ezeptoren
AMP	<u>A</u> mpicillin
C, Cys	<u>C</u> ystein
CTAB	<u>C</u> etyltrimethylammonium <u>b</u> romid
Cys _x	Cystein an Position x des Moleküls
Cys ^x	Cystein Nummer x des Moleküls
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
dNTP	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleotid <u>t</u> riphosphat
EDTA	ethylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid
µg, mg, g	Microgramm, Milligramm, Gramm
HGn	<u>H</u> auptgruppe n
IPTG	<u>I</u> sopropyl-β-D- <u>t</u> hiogalactosid
kb	<u>K</u> ilobase
LB	<u>l</u> ysogeny <u>b</u> roth
µm, mm, cm	Micrometer, Millimeter, Centimeter
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PMD	<u>p</u> osition of <u>m</u> aximum <u>d</u> iameter
RACE	<u>r</u> apid <u>a</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds
RNA	<u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
rpm	<u>r</u> evolutions per <u>m</u> inute
RD	<u>r</u> elative <u>d</u> iameter
RSH	<u>r</u> elative spire <u>h</u> eight
RW	<u>r</u> elative <u>w</u> eight
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SOC	<u>s</u> uper <u>o</u> ptimal broth plus <u>g</u> lucose
TAE	<u>t</u> ris- <u>a</u> cetate- <u>E</u> DTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D- <u>g</u> alactopyranosid

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie die gute Betreuung dieser Arbeit. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für mich und gab mir während der Gespräche stets neue Anregungen.

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. Bernd Werding für die Begutachtung der Arbeit und die zahlreichen Phylogenie-bezogenen Diskussionen, durch die ich viel von seinem Wissen profitieren konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Schipp möchte ich mich dafür bedanken, dass er seine pharmakologischen Kenntnisse und präparativen Fähigkeiten mit mir geteilt hat.

Herrn Prof. Dr. Frank Marí von der Florida Atlantic University in Boca Raton, Florida danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor während meiner Aufenthalte in seiner Arbeitsgruppe in Florida. Er war darüber hinaus stets an einem Ideenaustausch bezüglich der Conotoxine in theoretischer wie auch praktischer Hinsicht interessiert. Frau Jana Kratzsch und Herrn Dr. Felix Lorenz und danke ich für die sehr freundschaftliche und umfangreiche Hilfe, in jeglicher Hinsicht, die weit über das normale Maß hinausging. Mir ist klar, dass ich nicht immer einfach war, aber ihre Geduld mit mir war beispielhaft, ganz gleich, ob es um das Besorgen von Material oder das Korrekturlesen der Arbeit ging.

Den Herren Dipl. Geol. Hans-Jörg Niederhöfer (Stuttgart), Dr. Dai Herbert, (Pietermaritzburg, Südafrika), Rainer Norpoth (Münster) sowie Dr. Mathias Glaubrecht und Dr. Thomas von Rintelen (Berlin) danke ich für die Bereitstellung von Material. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn William P. Cargile (Woodside, Kalifornien). Ohne seine mannigfaltige Unterstützung wäre diese Arbeit bei weitem nicht so umfangreich geworden. Weiterhin möchte ich mich bei Bill Fenzan, Eric Fritz, Hugh Morrison, Randy Bridges, Danny McBride und Lars Kleineberg bedanken die mich bei der Materialbeschaffung und beim Korrekturlesen unterstützt haben. Auch Chris Meyer (Washington) gilt mein Dank. Er stand mir während der Arbeit mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite, wie auch Doktor Alexandra Hiller.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Dorresteyn und Holz, v.a., Dipl. Biol. Raphael Pajaziti, Dr. Christoph Schaub, Dipl. Biol. Stephanie Herder, Dr. Katrin Thamm, Dipl. Biol. Georg Wolfstetter, PD Dr. Bettina Westermann, Dipl. Biol. Katrin Domsch, Dr. Henrike Schmidtberg und Dr. Andreas Fröbuis möchte ich mich für die angenehme Zeit und freundschaftliche Atmosphäre während der Arbeit bedanken.

Frau Dr. Anne Holz danke ich für die freundschaftliche und kompetente Unterstützung im Labor. Hierbei möchte ich mich auch beim technischen Personal und vor allem

Feinmechanikermeister Jörg Schmandt bedanken, der stets mit der Erstellung „innovativer“ Labor-Gerätschaften behilflich war.

Herrn Dr. Ulrich Kuch mein ganz besonderer Dank im Hinblick auf seine Hilfe bei Problemen mit phylogenetischen Programmen. Das Gleiche gilt für Dipl. Biol. Jan Sauer. Er stand mir stets sehr freundschaftlich mit Rat und Tat in vielerlei Hinsicht zur Seite.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Dietrich Mebs (Frankfurt) danken. Ohne ihn hätte ich die Arbeit nicht beenden können.

Außerdem danke ich meiner Familie, allen voran meinem Vater und meiner Mutter, auch wenn sie den Abschluss der Arbeit nicht mehr erleben durfte. Mein besonderer Dank gilt Kathrin Schäfer für das Korrekturlesen, ihre Geduld, ihr großes Verständnis und ihre moralische Unterstützung im Laufe dieser Arbeit.

Lebenslauf

Christian Melaun

Geburtsdatum: 02.11. 1976

Geburtsort: Frankfurt am Main

Staatsangehörigkeit: deutsch/österreichisch

Familienstand: ledig, keine Kinder

Ausbildung

- | | |
|--------------------|--|
| 13.06.96 | Allgemeine Hochschulreife mit einem Notendurchschnitt von 2,6 |
| 01.10.1997 | Beginn des Studiums der Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen |
| 15.03.2000 | Bestehen der Diplom-Vorprüfung an der Justus-Liebig-Universität Gießen mit „Sehr gut“ |
| 01.07.2000 | Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes |
| 05.02. -25.02.2002 | Ablegen der mündlichen Prüfungen zur Diplom-Hauptprüfung |
| 06.01.03 | Verleihung des akademischen Grades Diplom-Biologe mit der Note „Sehr gut“ and der Justus-Liebig-Universität Gießen |
| seit 01.06.2003 | Beginn der Promotion am Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie |

Gießen, 25.05.2008

Christian Melaun

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen

KAUFERSTEIN, S., HUYS, I., KUCH, U., MELAUN, C., TYTGAT, J., MEBS, D. (2004): Novel conopeptides of the I-superfamily occur in several clades of cone snails. *Toxicon*. **44**(5): 539-548.

MELAUN, C., SAUER, J., LORENZ, F. (2004): Convergent or related? Considerations on certain Conidae (Gastropoda: Toxoglossa) from South Africa, Arabia and Australia. *La Conchiglia*. **310**: 27-32

KAUFERSTEIN, S., MELAUN, C., MEBS, D. (2005).: Direct cDNA cloning of novel conopeptide precursors of the O-superfamily. *Peptides*. **26**(3): 361-367.

KUCH, U., GUMPRECHT, A. & MELAUN, C. (2007): A new species of Temple Viper (*Tropidolaemus* Wagler, 1830) from Sulawesi, Indonesia (Squamata: Viperidae: Crotalinae). *Zootaxa* **1446**: 1-20

MÖLLER, C., RAHMANKHAH-DOVELL, S., MELAUN, C., CASTILLO, C., HERNANDEZ, D., MARÍ, F., TYTGAT, J.: F-Superfamily: Structure and diversity of a new framework of conotoxins. *In Preperation*.

Wissenschaftliche Beiträge – Kongresse und Symposien

KUCH, U., VEY, E., MELAUN, C., MEBS, D.: Unity in diversity? Phylogenetic relationships of the American Milk Snakes (*Lampropeltis triangulum* complex) as inferred from mitochondrial DNA sequence information. *Annual Meeting of The American Society of Ichthyologists and Herpetologists 05-10.07.2001, University Park, Pennsylvania U.S.A.*

KUCH, U., VEY, E., MELAUN, C., MEBS, D.: Molekulare Phylogenie, historische Biogeografie und Taxonomie des *Lampropeltis-triangulum*-Komplexes: Ergebnisse einer Multigenanalyse mitochondrialer DNA-Sequenzen. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Herpetologie und Terrarienkunde, 07-09.09.2001, Landau*.

MELAUN, C.: Kryptische Arten bei Kauri-Verwandten (Cypraeidae & Ovulidae) und Kegelschnecken (Conidae) am Beispiel Südafrika. *Jahrestagung der Friedrich-Held-Gesellschaft 11-13.02.2005, Berlin*.

MELAUN, C., WOLFSTETTER, G. & DORRESTEIJN, A.: Die Gattung *Conus* im Atlantik. *Jahrestagung der Deutschen Malakologischen Gesellschaft, 02-05. 06. 2006, Giessen*

MELAUN, C. & DORRESTEIJN, A.: The genus *Conus* (Mollusca, Gastropoda) in the Atlantic Ocean. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 21-24.09. 2007, Köln*

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die hier vorgelegte Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und mich dabei keiner anderen Mittel, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen, bedient habe.

Giessen, im Mai 2008

Dipl. Biol. Christian Melaun