

**Struktur-/Funktionsbeziehung
rekombinant hergestellter Proteine aus dem Byssusfaden
der Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Bayreuther Graduiertenschule
für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT)
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Michael H. Suhre (M.Sc.)

aus Neufinsing

Bayreuth 2013

Für meine Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2009 bis Mai 2013 in Bayreuth am Lehrstuhl Biomaterialien unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheibel angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	03.06.2013
Zulassung durch das Leitungsgremium:	10.06.2013
Wissenschaftliches Kolloquium:	20.11.2013

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Thomas Scheibel	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Stephan Schwarzinger	(Zweitgutachter)
PD Dr. Stefan Geimer	(Vorsitz)
Prof. Dr. Clemens Steegborn	

Drittgutachter: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Strukturproteine	1
1.2	Muschelbyssus	1
1.2.1	Morphologie und Biogenese.....	1
1.2.2	Mechanische Eigenschaften	4
1.2.3	Komponenten des Muschelbyssus.....	5
1.2.4	Byssuskollagene (PreCols).....	7
1.2.5	Proteine der Fadenmatrix (TMPs, PTMP1).....	9
1.2.6	Protein der Fadenkutikula (Mfp-1).....	11
1.2.7	Proteine des adhäsiven Plaques (Mfps).....	12
1.2.8	Byssuscatechoxidase	14
1.3	Typ-3-Kupferproteine	17
1.4	Von-Willebrand-Faktor Typ A-ähnliche Domänen	20
1.5	Kollagene	22
1.6	Bio-inspirierte Materialien basierend auf Byssusproteinen	24
1.7	Zielsetzung.....	25
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Verwendetes Material.....	27
2.1.1	Chemikalien.....	27
2.1.2	Proteine und Peptide.....	29
2.1.3	Größenstandards und Kits	30
2.1.4	Chromatographiematerialien	31
2.1.5	Sonstiges Material	31
2.1.6	Geräte	32
2.1.7	Computerprogramme und Tools.....	35
2.1.8	Plasmide	37
2.1.9	Vektorkonstrukte	38
2.1.10	Oligonukleotide	39
2.1.11	cDNA-Bank des Muschelfußes	42
2.2	Verwendete Organismen und ihre Kultivierung	42
2.2.1	Stämme	42
2.2.2	Kultivierungsmedien und Antibiotika	43
2.2.3	Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i>	44
2.2.4	Anzucht und Aufbewahrung von <i>P. pastoris</i>	44

2.3	Molekularbiologische Methoden	45
2.3.1	Puffer und Lösungen.....	45
2.3.2	Polymerasekettenreaktion.....	45
2.3.3	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese.....	48
2.3.4	Isolierung und Reinigung von DNA.....	48
2.3.5	Restriktionsverdau von DNA.....	48
2.3.6	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	49
2.3.7	Desoxythymidin-Erweiterung von DNA-Enden (<i>T-tailing</i>).....	49
2.3.8	Ligation von DNA-Enden.....	49
2.3.9	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	50
2.3.10	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	50
2.3.11	Präparation von Plasmid-DNA.....	51
2.3.12	Sequenzierung von DNA.....	51
2.3.13	TA-Klonierung.....	51
2.3.14	Mutagenese.....	52
2.3.15	Transformation von <i>P. pastoris</i>	52
2.3.16	Selektion von <i>P. pastoris</i>	53
2.4	Bioinformatische Methoden	53
2.4.1	Berechnung physikalischer und chemischer Parameter von Proteinen.....	53
2.4.2	Alignment von DNA- und Proteinsequenzen.....	53
2.4.3	Strukturvorhersagen.....	54
2.4.4	Analyse potenzieller posttranslationaler Modifikationen.....	54
2.4.5	Strukturanalysen.....	55
2.5	Präparative Methoden	56
2.5.1	Puffer und Lösungen.....	56
2.5.2	Expressionstests.....	56
2.5.3	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i>	58
2.5.4	Isolierung und Solubilisierung von Inclusion Bodies.....	60
2.5.5	Präparative säulenchromatographische Methoden.....	60
2.5.6	Proteolytische Spaltung des 6xHis-SUMO-Fusionstags.....	63
2.5.7	Dialyse und Ultrafiltration.....	63
2.5.8	Gefriertrocknung und Lagerung von Proteinen.....	64
2.5.9	Lösen gefriergetrockneter Proteine.....	64
2.6	Proteinanalytische Methoden	65
2.6.1	Puffer und Lösungen.....	65
2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	65
2.6.3	Färbung mit Coomassie-Brillantblau.....	66
2.6.4	Silberfärbung.....	66
2.6.5	Immunoblotting (Westernblot).....	67
2.6.6	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	68
2.6.7	Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen mit dem Ellmans-Reagenz.....	68

2.6.8	Markierung freier Sulfhydrylgruppen mit IAEDANS	69
2.6.9	Spaltung von Proteinen durch Proteolyse.....	70
2.6.10	Proteinkristallographie und Strukturbestimmung.....	71
2.7	Spektroskopische Methoden	75
2.7.1	Puffer und Lösungen	75
2.7.2	Massenspektrometrie.....	75
2.7.3	UV/VIS-Absorptionsspektrometrie.....	77
2.7.4	Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie (FT-IR).....	78
2.7.5	Zirkulardichroismusspektroskopie (CD).....	79
2.7.6	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (BIACORE)	81
2.7.7	Statische Lichtstreuung	84
2.8	Mikroskopische Methoden.....	87
2.8.1	Lichtmikroskopie.....	87
2.8.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	87
2.8.3	Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	87
2.8.4	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	88
2.9	Sonstige Methoden	89
2.9.1	Generierung eines Anti-PTMP1-Serums.....	89
2.9.2	Bildung von Kollagenfibrillen.....	89
2.9.3	Statische Kollagenbindungstests (ELISA-ähnlicher Assay)	90
3	Ergebnisse	94
3.1	Bioinformatische Charakterisierung von Muschelbyssusproteinen	94
3.1.1	Evaluierung einer Muschelfuß-cDNA-Bank.....	94
3.1.2	Catecholoxidase.....	95
3.1.3	Proximales Fadenmatrixprotein 1 (PTMP1)	106
3.2	Rekombinante Produktion von Byssusproteinen.....	108
3.2.1	Expressionstests in <i>E. coli</i>	108
3.2.2	Catecholoxidase.....	108
3.2.3	PTMP1.....	110
3.3	Reinigung und Rückfaltung von PTMP1	111
3.3.1	Generierung von PTMP1-Varianten/-Mutanten.....	111
3.3.2	Produktion, Reinigung und Rückfaltung.....	112
3.4	Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von PTMP1	114
3.4.1	Charakterisierung rückgefalteter PTMP1-Formen	114
3.4.2	Strukturbestimmung von PTMP1	123
3.4.3	Strukturelle Unterschiede monomerer PTMP1-Isoformen.....	135
3.4.4	Strukturelle Stabilität von PTMP1	137
3.4.5	Bindung an Kollagen.....	145
3.4.6	Einfluss von PTMP1 auf die Kollagenassemblierung.....	149

4	Diskussion	152
4.1	Byssuscatecholoxidase.....	152
4.2	Struktur-/Funktionsbeziehung von PTMP1	157
4.2.1	Faltungsisoformen.....	157
4.2.2	Struktur und Stabilität von PTMP1	160
4.2.3	Funktionelle Rolle von PTMP1 im Muschelbyssus.....	163
4.3	Ausblick.....	170
5	Zusammenfassung.....	172
6	Summary	174
7	Literatur	176
8	Publikationen.....	193
9	Abkürzungen	194
10	Danksagung	196
11	Erklärung.....	198

1 Einleitung

1.1 Strukturproteine

Von allen in der Natur auftretenden Biopolymeren stellen Proteine die vielseitigsten dar. Dabei besteht ihre Faszination hauptsächlich darin, aus einer relativ beschränkten Auswahl an Grundbausteinen an Komplexität kaum zu übertreffende Makromoleküle zu erzeugen. So ist es möglich, aus den 20 aus dem genetischen Code ableitbaren Aminosäuren mittels einfacher Kondensationsreaktionen Moleküle zu generieren, welche in der Lage sind, nahezu jede biologische Aufgabe zu bewerkstelligen. Neben enzymatischen oder regulativen Funktionen innerhalb biochemischer Stoffwechselwege bilden strukturgebende Aufgaben eine weitere essenzielle Funktion von Proteinen. Diese Strukturproteine finden sich sowohl intrazellulär, z. B. im Cytoskelett oder in Membranen als auch in der extrazellulären Matrix, die zelluläre Systeme miteinander verbindet und Geweben Struktur und Integrität verleiht. Hier bilden Kollagene mit Abstand die quantitativ dominierende Proteinklasse. Faszinierende Beispiele hochspezialisierter extrazellulärer Proteine finden sich bei Arthropoden und Mollusken in Form von Seiden und anderen extrakorporalen Faserproteinen, welche Strukturen bilden, die als Haftapparate, Abseilfäden, zum Beutefang oder zum Schutz der eigenen Nachkommenschaft eingesetzt werden (Scheibel, 2008). Die mechanischen Eigenschaften dieser biologischen Fasern übertreffen die synthetischer Materialien oftmals bei weitem, u. a. dank einer Kombination einer hohen Steifigkeit und gleichzeitiger Elastizität und somit einer außerordentlichen Zähigkeit, d. h. Fähigkeit zur Aufnahme von Energie (Gosline *et al.*, 2002). Interessante Beispiele hochspezialisierter Strukturproteine finden sich im Byssus der Miesmuschel, welcher hinsichtlich seines molekularen Aufbaus im Vergleich z. B. zu den Seiden von Arthropoden bislang weniger erforscht ist.

1.2 Muschelbyssus

1.2.1 Morphologie und Biogenese

Muscheln der Gezeitenzone, insbesondere Miesmuschelarten (Spezies der Gattung *Mytilus*, z. B. *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819), besitzen in Form ihres Byssus (auch als Muschelbart bezeichnet) einen einzigartigen Haftapparat, welcher es ihnen ermöglicht, sich fest an den Untergrund zu haften und somit ein Abdriften effektiv zu verhindern. Der Byssus besteht aus einer Vielzahl einzelner Fäden, welche an einem gemeinsamen Stamm befestigt

sind, der seinerseits mittels einer Wurzel im Muschelgewebe verankert ist (Brown, 1952; Price, 1983). Der Stamm besteht dabei aus einer Reihe ineinander geschichteter Laminae, denen die einzelnen Fäden entspringen (Bairati und Vitellaro Zuccarello, 1974).

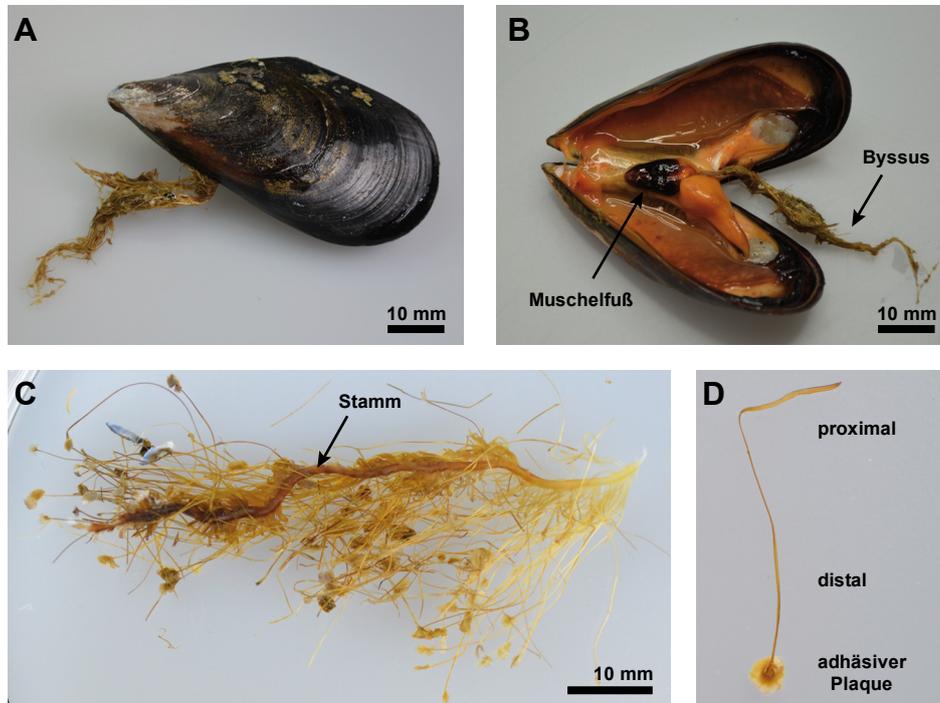


Abbildung 1-1 Der Byssus der Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis*

(A) Miesmuschel (*Mytilus galloprovincialis*) mit Byssus. (B) geöffnete Muschel (Byssus und Muschelfuß sind durch Pfeile markiert). (C) von der Muschel abgetrennter Byssus mit Markierung des Byssusstamms. Durch Reifungsprozesse erscheinen ältere Byssusteile braun (links), während junge Byssusteile eher gelblich gefärbt sind (rechts). (D) einzelner Byssusfaden mit Annotationen der entsprechenden morphologisch unterscheidbaren Regionen

Die Produktion des Byssus erfolgt durch den Muschelfuß (siehe Abbildung 1-1 B), ein spezialisiertes Organ der Muschel, welches mehrere Drüsen enthält, in denen die unterschiedlichen Komponenten des Byssus produziert und sekretiert werden.

Jeder der einzelnen Fäden lässt sich longitudinal in drei morphologisch unterscheidbare Teile untergliedern, einen proximalen (der Muschel nahen) Abschnitt mit gewellter Oberfläche, einen glatten distalen (der Muschel abgewandten) Teil sowie an jedem Fadenende eine verbreiterte Haftscheibe, den adhäsiven Plaque (Abbildung 1-2). Die Bildung einzelner Byssusfäden erfolgt stufenweise nach einem Schema, welches mit technischen Prozessen wie Extrusions- oder Spritzgussverfahren verglichen wurde (Waite, 1992). Dabei werden zunächst die adhäsiven Plaques durch Injektion einer Proteinlösung aus der sog. Phenoldrüse in eine durch den Muschelfuß gebildete Kavität (distale Furche) gebildet, unterstützt durch Sekrete der sog.

Schleimdrüse (Vitellaro-Zuccarello, 1983) sowie spezialisierte Cilien, welche die distale Furche auskleiden (Tamarin *et al.*, 1974). Anschließend werden die Fäden durch analoge Injektion ihrer Komponenten in die ventrale Furche des Muschelfußes erzeugt. Dabei werden die Bestandteile des Fadens von der sog. Kollagendrüse produziert, die Komponenten der Fadenhülle (Kutikula) von der sog. Enzymdrüse (Vitellaro-Zuccarello, 1980, 1981). Nach einer Reifungszeit von wenigen Minuten wird der Faden unter einer Zugbewegung des Fußes aus der ventralen Furche entlassen. Dabei besitzen die Fäden zunächst eine sehr helle Färbung, dunkeln jedoch im Zuge ihrer Reifung stark nach, bis sie schließlich einen bräunlichen Farbton annehmen (vgl. Abbildung 1-1 C). Diese alterungsbedingte Bräunung wurde mit ortho-chinon- (o-chinon-)basierten Gerbungsprozessen (*quinone tanning*, s. u.) in Verbindung gebracht (Brown, 1950a).

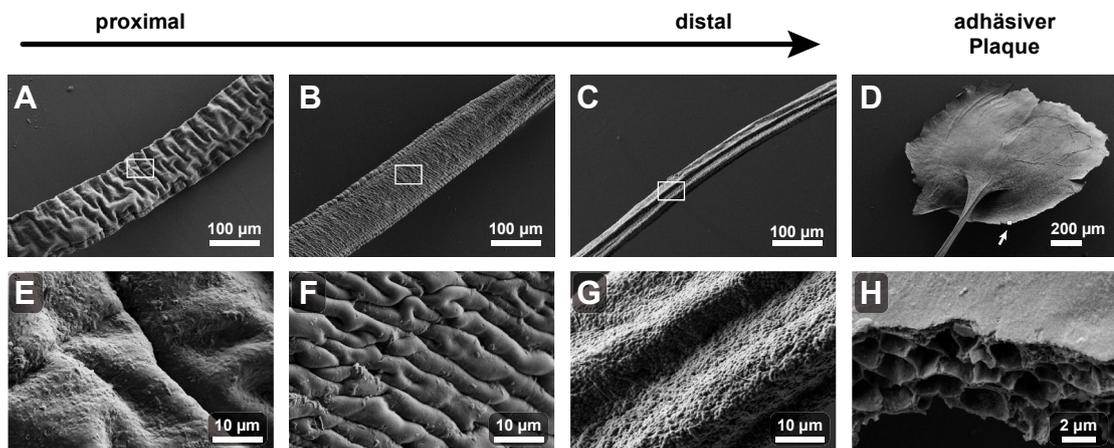


Abbildung 1-2 Morphologie von Byssusfäden

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche der einzelnen Abschnitte eines Byssusfadens. (A)-(D) Übersichten, (E)-(G) Detailaufnahmen. Die Bilder wurden wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben aufgenommen.

Die Kernbereiche der Byssusfäden sowie die inneren Bereiche des Stammes und der Wurzel enthalten Filamente, welche einen besonderen elektronenmikroskopischen Kontrast mit einem elektronendichten äußeren Ring (Durchmesser ~ 7 nm) und elektronendurchlässigem inneren Bereich (Durchmesser 3 nm) besitzen (Bairati und Vitellaro-Zuccarello, 1976). Diese Filamente sind in einer elektronendurchlässigen mikrofilamentären und granulären Matrix eingebettet. Die morphologisch unterschiedlichen proximalen und distalen Fadenteile unterscheiden sich dabei auch auf mikroskopischer Ebene signifikant (Bairati und Vitellaro-Zuccarello, 1976). Im distalen Teil befinden sich die Fibrillen in dicht gepackten Strängen/Bündeln und

erscheinen geradlinig angeordnet (siehe Abbildung 1-3). Zwischen den einzelnen Fibrillenbündeln befindet sich nur ein geringer Anteil an Matrix (ca. vier Gewichtsprozent).

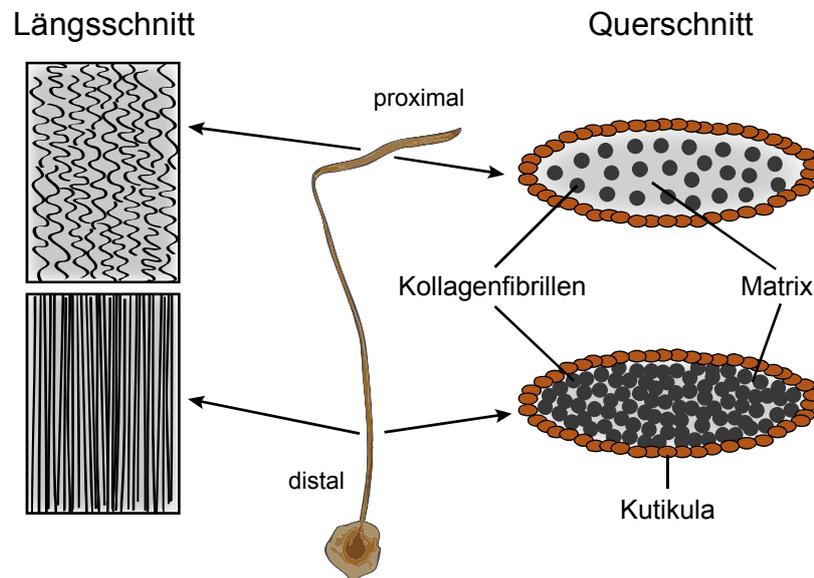


Abbildung 1-3 Verteilung von Kollagenfibrillen und Matrix im Byssusfaden

Schematische Darstellung der Verteilung von fibrillären Kollagenen und der die Fibrillen umgebenden Matrix in den unterschiedlichen Abschnitten des Byssusfadens. Links: Längsschnitte; rechts: Querschnitte. Abbildung nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Bairati und Vitellaro-Zuccarello (Bairati und Vitellaro-Zuccarello, 1976)

Im proximalen Fadenteil zeigen sich die Fibrillen dagegen zwar entlang der Fadenachse ausgerichtet (Bairati und Zuccarello, 1974), erscheinen jedoch wesentlich lockerer gepackt und weisen eine eher sinus- oder wellenförmige Gestalt auf (Bairati und Vitellaro-Zuccarello, 1976; Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 1983). Ferner ist der Matrixanteil hier mit bis zu 34 Gewichtsprozent wesentlich höher (Harrington und Waite, 2008b).

1.2.2 Mechanische Eigenschaften

Der Byssus vermittelt eine starke Anhaftung der Muscheln an den Untergrund, weswegen er ein interessantes Modellsystem für die mechanischen Eigenschaften biologischer Fasern darstellt. Dabei unterscheidet sich die Stärke der Anhaftung bereits zwischen den einzelnen Arten der Gattung *Mytilus* signifikant (Brazeo und Carrington, 2006). Innerhalb einer Art variiert die Stärke der Anhaftung einzelner Individuen mit der Anzahl der gebildeten Fäden, deren Durchmesser und individueller Zähigkeit, die ihrerseits von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren gesteuert werden und z. B. vom Reproduktionszyklus der Muscheln (Babarro und Reiriz, 2010) oder weiterer populationsökologischer Einflüsse abhängen

(Carrington, 2002a). Ferner zeigen sich starke jahreszeitlich bedingte Schwankungen der Anhaftungsstärke (Carrington, 2002b; Moeser und Carrington, 2006).

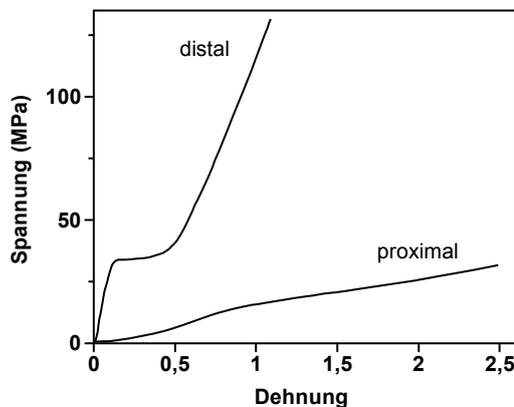


Abbildung 1-4 Mechanische Eigenschaften von Muschelbyssusfäden

Spannungs-Dehnungskurven der beiden morphologisch unterscheidbaren Teile des Byssusfadens (reproduziert nach Bell und Gosline (Bell und Gosline, 1996), mit Genehmigung des Verlags *The Company of Biologists*)

Die morphologisch unterscheidbaren Teile der Byssusfäden weisen auch signifikante Unterschiede in ihren mechanischen Eigenschaften auf (Abbildung 1-4). Während der distale Teil eine hohe Steifigkeit besitzt, zeigt sich der proximale Teil wesentlich elastischer (Bell und Gosline, 1996). Dabei weisen beide Teile isoliert voneinander vergleichbare Zähigkeit (Energieaufnahmefähigkeit) auf (Gosline *et al.*, 2002). Ferner findet ein fließender Übergang zwischen Steifigkeit und Elastizität vom proximalen zum distalen Teil statt. Ein Vorteil dieser graduellen Verteilung mechanischer Eigenschaften ist die Vermeidung von scharfen Übergängen zwischen steifen und weichen Byssusteilen und somit die Reduktion von lateralem Stress, welcher Schwachstellen hervorruft (Waite *et al.*, 2004; Waite *et al.*, 2002). Unterschiede zeigen die einzelnen Teile des Byssusfadens auch bei zyklischer Belastung: während der proximale Fadenteil dabei zu einer zunehmenden Versteifung neigt (Sun *et al.*, 2001), weist der distale Teil einen dramatischen Verlust der Steifigkeit nach der initialen Belastung auf (Vaccaro und Waite, 2001). Interessanterweise besitzt der distale Teil eine Fähigkeit zur „Selbstheilung“, da er in der Lage ist, seine ursprüngliche Steifigkeit zu einem gewissen Grad wieder herzustellen (Vaccaro und Waite, 2001), was mit reversiblen Umlagerungen nicht-kovalenter Bindungen innerhalb des Byssusfadens erklärt werden kann (Harrington *et al.*, 2009; Krauss *et al.*, 2013).

1.2.3 Komponenten des Muschelbyssus

Naturgemäß besitzen Byssusfäden einen hohen Wassergehalt von ~70 Gewichtsprozent (Waite *et al.*, 2002). Der restliche Anteil wird nahezu vollständig von Proteinen eingenommen (>95 %), andere organische (v. a. Kohlenhydrate aus Glykoproteinen) sowie anorganische Anteile (z. B. Metallionen) leisten nur einen geringen Gewichtsbeitrag (<5 %). Aminosäure-

analysen einzelner Fadenabschnitte zeigen eine graduelle Verteilung der Byssusproteine (Mascolo und Waite, 1986), weswegen die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der Byssusteile einzelnen graduell verteilten Proteinen zugeordnet wurden (Harrington und Waite, 2008b; Qin und Waite, 1995). Über Struktur und Funktion einzelner Byssusproteine existieren insgesamt nur wenige Daten, da sich diese aufgrund eines hohen Grades an kovalenter Quervernetzung nur schwer bzw. mittels destruktiver Methoden (z. B. Proteolyse) aus den Byssusfäden extrahieren lassen (Benedict und Waite, 1986). Eine grobe Zuweisung von Proteinklassen nach den in den einzelnen Byssusfadenteilen dominierenden Sekundärstrukturelementen ließ sich mittels Röntgenbeugungsstudien, *in situ*-Raman- oder Festphasen-NMR-Spektroskopie an den Fäden treffen (Hagenau *et al.*, 2009; Harrington *et al.*, 2009; Mercer, 1952; Rudall, 1955). Die Identifizierung aller bisher bekannten Byssusproteine bzw. ihrer Primärstrukturen wurde jedoch durch eine Kombination proteinanalytischer und molekularbiologischer Methoden erreicht. Eine gängige Methode zur Gewinnung von Byssusproteinen stellt dabei deren Isolierung aus Drüsen- oder Muschelfußhomogenisaten sowie aus Drüsensekreten dar, welche u. a. durch die Injektion von Kaliumchlorid in den Muschelfuß stimuliert werden können (Tamarin *et al.*, 1976). Aus diesen Homogenisaten bzw. Sekreten können die Proteine durch selektive Präzipitation oder mittels chromatographischer Methoden gereinigt und im Anschluss daran Teile deren Sequenzen mittels Massenspektrometrie oder Peptidsequenzierung bestimmt werden. Diese Teilsequenzen wurden dazu verwendet, die vollständigen Sequenzen der Byssusproteine über deren zugehörige komplementäre DNA (cDNA) zu ermitteln. Dabei wurden cDNA-Banken des Muschelfußes eingesetzt, in dem prinzipiell alle an der Biogenese des Byssus beteiligten Gene exprimiert sein sollten (Hagenau *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Durch bioinformatische Analysen solcher cDNA-Banken konnten einige der Sequenzen von Byssusproteinen direkt ermittelt und die entsprechenden Proteine in der Folge experimentell im Byssus nachgewiesen werden (Coyne *et al.*, 1997; Coyne und Waite, 2000; Inoue *et al.*, 1996a; Qin und Waite, 1998). Alternativ dazu wurden mittels PCR- oder Hybridisierungssonden, die nach den beschriebenen Analysen von Teilsequenzen der Byssusproteine entwickelt wurden, die zugehörigen cDNA-Sequenzen einiger Byssusproteine ermittelt (Filpula *et al.*, 1990; Inoue und Odo, 1994; Inoue *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 1996a; Sagert und Waite, 2009; Sun *et al.*, 2002; Waite und Qin, 2001; Zhao und Waite, 2006a, b). Basierend auf den vollständigen Sequenzen der Byssusproteine wurden verschiedene Variationen wie Spleißvarianten, Polymorphismen bzw. Isoformen detektiert sowie mit entsprechenden Sequenzen Homologe anderer Spezies identifiziert (Lucas *et al.*, 2002).

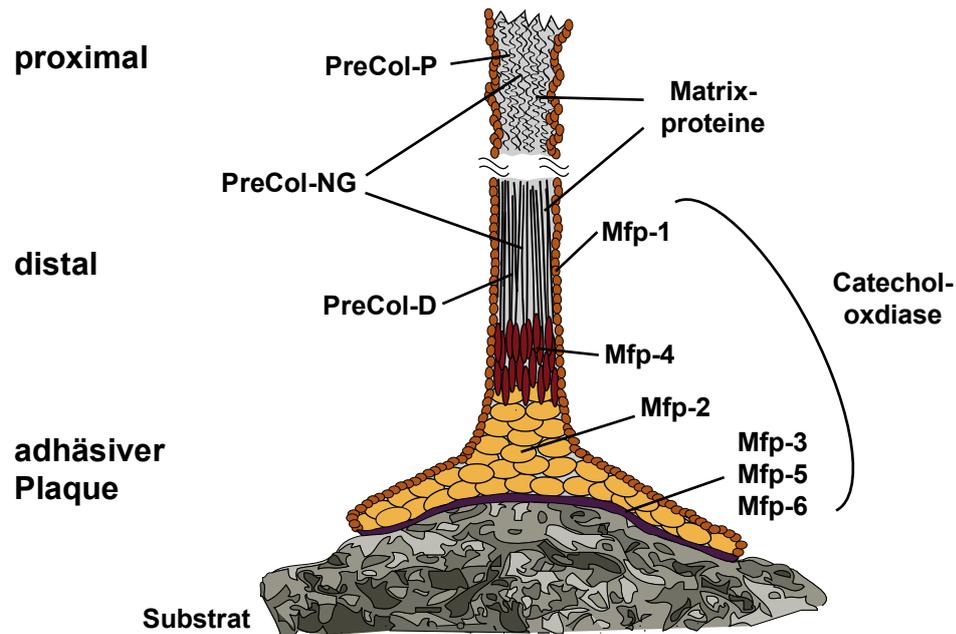


Abbildung 1-5 Die Proteine des Muschelbyssusfadens

Schematische Darstellung der Proteine in den einzelnen Abschnitten des Byssusfadens

Bislang wurden elf unterschiedliche Proteine aus dem Byssus extrahiert und z. T. deren cDNA-Sequenz beschrieben (siehe Abbildung 1-5). Diese lassen sich in vier Gruppen einteilen: Byssuskollagene (PreCols), Matrixproteine, Muschelfußproteine (Mfps) und die Byssuscatecholoxidase (CO).

1.2.4 Byssuskollagene (PreCols)

Röntgenbeugungsstudien an ganzen Byssusfäden weisen charakteristische Muster auf, weswegen bereits in der Mitte des vergangenen Jahrhunderts die Anwesenheit eines hohen Anteils an Kollagen postuliert wurde (Mercer, 1952; Rudall, 1955). Diese Befunde wurden durch Aminosäureanalysen gestützt, mittels derer in Byssusfäden sowie in sekretorischen Granulae des Muschelfußes ein hoher Anteil an 4-Hydroxyprolin, einer für Kollagen typischen posttranslational modifizierten Aminosäure, detektiert wurde (Bdolah und Keller, 1976; Benedict und Waite, 1986; Pikkarainen *et al.*, 1968; Pujol *et al.*, 1970). Daneben wurden mit unterschiedlichen spektroskopischen Methoden kollagentypische tripelhelikale Strukturen nachgewiesen (Arnold *et al.*, 2012; Hagenau *et al.*, 2011; Hagenau *et al.*, 2009). Aus dem Byssusfaden wurden mittels Pepsinverdau zunächst zwei verschiedene Kollagenfragmente (Col-P und Col-D) mit gradueller Verteilung extrahiert, wobei Col-P hauptsächlich im proximalen, Col-D im distalen Abschnitt detektiert wurde (Qin und Waite, 1995). Im Muschelfuß konnten die

entsprechenden Vorläufer bzw. Volllängenformen dieser Kollagene detektiert werden, die als PreCols bezeichnet wurden (Qin und Waite, 1995). Die mittels der entsprechenden cDNAs ermittelten Aminosäuresequenzen zeigten eine einzigartige molekulare Struktur der Byssuskollagene an. Die zentrale Kollagendomäne der PreCols weicht dabei durch gelegentliche Substitutionen oder Deletionen von einer perfekten Abfolge an kollagentypischen GXY-Motiven ab. Die dadurch verursachten Störungen der regelmäßigen Kollagentripelhelix verleihen diesen Molekülteilen einen gewissen Grad an Flexibilität und ermöglichen eine besondere Anordnung der PreCol-Moleküle in den Fibrillen (Hagenau, 2011; Hassenkam *et al.*, 2004). Die zentrale Kollagendomäne wird von Domänen flankiert, welche für die einzelnen PreCols einzigartige Sequenzen aufweisen. Das im proximalen Teil hauptsächlich auftretende PreCol-P besitzt hier Sequenzen (XGXPG-Motive, X bezeichnet beliebige hydrophobe Aminosäuren), welche elastischen Proteinen wie Elastin, Resilin oder Flagelliformseide ähneln, weswegen für das Protein elastische Eigenschaften postuliert wurden (Coyne *et al.*, 1997). Dagegen zeigt PreCol-D, welches stark im distalen Teil vertreten ist, seidenähnliche Sequenzen (v. a. Polyalanin-Abschnitte), die dem Protein eher Steifigkeit zuweisen (Qin *et al.*, 1997). Diese liegen, analog zu bekannten Strukturproteinen, auch im Byssusfaden in Form antiparalleler β -Faltblätter vor (Arnold *et al.*, 2012; Hagenau *et al.*, 2011). Da die Eigenschaften der Byssuskollagene mit deren Verteilung in den elastischen proximalen und steifen distalen Abschnitten korrelieren, wurden die differenziellen mechanischen Eigenschaften der Byssusteile auf die flankierenden Regionen der entsprechenden PreCols zurückgeführt (Waite *et al.*, 1998). Das dritte bekannte Byssuskollagen stellt PreCol-NG dar, welches, anders als die beiden anderen PreCols, homogen über den gesamten Faden verteilt vorliegt (NG = nicht graduell verteilt) (Qin und Waite, 1998). Die Aminosäuresequenzen der flankierenden Regionen von PreCol-NG ähneln dabei glycinreichen Proteinen, welche in pflanzlichen Zellwänden auftreten (Condit und Meagher, 1986). Diesen Regionen wurde eine Beteiligung an der Elastizität des distalen Teil zugeschrieben (Harrington und Waite, 2007). Neben diesen einzigartigen Sequenzabschnitten zeigen alle PreCols an den jeweiligen Amino- und Carboxytermini Regionen mit zahlreichen Histidinresten sowie einigen Tyrosinen, welche z. T. in zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) oxidiert vorliegen (Qin und Waite, 1995). Aufgrund dieser Aminosäuren wird den His/DOPA-Regionen eine Rolle bei der metallionenvermittelten reversiblen Quervernetzung von PreCol-Molekülen zugewiesen (Waite *et al.*, 2004) und somit auch bei den beobachteten mechanischen Eigenschaften der Byssusfäden, insbesondere der beschriebenen Kapazität zur „Selbsteilung“ (Harrington *et al.*, 2009; Krauss *et al.*, 2013; Vaccaro und Waite, 2001). Daneben bergen DOPA-Reste bzw. deren Oxidationsprodukte

auch die Möglichkeit einer kovalenten Verbindung der PreCol-Moleküle (s. u.), die insgesamt vergleichsweise wenige Cysteinreste für eine Quervernetzung durch Disulfidverbrückung besitzen.

1.2.5 Proteine der Fadenmatrix (TMPs, PTMP1)

Bereits sehr früh wurde neben kollagenartigen Bestandteilen auch die strukturelle und funktionelle bzw. mechanische Beteiligung weiterer Proteine im Byssusfaden postuliert (Rudall, 1955). Da neben den mikroskopisch detektierten fibrillären Komponenten im Byssusfaden auch nichtfibrilläre Bereiche (Matrix) beobachtet werden konnten, wurde den entsprechenden Proteinen die zusammenfassende Bezeichnung Matrixproteine zugewiesen. Die Bedeutung dieser Proteine im Vergleich zu den lasttragenden Kollagenen wird insbesondere im proximalen Abschnitt des Fadens deutlich, in dem sie ca. ein Drittel des gesamten Proteins ausmachen. Da sich Proteine mit nichtdestruktiven Methoden nur marginal aus dem Byssus isolieren lassen, wurden Versuche unternommen, mittels Säure-Harnstoff-Extraktion einzelne nichtfibrilläre Proteinkomponenten bzw. Matrixproteine zu isolieren. Bislang wurden zwei auf diese Weise isolierte Proteine bzw. Proteingruppen beschrieben, die *thread matrix proteins* (TMPs) (Sagert *et al.*, 2006; Sagert und Waite, 2009) und das proximale Fadenmatrixprotein 1 (*proximal thread matrix protein 1*, PTMP1) (Sun *et al.*, 2002).

1.2.5.1 Fadenmatrixproteine (TMPs)

Die TMPs, zunächst als *distal matrix proteins* (DMPs) bezeichnet, wurden nach chromatographischer Reinigung und massenspektrometrischer Analyse detektiert (Sagert *et al.*, 2006; Sagert und Waite, 2009). Ihre Heterogenität wird mutmaßlich durch alternatives Spleißen der entsprechenden mRNA bedingt oder basiert auf Proteolyse von mindestens drei verschiedenen Vorläufer- bzw. Basissequenzen (TMP1, -2, und -3). Die längste detektierte Sequenz stellt dabei TMP-1A (58 kDa) dar. In den Aminosäuresequenzen der TMPs befinden sich eine große Anzahl an Tyrosin-, Asparagin- und Glycinresten, welche zusammen ca. drei Viertel der Proteine ausmachen. Ferner finden sich eine Vielzahl an Asparagin-Glycin-Dipeptiden, die die Proteine höchst anfällig für eine autokatalytische Deamidierungsreaktion machen (Sagert und Waite, 2009). Dabei wurde ein nukleophiler Angriff des Glycin-Stickstoffatoms im Polypeptidrückgrat auf die Seitenkette des vorangehenden Asparaginrests postuliert, welcher nach der Bildung eines zyklischen Succinimids und dessen hydrolytischer Spaltung zur Bildung von Aspartat-Glycin- sowie Isoaspartat-Glycin-Motiven führt. Diese in einem rekombinant hergestellten TMP experimentell nachgewiesene Reaktion führt zu einer hohen

chemischen Instabilität der TMPs, welche mit Alterungs- bzw. Reifungsprozessen des Byssusfadens in Verbindung gebracht wurde (Sagert und Waite, 2009). Für die TMPs wurde eine Rolle bei der Bildung einer viskoelastischen Matrix postuliert, welche die einzelnen Kollagenfibrillen umgibt und diese voneinander isoliert bzw. als Gleit- oder Schmiermittel bei mechanischer Belastung fungiert (Sagert und Waite, 2009).

1.2.5.2 Proximales Fadenmatrixprotein 1 (PTMP1)

PTMP1 wurde erstmals durch direkte Desorptionsionisierung eines proximalen Fadenstücks massenspektrometrisch detektiert, durch Säure-Harnstoff-Extraktion aus frischen Byssusfäden und anschließende Chromatographie gereinigt und charakterisiert (Sun *et al.*, 2002). Nach Proteolyse des gereinigten Proteins, Isolierung und Sequenzierung zweier Peptide wurde ein Satz degenerierter Primer kreiert, mittels welchem die Sequenz von PTMP1 aus einer cDNA-Bank amplifiziert werden konnte. Die daraus ermittelte Aminosäuresequenz von PTMP1 besteht aus zwei zu 46 % identischen Wiederholungen einer ca. 200 Aminosäuren umfassenden Sequenz, welche ca. 50 % Homologie zur Gruppe der Von-Willebrand-Faktor Typ A-ähnlichen Domänen (VWA, s. u.) aufweist. Ferner unterschied sich das aus der Aminosäuresequenz berechnete theoretische Molekulargewicht von PTMP1 (47,5 kDa) vom massenspektrometrisch bestimmten Gewicht des Proteins um 2,4 kDa, welche durch posttranslationale Modifikationen erklärt werden könnten. Tatsächlich konnten im extrahierten Protein Glykane detektiert werden, die jedoch nur einen Teil der entsprechenden Massendifferenz abdeckten, weitere posttranslationale Modifikationen wie Hydroxylierung von Tyrosin oder Prolin, Phosphorylierung etc. wurden aus diesem Grund postuliert, konnten jedoch nicht detektiert werden. In der PTMP1-Sequenz befinden sich zudem sechs Cysteine, die im extrahierten Protein in vollständig disulfidverbrückter Form vorzuliegen scheinen. Ein polyklonales Antiserum gegen das gereinigte PTMP1 wurde zur immunohistochemischen Lokalisierung des Proteins im Byssus eingesetzt, wobei PTMP1 ausschließlich in der Matrix des Fadenkerns im proximalen Abschnitt des Byssusfadens detektiert werden konnte. Ferner zeigte ein polyklonales Antiserum gegen den humanen Von-Willebrand-Faktor Kreuzreaktivität mit PTMP1. Aufgrund der Homologie der PTMP1-Sequenz mit bekannten Kollagen-bindenden Proteinen, wie dem Von-Willebrand-Faktor oder den Integrinen (s. u.), wurde für PTMP1 ebenfalls kollagenbindende Funktion postuliert. Mittels eines *enzyme-linked immuno-sorbent assay*- (ELISA-) ähnlichen Test wurde die Bindung von PTMP1 an immobilisiertes Vertebra-kollagen vom Typ I detektiert (Dissoziationskonstante 0,25 μM). Aufgrund der Zweidomänenarchitektur von PTMP1 sowie seiner Fähigkeit zur Kollagenbindung wurde eine funk-

tionelle Beteiligung als Vermittler und Quervernetzer der Kollagenfibrillen im proximalen Byssusteil postuliert. Wie für andere VWA-Domänen nachgewiesen (Smith *et al.*, 2000), wurde zudem eine Scherabhängigkeit der Quervernetzung postuliert, um den Beitrag von PTMP1 zur beobachteten Versteifung des proximalen Byssusteils bei zyklischer Belastung einzuordnen (Waite *et al.*, 2002). Bei Streckung des proximalen Fadenteils gleiten die PreCol-Fibrillen demnach aneinander vorbei, eine darauf folgende, ggf. metallionenvermittelte Bindung von PTMP1 an die Fibrillen könnte schließlich zu einer stärkeren Quervernetzung und somit Versteifung des Fadens führen.

1.2.6 Protein der Fadenkutikula (Mfp-1)

Da der Byssus fast ausschließlich aus Proteinen aufgebaut ist, wurde postuliert, dass auch die außergewöhnlichen adhäsiven Eigenschaften der Byssusfäden von Proteinen vermittelt werden. Aus diesem Grund wurden adhäsive Plaques und Extrakte der Phenoldrüse, von welcher diese produziert werden, hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung analysiert, wobei u. a. die nicht-kanonische Aminosäure DOPA detektiert werden konnte (Waite und Tanzer, 1980). Das erste Protein, welches aus Drüsenextrakten isoliert werden konnte, wurde zunächst als *polyphenolic protein* bezeichnet (Waite und Tanzer, 1981) und lange Zeit als *glue protein* oder (*mussel*) *adhesive protein* (MAP) bezeichnet (Green *et al.*, 1987; Waite, 1983; Waite *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1989). Erst später stellte sich heraus, dass es sich dabei um das Protein handelte, welches die hauptsächliche Komponente der Kutikula, welche den gesamten Byssusfaden und den adhäsiven Plaque als Schutzschicht umgibt, darstellt und aus diesem Grund eher kohäsive als adhäsive Eigenschaften besitzt (Lin *et al.*, 2007). Mit der Entdeckung weiterer Proteine im Byssus, vor allem im Bereich des adhäsiven Plaques, wurde dem MAP die Bezeichnung Muschelfußprotein 1 (Mfp-1) zugewiesen (Rzepecki *et al.*, 1992). Mfp-1 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa und eine repetitive Struktur mit einigen Dutzend Wiederholungen eines Dekapeptids mit der Konsensussequenz AKPSYPPTYK, sowie teilweise des Hexapeptids AKPTYK oder ein Tetradekapeptid AKPSYPATYPSTYK (Filpula *et al.*, 1990; Holten-Andersen *et al.*, 2009; Inoue und Odo, 1994; Inoue *et al.*, 1996b). Analysen ergaben ferner einen hohen Grad an posttranslationalen Hydroxylierungen innerhalb dieser Sequenzen von Tyrosin zu DOPA bzw. Prolin zu 4-Hydroxyprolin sowie *trans*-2,3-*cis*-3,4-Dihydroxyprolin (Taylor *et al.*, 1994; Waite, 1983; Waite *et al.*, 1985). Der Hydroxylierungsgrad von Mfp-1 hängt stark von der Lokalisierung im Faden ab, da der DOPA-Gehalt im Faden vom proximalen zum distalen Ende kontinuierlich zunimmt (Sun und Waite, 2005). Die Fadenkutikula, die nahezu vollständig aus Mfp-1 besteht, besitzt außergewöhnliche me-

chanische Eigenschaften, da diese eine hohe Härte und Steifigkeit aufweist, jedoch gleichzeitig, ohne größere Risse zu erleiden, bis zu 70 % gedehnt werden kann (Holten-Andersen und Waite, 2008). Ferner besitzt die Kutikula bei Streckungen bis zu 30 % die Fähigkeit zur vollständigen Regeneration („Selbsteilung“). Diese besonderen Eigenschaften werden durch ein Zusammenspiel der mikroskopischen Struktur der Kutikula sowie Interaktionen der Mfp-1-Moleküle bedingt. Innerhalb der Kutikula bildet Mfp-1 Granulae mit Durchmessern unter einem Mikrometer. Diese werden bei Streckung gedehnt, wobei die entsprechende Dehnungsspannung durch reversible Mikrorisse zwischen den Granulae dissipiert wird, ohne dass sich diese zu größeren Schäden ausweiten (Holten-Andersen *et al.*, 2007; Holten-Andersen *et al.*, 2009). Die molekulare Ursache der Härte der Kutikula konnte z. T. durch detektierte DOPA-Fe³⁺-Komplexe (Sever *et al.*, 2004) erklärt werden, welche im Bereich der Granulae gehäuft, zwischen den Granulae jedoch in geringerer Konzentration auftreten (Harrington *et al.*, 2010). Dadurch brechen bei Dehnung diese Komplexe zwischen den Granulae eher auf und führen zu den beobachteten Mikrorissen. Bei Alterungsprozessen der Byssusfäden spielen die DOPA-Reste in Mfp-1 eine entscheidende Rolle, da diese bei Oxidation zu den entsprechenden o-Chinonen die Möglichkeit zur kovalenten Quervernetzung der Proteine liefern (s. u.), was entscheidend zum Kohäsionsverhalten des Proteins beiträgt (Fant *et al.*, 2010).

1.2.7 Proteine des adhäsiven Plaques (Mfps)

Der adhäsive Plaque, welcher die eigentliche Anhaftungsstelle der Byssusfäden repräsentiert und die Interaktionsfläche mit dem Substrat bereitstellt, besteht aus einem Ensemble verschiedener Muschelfußproteine (Mfps), welche in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert wurden (Silverman und Roberto, 2007). Ferner erstrecken sich die Byssuskollagene, insbesondere PreCol-D und -NG aus dem distalen Fadenabschnitt in den adhäsiven Plaque hinein, so dass auch hier teilweise Kollagene nachgewiesen werden konnten (Tamarin *et al.*, 1976). Neben dem in der Plaquekutikula lokalisierten Mfp-1 wurden fünf weitere Mfps im adhäsiven Plaque beschrieben, die entweder kohäsive oder adhäsive Eigenschaften besitzen (Lee *et al.*, 2011).

1.2.7.1 Kohäsive Proteine (Mfp-2, Mfp-4)

Mfp-2 stellt das im adhäsiven Plaque hauptsächlich vorkommende Protein dar (Miki *et al.*, 1996; Rzepecki *et al.*, 1992) und bildet im inneren Bereich eine schaumartige Matrix (siehe Abbildung 1-2 H). Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 45 kDa. Seine Aminosäuresequenz weist elf Wiederholungsmotive auf, die Homologie zum calciumbindenden epi-

dermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) besitzen, wobei allerdings die Aminosäuren, die bei den EGFs die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln, nicht konserviert sind (Inoue *et al.*, 1995). Jede EGF-ähnliche Wiederholungssequenz enthält sechs Cysteine, welche mutmaßlich in drei intramolekularen Disulfidbrücken vorliegen (Hwang *et al.*, 2010). Analog zu Mfp-1 besitzt auch Mfp-2 einen kohäsiven anstatt eines adhäsiven Charakters, da die Interaktion mit mehreren im adhäsiven Plaque auftretenden Proteine durch DOPA-Fe³⁺-Komplexe nachgewiesen werden konnte, jedoch keine Adhäsion auf mineralischen Oberflächen beobachtet wurde (Hwang *et al.*, 2010).

Mfp-4 besitzt ein Molekulargewicht von etwa 93 kDa und wurde bislang nur in einer einzigen Studie beschrieben (Zhao und Waite, 2006b). Seine Sequenz weist im aminoterminalen Bereich 36 histidinreiche Dekapeptidwiederholungen auf, im carboxyterminalen Bereich befinden sich 16 aspartat- und asparaginreiche Undekapeptidwiederholungen. Für die histidinreiche Domäne wurde eine präferenzielle Bindung von Cu²⁺-Ionen beobachtet, wohingegen die DN-reiche Domäne potenziell Ca²⁺ bindet. Aufgrund dieser Zwei-Domänen-Architektur wurde dem Protein eine Rolle als Kohäsionsvermittler zwischen Faden- und Plaqueproteinen zugeschrieben, da die histidinreiche Domäne mit den His/DOPA-Regionen der PreCols und mit den calciumbindenden EGF-ähnlichen Motiven von Mfp-2 interagieren könnte.

1.2.7.2 Adhäsive Proteine (Mfp-3, Mfp-5)

Mfp-3 bezeichnet eine heterogene Gruppe kleiner Proteine mit Molekulargewichten von ca. 6 kDa, welche durch einen hohen Gehalt an DOPA-Resten (~20 Molprozent) charakterisiert sind (Inoue *et al.*, 1996a; Warner und Waite, 1999). Im Gegensatz zu Mfp-1 und Mfp-2 besitzt diese Proteinfamilie keine repetitiven Sequenzen. Zusätzlich zu DOPA wurden weitere posttranslational modifizierte Aminosäuren wie 4-Hydroxyarginin detektiert (Papov *et al.*, 1995). Mfp-3 wurde ausschließlich an der Interaktionsfläche zwischen adhäsivem Plaque und dem Substrat detektiert, weswegen ihm eine Rolle als Adhäsionsvermittler zugewiesen wird (Floriolli *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2006).

Mfp-5, eine Gruppe von Proteinen mit Molekulargewichten von ca. 9,5 kDa, kommt wie Mfp-3 ausschließlich an der Plaque-Substrat-Interaktionsfläche vor (Waite und Qin, 2001). Diese stark geladenen Proteine (>20 Molprozent Lysin oder Arginin) zeichnen sich ferner durch einen außerordentlich hohen Grad an posttranslationalen Modifikationen aus, da sie zu ~30 Molprozent aus DOPA bestehen. Darüber hinaus wurden ~10 Molprozent phosphorylierte Serinreste detektiert, welche den Proteinen zusätzliche Ladungen verleihen. Der Grad an

posttranslationalen Modifikationen erwies sich als variabel, was als Anpassung der Adhäsionseigenschaften an unterschiedliche Oberflächen interpretiert werden kann (Waite und Qin, 2001). Die gemessene Adhäsionsenergie von Mfp-5 gegenüber mineralischen Oberflächen ($-13,7 \text{ MJ m}^{-2}$) übersteigt die von Mfp-3 um den Faktor 4-5, was Mfp-5 zum stärksten je gemessenen Muscheladhäsiv macht (Danner *et al.*, 2012).

1.2.7.3 Redoxmodulatorprotein (Mfp-6)

Wie Mfp-3 und Mfp-5 wurde Mfp-6 ausschließlich an der Plaque-Substrat-Interaktionsfläche detektiert (Zhao und Waite, 2006a). Es besitzt ein Molekulargewicht von 11,6 kDa und, analog zu anderen Mfps, einen hohen Gehalt an Tyrosinen (~ 20 Molprozent). Interessanterweise liegen diese jedoch in Mfp-6 nur zu ca. einem Viertel in zu DOPA oxidierte Form vor. Ferner enthält Mfp-6 elf Cysteine, welche in für extrazelluläre Proteine ungewöhnlicher Weise nur marginal disulfidverbrückt vorliegen. Die somit freien Thiole fungieren als Redoxmodulatoren, um autooxidierte DOPA-Reste von Mfp-3 und Mfp-5 wieder zu reduzieren und somit o-Chinon-vermittelte Quervernetzungen zu inhibieren bzw. DOPA z. B. zur metallionenvermittelte Adhäsion oder Kohäsion zu erhalten (Yu *et al.*, 2011a), womit dieses Protein gewissermaßen einen Gegenspieler der Byssuscatecholoxidase (s. u.) darstellt. In gereiften adhäsiven Plaques können diese Thiole auch ihrerseits an der kovalenten Quervernetzung mittels chinonbasierten Reaktionen beteiligt sein (Yu *et al.*, 2011a; Zhao und Waite, 2006a).

1.2.8 Byssuscatecholoxidase

Während der Reifung von Byssusfäden und der damit einhergehende Bräunung spielt die kovalente Quervernetzung von Byssusproteinen eine zentrale Rolle. Die dabei beteiligten Prozesse werden unter dem Begriff „*quinone tanning*“ (chinonbasierte Gerbung) zusammengefasst (Brown, 1950a), welche einen weitverbreiteten Prozess in Arthropoden und Mollusken darstellt (Brown, 1950a; Dennell, 1949). Im Allgemeinen bezeichnet Gerbung die Einführung zusätzlicher kovalenter oder elektrovalenter Bindungen, welche Strukturproteine bzw. biologische Fasern, Schichten etc. aus diesen Proteinen stabilisieren und so ihre Härte und Steifigkeit erhöhen (Brown, 1950b). Im Byssus tragen diese Prozesse zum einen zur Stabilisierung bzw. Verhärtung der Fäden bei, andererseits könnten auch im Bereich des adhäsiven Plaques kovalente Bindungen mit dem Substrat die Adhäsion verstärken (Lee *et al.*, 2011). Die zugrundeliegenden chemischen Reaktionen basieren auf der Oxidation von Catecholen zu o-Chinonen, die in Anwesenheit von Sauerstoff zu einem geringen Anteil spontan abläuft

(insbesondere unter alkalischen Bedingungen wie im Meerwasser gegeben) oder durch die Aktivität einer Catecholoxidase (CO, EC 1.10.3.1) bedingt ist (Waite, 1990b).

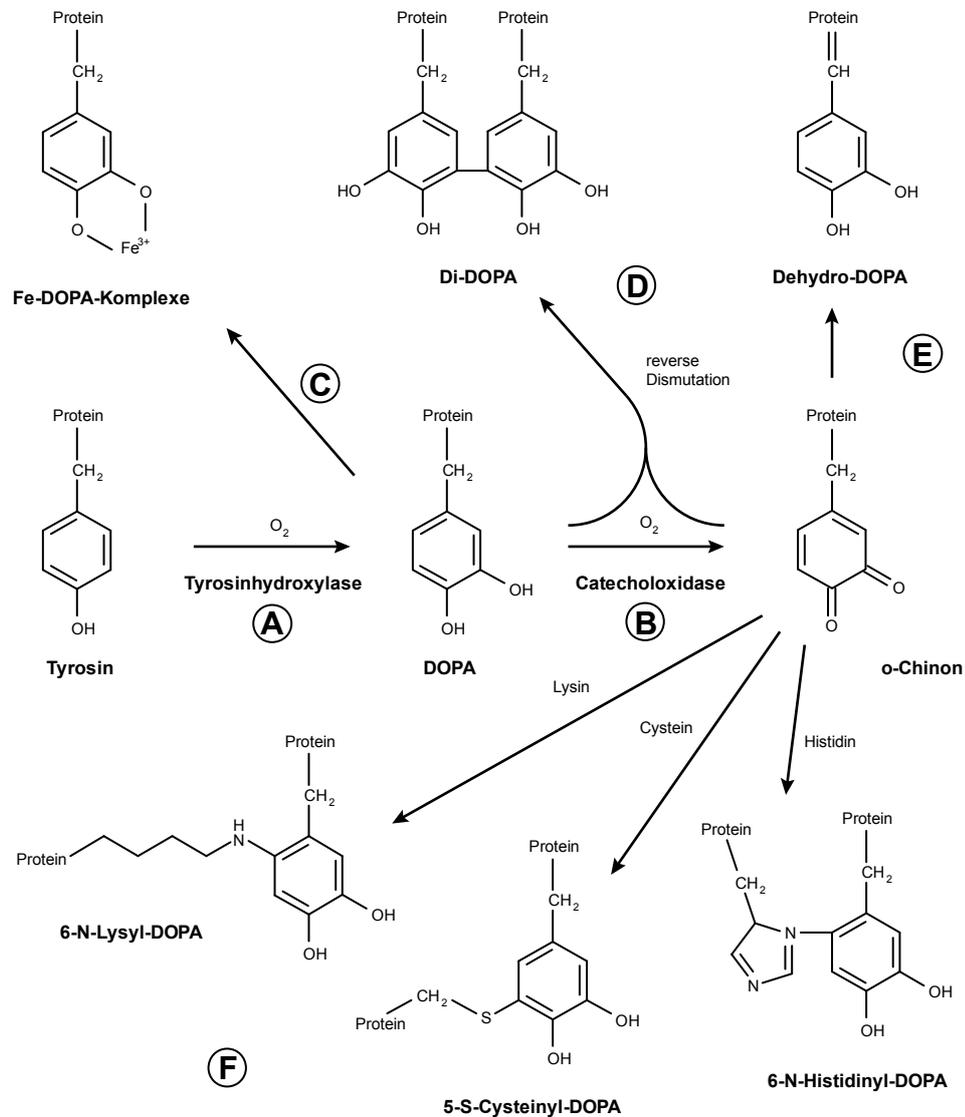


Abbildung 1-6 DOPA-basierte Chemie im Muschelbyssus

Schematische Darstellung der chemischen Reaktion ausgehend von DOPA-Resten im Muschelbyssus. Durch die Aktivität der Enzyme Tyrosinhydroxylase (A) und Catecholoxidase (B) werden Tyrosinreste in Proteinen zu DOPA hydroxyliert bzw. zum entsprechenden o-Chinon oxidiert. Cofaktor beider Reaktionen ist molekularer Sauerstoff. DOPA-Reste sind im Byssus z. T. in Fe-DOPA-Komplexen gebunden (C). Zwischen DOPA und o-Chinon besteht die Möglichkeit einer radikalischen Quervernetzungsreaktion (reverse Dismutation, D). Für das o-Chinon können eine Reihe autokatalytischer Weiterreaktionen formuliert werden, wie die Tautomerisierung zu Dehydro-DOPA (E) oder die intra- bzw. intermolekulare Quervernetzung mittels Michael-artiger Addition unterschiedlicher Aminosäurereste (F). Schema adaptiert nach Sagert et al. (Sagert *et al.*, 2006)

Catechole befinden sich im Byssusfaden in proteingebundener Form von zu DOPA hydroxylierten Tyrosinresten (Vreeland *et al.*, 1998). Die Reaktivität der daraus gebildeten o-Chinone bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten für Gerbungs- bzw. Quervernetzungsreaktionen (siehe

Abbildung 1-6), welche autokatalytisch ablaufen (Smyth, 1954). Einige der entsprechenden Reaktionsprodukte konnten dabei experimentell im Byssus nachgewiesen werden, z. B. Di-DOPA (Burzio und Waite, 2000; Haemers *et al.*, 2003; McDowell *et al.*, 1999), Dehydro-DOPA (Rzepecki *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 2011b) oder 5-S-Cysteinyl-DOPA (Zhao und Waite, 2005).

Neben der Reaktivität von o-Chinonen spielen, wie bereits erwähnt (Kapitel 1.2.6), auch nichtoxidierte DOPA-Reste eine entscheidende Rolle für die Kohäsion von Byssusproteinen, was mit makroskopischen Effekten wie der „Selbstheilung“ verschiedener Byssuskomponenten in Zusammenhang gebracht wurde (Harrington *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2010). Ferner spielen diese Reste eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von Muschelfußproteinen, da diese Reste zur Ausbildung extrem stabiler nichtkovalenter Bindungen befähigt sind. So beträgt die adhäsive Stärke der DOPA-Bindung auf metallische Oberflächen etwa ein Viertel einer kovalenten Bindung (Lee *et al.*, 2006b). Die Bedeutung nichtoxidierter DOPA-Reste bei gleichzeitig ablaufenden oxidativen Gerbungsprozessen setzt eine komplexe Regulation der unterschiedlichen Redoxvorgänge bzw. der daran beteiligten Proteine/Enzyme voraus. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist das kürzlich beschriebene Protein Mfp-6 (s. o.), welches im Bereich der Substratinteraktionsfläche als natürlicher Redoxmodulator fungiert (Yu *et al.*, 2011a).

Die Mechanismen der Bildung von DOPA-Resten aus Tyrosinen in Muschelbyssusproteinen wurden bislang nicht beschrieben. Analog zu bekannten Systemen wird hierbei die Aktivität einer Tyrosinhydroxylase (Tyrosin-3-monooxygenase, EC 1.14.16.2) angenommen, welche unter Beteiligung von Fe^{2+} , Sauerstoff und Tetrahydrobiopterin diese Reaktion katalysiert (Waite, 1990b). Dieses Enzym ist mutmaßlich innerhalb des sekretorischen Wegs aktiv, sollte also im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat sekretorischer Zellen lokalisiert sein (J. H. Waite, persönliche Kommunikation).

Die Aktivität einer Catecholoxidase wurde sowohl in Byssusfäden (Brown, 1952; Waite, 1985) als auch in der Enzymdrüse des Muschelfußes (Banu *et al.*, 1980; Smyth, 1954) nachgewiesen. Aus dem Byssusfaden konnte ferner ein Protein mit einer entsprechenden Aktivität isoliert werden, welches eine hohe Präferenz für Diphenole (z. B. DOPA) und keine Fähigkeit zur Oxidation von Monophenolen wie Tyrosin aufwies (Waite, 1985). Ferner wurde aus dem Muschelfuß ein inaktiver Vorläufer des Enzyms mit einem Molekulargewicht von ~120 kDa isoliert, welcher erst nach proteolytischer Spaltung mit Chymotrypsin Aktivität zeigte. Da das Enzym im Byssusfaden in stark immobilisierter Form vorliegt (Waite, 1985), jedoch einen

breiten Wirkungsradius besitzen muss, wird eine hohe Abundanz (> 10 Gewichtsprozent) der Byssuscatecholoxidase angenommen (Waite, 1990a). Aus diesem Grund wurde neben der enzymatischen Aktivität auch eine strukturelle Beteiligung des Proteins im Byssus postuliert (Waite, 1990b).

Eine cDNA- bzw. Aminosäuresequenz des entsprechenden Enzyms wurde bislang nicht publiziert, ebenso wenig wie strukturelle Daten der isolierten Byssuscatecholoxidase. Stattdessen wurden die entsprechenden Funktionen aufgrund der Homologie aller bekannten Catecholoxidasen bzw. Typ-3-Kupferproteine von analogen Systemen wie den Tyrosinasen oder pflanzlichen Catecholoxidasen abgeleitet.

1.3 Typ-3-Kupferproteine

Catecholoxidasen werden der enzymatischen Gruppe der Oxidoreduktasen zugeordnet und gehören den Typ-3-Kupferproteinen an (Solomon *et al.*, 1996). Diese Proteine sind durch ein binukleares aktives Zentrum charakterisiert, welches aus sechs Histidinresten und zwei koordinierten Kupferionen besteht (siehe Abbildung 1-8). Zwischen diesen beiden Ionen kann ein Sauerstoffmolekül gebunden werden, welches im Falle der Catecholoxidasen zur Oxidation der entsprechenden Substrate benötigt wird. Der postulierte Reaktionsmechanismus sieht drei unterschiedliche Zustände bzw. Redoxformen des aktiven Zentrums vor (siehe Abbildung 1-7 A). Im *oxy*-Zustand liegt ein Sauerstoffatom als Peroxid in Koordination mit zwei Cu^{2+} -Ionen vor. Durch Umsetzung eines DOPA-Moleküls zum o-Chinon wird das Zentrum in die *met*-Form überführt, wobei der Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Unter Reduktion beider Kupferionen wird anschließend ein zweites DOPA-Molekül oxidiert, wonach das aktive Zentrum in der *deoxy*-Form vorliegt. Die Regeneration erfolgt durch erneute Anlagerung eines Sauerstoffmoleküls und Wiederherstellung der *oxy*-Form (Olivares und Solano, 2009).

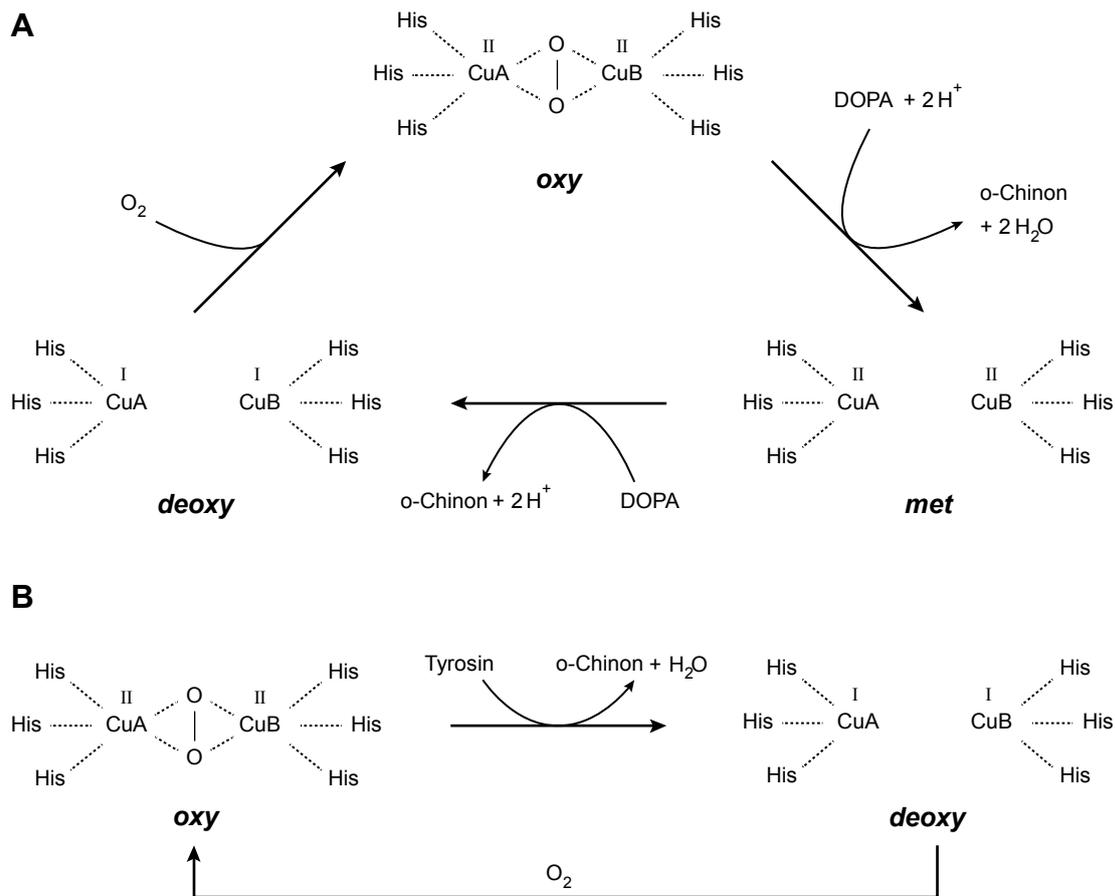


Abbildung 1-7 Reaktionsmechanismen von Catecholoxidasen und Tyrosinasen

(A) Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus von Catecholoxidasen. Nach Bindung je eines DOPA-Moleküls an die *oxy*- sowie *met*-Form des aktiven Zentrums und Umsetzung wird jeweils ein o-Chinon freigesetzt (unter Nettofreisetzung eines Wassermoleküls). Die Reaktivierung der resultierenden *deoxy*-Form zur *oxy*-Form erfolgt durch erneute Bindung eines Sauerstoffmoleküls. (B) Schematische Darstellung der Umsetzung von Tyrosin zum o-Chinon durch Tyrosinasen unter Freisetzung eines Wassermoleküls. Analog zur Catecholoxidasase wird das aktive Zentrum durch Bindung eines Sauerstoffmoleküls an die *deoxy*-Form regeneriert. Mechanismen nach Olivares und Solano (Olivares und Solano, 2009)

Zur Gruppe der Typ-3-Kupferproteine, welche in allen phylogenetischen Königreiche beschrieben wurden (Claus und Decker, 2006; Garcia-Borron und Solano, 2002), werden neben den Catecholoxidasen auch Tyrosinasen gerechnet. Diese besitzen neben der Catecholoxidasaseaktivität (Catecholase, EC 1.10.3.1) auch die Fähigkeit, Monophenole, z. B. Tyrosin, umzusetzen (Monophenolmonooxidase/Cresolase, EC 1.14.18.1, siehe Abbildung 1-7 B). Dabei wird nach Anlagerung des Substrates (z. B. Tyrosin) an die *oxy*-Form des katalytischen Zentrums ein Sauerstoffatom auf den Phenylring übertragen (Olivares und Solano, 2009). Das finale Reaktionsprodukt bei der Umsetzung von Tyrosin stellt dabei stets das o-Chinon dar, der Reaktionsmechanismus lässt die Freisetzung von DOPA nicht zu (Olivares und Solano, 2009). Aus diesem Grund ist in Byssusproteinen für die Bildung von DOPA-Resten aus Tyrosinen die Aktivität einer Tyrosinhydroxylase (s. o.) zwingend notwendig (Waite, 1990b).

Tyrosinasen wurden im Zusammenhang mit einer Vielzahl biologischer Prozesse beschrieben. In Pflanzen sind diese Enzyme an der immunologischen Abwehr sowie an Bräunungsprozessen beteiligt (Cerenius und Söderhäll, 2004). Ähnliche Funktionen erfüllen Tyrosinasen in Säugern, in denen sie an der Synthese von Melanin und somit ebenfalls an Bräunungsprozessen von Haaren und Haut beteiligt sind (Garcia-Borron und Solano, 2002). Auch für Mollusken wurden Proteine beschrieben, welche Tyrosinaseaktivität besitzen bzw. Sequenzhomologie zu bekannten Tyrosinasen aufweisen. Diese stehen ebenfalls im Zusammenhang mit der Melaninsynthese durch das Prophenoloxidasystem, welches ein zentrales Element der Abwehr von Feinden, der Immunabwehr und des Wundheilungssystems dieser Organismen darstellt (Carballal *et al.*, 1997; Coles und Pipe, 1994; Cong *et al.*, 2005; Deaton *et al.*, 1999; Naraoka *et al.*, 2003; Palumbo *et al.*, 1997; Renwranz *et al.*, 1996).

Die dritte Gruppe der Typ-3-Kupferproteine stellen die Hämocyanine dar, die hauptsächlich sauerstofftransportierenden Proteine in der Hämolymphe von Arthropoden und Mollusken (van Holde *et al.*, 2001). Diese sind in ihrer physiologischen Form nicht in der Lage, Substrate umzusetzen, können aber unter bestimmten Bedingungen enzymatisch aktiviert werden (Decker und Rimke, 1998). Die Quartärstrukturen von Tyrosinasen bzw. Catecholoxidase und Hämocyaninen unterscheiden sich stark voneinander. Dabei liegen Hämocyanine stets als Multimere vor, während alle bekannten Tyrosinasen und Catecholoxidasen in monomerer oder dimerer Form vorliegen (Decker und Terwilliger, 2000).

Kristallstrukturen von Tyrosinasen und Hämocyaninen weisen den entsprechenden katalytischen Domänen eine hohe strukturelle Homologie zu (Gaykema *et al.*, 1984; Klabunde *et al.*, 1998; Matoba *et al.*, 2006). Dabei wird das katalytische Zentrum durch ein Arrangement von vier α -Helices gebildet (siehe Abbildung 1-8). Das Kupferzentrum wird von einer hydrophoben Schale umgeben, welche an der Bindung bzw. Orientierung der Substrate beteiligt ist (Garcia-Borron und Solano, 2002). Neben dieser strukturellen Homologie besitzen die Sequenzen dieser Domänen dagegen nur eine geringe Übereinstimmung, die sich auf den Bereich des aktiven Zentrums und der angrenzenden Bereiche beschränkt.

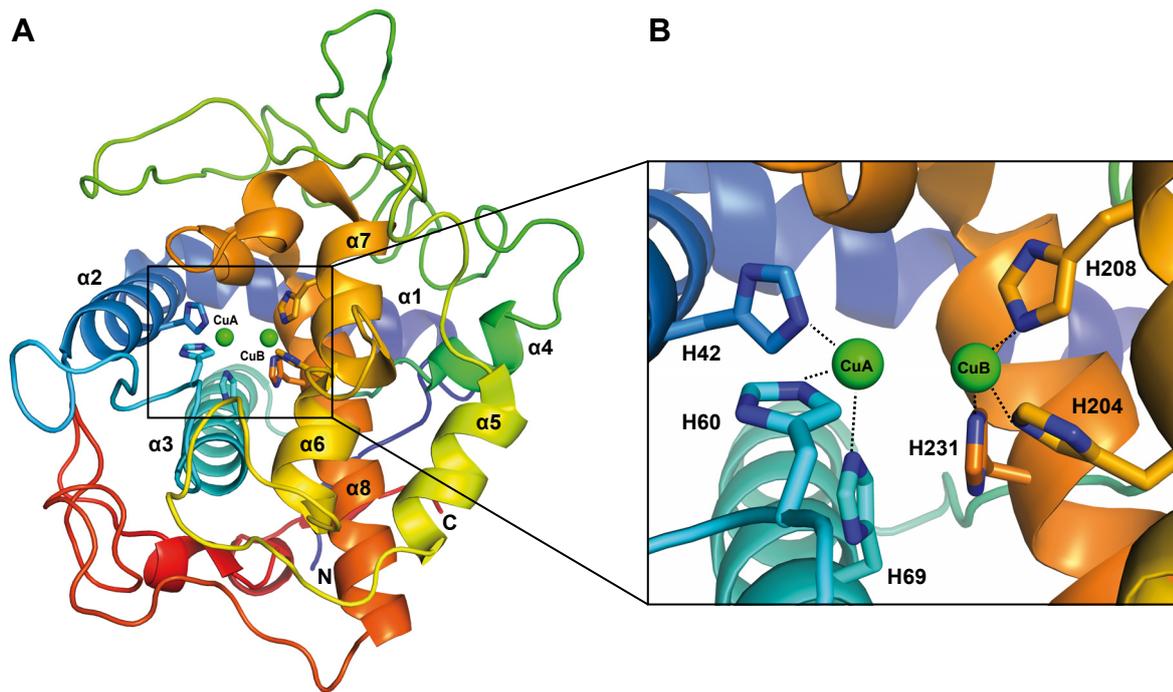


Abbildung 1-8 Kristallstruktur einer bakteriellen Tyrosinase

(A) Kristallstruktur der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* (Sendovski *et al.*, 2011). Abbildung erstellt mit dem Koordinatensatz PDB 3NPY. Blau: Aminoterminus; Rot: Carboxyterminus. Die beiden Kupferionen sind als grüne Kugeln, die entsprechenden an der Kupferbindung beteiligten Histidinreste in Stäbchendarstellung gezeigt. (B) Detailansicht des katalytischen Zentrums mit Annotation der beteiligten Histidinreste

1.4 Von-Willebrand-Faktor Typ A-ähnliche Domänen

Die meisten bekannten Byssusproteine besitzen einzigartige Sequenzen ohne signifikante Homologien zu bekannten Proteinen. Trotzdem finden sich vereinzelt generelle Muster extrazellulärer Proteine, z. B. die tripelhelikale Kollagendomäne der PreCols, sowie die für Mfp-2 beschriebene Homologie zum epidermalen Wachstumsfaktor (Inoue *et al.*, 1995). Ein weiteres Beispiel für die Zuordnung von Byssusproteinen zu Gruppen sequenz- oder strukturhomologer Proteine stellt das Matrixprotein PTMP1 dar, welches zwei Domänen besitzt, die auf Sequenzebene Homologie mit der Gruppe der Von-Willebrand-Faktor Typ A-ähnliche Domänen (VWA-Domänen oder VWA-ähnliche Domänen, PFAM PF00092) zeigen (Sun *et al.*, 2002). Diese VWA-Domänen treten ubiquitär über alle phylogenetischen Königreiche bei sowohl extrazellulären, als auch intrazellulären Proteinen auf, wobei die extrazellulären Formen evolutionär jünger sind (Colombatti *et al.*, 1993). PTMP1 stellt dabei das einzige bislang bekannte Beispiel für ein extrakorporales Strukturprotein mit VWA-Domänen dar. Allein im menschlichen Proteom finden sich 86 Proteine mit insgesamt 134 VWA-Domänen (Whittaker und Hynes, 2002). Ihre Funktionen reichen von intrazellulären Vorgängen wie Signaltrans-

duktion (z. B. Copine) über Intramembranproteine (z. B. Ionenkanäle, Rezeptoren) bis zu extrazellulären Funktionen wie Zelladhäsion (z. B. Integrine, Von-Willebrand-Faktor). Ferner stellen diese viele Bestandteile der ECM dar (z. B. Kollagene, Matriline) oder Teile von Proteaseinhibitoren (z. B. Trypsininhibitor). Eine funktionelle Gemeinsamkeit vieler VWA-Domänen stellt ihre Fähigkeit zur Bindung von Kollagenen dar.

Alle VWA-Domänen besitzen auf Sequenzebene ca. 25 % identische und ca. 50 % ähnliche Aminosäuren. Bekannte Strukturen dieser Gruppe weisen eine klassische Rossmann-Faltung auf, ein generelles Faltungsmuster, welches zunächst für nukleotidbindende Proteine beschrieben wurde (Rossmann und Argos, 1981). Dieses Faltungsmuster besteht aus einem verdrehten innenliegenden parallelen β -Faltblatt, welches von α -Helices umgeben vorliegt. Ein häufig anzutreffendes, jedoch nicht vollständig konserviertes Merkmal von VWA-Domänen stellen zwei Cysteinreste dar, welche an den jeweiligen Domänengrenzen liegen und die Struktur durch eine Disulfidbrücke stabilisieren. Neben einer einheitlichen Faltung besitzen alle VWA-Domänen ein konserviertes diskontinuierliches Sequenzmotiv (DXSXS...T...D, wobei X beliebige Aminosäuren bezeichnet), welches einen potenziell metallionenbindenden Charakter besitzt. Da im Falle der Integrine die Koordination von Metallionen sowie die Bindung von Kollagen mittels dieser Motive nachgewiesen werden konnten, wurden dieses generell als MIDAS-Motive bezeichnet (*metal ion dependent adhesion sites*), obwohl nicht alle bekannten VWA-Domänen Metallionen binden können bzw. diese Stellen nicht generell für die Interaktion mit anderen Makromolekülen dienen, wie im Falle der A3-Domäne des Von-Willebrand-Faktors nachgewiesen wurde (Bienkowska *et al.*, 1997).

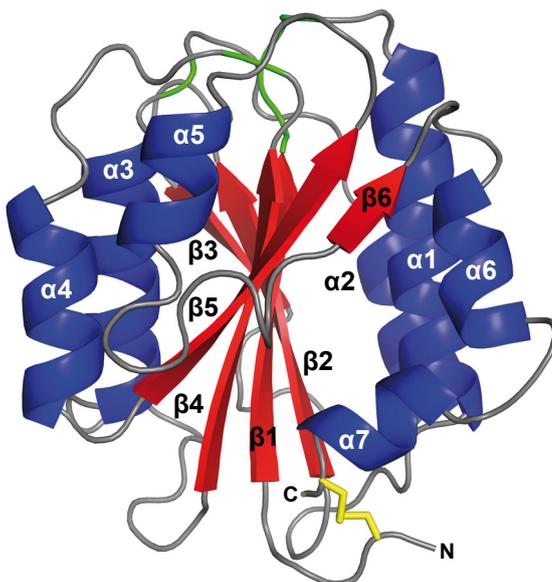


Abbildung 1-9 Struktur von VWA-Domänen

Schematische Darstellung der Kristallstruktur der A3-Domäne des humanen Von-Willebrand-Faktors (PDB 1ATZ) mit Annotationen der Sekundärstrukturelemente (α -Helices blau, β -Faltblätter rot). Die Positionen des MIDAS-Motivs sind grün dargestellt, die Disulfidbrücke gelb. C: Carboxyterminus; N: Aminoterminus

1.5 Kollagene

Kollagene bilden den Hauptanteil aller Strukturproteine der extrazellulären Matrix von Vertebraten, wobei sie die grundlegende lasttragende Rolle in allen Körpergeweben einnehmen (Kadler *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer Beteiligung am Aufbau von Knochen- und Knorpelgewebe stellen dabei fibrilläre Kollagene den größten Massenanteil. Daneben erfüllen nicht-fibrilläre Kollagene, insbesondere im Bereich der Basallamina, wichtige Funktionen, z. B. bei Zell-Zell-Interaktionen. Kollagene stellen eine extrem heterogene Gruppe von Proteinen dar, die hauptsächlich durch die Anwesenheit einer tripelhelikalen Struktur bzw. Domäne charakterisiert sind, welche von einer regelmäßigen Abfolge eines Gly-X-Y-Aminosäuretriplets gebildet wird. X und Y bezeichnen dabei beliebige Aminosäuren mit hoher Präferenz für Prolin, welches in Y-Position häufig posttranslational zu 4-Hydroxyprolin modifiziert vorliegt. Diese spezielle Aminosäureabfolge ermöglicht die Bildung einer stabilen rechtsgängigen Tripelhelix, bei der die drei einzelnen Ketten in linksgängiger polyprolin-II-helikaler Anordnung vorliegen. Die kleinen Glycine der Triplets liegen dabei jeweils im Inneren der Tripelhelix, während die beiden anderen Aminosäuren nach außen gewandt sind (Bella *et al.*, 1994). Neben dieser gemeinsamen tripelhelikalen Domäne besitzen viele Kollagene eine Reihe weiterer Domänen unterschiedlichster Funktionen, welche ihrerseits unterschiedlichen Strukturfamilien wie den bereits beschriebenen VWA-Domänen, Fibronectin III oder Coiled-Coils zugeordnet werden können (Hulmes, 2008). Die einzelnen Prokollagenmoleküle lagern sich intrinsisch zu einer Vielzahl supramolekularer Arrangements zusammen, die in unterschiedlichen hierarchischen Ebenen von flüssigkristallinen über mikrofibrillären Assemblierungsformen bis zu makroskopischen Fasern einnehmen (Ottani *et al.*, 2002). Dabei unterscheiden sich die *in vitro* aus gereinigten Kollagenmolekülen gebildeten Assemblierungsformen signifikant von *in vivo* gebildeten, was eine komplexe Steuerung der Bildung in Geweben durch unterschiedlichste Kontrollmechanismen indiziert (Hulmes, 2002). Neben den klassischen Kollagenen wurden in Vertebraten eine Reihe kollagenähnlicher Proteine detektiert, welche ebenfalls tripelhelikale Regionen besitzen. Kollagene und kollagenähnliche Proteine lassen sich einer Reihe von Subklassen zuordnen (Tabelle 1-1), wobei die genauen Zuordnungen der einzelnen detektierten Moleküle teilweise kontrovers diskutiert werden.

Tabelle 1-1 Zuordnung von Kollagenen und kollagenähnlichen Proteine zu Subklassen (Hulmes, 2008)

Subklasse	Mitglieder (Beispiele)
fibrilläre Kollagene	Kollagen Typ I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
fibrillenassoziierte und verwandte Kollagene	Kollagen Typ IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII (sog. FACIT-Kollagene)
perlenschnurartige Kollagene	Kollagen Typ VI
Basallamina- und assoziierte Kollagene	Kollagen Typ IV, VII, XV, XVIII
kurzkettige Kollagene und verwandte Proteine	Kollagen Typ VIII, X; Komplementfaktor C1q; Emilin 1 und 2; Adiponektin
Transmembrankollagene und kollagenähnliche Transmembranproteine	Kollagen Typ XIII, XVII, XXIII, XXV; Ectodysplasin; Makrophagen-Scavenger-Rezeptoren I-III
Kollektine und Ficoline	Mannanbindeproteine; Surfactantproteine A und D; Conglutinin; Kollektin 43; M- und H-Fikolin
weitere Kollagene und kollagenähnliche Proteine	Emu1; Kollagen Typ XXVI, XXVIII

Für die Integrität von Geweben bzw. den Aufbau der extrazellulären Matrix sind komplexe Wechselwirkungen zwischen Kollagenen und der umgebenden Matrix essenziell, wobei diese meist von kollagenbindenden Matrixproteinen vermittelt werden. Hierzu besitzen Kollagene spezifische Bindestellen für diverse Proteine der extrazellulären Matrix (Sweeney *et al.*, 2008). Als Matrixproteine in Vertebraten spielen z. B. die Matriline eine wichtige Rolle, eine Gruppe von Proteinen mit repetitiver Abfolge verschiedener VWA- und EGF-Domänen (Klatt *et al.*, 2011). Für diese Proteine wurde sowohl die hochaffine Bindung an Kollagen als auch an weitere Matrixkomponenten nachgewiesen, wodurch ihnen eine Rolle als Adapterproteine zugeschrieben wird (Fresquet *et al.*, 2007). Darüber hinaus zeigten Matriline auch ein Einfluss auf die Assemblierung von Kollagenfibrillen (Otten *et al.*, 2010).

Die meisten Erkenntnisse zu Struktur und Funktion von Kollagenen wurden für Vertebraten beschrieben. Daneben existieren jedoch auch in Invertebraten eine Reihe von Kollagenen und kollagenähnlichen Proteinen (Adams, 1978). Ein Beispiel hierfür stellen die Byssuskollagene dar, mit der besonderen Eigenschaft der Beteiligung an der Bildung extrakorporaler Strukturen (Waite *et al.*, 1998). Interaktionen von PreCols mit der umgebenden Matrix im Byssus wurden zwar mehrfach postuliert (Sagert und Waite, 2009; Sun *et al.*, 2002; Waite *et al.*, 2002), jedoch experimentell bislang nicht beschrieben.

1.6 Bio-inspirierte Materialien basierend auf Byssusproteinen

Der Byssus der Miesmuschel stellt aufgrund seiner interessanten chemischen und mechanischen Eigenschaften ein Modellsystem für eine Vielzahl bio-inspirierter Anwendungen dar (Deming, 1999; Waite *et al.*, 2005). Einen wichtigen Aspekt stellen dabei die Adhäsions- und Kohäsionseigenschaften der Proteine dar, die stark durch von DOPA ausgehenden chemischen Eigenschaften geprägt sind. Die Sekretion DOPA-haltiger Muschelfußproteine kann durch die Injektion von Kaliumchlorid in den Muschelfuß stimuliert werden (Tamarin *et al.*, 1976). Die auf diese Weise gewonnenen Proteine bzw. Proteinmischungen eignen sich für eine Vielzahl von Anwendungen, wie ihre Verwendung als Zellkulturoberflächen, und werden u. a. auch kommerziell, z. B. als Cell-TAK (BD Biosciences), vertrieben (Waite, 1990a). Die Oxidation der DOPA-Reste in diesen Proteinen kann entweder chemisch durch Oxidationsmittel oder enzymatisch durch Pilztyrosinase (*mushroom tyrosinase*, Sigma-Aldrich Nr. T3824), welche aus dem Champignon *Agaricus bisporus* isoliert wird, durchgeführt werden (Ito *et al.*, 1984; Monahan und Wilker, 2004). Durch die folgende autokatalytische Quervernetzung ändert sich die Löslichkeit sowie mechanische Stabilität der entsprechenden Proteine signifikant (Hansen *et al.*, 1998; Lauren und Wilker, 2007).

Neben der Verwendung natürlicher Proteine bietet sich auch die rekombinante Produktion zur Gewinnung materialwissenschaftlich relevanter Mengen entsprechender Proteine an. Diese bietet zudem die Möglichkeit zur Generation von Varianten, verkürzten Formen bzw. Fusionsproteinen. Die rekombinante Produktion wurde u. a. für Mfp-1 bzw. Proteine basierend auf dessen repetitiver Struktur beschrieben (Filpula *et al.*, 1990; Strausberg *et al.*, 1989). Ferner wurden Proteine des adhäsiven Plaques, insbesondere Mfp-3 und -5, welche maßgeblich die adhäsiven Eigenschaften des Byssus bedingen, rekombinant hergestellt (Hwang *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2004). Auch bei diesen Proteinen ändern sich die adhäsiven Eigenschaften nach chemischer bzw. enzymatischer Oxidation. Um Proteine mit neuen Eigenschaften zu generieren bzw. Eigenschaften zu kombinieren, wurden Fusionsproteine aus Mfp-1, -3 und -5 generiert, welche bessere adhäsive Eigenschaften als die isolierten Proteine aufwiesen und u. a. zur Bildung einer artifiziellen extrazellulären Matrix eingesetzt werden können (Choi *et al.*, 2010; Gim *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2007a). Dabei konnten die zellbindenden Eigenschaften u. a. durch Hinzufügen einer integrinbindenden RGD-Sequenz verbessert werden (Hwang *et al.*, 2007b). Analog zu den natürlich vorkommenden Muscheladhäsiven sind einige Produkte rekombinant hergestellter Muschelfußproteine bereits kommerziell erhältlich (z. B. MAPTriX, AMS Biotechnology).

Neben der Verwendung von aus Muscheln extrahierten oder rekombinant hergestellten Proteinen inspirierten die für Byssusproteine beschriebene DOPA-basierten chemischen Reaktionen die Generierung von Peptiden (Olivieri *et al.*, 2010; Yu und Deming, 1998) oder Polymeren mit DOPA- bzw. Catecholfunktionen (Lee *et al.*, 2006a; Wang *et al.*, 2007; Westwood *et al.*, 2007).

Im Zusammenhang mit Muschelbyssus- bzw. DOPA-inspirierten Materialien ist auch die Byssuscatecholoxidase von großem Interesse für technische Anwendungen. Bislang wurde zur Hydroxylierung bzw. oxidativen Quervernetzung dieser Materialien stets kommerziell erhältliche Pilztyrosinase eingesetzt. Die Verwendung des im Byssus vorhandenen Enzyms zu diesen Zwecken könnte jedoch die Spezifität der entsprechenden Reaktionen signifikant erhöhen und somit die Möglichkeit bieten, oxidative Modifikationen noch zielgerichteter einzuführen. Anwendung könnte dieses Enzym neben der Generierung spezifischer Adhäsive auch im Bereich der Biosensorik finden, in der Tyrosinasen bereits erfolgreich eingesetzt werden (Berenguer *et al.*, 1989; Fiorentino *et al.*, 2010). Ferner werden Tyrosinasen bereits erfolgreich zur Detoxifizierung von phenolbelasteten Erdreihen oder Abwässern, zur Herstellung von Pharmazeutika (z. B. L-DOPA zur Behandlung von Morbus Parkinson) sowie im Bereich der kosmetischen Industrie oder Nahrungsmittelproduktion zur gezielten Förderung oder Inhibition von Bräunungsprozessen eingesetzt (Claus und Decker, 2006; Claus und Filip, 1988).

Auch die Byssuskollagene bieten sich aufgrund der ihnen zugewiesenen interessanten mechanischen Eigenschaften für eine Reihe materialwissenschaftlicher Anwendungen an. Insbesondere ihre graduelle Verteilung und der dadurch bedingte mechanische Gradient (Waite *et al.*, 2002) stellen ein wichtiges Modellsystem zur Generierung von Gradientenmaterialien dar (Claussen *et al.*, 2012a; Claussen *et al.*, 2012b). Da die Extraktion der einzelnen Kollagene aus Extrakten oder den Byssusfäden extrem limitiert ist, bietet sich auch in diesem Fall die rekombinante Produktion der PreCols an (Hagenau und Scheibel, 2010). Die hauptsächliche Schwierigkeit stellt dabei die Bildung einer intakten, stabilen Kollagentripelhelix dar, welche u. a. durch die posttranslationale Einführung von 4-Hydroxyprolinresten bedingt ist (Golser, 2009).

1.7 Zielsetzung

Der Byssusfaden der Miesmuschel stellt ein außergewöhnliches Beispiel der evolutionären Anpassung mariner Organismen an ihr natürliches Habitat, die Gezeitenzone, dar. Morpholo-

gie, Struktur und Funktion dieser biologischen Faser wurden in den vergangenen Jahrzehnten eingehend beschrieben. Darüber hinaus konnten die außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften des Byssus, wie die Klebeeigenschaften unter Wasser oder die spezielle mechanische Stabilität der Fäden, auf einfache chemische Prozesse wie reversible Metallkoordination oder Redoxreaktionen reduziert werden. Dies verleiht dem Byssus den Charakter eines interessanten Modellsystems gleichermaßen für Grundlagenforscher und Materialwissenschaftler (Harrington und Waite, 2008b). Neben dieser modellhaften Betrachtung des Byssusfadens existieren dagegen verhältnismäßig wenige Informationen über die Struktur und den funktionellen Beitrag einzelner Komponenten bzw. in diesem Kontext die Struktur-/Funktionsbeziehung der entsprechenden Byssusproteine. Dies ist mitunter dem Umstand geschuldet, dass einzelne Proteine, bedingt durch einen hohen Grad an Quervernetzung, nur schwer aus dem Byssus extrahiert werden können. Aus diesem Grund bietet sich die rekombinante Produktion zur Gewinnung und Analyse einzelner Byssusproteine an.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zwei Proteine des Byssusfadens von *M. galloprovincialis* hinsichtlich ihrer Struktur und funktionellen Rolle analysiert werden. Einen Fokus der Arbeit stellte dabei die Identifizierung einer im Byssus aktiven Catecholoxidase dar, welche bereits mehrfach im Byssusfaden nachgewiesen werden konnte (Waite, 1985), von der jedoch bislang keine Sequenz publiziert wurde. Die Basis hierzu stellte eine cDNA-Bank des Muschelfußes dar, aus der entsprechende Sequenzen mittels PCR-basierter Ansätze isoliert und anschließend eingehend bioinformatisch charakterisiert werden sollten. Den Hauptteil der Arbeit stellt die Analyse des bereits bekannten Proximalen Fadenmatrixproteins 1 (Sun *et al.*, 2002) dar, von dem ebenfalls Sequenzen aus der cDNA-Bank extrahiert werden sollten. Um PTMP1 zu charakterisieren, sollte dieses rekombinant hergestellt, gereinigt und eingehend proteinchemisch und spektroskopisch analysiert werden. Da PTMP1 ausschließlich in Form bakterieller Inclusion Bodies produziert werden konnte, stand zunächst die Rückfaltung bzw. die Charakterisierung rückgefalteter PTMP1-Formen im Vordergrund. Anschließend sollte die Struktur von PTMP1 mittels Röntgenkristallographie bestimmt werden. Neben der Analyse der strukturellen Stabilität von PTMP1 und verschiedener Varianten bzw. Mutanten sollte die beschriebene Fähigkeit von PTMP1 zur Bindung von Kollagen überprüft und näher charakterisiert werden. Ferner sollte die funktionelle Rolle von PTMP1 als Matrixprotein des proximalen Byssusabschnittes eingeordnet werden. Hierzu wurde der Einfluss von PTMP1 auf die Assemblierung von Fibrillen aus löslichem Kollagen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendetes Material

2.1.1 Chemikalien

Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniak 25 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumeisen(III)-citrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Anhydrotetracyclin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Arginin	Carl Roth, Karlsruhe
Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Breox FMT 30 Antifoam	Cognis, Southampton, Großbritannien
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
3,4-Cyclohexenoesculetin- β -D-galaktopyranosid (S-Gal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blau	Carl Roth, Karlsruhe
α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphate (dNTPs)	New England Biolabs, Ipswich, USA
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	VWR International, Radnor, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	VWR International, Radnor, USA
Ethanol (technisch und p. A.)	VWR International, Radnor, USA
Ethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glutathion oxidert (GSSG)	Carl Roth, Karlsruhe
Glutathion reduziert (GSH)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Guanidiniumhydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe

Imidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]- naphthalen-1-sulfonsäure (IAEDANS)	Molecular Probes (Life Technologies), Carlsbad, USA
Isopropanol	VWR International, Radnor, USA
Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin-Sulfat	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lithiumsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	VWR International, Radnor, USA
2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin (Bicin)	Alfa Aesar, Ward Hill, USA
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriummetaperiodat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
2-Nitro-5-Thiocyanobenzoessäure (NTCB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
o-Phosphorsäure 85 %	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol PEG 2000 MME	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglycol PEG 3350	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglycol PEG 400	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglycol PEG 6000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor Mix G	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Rotiphorese Gel 40 Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Sauerstoff	Rießner-Gase, Lichtenfels
Schwefelsäure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Sorbitol	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Linde, München
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
Tetracyclin	Carl Roth, Karlsruhe

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Carl Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris(2-carboxyethyl)phosphine-hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid	VWR International, Radnor, USA
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zeocin (100 mg/mL)	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
Zinkchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Zitronensäure-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe

Weitere Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Alle verwendeten Chemikalien besaßen, sofern nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad p. A.

2.1.2 Proteine und Peptide

Polymerasen

PfuTurbo DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Phusion Hot Start DNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA

Restriktionsendonukleasen/Schnittstellen¹

BamHI	G↓GATCC	New England Biolabs, Ipswich, USA
BsaI	GGTCTC(1/5)	New England Biolabs, Ipswich, USA
BsrGI	T↓GTACA	New England Biolabs, Ipswich, USA
DpnI	GA↓TC (nur bei methyliertem A)	New England Biolabs, Ipswich, USA
EcoRI	G↓AATTC	New England Biolabs, Ipswich, USA
EcoRV	GAT↓ATC	New England Biolabs, Ipswich, USA
HindIII	A↓AGCTT	New England Biolabs, Ipswich, USA
NcoI	C↓CATGG	New England Biolabs, Ipswich, USA
NdeI	CA↓TATG	New England Biolabs, Ipswich, USA
NheI	G↓CTAGC	New England Biolabs, Ipswich, USA
NotI	GC↓GGCCGC	New England Biolabs, Ipswich, USA
SacI	GAGCT↓C	New England Biolabs, Ipswich, USA
XbaI	T↓CTAGA	New England Biolabs, Ipswich, USA
XhoI	C↓TCGAG	New England Biolabs, Ipswich, USA

Phosphatase/Ligase

Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4 DNA-Ligase	Promega, Fitchburg, USA

¹ Bezeichnung nach Roberts et al., 2003

Proteasen

ULP1

Lukas Eisoldt, Lehrstuhl Biomaterialien,
Universität BayreuthAsp-N, *Sequencing Grade*

Promega, Fitchburg, USA

Glu-C, *Sequencing Grade*

Promega, Fitchburg, USA

Trypsin, modifiziert, *Sequencing Grade*

Promega, Fitchburg, USA

Chymotrypsin, *Sequencing Grade*

Promega, Fitchburg, USA

Antikörper

Anti-c-MYC-Antikörper (Maus, monoklonal)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Anti-Hase IgG Peroxidase-Konjugat (Ziege,
polyklonal)

Acris Antibodies, Hiddenhausen

Anti-humaner Von-Willebrand Faktor-Antikörper
(Hase, polyklonal)

Dako, Glostrup, Dänemark

Anti-Maus IgG FITC-Konjugat (Ziege, polyklonal)

Acris Antibodies, Hiddenhausen

Anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat (Ziege,
polyklonal)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Anti-polyHistidin-Antikörper (Maus, monoklonal)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Anti-PTMP1-Serum (Hase, polyklonal)

Pineda Antikörper-Service, Berlin

Kollagene

Kollagen Typ I (Känguru-Schwanz)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kollagen Typ I (Kälberhaut)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kollagen Typ II (Rindertrachea-Knorpelgewebe)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kollagen Typ III (humane Plazenta)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kollagen Typ IV (humane Plazenta)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kollagen Typ V (humane Plazenta)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sonstige Proteine/Peptide

Albumin Fraktion V (BSA)

Carl Roth, Karlsruhe

Lysozym

AppliChem, Darmstadt

(PPG)₁₀

PeptaNova, Sandhausen

2.1.3 Größenstandards und Kits

1 kb DNA-Leiter

New England Biolabs, Ipswich, USA

100 bp DNA-Leiter

New England Biolabs, Ipswich, USA

Additive Screen HT

Hampton Research, Aliso Viejo, USA

Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System

GE Healthcare, Chalfont St. Giles,
GroßbritannienColorPlus Prestained Protein Marker,
Broad Range (7-175 kDa)

New England Biolabs, Ipswich, USA

JCSGcore Suites I-IV

Qiagen, Hilden

PrepEase Genomic DNA Isolation Kit

Affymetrix, Santa Clara, USA

Protein Marker, Broad Range (2-212 kDa)

New England Biolabs, Ipswich, USA

Wizard Plus SV Midipreps DNA Purification System

Promega, Fitchburg, USA

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System

Promega, Fitchburg, USA

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

Promega, Fitchburg, USA

2.1.4 Chromatographiematerialien

Chelating Sepharose Fast Flow
 SP Sepharose Fast Flow
 HiLoad 26/60 Superdex 200 pg
 Superdex 200 10/300 GL
 Säulenmantel XK 16 und XK 26
 HisTrap FF 5 mL

GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
 GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien

2.1.5 Sonstiges Material

24-well Kristallisationsplatten Cryschem
 24-well Kristallisationsplatten VDXm mit Dichtmittel
 96-well-Platten (BD Microtest)
 96-well-Platten (Costar Carbo-BIND)
 96-well-Platten (Nunc MaxiSorp)
 96-well-Platten (Nunc PolySorp)
 96-well-Platten (Pierce Amine-binding, Maleic Anhydride Activated)
 Aluminium-Klebeband Scotch Brand
 Bechergläser
 Blotting-Membran Roti-PVDF
 Cantilever OMCL-AC160TS-W2
 Cellophanfolien
 Cryo-Loops
 Deckgläser 18 mm Borosilikatglas Dicke Nr. 1,5
 Dewargefäß Agil 2
 Dialyseschläuche und Klammern
 Easypet Pipettierhilfe
 Elektroporationsküvetten (0,2 cm)
 Erlenmeyerkolben
 Glasperlen
 Indikatorstreifen pH-Fix
 Kanülen
 Küvetten-Reinigungslösung Hellmanex II
 Laborflaschen
 Labortücher Kimtech Science
 Leitfähige Haftaufkleber
 Messzylinder
 Mikroküvetten
 MRC 96-well-Kristallisationsplatten
 Multipette Plus mit Combitips
 Muskovit (Glimmer)
 Objektträger für AFM-Messungen (15 mm)
 Parafilm M
 Pasteurpipetten
 Petrischalen

Hampton Research, Aliso Viejo, USA
 Hampton Research, Aliso Viejo, USA
 BD, Franklin Lakes, USA
 Corning, Corning, USA
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 3M, St. Paul, USA
 VWR International, Radnor, USA
 Carl Roth, Karlsruhe
 Olympus, Tokyo, Japan
 Carl Roth, Karlsruhe
 Hampton Research, Aliso Viejo, USA
 VWR International, Radnor, USA
 Air Liquide, Paris, Frankreich
 Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA
 Eppendorf, Hamburg
 VWR International, Radnor, USA
 VWR International, Radnor, USA
 Carl Roth, Karlsruhe
 Carl Roth, Karlsruhe
 B. Braun Melsungen, Melsungen
 Hellma, Müllheim
 Duran Group, Mainz
 Kimberly-Clark, Dallas, USA
 Plano, Wetzlar
 VWR International, Radnor, USA
 Sarstedt, Nümbrecht
 Molecular Dimensions, Newmarket, Großbritannien
 Eppendorf, Hamburg
 Alfa Aesar, Ward Hill, USA
 Ted Pella, Redding, USA
 Bemis, Neenah, USA
 VWR International, Radnor, USA
 Sarstedt, Nümbrecht

Pipetten (1000/200/8x100/20/10/2,5 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhrchen (15/50 mL)	VWR International, Radnor, USA
Quarzglas Suprasil-Küvetten 1 mm, 3 mm, 10 mm	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße (200 µL, 1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
REM-Probenträger	Agar Scientific, Stansted, Großbritannien
Rührfische	VWR International, Radnor, USA
SERVAGel TG 12, Vertical Tris-Glycine Gel 12 %	Serva Electrophoresis, Heidelberg
SERVAGel TG 4-20, Vertical Tris-Glycine Gel 4-20 %	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Skalpelle	B. Braun Melsungen, Melsungen
SPR-Chips CM5	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Spritzen (50/250 µL)	Hamilton, Reno, USA
Spritzen Omnifix (2-50 mL)	B. Braun Melsungen, Melsungen
Stabpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Filtrapur S (0,22/0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
TEM-Objektträger	Agar Scientific, Stansted, Großbritannien
Thermanox-Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultrafiltrationseinheit Vivaspin 2, 6, 20 (10 000/30 000 MWCO)	Sartorius, Göttingen
Ultrafiltrations-Membranen (10 000/30 000 MWCO)	Millipore (Merck), Darmstadt
UV-Küvetten	Brand, Wertheim
Wägeschälchen	VWR International, Radnor, USA
Whatman 3MM CHR Chromatographiepapier	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
ZipTip C4, C18	Millipore (Merck), Darmstadt

Weiteres Laborzubehör bzw. zusätzliche Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen VWR International (Radnor, USA) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.6 Geräte

Spektroskopie

ESI-Massenspektrometer LTQ XL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FT-IR-Spektrometer Tensor 27 mit AquaSpec-Messzelle	Bruker, Billerica, USA
J-815 Spektropolarimeter mit Peltierelement PTC 423S/15	Jasco, Tokyo, Japan
MALDI-TOF-Massenspektrometer Reflex III	Bruker, Billerica, USA
Oberflächenplasmonenresonanzspektrometer Biacore X	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
OD600 DiluPhotometer	Implen, München
Photometer NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plattenleser Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
UV/VIS-Spektrometer GENESYS 10S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
UV/VIS-Spektrometer Varian Cary 50 Bio	Agilent, Santa Clara, USA

Chromatographie

Äkta FPLC	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Äkta Purifier	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Brechungsindex-Detektor Shodex RI-71	Showa Denko, Tokyo, Japan
Fraktionssammler Frac-950	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
HPLC-Anlage 1100 Series	Agilent, Santa Clara, USA
HPLC-Anlage Prominence mit Autosampler Sil20AC	Shimadzu, Kyoto, Japan
Lichtstreuungsdetektor DAWN EOS (MALS)	Wyatt Technology, Santa Barbara, USA
Probenauftragspumpe P-960 mit Luft-Sensor	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Superloop150 mL	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien

Elektrophorese

Agaroseelektrophoresekammern BlueMarine 100, BlueMarine 200	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Blotting-Apparatur Fastblot	Biometra (Analytik Jena), Jena
Gießstand für Polyacrylamidgele	Mechanikwerkstatt, Universität Bayreuth
Laufapparatur Mighty Small II	Hoefer, Holliston, USA
Spannungsquellen BluePower 500, BluePower Plus	Serva Electrophoresis, Heidelberg

Mikroskopie

AFM Veeco Dimension 3100 mit Nanoscope IV Controller und XY-closed-loop-Scanner	Bruker, Billerica, USA
Rasterelektronenmikroskop JSM 6400	Jeol, Akishima, Japan
Transmissionselektronenmikroskop JEM-2100	Jeol, Akishima, Japan
CCD-Kamera ES500W Erlangshen	Gatan, Pleasanton, USA
Mikroskop SZX16 mit Kamera E-620	Olympus, Tokyo, Japan
Mikroskop SMZ1500	Nikon, Tokyo, Japan

Kristallographie

Pipettierroboter Phoenix	Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA
Röntgenquelle I μ S (<i>sealed tube</i>)	Incoatec, Geesthacht
Röntgendetektor MAR 345 DTB	Marresearch, Norderstedt
Synchrotron und Elektronenspeicherring BESSY II	Helmholtz-Zentrum Berlin
CCD-Detektor MX225	Rayonix, Evanston, USA

Dokumentation

GelDoc XR	Bio-Rad, Hercules, USA
Gelscanner Bio-5000	Microtek, Hsinchu, Taiwan
Gelscanner HP Scanjet G4050	Hewlett-Packard, Palo Alto, USA
Rock Imager 1000	Formulatrix, Waltham, USA
Digitale Spiegelreflexkamera D5000	Nikon, Tokyo, Japan
Objektiv AF 90 mm F/2.8 Macro 1:1	Tamron, Saitama, Japan
Fluoreszenz-Imager Ettan DIGE	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien

Inkubation/Aufbewahrung

Bioreaktor Minifors 1,3 L	Infors, Bottmingen/Basel, Schweiz
Bioreaktor 4 L	Glasbläserei, Universität Bayreuth
Gefrierschrank Comfort NoFrost	Liebherr, Bulle, Schweiz

Sonstige Geräte

Autoklav SANOclav	Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen
Autoklav VX-150	Systemec, Wettenberg
Eismaschine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Elektroporationseinheit MicroPulser	Bio-Rad, Hercules, USA
pH-Meter Schott Lab 850	SI Analytics, Mainz
Reinstwasseranlage MilliQ Advantage A10	Millipore (Merck), Darmstadt
Vakuumpumpe Rotavac Valve Tec	Heidolph, Schwabach

2.1.7 Computerprogramme und Tools**Programme**

Accelrys Draw 4.1	Accelrys, San Diego, USA
ApE 1.17	M. Wayne Davis, University of Utah, USA
Astra 6.0.1	Wyatt Technology, Santa Barbara, USA
Biacore X Control Software 2.3	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
BIAevaluation 4.1.1	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Cary WinUV 3.00	Varian (Agilent), Santa Clara, USA
CDNN 2.1	Dr. Gerald Böhm, Leipzig
CLC Sequence Viewer 6.5.3	CLC bio, Aarhus, Dänemark
Creative Suite 5 Design Standard	Adobe, San Jose, USA
EndNote X4	Thomson Reuters, New York City, USA
Ettan DIGE Imager 1.0.2.21	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
GENTle 1.9.4	Magnus Manske, Universität Köln
Image Quant 5.2	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Iris 5.3	Infors, Bottmingen/Basel, Schweiz
mar345dtb 10.4	Marresearch, Norderstedt
MicroWin 4.41	Berthold Technologies, Bad Wildbad
mMass 5.1.0	Martin Strohaln (Niedermeyer und Strohaln, 2012)
NanoDrop ND-1000 3.7.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NanoScope 7.20	Veeco (Bruker), Billerica, USA
Office Professional 2010	Microsoft, Redmond, USA
OPUS 6.5	Bruker, Billerica, USA
Origin 8.1G	OriginLab, Northampton, USA
Phoenix 1.10.3.5	Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA
Primer D'Signer 1.1	IBA, Göttingen
PyMOL 1.3	Schrödinger, New York City, USA
PyMOL APBS tools plugin	M.G. Lerner/H.A. Carlson, University of Michigan, Ann Arbor, USA
PyMOL DSSP and Stride plugin	Hongbo Zhu, BIOTEC, Technische Universität Dresden
Quantity One 4.65	Bio-Rad, Hercules, USA
Rock Imager 2.6.4.2	Formulatrix, Waltham, USA
Rock Maker Enterprise 2.4.9.2	Formulatrix, Waltham, USA
ScanWizard Bio 1.01	Microtek, Hsinchu, Taiwan
SEQUEST	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spectra Manager 1.54.03	Jasco, Tokyo, Japan
Spectra Manager 2.08.04	Jasco, Tokyo, Japan
UNICORN 5.11	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Xcalibur 2.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Online-Tools/-Ressourcen/-Datenbanken

APBS	http://www.poissonboltzmann.org/
big-PI Predictor	http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html
Bioinformatics Toolkit	http://toolkit.tuebingen.mpg.de/
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Boxshade 3.21	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
CBS Prediction Servers	http://www.cbs.dtu.dk/services/
Clustal W, W2, Omega	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/
Codon Usage Database	http://www.kazusa.or.jp/codon/
DichroWeb	http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml
DSSP	http://swift.cmbi.ru.nl/gv/dssp/
E. coli Codon Usage Analyzer 2.1	http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm
ExPASy Bioinformatics Resource Portal	http://www.expasy.org/
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
Graphical Codon Usage Analyzer	http://gcu.schoedl.de/
K2D3	http://www.ogic.ca/projects/k2d3/
MytiBase	http://mussel.cribi.unipd.it/
NetCGlyc 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCGlyc/
NetNGlyc 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
NetOGlyc 3.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/
NetPhos 2.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
OligoAnalyzer 3.1	http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer
PDB (Protein Database)	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
Phyre ²	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
PSIPRED	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Readseq	http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/readseq.cgi
Reverse and/or complement DNA sequences	http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html
SCOP	http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/
SignalP 4.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SWISS-MODEL	http://swissmodel.expasy.org/
The Sequence Manipulation Suite	http://www.bioinformatics.org/sms/index.html
TMHMM Server 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
UniProt	http://www.uniprot.org/
Web of Knowledge 5.8	http://apps.webofknowledge.com
WoLF PSORT	http://wolfpsort.org/

2.1.8 Plasmide

Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit als Vektoren bei Klonierungen sowie für die rekombinante Produktion von Byssusproteinen eingesetzt. Repräsentative Vektorkarten der verwendeten Basisvektoren sind in Abbildung 2-1 dargestellt, Tabelle 2-1 fasst die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Plasmide sowie ihre Herkunft zusammen.

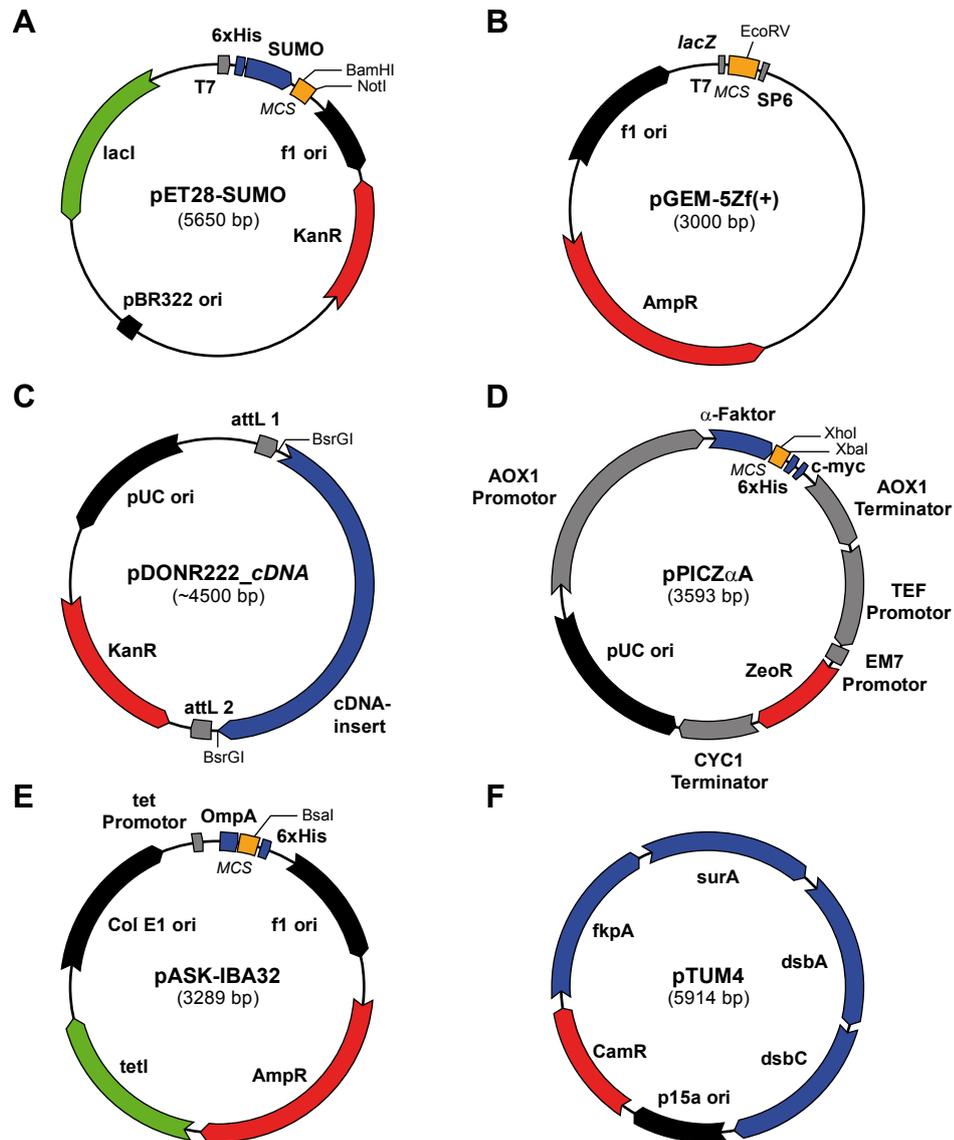


Abbildung 2-1 Schematische Darstellungen der verwendeten Plasmide

Schematische Darstellungen der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Plasmide mit Angabe der verwendeten Restriktionsschnittstellen und farblicher Kennzeichnung der entsprechenden Elemente (schwarz: Replikationsursprung; rot: Resistenzmarker; grün: Inhibitoren; blau: codierende Sequenzen). **(A)** Karte des pET28-SUMO-Vektors. T7: T7-Promotor; MCS: *multiple cloning site*; ori: Replikationsursprung; KanR: Kanamycinresistenzgen (Phosphotransferase); lacI: Lac-Inhibitor. **(B)** Karte des pGEM-5Zf(+)-Vektors. AmpR: Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase); SP6: SP6-Promotor. **(C)** Karte des pDONR222-Vektors mit einem cDNA-Insert. attL 1, 2: Rekombinationssequenzen. **(D)** Karte des pPICZ α A-Vektors: c-myc: c-myc-Epitop; ZeoR: Zeocin-Resistenzgen (*Sh ble*-Genprodukt, bindet Zeocin). **(E)** Karte des pASK-IBA32-Vektors: OmpA: OmpA-Signalsequenz; tetI: tet-Inhibitor. **(F)** Karte des pTUM4-Helferplasmids. CamR: Chloramphenicolresistenz (Acetyltransferase); fkpA, surA, dsbA, dsbC: konstitutiv exprimierte Chaperone (Schlaphschy *et al.*, 2006).

Tabelle 2-1 Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Insert, Schnittstellen	Herkunft	Verwendung
pDONR222_ <i>cDNA</i>	cDNAs, BsrGI	cDNA-Bank (Hagenau, 2011)	cDNA-Quelle
pET28a(+)	MCS ²	Novagen (Merck), Darmstadt	Expressionsvektor
pET28-SUMO	6xHis-SUMO, NdeI/BamHI	Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München	Expressionsvektor für 6xHis-SUMO- Fusionsproteine
pPICZαA	XhoI/XbaI	Invitrogen, Carlsbad, USA	Expressionsvektor
pASK-IBA32	BsaI	IBA, Göttingen	Expressionsvektor
pTUM4		A. Skerra, TU München (Schlapschy <i>et al.</i> , 2006)	Helferplasmid für periplasmatische Expression
pGEM-5Zf(+)	MCS ²	Promega, Fitchburg, USA	Generation von pGEM-T
pGEM-T		diese Arbeit (aus pGEM-5Zf(+)) hergestellt)	TA-Klonierungen

2.1.9 Vektorkonstrukte

Aus den in Tabelle 2-1 angegebenen Plasmiden wurden folgende Vektorkonstrukte generiert:

Tabelle 2-2 Generierte Vektorkonstrukte

Plasmid	Insert, Schnittstellen	Verwendung
pGEM_PTMP1-1a	PTMP1 Isoform 1	Sequenzanalyse/-quelle
pGEM_PTMP1-1b	PTMP1 Isoform 2	Sequenzanalyse
pGEM_PTMP1-1c	PTMP1 Isoform 3	Sequenzanalyse
pGEM_PTMP1-1d	PTMP1 Isoform 4	Sequenzanalyse
pGEM_PTMP1-2	PTMP1 Isoform 5	Sequenzanalyse
pET28a_PTMP1	PTMP1, NheI/EcoRI	Expression von PTMP1 mit aminoterminalen 6xHis-Tag
pET28-SUMO_PTMP1	PTMP1, BamHI/NotI	Expression von 6xHis-SUMO-PTMP1
pET28-SUMO_PTMP1- C244S/C440S	PTMP1-C244S/C440S, BamHI/NotI	Expression von 6xHis-SUMO- C244S/C440S
pET28-SUMO_PTMP1- C49S/C241S/C244S/ C248S/ C437S/C440S	PTMP1- C49S/C241S/C244S/ C248S/ C437S/C440S, BamHI/NotI	Expression von 6xHis-SUMO-NoCys
pET28-SUMO_PTMP1-ΔN ¹⁻⁴⁶	PTMP1-ΔN ¹⁻⁴⁶ , BamHI/NotI	Expression von 6xHis-SUMO-ΔN
pET28-SUMO_PTMP1- ΔN ¹⁻⁴⁶ ΔC ⁴⁴³⁻⁴⁵³	PTMP1- ΔN ¹⁻⁴⁶ ΔC ⁴⁴³⁻⁴⁵³ , BamHI/NotI	Expression von 6xHis-SUMO-ΔNΔC

² *multiple cloning site*, mehrere für die Klonierung geeignete Schnittstellen

Plasmid	Insert, Schnittstellen	Verwendung
pET28-SUMO_PTMP1-A1	PTMP1-A1, BamHI/NotI	Expression von 6xHis-SUMO-A1 ³
pET28-SUMO_PTMP1-A2	PTMP1-A1, BamHI/NotI	Expression von 6xHis-SUMO-A2 ³
pASK-IBA32_PTMP1	PTMP1, BsaI	Periplasmatische Expression von PTMP1
pASK-IBA32_SUMO-PTMP1	6xHis-SUMO-PTMP1, BsaI	Periplasmatische Expression von 6xHis-SUMO-PTMP1
pASK-IBA32_PTMP1-C244S/C440S	PTMP1-C244S/C440S, BsaI	Periplasmatische Expression von PTMP1-C244S/C440S
pASK-IBA32_SUMO-PTMP1-C244S/C440S	6xHis-SUMO-PTMP1-C244S/C440S, BsaI	Periplasmatische Expression von 6xHis-SUMO-PTMP1-C244S/C440S
pGEM_CO-1	CO Isoform 1	Sequenzanalyse/-quelle ⁴
pGEM_CO-2	CO Isoform 2	Sequenzanalyse ⁴
pGEM_CO-3	CO Isoform 3	Sequenzanalyse ⁴
pGEM_CO-4	CO Isoform 4	Sequenzanalyse ⁴
pGEM_CO-5	CO Isoform 5	Sequenzanalyse ⁴
pGEM_CO-6	CO Isoform 6	Sequenzanalyse ⁴
pGEM_CO-1-ΔBamHI	CO Isoform 1, BamHI-Schnittstelle entfernt	Sequenzquelle ⁴
pET28a_CO	CO, NheI/NotI	Expression von CO mit aminoterminalen 6xHis-Tag ⁴
pET_CO	CO, NcoI/NotI	Expression von CO
pET28-SUMO_CO	CO, BamHI/NotI	Expression von 6xHis-SUMO-CO
pPICZαA_CO	CO, XhoI/XbaI	Expression von sekretierter CO ⁴

2.1.10 Oligonukleotide

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide kamen bei der PCR-Amplifikation von Muschelfuß-cDNA oder cDNA-Fragmenten sowie zur DNA-Sequenzierung zum Einsatz und wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg), biomers.net (Ulm) oder Microsynth (Balgach, Schweiz) synthetisiert. Sequenzierungsprimer wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) bereitgestellt. Design und die Berechnung physikalischer Parameter von Oligonukleotiden erfolgten mit dem Online-Tool OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) oder der Software Primer D'Signer (IBA, Göttingen). Tabelle 2-3 zeigt eine vollständige Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Zeichencode nach IUPAC) mit farblicher Kennzeichnung der entsprechenden Restriktionsschnittstellen (grün) und Mutagenesepositionen (rot).

³ im Rahmen eines Forschungspraktikums von Michael Magdeburg

⁴ im Rahmen eines Forschungspraktikums von Erik Richter

Tabelle 2-3 verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3'-Orientierung)	Verwendung
PTMP1_Bam_fwd	GATCTCGGATCCATGGGACATCATGGGGTAATGCC	Amplifikation von PTMP1
PTMP1_Eco_rev	GATCGAATTC TTATCCAATGGCTCCTGATCCTTTC	Amplifikation von PTMP1
PTMP1_Nhe_fwd	AATACATAGCTAGCATGGGACATCATGGGGTAATGCC	Amplifikation von PTMP1
PTMP1_Not_rev	GACTTCGCGGGCCGCTTATCCAATGGCTCCTGATCCCTTTC	Amplifikation von PTMP1
PTMP1_A1_Bam_fwd	TAATAGGATCCGAGGAATGCGATGTCCAAGCTG	Deletion am Aminoterminus, Amplifikation der A1-Domäne
PTMP1_ΔC_Not_rev	TAATTGCGGGCCGCTTATGGTTTACAACCTCATGCAGGCTAG	Deletion am Carboxyterminus
PTMP1_A1_Not_rev	TGATTGCGGGCCGCTTACACTTCACATGCTAGATCGATTACC	Amplifikation der A1-Domäne Sequenzierung
PTMP1_A2_Bam_fwd	TGTATGGATCCGACTGTGCCGGACATGCTGATATAGC	Amplifikation der A2-Domäne Sequenzierung
PTMP1_A2_Not_rev	TGATTGCGGGCCGCTTAACTCATGCAGGCTAGTTTTACAACATCC	Amplifikation der A2-Domäne
PTMP1_C49S_fwd	GATGCTGAGGAATCCGATGTCCAAGCTGATC	Mutagenese
PTMP1_C49S_rev	TCAGCTTGGACATCGGATTCCTCAGCATC	Mutagenese
PTMP1_C244S_fwd	GCATGTGAAGTGTCTGTTGTCGACTGTGC	Mutagenese
PTMP1_C244S_rev	GCACAGTCGACAACAGACACTTCACATGC	Mutagenese
PTMP1_C440S_fwd	AGCCTGCATGAGTCTAAACCACGTGCAC	Mutagenese
PTMP1_C440S_rev	GTGCACGTGGTTTAGAACTCATGCAGGCT	Mutagenese
PTMP1_CmidS_fwd	CTAGCATCTGAAGTGTCTGTTGTCGACTCTGCCGGAC	Mutagenese
PTMP1_CmidS_rev	GTCCGGCAGAGTCGACAACAGACACTTCAGATGCTAG	Mutagenese
PTMP1_CendS_fwd	GTA AAACTAGCCTCCATGAGTCTAAACCA CGTGAC	Mutagenese
PTMP1_CendS_rev	GTGCACGTGGTTTAGAACTCATGGAGGCTAGTTTTAC	Mutagenese
SUMO_Bsa_fwd	ATGGTAGGTCTCAGGCCGGCAGCAGCCATCATCATC	Amplifikation von 6xHis-SUMO_PTMP1
PTMP1_Bsa_stop_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTATCCAATGGCTCCTGATCCTTTCT	Amplifikation von PTMP1 mit Stopcodon
PTMP1_Bsa_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTCCAATGGCTCTGATCCTTTCT	Amplifikation von PTMP1 ohne Stopcodon
PTMP1_Bsa_fwd	ATGGTAGGTCTCAGGCCATGGGACATCATGGGTAATGCC	Amplifikation von PTMP1
CuA_65536	ARGWAYNSNCKRTGCCANCCNARRA	Bindung an die CuA-Region von CO, Degeneration 65536-fach
CuA_2048	AGGWAYWCYCKATGCCAYCCWARRAWRCT	Bindung an die CuA-Region von CO, Degeneration 2048-fach

Bezeichnung	Sequenz (5'→3'-Orientierung)	Verwendung
CuA_1536	ARRAANACYCTRTGCCAWCCHARRAT	Bindung an die CuA-Region von CO, Degeneration 1536-fach
CuA_1024	CCTGGRAGRWAATCWAWSGTSGARTCCCAR TARCA	Bindung an die CuA-Region von CO, Degeneration 1024-fach
CuA_128	GRMCCSWSRTGMGCGT	Bindung an die CuA-Region von CO, Degeneration 128-fach
CuB_36863	TGRTGVARMHWRAQANANNGGRTC	Bindung an die CuB-Region von CO, Degeneration 36863-fach
CuB_576	TGRTGRAADGTRAAHARRGGRTC	Bindung an die CuB-Region von CO, Degeneration 576-fach
CuB_128	ATGRTGRAAAWAGAAWASWGGRTC	Bindung an die CuB-Region von CO, Degeneration 128-fach
MGC01495_rev	TTATCGTTACACTGAGGAATAGAAGC	Bindung an MGC01495
CO_fwd	ATGAAACCTACATTACAACACTACTGCTATTG	Amplifikation von CO mit Signalpeptid
CO_pPICZA_fwd	TAATACTCGAGAAAAGAGATGTCATAACTG ACCAGTATCCTGC	Amplifikation von CO
CO_pPICZA_rev	ATTAATCTAGACCATAGCAAAGGAACGCC	Amplifikation von CO
CO_ΔBam_fwd	CCAAATAACGAACCCGACATCTGATCCCAA CAGTCAAGTCG	Eliminierung der BamHI-Schnittstelle in der CO-Sequenz
CO_ΔBam_rev	CGACTTGACTGTTGGGATCAGATGTCGGGT TCGTTATTTGG	Eliminierung der BamHI-Schnittstelle in der CO-Sequenz
CO_Bam_fwd	ATAATGGATCCGATGTCATAACTGACCAGT ATCCTGC	Amplifikation von CO
CO_Nhe_fwd	ATAATGCTAGCGATGTCATAACTGACCAGT ATCCTGC	Amplifikation von CO
CO_Nco_fwd	ATAATCCATGGATGTCATAACTGACCAGTA TCCTGC	Amplifikation von CO
CO_Not_rev	TAATTGCGGCCGCTTAATAGCAAAGGAACG CC	Amplifikation von CO
CO_1108_fwd	CCACGTAGAAGAGTGGAGACGCCACCAG	Sequenzierung von CO
5'AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Sequenzierung von pPICZαA
3'AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC	Sequenzierung von pPICZαA
M13_fwd	TGTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung, Screening-PCR, Amplifikation von CO
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung, Screening-PCR
pUC_fwd	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT	Screening-PCR
pUC_rev	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Screening-PCR
SUMO_seq_fwd	CGGTATTAGAATTCAAGCTGATCAGACCCC	Sequenzierung
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA	Sequenzierung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung, Screening-PCR, Amplifizierung von CO

2.1.11 cDNA-Bank des Muschelfußes

Als Quelle für die genetische Information der Muschelbyssusproteine wurde eine cDNA-Bank des Muschelfußes verwendet (Hagenau, 2011). Solche Bibliotheken eignen sich dazu, die in einem Gewebe aktiven Gene zu konservieren und zu analysieren. Dazu wird die im entsprechenden Gewebe transkribierte mRNA isoliert, mithilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese mittels gängiger Klonierungsmethoden in Zielvektoren eingebaut. Eine cDNA-Bank, basierend auf der präparierten mRNA zweier Muschelfüße⁵ wurde von Anja Hagenau in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J. Adamski, Helmholtz Zentrum München, mit dem *Clone Miner cDNA Library Construction Kit* (Invitrogen/Life Technologies) hergestellt (Hagenau, 2011) und zur Verfügung gestellt. Diese cDNA-Bank umfasst zwei Teilbanken (*mussel foot library 1 und 2 bzw. Mfl-1, -2*), welche sich in der mittleren Größe der enthaltenen cDNAs unterscheiden. Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit waren Glycerinkulturen der entsprechenden cDNA-Teilbanken (*E. coli* DH10B-Zellen, transformiert mit pDONR222-Vektoren mit einem im optimalen Fall vollständigen Satz an cDNA-*inserts*).

Tabelle 2-4 Kennwerte der cDNA-Banken Mfl-1 und -2 (Hagenau, 2011)

	Mfl-1	Mfl-2
Titer	1700 cfu/μL	5300 cfu/μL
Gesamtanzahl	2,1 x 10 ⁷ cfu	6,35 x 10 ⁷ cfu
Effizienz der Rekombination ⁶	100 %	91 %
Größe der Konstrukte	0,2-3 kb	0,15-2 kb
durchschnittliche Konstruktgröße	1,2 kb	0,63 kb

2.2 Verwendete Organismen und ihre Kultivierung

2.2.1 Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA sowie zur heterologen Expression von Genen zur rekombinanten Produktion von Muschelbyssusproteinen verwendet. Die Hefe *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) kam analog dazu ebenfalls als heterologes Expressionssystem zum Einsatz. Tabelle 2-5 fasst die verschiedenen verwendeten Stämme zusammen.

⁵ *Mytilus galloprovincialis* aus italienischer Zucht

⁶ experimentell ermitteltes Verhältnis cDNA-enthaltender Vektoren zu Vektoren ohne Insert

Tabelle 2-5 verwendete Stämme von *E. coli* und *P. pastoris*

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz	Verwendung
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1</i> <i>araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ</i> <i>rpsL nupG</i>	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA	Klonierungen
<i>E. coli</i> BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU proL Cam</i> ^r] [<i>argU ileY leuW Strep/Spec</i> ^r]	Stratagene, La Jolla, USA	Expressionstests, rekombinante Produktion
<i>E. coli</i> BL21- Gold(DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA</i> Hte	Stratagene, La Jolla, USA	Expressionstests
<i>E. coli</i> BL21- Gold(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA</i> Hte [pLysS Cam ^r]	Stratagene, La Jolla, USA	Expressionstests
<i>E. coli</i> HMS174(DE3)	F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) (DE3) (Rif ^r)	Novagen (Merck), Darmstadt	Expressionstests
<i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 (DE3)	Δ(<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74 ΔphoA PvuII</i> <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) F' [<i>lac</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>pro</i>] <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB pRARE2</i> (Cam ^r , Str ^r , Tet ^r)	Novagen (Merck), Darmstadt	Expressionstests
<i>E. coli</i> JM83	F ⁻ <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> (Str ^r) [Φ80 <i>dlacZΔM15</i>] <i>thi</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)	Expressionstests
<i>E. coli</i> JM83pTUM4	F ⁻ <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> (Str ^r) [Φ80 <i>dlacZΔM15</i>] <i>thi</i> pTUM4 (Cam ^r)	diese Arbeit	Expressionstests
<i>P. pastoris</i> X33	Wildtyp, Mut ⁺ -Phänotyp	LifeTechnologies, Carlsbad, USA	Expressionstests

2.2.2 Kultivierungsmedien und Antibiotika

Die Kultivierung von Mikroorganismen erfolgte in folgenden Medien:

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7 (mit NaOH eingestellt), für Platten wurden zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar zugegeben
S-Gal-Agarplatten	LB-Agarplatten inkl. 300 µg/mL S-Gal, 500 µg/mL Ammoniumeis(III)-citrat und 0,5 mM IPTG
Niedrigsalz-LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,5 (mit NaOH eingestellt), für Platten wurden zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar zugegeben
Fermentationsmedium	1,62 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, 2,48 % (w/v) Hefeextrakt, 15,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 40,7 mM Ammoniumsulfat, 0,75 mM Calciumchlorid, 4,38 mM Magnesiumsulfat (Zugabe nach dem Autoklavieren)
YPD-Medium	1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glucose, für Platten wurden zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar zugegeben
YPDS-Agarplatten	1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glucose, 1 M Sorbitol, für Platten wurden zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar zugegeben
BMGY-Medium/ BMMY-Medium	1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,0, 1,34 % (w/v) YNB, 0,00004 % Biotin, 1 % (v/v) <u>G</u> lycerin oder 0,5 % (v/v) <u>M</u> ethanol
MD-Agarplatten/ MM-Agarplatten	1,34 % (w/v) YNB, 0,00004 % Biotin, 2 % (v/v) Glucose (<u>D</u> extrose) oder 0,5 % (v/v) <u>M</u> ethanol, 15 g (w/v) Agar-Agar

Eingesetzte Antibiotika (Stammlösungen und Arbeitskonzentrationen):

Kanamycin	35 µg/mL (Stammlösung: 35 mg/mL)
Ampicillin	100 µg/mL (Stammlösung: 100 mg/mL)
Chloramphenicol	50 µg/mL (Stammlösung: 50 mg/mL in Ethanol)
Tetracyclin	12,5 µg/mL (Stammlösung: 12,5 mg/mL in Ethanol)
Zeocin	25-2000 µg/mL (Stammlösung: 100 mg/mL)

Alle Medien wurden mit VE-Wasser hergestellt und im Autoklaven für mindestens 20 Minuten bei 121 °C dampfsterilisiert. Die Zugabe von Antibiotika/Zusätzen aus 0,22 µm-filtrierten 1000-fach-Stammlösungen und das Gießen von Platte erfolgten nach dem Abkühlen der Medien.

2.2.3 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* auf Selektionsagarplatten erfolgte nach Ausstrich mittels Glasperlen für 16-20 h bei 37 °C im Inkubator. Mit einzelnen Kolonien wurden mittels steriler Pipettenspitzen oder Impföse jeweils 4-20 mL-Flüssigkulturen (inkl. entsprechender Antibiotika) inokuliert und diese im Reagenzglasschüttler bei 37 °C für 14-16 h inkubiert. Die Inokulation größerer Volumina erfolgte stets mit solchen Übernachtskulturen. Das Wachstum von Bakterien wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Die Lagerung von Nährplatten mit Bakterien erfolgte bei 4 °C für maximal 4 Wochen, Flüssigkulturen wurden für die jeweilige Verwendung frisch angesetzt.

2.2.4 Anzucht und Aufbewahrung von *P. pastoris*

Die Kultivierung von *P. pastoris* auf Nährplatten erfolgte nach Ausstrich mittels Glasperlen, steriler Zahnstocher, Impföse oder steriler Pipettenspitzen für 2-5 Tage bei 30 °C im Inkubator. Mit durch Verdünnungssaustrieche vereinzelt Kolonien wurden jeweils 4 mL-Flüssigkulturen inokuliert und diese im Reagenzglasschüttler bei 30 °C für 2 Tage inkubiert. Größere Volumina wurden stets mit solchen Flüssigkulturen beimpft und in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 200 rpm inkubiert. Um Schaumbildung zu verhindern, erfolgte die Zugabe von ca. 0,001 % (v/v) Breox FMT 30 Antifoam (Cognis) zu den Kulturen. Das Wachstum der Hefen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Die Lagerung von Nährplatten und Flüssigkulturen erfolgte bei 4 °C.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Puffer und Lösungen

Für molekularbiologische Arbeitsschritte wurden folgende mit MilliQ-gefiltertem Wasser hergestellte Puffer bzw. Lösungen verwendet.

TAE (50 x Stammlösung)	2 M Tris/Essigsäure pH 8, 50 mM Natrium-EDTA
DNA-Gelauftragungspuffer (10 x)	50 % (v/v) Glycerin, 10 mM EDTA pH 8, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol
dNTP-Mix	jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Lösung A (sterilfiltriert 0,22 µm-Filter)	39 mM Natriumacetat/Essigsäure pH 5,5, 100 mM Calciumchlorid, 70 mM Mangan(II)-chlorid
Lösung A-Glycerin (sterilfiltriert 0,22 µm-Filter)	15 % (v/v) Glycerin in Lösung A
SYBR Safe-Lösung	10 000-fache Stammlösung in DMSO
Enzymreaktionspuffer (5-10x)	Konzentrate vom Enzymhersteller bereitgestellt
Sorbitol-Lösung	1 M Sorbitol
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat

2.3.2 Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis und Faloona, 1987) lassen sich Nukleinsäuren vervielfältigen. Dabei werden ein Templat, d. h. eine DNA-Matrize, deren Sequenz amplifiziert werden soll, benötigt und zwei Oligonukleotide (Primer), welche das gewünschte Fragment an den jeweiligen 5'- und 3'-Enden abgrenzen. Durch Erhitzen wird die doppelsträngige Templat-DNA zu Einzelsträngen denaturiert. Anschließend hybridisieren bei einer von den Primern abhängigen Temperatur die Oligonukleotide mit den Einzelsträngen. Diese Verbindung verschafft einer thermostabilen DNA-Polymerase die Möglichkeit, in der Synthesephase, von den Primern ausgehend, den Doppelstrang zu resynthetisieren. Das Ergebnis einer zyklischen Wiederholung dieser Reaktionsfolge ist eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments. Da die beiden eingesetzten Primer an komplementäre DNA-Einzelstränge binden, erhält man DNA-Stücke einer genau definierten Länge. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen verwendet, *PfuTurbo*-Polymerase, Phusion Hot Start DNA-Polymerase und Taq DNA-Polymerase, von denen die ersten beiden zusätzlich zur eigentlichen Polymeraseaktivität eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzen, die ihnen ermöglicht, zunächst falsch eingebaute Nukleotide wieder zu entfernen, wodurch die Fehlerrate der Reaktion stark reduziert wird (*proof-reading*-Aktivität).

2.3.2.1 Standard-PCR

Mittels der Standard-PCR wurden cDNA-Sequenzen von Muschelbyssusproteinen aus der cDNA-Bank oder isolierten Plasmiden mittels spezifischer Primer unterschiedlichen Degenerierungsgrades amplifiziert. Die Reaktionen erfolgten nach folgendem Protokoll, wobei Inkubationszeiten und Temperaturen den Primern/Templaten bzw. den verwendeten Enzymen gemäß den Herstellerangaben angepasst wurden:

Ansatz:	Templat-DNA	10-200 ng
	Vorwärtsprimer (10 µM)	2 µL
	Rückwärtsprimer (10 µM)	2 µL
	dNTP-Mix	2 µL
	Reaktionspuffer (5- bzw. 10 x Konzentrat)	20 bzw. 10 µL
	Polymerase (2-5 u/µL)	0,5-1 µL
	MilliQ-Wasser	ad 100 µL

Ablauf:	Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
	Initialdenaturierung	95 °C	5 min	1
	i.) Denaturierung	95 °C	30 s	
	ii.) Primer-Anlagerung (<i>annealing</i>)	50-65 °C	30 s	35
	iii.) Synthese	68-72 °C	30 s-3,5 min	
	Verlängerte Extension	68-72 °C	10 min	1
	Lagerung	4 °C	∞	

2.3.2.2 Mutagenese-PCR

Um ortsspezifische Mutationen in die Sequenz von Plasmid-DNA einzuführen, wurde Mutagenese-PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Ansatz:	Plasmid-DNA	1-2 ng
	Vorwärtsprimer (10 µM)	2 µL
	Rückwärtsprimer (10 µM)	2 µL
	dNTP-Mix	1 µL
	10 x PfuTurbo Reaktionspuffer	5 µL
	PfuTurbo-Polymerase (2,5 u/µL)	1 µL
	MilliQ-Wasser	ad 50 µL

Ablauf:	Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
	Initialdenaturierung	95 °C	5 min	1
	i.) Denaturierung	95 °C	1 min	
	ii.) Primer-Anlagerung (<i>annealing</i>)	52-60 °C	45 s	20
	iii.) Synthese	68 °C	7,5 min	
	Verlängerte Extension	68 °C	10 min	1
	Lagerung	4 °C	∞	

2.3.2.3 Screening-PCR

Um positive Klone bei Klonierungen zu identifizieren, wurden diese per Screening-PCR analysiert. Dabei kamen als Template Flüssigkulturen von isolierten Einzelkolonien zum Einsatz. Die entsprechenden Kolonien wurden mittels steriler Pipettenspitzen von den Nährplatten in jeweils 500 µL LB-Medium (incl. Antibiotikums) überführt und bei 37 °C unter konstantem Schütteln (750 rpm) inkubiert, bis die Kultur eine deutliche Trübung aufwies (ca. 3 h). Neben der Identifizierung positiver Klone wurde die Screening-PCR auch zur Überprüfung der Integration transgener DNA in das Genom von *P. pastoris* durchgeführt. Hierzu erfolgte die Präparation der genomischen DNA aus frischen Hefekulturen mit dem *PrepEase Genomic DNA Isolation Kit* (USB/Affymetrix).

Ansatz:	Bakterienkultur	2 µL	genomische DNA	1 µg
	Vorwärtsprimer (10 µM)	0,4 µL		0,4 µL
	Rückwärtsprimer (10 µM)	0,4 µL		0,4 µL
	dNTP-Mix	0,4 µL		0,4 µL
	10 x Standard-Taq-Puffer (5- bzw. 10 x Konzentrat), incl. MgCl ₂	2 µL		2 µL
	Polymerase (2-5 u/µL)	0,2 µL		0,2 µL
	MilliQ-Wasser	14,6 µL		ad 20 µL

Ablauf:	Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
	Initialdenaturierung	95 °C	5 min	1
	i.) Denaturierung	95 °C	30 s	
	ii.) Primer-Anlagerung (<i>annealing</i>)	50 °C	30 s	35
	iii.) Synthese	72 °C	2,5 min	
	Verlängerte Extension	72 °C	10 min	1
	Lagerung	15 °C	∞	

2.3.3 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse oder Präparation von DNA-Proben wurden diese mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wandert die im eingesetzten Pufferbereich negativ geladene DNA im elektrischen Feld in Richtung Anode. Da DNA immer dieselbe Ladungsdichte hat, bestimmt bei gleicher Struktur (z. B. lineare DNA) nur die Größe der DNA-Stücke ihr Laufverhalten im Gel. Zur Herstellung von Gelen wurde 0,5-1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C erfolgten die Zugabe eines DNA-spezifischen Farbstoffs (*SYBR Safe DNA Gel Stain*) im Verhältnis 1:10 000 und das Gießen der Gellösung in die Laufapparatur. Beim Abkühlen bildet sich ein Netzwerk aus Agarosemolekülen mit Porengrößen von ca. 100-150 nm (Stellwagen, 2009). Zum Auftragen wurden die entsprechenden Proben mit DNA-Gelauftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach verwendeter Laufapparatur bei 100-200 V für 30-60 min. Anschließend wurden die Gele mit dem GelDoc-System (BioRad) dokumentiert. Zur Größenabschätzungen der getrennten DNA-Fragmente kamen DNA-Leitern (1 kb oder 100 bp) zum Einsatz.

2.3.4 Isolierung und Reinigung von DNA

Plasmid-DNA, PCR-Amplifikate oder restriktionsverdaute DNA-Fragmente wurden mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) entsprechend den Herstellerangaben gereinigt. Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach Elektrophorese wurden die Stücke mittels Skalpell aus den entsprechenden Gelen ausgeschnitten. Die Lagerung von DNA erfolgte bei -20 °C.

2.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Um DNA-Fragmente gezielt zu kombinieren, wurden diese jeweils mittels spezifischer Enzyme geschnitten. Dabei kamen prokaryotische Typ II-Restriktionsendonukleasen zum Einsatz, welche palindromische Sequenzen einer Länge von 6-8 Nukleotide spezifisch erkennen und hydrolytisch schneiden können. Dabei erzeugen die Enzyme entweder überlappende bzw. adhäsive (*sticky ends*) oder gerade DNA-Enden (*blunt ends*). Für molekularbiologische Arbeiten werden meist *sticky ends* bevorzugt, da diese wesentlich effektiver wieder zusammengefügt werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsverdaue im analytischen und präparativen Maßstab durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten in den jeweiligen vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffern bei 37 °C für 2-16 h unter leichtem Schütteln (300 rpm). Sofern möglich, wurden die Enzyme durch Inkubation für 20 min bei

65 °C inaktiviert. Anschließend wurde die DNA wie in 2.3.4 beschrieben gereinigt bzw. die Proben der analytischen Verdauung per Agarosegelelektrophorese analysiert.

	<u>präparativer Ansatz:</u>	<u>analytischer Ansatz:</u>
DNA	2-5 µg	200-300 ng
10 x Reaktionspuffer	10 µL	2 µL
Enzyme	jeweils 10-20 u	jeweils 2-5 u
BSA (10 mg/mL) (optional)	1 µL	0,2 µL
MilliQ-Wasser	ad 100 µL	ad 20 µL

2.3.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um nach Restriktionsverdauen die unerwünschte Re-Ligation von DNA zu verhindern, wurden ggf. die jeweiligen 5'-Phosphatgruppen enzymatisch entfernt. Dazu wurde gereinigte DNA gemäß den Herstellerangaben im entsprechenden Reaktionspuffer mit *Antarctic Phosphatase* versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der Phosphatase erfolgte bei 65 °C für 20 min.

2.3.7 Desoxythymidin-Erweiterung von DNA-Enden (*T-tailing*)

Für das TA-Klonierungssystem (siehe 2.3.13) wurde am 3'-Ende eines *blunt end-*geschnittenen Vektors ein Desoxythymidin-Überhang erzeugt (*T-tailing*). Dazu wurde die verdauete und gereinigte Vektor-DNA mit Taq-Polymerase im entsprechenden Reaktionspuffer in Anwesenheit von dTTP für 3 h bei 72 °C inkubiert und der Ansatz anschließend mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) gereinigt.

	<u>Ansatz:</u>
Verdauter Vektor	1-2 µg
10 x Standard Taq-Puffer	10 µL
Taq-Polymerase	10-20 u
dTTP (100 mM)	2 µL
MilliQ-Wasser	ad 100 µL

2.3.8 Ligation von DNA-Enden

Zur effektiven Rekombination von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten ist ihre kovalente Verknüpfung notwendig. Dazu wurden die verdauten und ggf. dephosphorylierten Vektor-DNA-Stücke mit den entsprechenden zu kombinierenden Fragmenten (Inserts) gemischt, wo-

bei sich ggf. *sticky ends* gemäß ihrer Watson-Crick-Basenpaarung zusammenlagern. Zur kovalenten Verknüpfung der DNA-Stränge kam eine DNA-Ligase zum Einsatz. Dieses Enzym katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die Reaktion der 3'-OH-Gruppe eines Stranges mit der entsprechenden freien 5'-Phosphatgruppe des jeweilig anderen Fragments unter Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung. Die Ansätze wurden entweder 1 h bei Raumtemperatur, 3 h bei 16 °C oder 16 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* DH10B mit dem halben Ligationsansatz. Das molare Verhältnis von Vektor- und Insert-DNA variierte im Verhältnis 1:1 bis 1:10. Um den Vektor-Hintergrund (Menge unverdauter bzw. re-ligierter Vektoren) zu bestimmen, wurden stets Kontrollansätze ohne Insert-DNA untersucht.

	<u>Ansatz:</u>
verdauter Vektor	50-150 ng
Insert-DNA	gemäß molarem Verhältnis
10 x Ligasepuffer (inkl. ATP)	2 µL
T4 DNA-Ligase (3 u/µL)	2 µL
MilliQ-Wasser	ad 20 µL

2.3.9 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung von *E. coli*-Zellen mit Kompetenz zur Aufnahme von Vektor-DNA erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Sambrook und Russel (Sambrook und Russell, 2001). Dazu wurden 100 mL LB-Medium (ggf. incl. entsprechender Antibiotika) 1:100 mit Übernachtskulturen angeimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert (150 rpm). Nach Zugabe von 20 mM MgCl₂ (1 M Stammlösung) und erneuter Inkubation für 10 min bei 37 °C (150 rpm) erfolgte die Zentrifugation der Zellen (5 min bei 4000 x g und 4 °C). Die Zellpellets wurden in 10 mL eiskalter Lösung A resuspendiert und die Suspensionen für 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 3000 x g und 4 °C) wurden die Zellen in 2 mL kalter Lösung A-Glycerin resuspendiert und in 100 µL-Aliquoten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80 °C.

2.3.10 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden Aliquote der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von der DNA (10-100 ng) oder einem halben Ligationsansatz wurden die Ansätze gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Inkubation für 30-45 s bei 42 °C und das erneute Abkühlen auf Eis für 2 min. Anschließend wurden die Zel-

len mit 1 mL LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und für 45 min bei 750 rpm und 37 °C geschüttelt. 10-100 µL der Suspension wurden auf LB-Selektions-Agarplatten ausplattiert bzw. bei Ligationsansätzen die gesamten Zellen nach Zentrifugation (2 min bei 5000 x g) und Resuspendieren des Zellpellets in 100 µL LB-Medium.

2.3.11 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH10B im Miniprep-Maßstab (4 mL Übernachtskultur) oder Midiprep-Maßstab (50 mL Übernachtskultur) wurde mit dem Wizard Plus SV *Minipreps DNA Purification System* (Promega) bzw. dem Wizard Plus SV *Midipreps DNA Purification System* (Promega) durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte stets mit MilliQ-Wasser (Miniprep: 100 µL, Midiprep: 1000 µL).

2.3.12 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen nach der Sanger-Methode (Sanger *et al.*, 1977) zur Verifizierung klonierter Konstrukte sowie zur Analyse der cDNA von Muschelbyssusproteinen wurden von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Die Analyse von Chromatogrammen erfolgte mit der Software ApE (M. Wayne Davis, University of Utah, USA), die Überprüfung der Sequenzen mit dem CLC Sequence Viewer (CLC bio).

2.3.13 TA-Klonierung

Ein einfaches und effektives Hilfsmittel für die Sequenzanalyse von cDNAs stellt die TA-Klonierung dar. Viele DNA-Polymerasen, u. a. Taq-Polymerase, produzieren bei ihrer Reaktion keine glatten DNA-Enden, sondern ergänzen das 3'-Ende eines jeden Doppelstrangs durch ein zusätzlich angefügtes überhängendes Adenosin. Diese Eigenschaft kann ebenfalls dafür genutzt werden, um an glatte Enden von restriktionsverdauten Vektoren oder mittels anderer Polymerasen produzierten PCR-Produkten ein zusätzliches Nukleotid anzufügen. Durch geschickte Kombination von PCR-Produkten mit 3'-Adenosin-Überhängen und *blunt-end*-geschnittenen und mit 3'-Thymidin versehene Vektoren können somit effizient einfach zu ligierende Duplexe erzeugt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden pGEM-T-Vektoren, welche auch kommerziell erhältlich sind (Promega), selbst hergestellt. Dazu erfolgte die Linearisierung des Vektors pGEM-5Zf(+) mit EcoRV (ü. N. bei 37 °C). Anschließend wurden mittels *T-tailing* (siehe 2.3.7) 3'-T-Überhänge erzeugt und nicht beidseitig thymidinylierte Vektoren durch Ligation miteinander verbunden. Die generierten pGEM-T-Vektoren wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese von den ligierten Fragmenten getrennt

und isoliert. Ligationen erfolgten durch Mischung von Vektor (100 ng) und Inserts im molaren Verhältnis von 1:3, Zugabe von Ligasepuffer und Ligase, Inkubation der Ansätze ü. N. bei 4 °C und anschließender Transformation von *E. coli* DH10B. Positive Klone wurden bei der TA-Klonierung über Schwarz-/Weiß-Selektion (S-Gal) identifiziert (Messing *et al.*, 1977; Ullmann *et al.*, 1967).

2.3.14 Mutagenese

Zur zielgerichteten Einführung von Mutationen in Plasmid-DNA wurde Mutagenese-PCR mit Primern, welche die entsprechende Mutation enthielten, durchgeführt (siehe 2.3.2.2). Anschließend erfolgte die Reinigung der amplifizierten Plasmid-DNA (2.3.4), die Entfernung nicht mutierte Templat-DNA durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease DpnI (2.3.5) und die Transformation von *E. coli* DH10B mit 5-20 µL des Restriktionsansatzes (2.3.10).

2.3.15 Transformation von *P. pastoris*

Neben Bakterien sind auch Hefen zur Aufnahme und Replikation transgener DNA fähig. Dabei besitzen diese die interessante Eigenschaft, Fremd-DNA durch homologe Rekombination in ihr Genom zu integrieren und somit stabile Transformanten zu bilden. Die Transformation von *P. pastoris* mit vektorieller DNA erfolgte mittels Elektroporation. Zur Vorbereitung der Zellen wurden 2 x 250 mL YPD-Medium im Verhältnis 1:500 mit frischen Übernachtskulturen beimpft und diese bis zu einer Zelldichte von $OD_{600}=1,5$ angezogen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Suspensionen (1500 x g, 5 min, 4 °C) und die Resuspension der Zellen in 500 mL eiskaltem MilliQ-Wasser. Dieser Waschschrift wurde mit 250 mL eiskaltem MilliQ-Wasser und 20 mL eiskalter Sorbitol-Lösung wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 mL Sorbitollösung resuspendiert und bis zu ihrer Verwendung auf Eis aufbewahrt. Um die genomische Integration der transformierten Plasmid-DNA zu ermöglichen, muss diese zuvor linearisiert werden. Dazu erfolgte der Verdau von 15 µg Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease SacI über Nacht bei 37 °C (siehe 2.3.5). Der inaktivierte Verdau-Ansatz wurde mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung versetzt und die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol p. A. gefällt (15 min bei Raumtemperatur, 10 min bei -80 °C). Nach Zentrifugation (17 000 x g, 30 min, 4 °C) wurde die DNA getrocknet (10 min bei 60 °C), in 10 µL MilliQ-Wasser gelöst und die Lösung mit 100 µL der Zellsuspension in einer 0,2 cm-Elektroporationsküvette gemischt (5 min auf Eis). Es folgte die Elektroporation nach den Herstellerangaben (2 kV, 4 ms-Puls). Die Zellen wurden mit 1 mL Sorbitollösung versetzt und für 2 h bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100 µL auf YPDS-

Agarplatten mit 100 µg/mL Zeocin ausplattiert und die Platten für 4-6 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.3.16 Selektion von *P. pastoris*

Bei der Transformation von *P. pastoris* durch Elektroporation entstehen mit geringer Wahrscheinlichkeit (1-10 %) Klone mit mehreren integrierten Kopien der rekombinanten DNA. Da diese Zellen auch mehrere Kopien der Zeocin-Resistenzkassette besitzen, können solche Klone auf Nährplatten mit wesentlich höherer Zeocinkonzentration wachsen. Um solche Klone zu identifizieren und zu selektionieren, wurden Verdünnungsausstriche von Einzelklonen der Transformationsplatten auf YPDS-Platten mit 500, 1000 und 2000 µg/mL Zeocin durchgeführt. Dieser Ausstrich wurde zweimal wiederholt und final auf Klone fokussiert, die stabiles Wachstum auf 2000 µg/mL-Zeocin-Platten aufwiesen.

2.4 Bioinformatische Methoden

2.4.1 Berechnung physikalischer und chemischer Parameter von Proteinen

Zur Berechnung physikalischer und chemischer Parameter von Proteinen kamen Online-Tools (u. a. ProtParam) zum Einsatz, welche durch das *ExpASy SIB Bioinformatics Resource Portal* (*Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB), www.expasy.org) bereitgestellt werden (Walker, 2005).

2.4.2 Alignment von DNA- und Proteinsequenzen

Zur Sequenzanalyse von DNA und Proteinen wurden Alignments erstellt. Hierzu fanden die Algorithmen Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007) oder Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) Verwendung, entweder innerhalb des Programms CLC-Sequence Viewer (CLC bio, Aarhus, Dänemark) oder mittels der entsprechenden Online Tools, bereitgestellt durch das *European Institute of Bioinformatics* (EBI, www.ebi.ac.uk). Zur Weiterbearbeitung von Sequenzalignments wurde das Online Tool Boxshade 3.21 (www.ch.embnet.org) eingesetzt.

2.4.3 Strukturvorhersagen

Für strukturelle Vorhersagen von Proteinen kamen Online-Tools zum Einsatz, die im *Bioinformatics Toolkit* des Max-Planck-Instituts für Entwicklungsbiologie, Tübingen (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de>), zusammengefasst sind. Mittels der zur Verfügung gestellten bzw. verlinkten Algorithmen wurden Vorhersagen zu Sekundärstruktur, Wiederholungssequenzen etc. getroffen. Sekundärstrukturvorhersagen mittels neuronalen Netzen erfolgten mit PSIPRED (Jones, 1999). Für die Vorhersage von Transmembranregionen in Proteinen wurde der TMHMM-Server (Version 2.0) verwendet (Krogh *et al.*, 2001). Basierend auf bekannten Proteinstrukturen ist es möglich, Homologiemodelle für die Tertiärstruktur von Proteinen unbekannter Struktur zu berechnen. Hierzu wurde Phyre² eingesetzt (Kelley und Sternberg, 2009), welchem eine eigene Faltungsbibliothek (Hidden-Markov-Modelle (HMMs) bekannter Struktur motive), erstellt aus den Datenbanken *Structural Classification of Proteins* (SCOP) und *Worldwide Protein Data Bank* (PDB), zugrunde liegt. Anhand einer eingegebenen Sequenz werden mittels PSI-BLAST-Suchen Homologiecluster erstellt sowie mit PSIPRED und weiteren Algorithmen Sekundärstrukturvorhersagen getroffen. Nach Erstellung eines HMMs und dessen Abgleich mit der Faltungsbibliothek (Bennett-Lovsey *et al.*, 2008) werden unterschiedliche Strukturmodelle erstellt und die Aminosäureseitenketten unter Berücksichtigung molekülgeometrischer sowie energetischer Überlegungen ergänzt. Die glaubwürdigsten Strukturmodelle werden schließlich zu einem finalen Homologiemodell kombiniert. Durch den Algorithmus 3DLigandSite (Wass *et al.*, 2010) werden schließlich potenzielle Liganden ermittelt und im Modell ergänzt.

2.4.4 Analyse potenzieller posttranslationaler Modifikationen

Neben dem experimentellen Nachweis posttranslationaler Modifikationen können diese mittels geeigneter Algorithmen vorausgesagt werden. Diese basieren meist auf einer datenbankgestützten Analyse der Primärstruktur eines Proteins hinsichtlich spezieller Sequenzmotive, die mit den entsprechenden Modifikationen im Zusammenhang stehen oder leiten sich ihrerseits von Vorhersagen (z. B. der Sekundärstruktur) ab. Die Algorithmen sind meist in Form von Online-Tools verfügbar, die z. B. vom *Center for Biological Sequence Analysis* (CBS) der Technischen Universität von Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) bereitgestellt werden.

Tabelle 2-6 Verwendete Online-Tools zur Vorhersage posttranslatiionaler Modifikationen

Online-Tool	Referenz	Verwendung
SignalP 4.1 Server	(Petersen <i>et al.</i> , 2011)	Vorhersage von Sekretions-Signalpeptiden
NetOGlyc 3.1 Server	(Julenius <i>et al.</i> , 2005)	Vorhersage von O-Glycosylierungen
NetNGlyc 1.0 Server	(Blom <i>et al.</i> , 2004)	Vorhersage von N-Glycosylierungen
NetCGlyc 1.0 Server	(Julenius, 2007)	Vorhersage von C-Mannosylierungen
NetPhos 2.0 Server	(Blom <i>et al.</i> , 1999)	Vorhersage von Phosphorylierungen
big-PI Predictor	(Eisenhaber <i>et al.</i> , 1999)	Vorhersage von GPI-Verankerung

2.4.5 Strukturanalysen

Analysen von Proteinkristallstrukturen erfolgten anhand entsprechender Koordinatendateien im PDB-Format mit der Software PyMOL (Schrödinger). Zur Berechnung von Oberflächenpotenzialen wurden die Algorithmen Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) (Baker *et al.*, 2001) und PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004) unter Verwendung der entsprechenden PyMOL-Plugins eingesetzt. Sekundärstrukturen wurden mit dem in PyMOL integrierten DSS-Algorithmus oder mit DSSP ermittelt (Kabsch und Sander, 1983). Die Skalierung der Oberflächenpotenziale erfolgte im Bereich $\pm 5 k_B \cdot T/e$ (in mV), wobei k_B die Boltzmann-Konstante darstellt ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T die absolute Temperatur (K) und e die Elementarladung eines Elektrons ($1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$). Überlagerungen von Strukturen erfolgten ebenfalls mit PyMOL. Ein Maß für die Identität der überlagerten Strukturen stellt dabei die Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (*root mean square deviation*, RMSD) der Abstände der überlagerten Atome dar.

Formel 2-1
$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum d_{ii}^2}{N}}$$

RMSD Standardabweichung der Abstände überlagerter Atome

d_{ii} Abstand des i-ten Atoms von Molekül 1 zum i-ten Atom von Molekül 2 (Å)

N Anzahl der überlagerten Atome

2.5 Präparative Methoden

2.5.1 Puffer und Lösungen

Die für präparative Methoden verwendeten Puffer und Lösungen sind zusammen mit den Beschreibungen der jeweiligen Methoden in den folgenden Kapiteln angegeben. Alle Lösungen wurden mit MilliQ-gefiltertem Wasser hergestellt und nach dem Einstellen des jeweiligen pH-Wertes auf das Endvolumen aufgefüllt und filtriert (0,22 μm oder 0,45 μm). Puffer für die Säulenchromatographie wurden zusätzlich für mindestens 30 min durch Anlegen von Vakuum unter stetigem Rühren entgast.

2.5.2 Expressionstests

2.5.2.1 *E. coli*

Zur Evaluierung der rekombinanten Produktion von Byssusproteinen in *E. coli* wurden Expressionstests (2.2.1) durchgeführt. Dabei kamen zwei Expressionssysteme zum Einsatz, welche unterschiedliche Promotoren verwenden:

T7-Promotorsystem zur cytosolischen Expression:

Mit frischen Übernachtskulturen der entsprechend transformierten Stämme (BL21-, HMS174- und Origami-Derivate, transformiert mit Vektoren des pET-Systems) wurden jeweils 50-100 mL LB-Medium (inkl. Antibiotika) im Verhältnis 1:100 bis 1:1000 inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,8 angezogen, wobei die Kulturen final für ca. 30 min auf 16-30 °C temperiert wurden. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression des Transgens durch Zugabe von 25 μM bis 1 mM Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (IPTG) aus einer 1 M-Stammlösung. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die OD_{600} bestimmt und die Zellen pelletiert (5000 x g, 2 min). Die Zellpellets von jeweils 800 μL Kultur wurden in 300 μL 2,5 x SDS-Auftragspuffer pro $\text{OD}_{600}=1$ resuspendiert und die Proben 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend folgte die Analyse von 10-15 μL der Proben per SDS-PAGE (siehe 2.6.2). Um die Löslichkeit der produzierten Proteine zu überprüfen, wurden zu entsprechenden Zeiten jeweils 2 mL Kultur entnommen, die Zellen zentrifugiert und in 500 μL Phosphatpuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 0,2 mg/mL Lysozym erfolgte die Inkubation der Zellen 90 min bei 4 °C und anschließender Aufschluss durch Ultraschallbehandlung (3 x 30 s, 2/0,2 s-Pulse, Sonde MS 73, 10 % Amplitude). Die Proben wurden zentrifugiert (20 000 x g, 30 min, 4 °C), Überstand und Pellet separiert und der Überstand im Verhältnis

1:5 mit SDS-Auftragspuffer versetzt. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 500 μ L Tris-Harnstoff-Puffer unter Zugabe von SDS-Auftragspuffer. Nach Inkubation für 10 min bei 95 °C wurden 10 μ L der Proben per SDS-PAGE analysiert.

tet-Promotorsystem zur periplasmatischen Expression:

Die Produktion rekombinanter Proteine im *E. coli*-Periplasma, welches ein oxidierendes Milieu zur Bildung von Disulfidbrücken bietet, wurde mittels Expressionstests evaluiert. Dabei kamen das tet-Promotorsystem und das aminoterminalen Sekretionssignals von OmpA, einem Protein aus der äußeren Membran von *E. coli*, zum Einsatz. Verwendet wurden die Stämme JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) und JM83pTUM4 (JM83, transformiert mit dem chaperoncodierenden Helferplasmid pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006)). Der tet-Promotor besitzt im Gegensatz zum T7-System ein deutlich reduziertes Expressionslevel, weswegen er sich für einen erfolgreichen Export der Proteine ins Periplasma eignet. Ein weiterer Vorteil dieses Systems besteht darin, dass die Expressionsrate durch die Induktor-Konzentration effektiv gesteuert (titriert) werden kann. Die Transformation der Zellen mit den entsprechenden Konstrukten im Vektor pASK-IBA32 erfolgte analog zum T7-System. Mit Übernachtskulturen der Zellen wurden jeweils 50-100 mL LB_{Amp}-Medium im Verhältnis 1:50-1:100 inokuliert und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert. Anschließend erfolgten die Induktion mit 0,05-0,2 mg/L Anhydrotetracyclin und die Expression für 3-20 h bei 16-22 °C. Die Probenahme für vollständige Zelllysate erfolgte analog zu den Tests im T7-Expressionssystem. Um die Lokalisierung gebildeter Proteine im Periplasma zu analysieren, wurden die Zellen in Saccharose-haltigem Puffer inkubiert, wobei die äußere Membran osmotisch zerstört, die innere Membran jedoch intakt bleibt. Dazu wurden Zellen aus 40 mL Kultur pelletiert (5000 x g, 5 min) und in 800 μ L Periplasma-Aufschlusspuffer resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Zellen bei 5000 x g für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet im Verhältnis zum ursprünglichen Volumen in SDS-Auftragspuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation des Überstands (17 000 x g, 30 min), um Zellfragmente restlos zu entfernen, wurde dieser mit 1/5 Volumen SDS-Auftragspuffer versetzt. Nach Inkubation für 10 min bei 95 °C erfolgte die Analyse von 10 μ L der Proben per SDS-PAGE.

SDS-Auftragspuffer (5 x Stammlösung)	312,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 50 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Phosphatpuffer	20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl
Tris-Harnstoff-Puffer	50 M Tris/HCl pH 7,5, 8 M Harnstoff
Anhydrotetracyclin-Lösung	2 mg/mL Anhydrotetracyclin in DMF oder Ethanol
Periplasma-Aufschlusspuffer	100 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA

2.5.2.2 *P. pastoris*

Um die rekombinante Produktion von Proteinen in der methylotrophen Hefe *P. pastoris* zu evaluieren, wurden analog zu *E. coli* Expressionstests durchgeführt. Dazu erfolgte die Anzucht von vorselektionierten Klonen (siehe 2.2.4) in 10 mL BMGY-Medium für 48 h. Pro $OD_{600}=10$ wurden 1 mL Kultur entnommen, zentrifugiert (1500 x g, 5 min), die Zellen in 10 mL BMMY-Medium (enthält Methanol) resuspendiert und die induzierten Kulturen inkubiert. Pro Tag wurden eine Probe von 1 mL entnommen, das Differenzvolumen der Kulturen durch BMMY-Medium ergänzt und 50 μ L Methanol zugegeben. Die entnommenen Proben wurden zentrifugiert und Überstand und Pellet separiert. Der Aufschluss der pelletierten Zellen erfolgte durch Resuspension in 100 μ L Tris-Harnstoff-Puffer, Versetzen mit einem Volumen Glasperlen und Schütteln für 3 h bei 1400 rpm. Anschließend wurden die Zellaufschlüsse sowie die Medien-Überstände per SDS-PAGE analysiert.

SDS-Auftragspuffer (5 x Stammlösung)	312,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 50 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Tris-Harnstoff-Puffer	50 M Tris/HCl pH 7,5, 8 M Harnstoff

2.5.3 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*

Die rekombinante Produktion von Byssusproteinen in *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)-RIPL wurde sowohl im Batchverfahren (diskontinuierliche Kulturen ohne Korrekturen von pH etc. bzw. Nährstoffzuführung) als auch mittels Fed-Batch-Kulturen (kontinuierlich gesteuerter Bioreaktor) durchgeführt.

2.5.3.1 Batchkultivierung

Die Batchkultivierung erfolgte im druckluftbegasteten Flaschenreaktor (5 L-Waschflasche mit Fritte und angesetztem weiteren Schraubgewinde-Port, Eigenbau Glasbläserei, Universität Bayreuth). Dazu wurden 4 L LB-Medium im Reaktor autoklaviert, dieser auf 37 °C vortemperiert, mit Kanamycin und 0,001 % Breox FMT30 Antifoam versetzt und mit sterilfiltrierter Druckluft begast (ca. 5-10 L/min). Anschließend erfolgte die Inokulation mit 20 mL-Übernachtskulturen (in $LB_{Kana/Cm}$ -Medium angezogen) und die Inkubation bis zu einer OD_{600} von $\sim 1,0$ (ca. 4 h). Die Kulturen wurden durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und für weitere 4 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 x g, 10 min), zweimal mit Trispuffer oder Phosphatpuffer gewaschen, in 5 mL

Tris-EDTA-Puffer/g Zellen schockgefroren (in flüssigem Stickstoff) und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

IPTG-Stammlösung	1 M IPTG
Phosphatpuffer	20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl
Trispuffer	50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl
Antifoam-Lösung	1 % (v/v) Breox FMT 30

2.5.3.2 Fed-Batch-Kultivierung

Die Fed-Batch-Kultivierung von *E. coli* erfolgte im Minifors Bioreaktor (Infors). Dazu wurden 1,3 L Fermentationsmedium im Reaktor autoklaviert, dieser auf 37 °C vortemperiert und mit Druckluft begast (4 L/min). Nach der Kalibrierung der Sonden (pH, Sauerstoff) nach den Herstellerangaben und Anschluss der Korrekturmittel und Nährlösung wurde Kanamycin zugesetzt und der Reaktor unter konstantem Rühren (900 rpm) inkubiert. Die Fermentation erfolgte semiautomatisch unter Verwendung der Software Iris (Infors) bei konstantem pH-Wert von 6,8, gesteuert durch Korrektur mittels 25 % Ammoniaklösung und 2,5 M Phosphorsäure und einem Sauerstoffpartialdruck (pO₂) von minimal 40 %, gesteuert durch die optionale Zufuhr von reinem Sauerstoff. Schaumbildung wurde automatisch durch die Zugabe von Antifoamlösung unterbunden, wogegen die Zufuhr der Nährlösung manuell nach dem Sauerstoffverbrauch der Kultur erfolgte. Das Wachstum der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen durch Messung der optischen Dichte überprüft. Bei einer OD₆₀₀ von ~40 erfolgte die Temperierung auf 30 °C und die Induktion mit 0,1 mM IPTG. Nach einer Expressionszeit von 3 h erfolgten die Ernte der Zellen durch Zentrifugation und dreimaliges Waschen mit Trispuffer oder Phosphatpuffer (jeweils Resuspension mittels Dispergierer und Zentrifugation bei 6000 x g für 15 min). Die vollständig resuspendierten Zellen wurden anschließend in 5 mL Tris-EDTA-Puffer/g Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

IPTG-Stammlösung	1 M IPTG
Basische Korrekturlösung	25 % (w/v) Ammoniak
Saure Korrekturlösung	2,5 M Phosphorsäure
Fermentations-Nährlösung	80 % (v/v) Glycerin
Antifoamlösung	5 % Breox FMT30
Phosphatpuffer	20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl
Trispuffer	50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl
Tris-EDTA-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA

2.5.4 Isolierung und Solubilisierung von Inclusion Bodies

Die Isolierung von unlöslich produzierten Proteinen aus *E. coli* wurde nach einem Protokoll von Rudolph et al. (Rudolph *et al.*, 1997) durchgeführt, unter Anpassung einiger Parameter an die höheren Zelldichten, die durch Fed-Batch-Kultivierung im Vergleich zu diskontinuierlichen Kulturen erreicht werden. Nach dem vollständigen Auftauen der Zellen wurden 0,2 mg/mL Lysozym zugegeben und die Suspension unter stetigem Rühren bei 4 °C für 90 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Proteaseinhibitoren (Mix G (Serva) oder 1 mM PMSF) und die Behandlung der Suspension mit Ultraschall (Sonde KE76 (Bandelin), 5 x 1 min auf Eis, 60 % Amplitude, 2/0,2 s-Pulsation). Der Zellaufschluss wurde zentrifugiert (5000 x g, 15 min, 8 °C) und das IB-Pellet mittels Dispergierer in ~10 Volumen Detergens-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (20 000 x g, 5 min, 8 °C) wurden die Inclusion Bodies in Tris-EDTA-Puffer resuspendiert und erneut 3 x 1 min mit Ultraschall behandelt. Diese Kombination aus Resuspendierung und Ultraschallbehandlung wurde dreimal wiederholt. Anschließend folgte jeweils dreimaliges Waschen der Inclusion Bodies in Detergenspuffer, IB-Waschpuffer und Trispuffer (20 000 x g, 5 min, 8 °C) und die Lagerung des IB-Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C. Zur Solubilisierung der Inclusion Bodies wurden diese mittels Dispergierer in Harnstoff- oder Guanidin-Denaturierungspuffer resuspendiert (10 mL/g IB-Pellet), für mindestens 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und unlösliche Bestandteile anschließend durch Zentrifugation entfernt (8000 x g, 30 min). Der durch UV-spektrometrische Messungen bestimmte Gewichtsanteil der rekombinanten Proteine am IB-Pellet betrug etwa 20 % (w/w).

Lysozym-Stammlösung	20 mg/mL in Phosphatpuffer
Tris-EDTA-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA
Detergenspuffer	60 mM EDTA, 2 % (v/v) Triton X-100, 1,5 M NaCl, pH 7
IB-Waschpuffer	100 mM Tris/HCl pH 7, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA
PMSF-Lösung	100 mM PMSF in Isopropanol
Harnstoff-Denaturierungspuffer	20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 10 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) oder 20 mM Dithiothreitol (DTT)
Guanidin-Denaturierungspuffer	20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl, 8 M Guanidiniumhydrochlorid, 20 mM TCEP

2.5.5 Präparative säulenchromatographische Methoden

Rekombinant produzierte Proteine wurde mittels präparativer Säulenchromatographie unter Verwendung der *fast protein liquid chromatography*-(FPLC)-Systeme ÄKTA FPLC und

ÄKTA Purifier sowie der Software Unicorn (GE Life Sciences) gereinigt. Dabei kamen verschiedene Chromatographiematrizes bzw. -methoden zum Einsatz, wobei die Flussraten den jeweiligen maximalen Drucklimits der Säulen/Säulenmaterialien gemäß den Herstellerangaben angepasst wurden. Die Beladung der Säulen erfolgte je nach Anwendung mittels Probenauftragsschleife, Superloop oder Auftragspumpe. Fraktionen wurden basierend auf der UV-Absorption bei 280 nm, unter Anpassung der Fraktionsgrößen an die jeweilige Säule, automatisiert gesammelt.

2.5.5.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf einer spezifischen reversiblen Interaktion einer gelösten Substanz mit einer festen Phase, z. B. die Bindung von Proteinen mit Poly-Histidin-Sequenzen (His-Tags) an Matrizes mit immobilisierten Metallionen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chromatographiesäulen mit einer Chelating Sepharose Fast Flow-Matrix (GE Life Sciences) verwendet. Dieses Material besteht aus quervernetzten sechsprozentigen Agarosekugeln mit einem mittleren Durchmesser von 90 µm und kovalent gekoppelter Iminodisäure (IDA). Durch den dreizähligen IDA-Liganden können Metallionen mit hoher Affinität gekoppelt werden, womit für die Koordination weiterer Liganden (z. B. His-Tag) drei Bindestellen zur Verfügung stehen. Durch die Zugabe von Imidazol kann der entsprechende Ligand dann kompetitiv aus dem Komplex verdrängt werden und das Protein aus der Säule eluiert. Im Rahmen der Arbeit wurden Säulen mit Volumina von 5 ml bis 180 mL verwendet. Vor jeder Reinigung erfolgte die Beladung des Säulenmaterials mit Nickelsulfat nach den Herstellerangaben. Anschließend erfolgte die Äquilibrierung mit mindestens 2 Säulenvolumen (SV) IMAC-A-Puffer. Die gelösten Inclusion Bodies wurden mindestens 1:10 mit IMAC-A-Puffer verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Die Auftragung der SUMO-Spaltungsansätze (siehe 2.5.6) erfolgte nach dem Hinzufügen kristallinen Harnstoffs auf eine Endkonzentration von 8 M und Filtration der Lösung (0,45 µm-Filter), wobei hier meist kleinere Säulen zum Einsatz kamen (5-10 mL HisTrap FF, GE Healthcare). Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit IMAC-A-Puffer bis sich eine stabile UV-Basislinie einstellte. Es folgte in analoger Weise ein zweiter Waschschriff mit 4-8 % IMAC-B-Puffer (entspricht 20-40 mM Imidazol). Anschließend wurden sämtliche Proteine mit 100 % IMAC-B-Puffer (500 mM Imidazol) eluiert.

IMAC-A-Puffer	20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 5 mM DTT
IMAC-B-Puffer	20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, 5 mM DTT

2.5.5.2 Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie basiert die Interaktion von Molekülen mit der Säulenmatrix auf ionischen Wechselwirkungen. Für Proteine stellt dabei die Nettoladung, also die Summe aller bei einem bestimmten pH-Wert vorhandenen Ladungen an der Moleküloberfläche, den entscheidenden Parameter dar. Diese lässt sich durch den isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins ermitteln, welcher den pH-Wert angibt, bei dem sich alle positiven und negativen Ladungen eines Proteinmoleküls ausgleichen. Bei pH-Werten unterhalb des pI liegt das Proteinmolekül netto kationisch, oberhalb anionisch vor. Je nach gewählter Säulenmatrix (immobilisierte Kationen oder Anionen) können somit Proteine auf die Säule gebunden werden. Die Elution erfolgt hier durch Erhöhung der Ionenstärke, was zu einer kompetitiven Verdrängung der Proteine durch die Salzionen führt. Theoretische pI-Werte der gereinigten Proteine wurden mittels ProtParam (www.expasy.org) bestimmt und basieren auf den pK-Werten der einzelnen Aminosäuren bzw. Termini (Bjellqvist *et al.*, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit kam Kationenaustauschchromatographie mit SP Sepharose Fast Flow (GE Life Sciences) als Matrix zum Einsatz. Diese besteht aus quervernetzten sechsprozentigen Agarosekügelchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 90 μm und negativ geladenen Sulfopropylgruppen. Zum Einsatz kam eine mit SP-A-Puffer äquilibrierte 20 mL-Säule, auf die solubilisierte Inclusion Bodies aufgetragen wurden. Nach dem Waschen mit SP-A-Puffer bis zur Einstellung einer stabilen Basislinie erfolgte die Elution gebundener Proteine durch einen linearen Gradienten von 0-70 % SP-B-Puffer (entspricht 50-715 mM NaCl) über 7 SV.

SP-A-Puffer	20 mM Kaliumphosphat pH 7, 40 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 10 mM DTT
SP-B-Puffer	20 mM Kaliumphosphat pH 7, 1 M NaCl, 8 M Harnstoff, 10 mM DTT

2.5.5.3 Gel-Permeationschromatographie

Bei der Gel-Permeationschromatographie (GPC) bzw. Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) werden Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Anders als die zuvor beschriebenen Chromatographiearten findet hier keine Bindung an die Matrix statt, entscheidend ist einzig das Diffusionsvolumen des entsprechenden Moleküls, welches durch dessen hydrodynamischen Radius bedingt ist. Kleinere Moleküle können weiter in die Matrix eindringen als größere, was dazu führt, dass sie später aus der Säule eluiert werden. Die GPC wurde sowohl im präparativen als auch im analytischen Maßstab unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Superdex 200-Säulen (GE Life Sciences) durchgeführt. Diese bestehen aus hochvernetzter Agarose mit kovalent gekoppeltem Dextran. Zur

Reinigung von Proteinen kam eine HiLoad 26/60 Superdex 200 pg-Säule mit einem Volumen von 320 mL zum Einsatz. Nach der Äquilibration der Säule mit mindestens 2 SV GPC-Puffer (20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl) wurden über eine Probenschleife maximal 7 mL konzentrierte Proteinlösung in GPC-Puffer aufgetragen. Die anschließende Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 3 mL/min.

2.5.6 Proteolytische Spaltung des 6xHis-SUMO-Fusionstags

Zur Vereinfachung der Reinigung rekombinant produzierter Byssusproteine wurden diese mit einem aminoterminalen 6xHis-SUMO-Tag produziert (Sequenz von SMT3, einem Mitglied der SUMO-Familie aus *S. cerevisiae*). Zur Spaltung des Tags erfolgte die Proteolyse mittels ULP1, einer SMT3-spezifischen Protease aus *S. cerevisiae*, welche, anders als viele sequenzspezifische Proteasen, die räumliche Struktur von SUMO erkennt (Mossesso und Lima, 2000). Neben der dadurch bedingten hohen Selektivität und Spezifität für die SUMO weist ULP1 eine hohe Stabilität und große Bandbreite möglicher Pufferbedingungen auf (Butt *et al.*, 2005). Eine rekombinante Version von ULP1 mit 6xHis-Tag wurde von Lukas Eisoldt produziert, gereinigt und zur Verfügung gestellt. Vor der Spaltung der 6x-His-SUMO-Tags erfolgte die Dialyse der aus den Inclusion Bodies isolierten und per IMAC gereinigten Proteine gegen SUMO-Spaltungspuffer. Anschließend wurde ULP1 im molaren Verhältnis von 1:500 gegenüber den Fusionsproteinen zugegeben und die Lösung über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren inkubiert. Die Abtrennung nicht gespaltener Fusionsproteine, der 6xHis-SUMO-Tags und der Protease erfolgte mittels IMAC.

SUMO-Spaltungspuffer	20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl, 1 M Harnstoff, 1 mM DTT
ULP1-Stammlösung	8,3 mg/mL ULP1, 25 mM Tris/HCl pH 8, 250 mM NaCl, 500 µM DTT, 50 % (v/v) Glycerin

2.5.7 Dialyse und Ultrafiltration

Zur Renaturierung/Rückfaltung von Proteinen und zum Pufferwechsel vor Experimenten wurden Dialysen durchgeführt. Die Dialyse basiert auf der passiven Diffusion von Molekülen durch eine semipermeable Membran mit einer definierten Ausschlussgröße, die so gewählt wird, dass kleine Moleküle (Wasser, Puffersubstanzen etc.) die Membran passieren können, Makromoleküle jedoch zurückgehalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit kamen Dialysesläuche aus regenerierter Zellulose mit einer Ausschlussgröße von 6-8 kDa zum Einsatz (Spectra/Por 1, Spectrum Laboratories), die vor ihrer Verwendung mindestens 15 min in des-

tilliertem Wasser inkubiert wurden. Die Dialyse von Proteinlösungen erfolgte schrittweise bei 4 °C gegen Reservoirs mit dem 10 bis 100-fachen Volumen unter leichtem Rühren (pro Dialyseschritt mindestens 5 h). Die Anzahl der Schritte richtete sich dabei nach den Bedürfnissen der jeweiligen Anwendungen bzw. den Volumenverhältnissen der Proteinlösungen zu den Reservoirs. Optional (insbesondere bei erstmaliger Rückfaltung nach Proteinreinigungen) erfolgte vor der Dialyse die Zugabe von Proteaseinhibitoren (Mix G, Serva) zu den Proteinlösungen. Um Proteine zu konzentrieren, wurden diese mittels Zentrifugalkonzentratoren (Millipore oder Sartorius) oder einer Amicon Rührzelle 8200 (Millipore) unter Verwendung von Membranen mit Ausschlussgrößen von 10 bzw. 30 kDa nach den Herstellerangaben ultrafiltriert.

2.5.8 Gefriertrocknung und Lagerung von Proteinen

Nach der Reinigung und Rückfaltung wurden Proteine zur Lagerung gefriergetrocknet. Dazu erfolgte die Dialyse der Eluate aus Gelfiltrationschromatographieläufen gegen einen flüchtigen Puffer (10 mM Ammoniumhydrogencarbonat). Um die Proben möglichst effizient zu entsalzen (maximal nanomolare Salzreste), wurden mindestens vier Dialyseschritte durchgeführt. Nach Zentrifugation der dialysierten Proteinlösungen (8000 x g, 20 min) oder Filtration (0,22 µm) wurden diese ggf. durch Ultrafiltration konzentriert und anschließend aliquotiert. Nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff folgte die Trocknung der Proteine in einer Gefriertrocknungsanlage.

2.5.9 Lösen gefriergetrockneter Proteine

Gefriergetrocknete rekombinante Proteine wurden durch Zugabe der entsprechenden Puffer und Mischen mittels einer Pipette gelöst. Anschließend erfolgte die Entfernung unlöslicher Bestandteile des Lyophilisates durch Zentrifugation (17 000 x g, 5 min, RT) und anschließende Ultrazentrifugation (186 000 x g, 30 min, 4 °C).

Das Lösen der verwendeten Kollagene (Sigma-Aldrich) erfolgte in verdünnter Essigsäure (Proteinkonzentration 1-2 mg/mL). Dazu wurden entsprechende Mengen eingewogen, mit 1-2 % (v/v) Essigsäure vermischt und für 16-20 h bei Raumtemperatur im Tischinkubator geschüttelt (700 rpm). Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (17 000 x g, 10 min, RT) bzw. Ultrazentrifugation (186 000 x g, 30 min, 4 °C) entfernt.

2.6 Proteinanalytische Methoden

2.6.1 Puffer und Lösungen

Die für proteinanalytische bzw. proteinchemische Methoden verwendeten Puffer und Lösungen sind zusammen mit den Beschreibungen der jeweiligen Methoden in den folgenden Kapiteln angegeben. Alle Lösungen wurden mit MilliQ-gemindertem Wasser hergestellt und nach dem Einstellen des jeweiligen pH-Wertes auf das Endvolumen aufgefüllt. Für kristallographische Experimente wurden die verwendeten Lösungen filtriert (0,22 μm), für chromatographische Analysen filtriert (0,22 μm) und mindestens 1 h unter Vakuum entgast.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gereinigte Proteine oder Proteingemische (z. B. Zelllysate) wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Bei dieser Methode werden proteinhaltige Proben mit SDS-haltigem Puffer versetzt, wodurch die Proteine denaturiert werden und SDS sich anlagert. Dabei zeigt sich für die meisten Proteine ein gleiches Massenverhältnis von angelagertem SDS zu Protein von $\sim 1,4:1$, was in etwa einem Molekül SDS pro zwei Aminosäuren des Proteins entspricht (Reynolds und Tanford, 1970). Durch die Anlagerung einer hohen Anzahl negativer Ladungen wird die Eigenladung der Proteine maskiert und sie erhalten dasselbe Ladung-/Masse-Verhältnis. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Proben ergibt sich somit eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Molekülmasse von der Laufstrecke im Gel. Im Rahmen der Arbeit kam sowohl kontinuierliche als auch diskontinuierliche SDS-PAGE zum Einsatz. Für die kontinuierliche SDS-PAGE wurden kommerziell erhältliche 12%ige Polyacrylamidgele oder 4 bis 20%ige Gradientengele (Serva) verwendet. Diskontinuierliche Gele, bestehend aus einem Trenngel und einem die Proteine zunächst fokussierenden Sammelgel wurden selbst hergestellt. Dazu wurden 12,5 bis 15%ige Trenngellösungen sowie 5%ige Sammelgellösungen aus den entsprechenden Stammlösungen hergestellt und die Polymerisation jeweils durch die Zugabe von 1 % (v/v) APS-Lösung und 0,2 % (v/v) TEMED gestartet. Die Trenngele wurden in einem Gießstand gegossen und nach dem Polymerisieren mit den Sammelgelen überschichtet. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 1 x SDS-Auftragspuffer versetzt und für 5-10 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 50-90 min bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA.

Trenngellösung	12,5-15 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1), 373 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,3 % SDS; 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Sammelgellösung	5 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,3 % SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
SDS-Laufpuffer (10 x)	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
SDS-Auftragspuffer (5 x Stammlösung)	312,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol (optional)

2.6.3 Färbung mit Coomassie-Brillantblau

Nach der SDS-PAGE wurden die elektrophoretisch getrennten Proteine mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Dieser Farbstoff bindet relativ stark an basische Aminosäureseitenketten, wodurch sich Proteine unspezifisch anfärben lassen, wogegen er aus dem Polyacrylamidgel leicht ausgewaschen werden kann. Zur Färbung wurden die Gele nach der Elektrophorese in Coomassielösung überführt, in der Mikrowelle aufgeköcht und für 1-16 h geschwenkt. Anschließend erfolgte die Entfärbung der Gele durch zweimaliges Aufkochen und jeweils ein-stündiges Schwenken in Coomassie-Entfärbelösung. Zur Digitalisierung wurden die Gele gewässert und gescannt (Microtek Bio-5000 Gelscanner, HP Scanjet G4050).

Coomassielösung	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % Coomassie-Brillantblau R250 oder G250
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure, 10 % Ethanol

2.6.4 Silberfärbung

Alternativ bzw. ergänzend zur Coomassiefärbung wurden Proteine nach der PAGE mit elementarem Silber gefärbt. Diese Färbemethode zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität aus, sodass im optimalen Fall Proteinmengen im Pikogrammereich detektiert werden können. Sie basiert auf der Anlagerung von Silberionen an saure Gruppen in Proteinen, welche durch Reduktion zu elementarem Silber sichtbar gemacht werden können (Switzer III *et al.*, 1979). Zunächst wurden die Gele nach der Elektrophorese für 10 min in Fixierlösung I geschwenkt, anschließend für mindestens 30 min in Fixierlösung II. Danach erfolgten viermaliges Waschen der Gele für jeweils 5 min in MilliQ-Wasser und die Inkubation in Silberfärbelösung für 45 min im Dunkeln. Anschließend wurden die Gele in Entwicklerlösung inkubiert bis sich der gewünschte Färbegrad einstellte und die Färbung anschließend durch Zugabe von Stopplösung beendet.

Fixierlösung I	30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Fixierlösung II	30 % (v/v) Ethanol, 0,5 % (v/v) Essigsäure, 0,4 M Natriumacetat pH 6, 0,1 % (w/v) Natriumthiosulfat
Silber-Färbelösung	6 mM Silbernitrat, 0,00925 % (w/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung	2,5 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,0148 % (w/v) Formaldehyd
Stopplösung	50 mM Natrium-EDTA pH 7,5

2.6.5 Immunoblotting (Westernblot)

Mittels Immunoblotting werden Proteine, welche zuvor mittels PAGE separiert wurden, auf eine Membran transferiert und durch Bindung spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Die Detektion erfolgt dabei meist durch eine enzymatische Reaktion oder durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunoblots zur Analyse/Detektion von rekombinant produzierten Proteinen in Zelllysaten sowie zur Evaluierung eines Antiserums gegen PTMP1 durchgeführt. Dazu kamen Membranen aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) zum Einsatz, die auf die Größe des jeweiligen Gels zugeschnitten und mittels kurzer Inkubation (20 s) in Methanol aktiviert wurden. Nach gründlichem Wässern der Membran (4 x 5 min) wurden die Gele der SDS-PAGE, die Membran und zehn auf die entsprechende Größe zugeschnittenen Stücke aus Whatman 3MM CHR Chromatographiepapier für 10 min in Westernblot-Transferpuffer inkubiert. Danach wurden in der Blotting-Apparatur fünf Whatman-Papierstücke, die Membran, das Gel und erneut fünf Papierstücke aufeinander geschichtet, die Apparatur verschlossen und die Proteine für 90 min bei einer konstanten Stromstärke von $1,25 \text{ mA/cm}^2$ auf die Membran transferiert. Anschließend erfolgten das Schwenken der Membran für 1-16 h in Blocking-Lösung, die Inkubation in Anwesenheit des primären Antikörpers für 90 min und dreimaliges Waschen (jeweils 5 min) mit PBS-T-Puffer. Nach Inkubation für 45 min in Anwesenheit des sekundären Antikörpers wurde die Membran erneut dreimal mit PBS-T-Puffer sowie einmal mit PBS-Puffer gewaschen und optional mit dem *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System* nach den Herstellerangaben entwickelt. Die Detektion peroxidasegekoppelter Antikörper erfolgte am Ettan DIGE Imager (GE Life Sciences) mittels Fluoreszenzanalyse unter Verwendung des Deep Purple 2- Filtersatzes bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm (Spaltbreite 20 nm) und einer Emissionswellenlänge von 595 nm (Spaltbreite 25 nm). Bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper erfolgte die Detektion mit dem Cy2-Filtersatz bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm (Spaltbreite 30 nm) und einer Emissionswellenlänge von 530 nm (Spaltbreite 40 nm). Die Belichtungszeiten betragen zwischen 0,017 und 0,4 (herstellerspez. Einheit).

Westernblot-Transferpuffer	25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol
Blocking-Lösung	5 % (w/v) Milchpulver in PBS
PBS-Puffer (10 x)	40 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 160 mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 1,15 M NaCl
PBS-T-Puffer	0,3 % (v/v) Tween20 in 1 x PBS
Antikörperlösungen	1:3000-1:20 000-Verdünnung in 1 % (w/v) Milchpulver oder 1 % (w/v) Serumalbumin (BSA) in PBS

2.6.6 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Neben der Reinigung von Proteinen mittels FPLC (2.5.5.3) wurde im Rahmen dieser Arbeit auch analytische HPLC in Form von Gelpermeationschromatographie mit einer Superdex 200 10/300 GL-Säule (GE Life Sciences) mit einem Säulenvolumen von 24 mL und einem Ausschlussvolumen von 8 mL durchgeführt. Dabei kamen HPLC-Anlagen von GE Life Science (Äkta Purifier) oder Agilent zum Einsatz. Auf die mit GPC-Laufpuffer (20 mM Natriumphosphat oder 25 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl) äquilibrierte Säule wurden bei einer Flussrate von 0,8 mL/min mittels Probenschleife jeweils 200 µL aufgetragen. Die Detektion von Proteinen erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm. An der Anlage von Agilent wurden zusätzlich der Brechungsindex sowie die statische Lichtstreuung (siehe 2.7.7) detektiert.

2.6.7 Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen mit dem Ellmans-Reagenz

Die Anzahl freier Sulfhydrylgruppen in Proteinen lässt sich mittels Spaltung von 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmans-Reagenz) bestimmen (Ellman, 1959). Dabei reagieren SH-Gruppen unter nukleophilem Angriff mit der S-S-Bindung in DTNB unter Freisetzung von einem Äquivalent 2-Nitro-5-thiobenzoat, welches im neutralen und alkalischen Milieu als gelb gefärbtes Thiolat-Anion vorliegt und somit spektrometrisch leicht detektiert werden kann (siehe Abbildung 2-2).

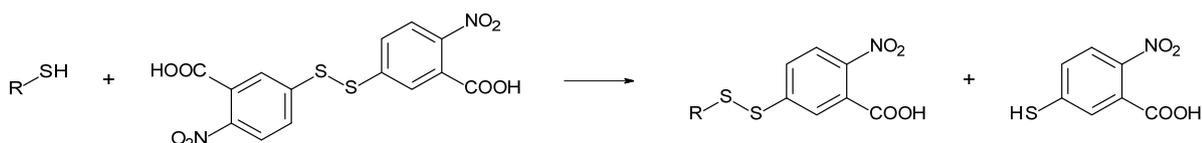


Abbildung 2-2 Reaktion von DTNB mit freien Thiolen

Der Ellmans Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 200 μL in UV-Küvetten micro (Brand) durchgeführt, wobei zunächst Wasser bzw. GdmCl-Lösung, Ellmans-Reaktionspuffer (10 μL) und DTNB-Lösung (6 μL) vorgelegt wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von Proteinlösung (2 μM final) und die Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Die Auswertung erfolgte durch Aufzeichnung von Absorptionsspektren von 600-370 nm im Cary50-Spektralphotometer. Die Absorptionswerte bei 412 nm wurden um den Hintergrund ohne Protein korrigiert und die Anzahl freier SH-Gruppen pro Proteinmolekül nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmt:

$$\text{Formel 2-2} \quad N(\text{SH}) = \frac{\text{Abs}_{412}}{\epsilon_{412} \cdot c_{\text{Protein}} \cdot d}$$

N (SH)	Anzahl freier SH-Gruppen
Abs ₄₁₂	Absorption bei 412 nm (pufferkorrigiert)
ϵ_{412}	molarer Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
c_{Protein}	Proteinkonzentration (M)
d	Schichtdicke (cm)

Die Werte für die molaren Extinktionskoeffizienten unterscheiden sich für die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, in Abwesenheit von GdmCl beträgt dieser $13\,700 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, in Anwesenheit von GdmCl $14\,150 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Riddles *et al.*, 1983). Zur initialen Evaluierung des Assays wurde die lineare Abhängigkeit der Absorption bei 412 nm von der Konzentration an freien SH-Gruppen durch die Titration mit reduziertem Glutathion (GSH) in einem Konzentrationsbereich von 0-50 μM getestet. Im späteren Verlauf wurden standardmäßig bei allen Tests stets Kontrollen mit bekannten GSH-Konzentrationen (1-12 μM) durchgeführt.

Ellmans-Reaktionspuffer (20 x)	2 M Tris/HCl pH 8
DTNB-Lösung (33,3 x)	100 mM Kaliumphosphat pH 8, 0,4 % (w/v) 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoesäure (DTNB), 1 mM EDTA
GdmCl-Lösung	8 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl)
Glutathionlösung	100 μM reduziertes Glutathion (GSH)

2.6.8 Markierung freier Sulfhydrylgruppen mit IAEDANS

Um freie Sulfhydrylgruppen in Proteinen massenspektrometrisch nachzuweisen, wurden diese durch Reaktion mit 5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]-naphthalen-1-sulfonsäure (IAEDANS) markiert.

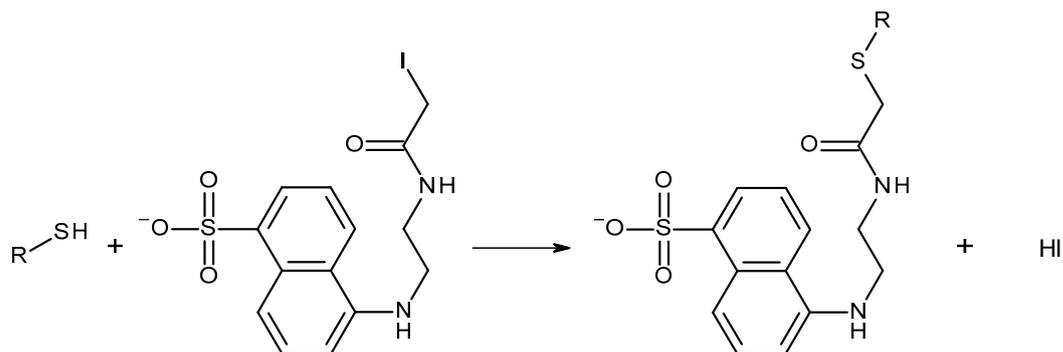


Abbildung 2-3 Reaktion von IAEDANS mit Thiolen

Pro Ansatz wurden 20 μM der Proteine mit 200 μM IAEDANS in 50 μL 100 mM Tris/HCl pH 7,5 gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen bzw. abzusättigen, wurden anschließend 2 mM β -Mercaptoethanol zugesetzt. Danach erfolgte die proteolytische Spaltung der Proteine.

IAEDANS-Lösung	100 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM 5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]-naphthalen-1-sulfonsäure
β -Mercaptoethanol-Lösung	100 mM β -Mercaptoethanol

2.6.9 Spaltung von Proteinen durch Proteolyse

Neben der proteolytischen Spaltung von 6xHis-SUMO-Fusionskonstrukten mit ULP1 (siehe 2.5.6) wurden Proteine für massenspektrometrische Untersuchungen mit verschiedenen Proteasen verdaut. Die Reaktionen erfolgten bei Proteinkonzentrationen von 0,5 bzw. 1 mg/mL über Nacht bei 25 $^{\circ}\text{C}$ unter den in Tabelle 2-7 angegebenen Reaktionsbedingungen. Die Proben der IAEDANS-markierten Proteine (siehe 2.6.8) wurden nach optionaler Zugabe von 10 mM Calciumchlorid direkt im IAEDANS-Reaktionspuffer verdaut.

Tabelle 2-7 Proteasen und Reaktionsbedingungen

Protease	Spaltstelle	Reaktionspuffer	Stammlösung (Reaktionspuffer)	Reaktions-Konzentration
Glu-C	Glu↓Xaa	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat	0,1 mg/mL	5 $\mu\text{g/mL}$
Asp-N	Xaa↓Asp	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat	0,04 mg/mL	5 $\mu\text{g/mL}$
Trypsin	Xaa↓(Arg/Lys)	100 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM Calciumchlorid	0,5 mg/mL	5 $\mu\text{g/mL}$
Chymotrypsin	Xaa↓(Trp/Tyr/Phe)	100 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM Calciumchlorid	0,5 mg/mL	5 $\mu\text{g/mL}$

2.6.10 Proteinkristallographie und Strukturbestimmung

Die räumliche Struktur von Proteinen kann mittels röntgenkristallographischer Analysen aufgeklärt werden. Grundsätzliche Voraussetzungen dabei sind die Kristallisierbarkeit des entsprechenden Proteins und die Eignung entsprechender Kristalle für Röntgenbeugungsanalysen. Zur Kristallisation wurden im Rahmen dieser Arbeit Dampfdiffusionsexperimente durchgeführt. Dabei werden Proteine in hoher Konzentration mit einer Präzipitationslösung gemischt, welche mindestens ein proteinfällendes Agens (z. B. Polyethylenglycol (PEG), Salze, organische Lösemittel etc.) enthält. Der Tropfen dieser Mischung wird in einem geschlossenen Kompartiment in Anwesenheit eines Reservoirs der Präzipitationslösung für mehrere Tage/Wochen inkubiert. Da die Konzentration der Fällungsmittel/Salze im Tropfen geringer ist als die der Reservoirlösung, diffundiert im Verlauf eines Experiments Wasser vom Tropfen über die Gasphase ins Reservoir, womit die Konzentrationen von Fällungsmittel und Protein im Tropfen steigt. Dies führt im optimalen Fall zur Bildung von Kristallisationskeimen und in der Folge zu Proteinkristallen.

Kristallisationsexperimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Melanie Gertz am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth (Prof. Dr. Clemens Steegborn). Dabei wurden zunächst sitzende Tropfen (*sitting drops* - der Tropfen liegt auf einer Oberfläche neben oder umgeben vom Reservoir), in Reproduktionsexperimenten auch hängende Tropfen (*hanging drops* - der Tropfen hängt über dem Reservoir) getestet. Verwendet wurden dabei Platten mit 24 oder 96 einzelnen Kompartimenten und kommerziell erhältliche sowie selbst hergestellte Präzipitationslösungen. Nach dem Ansatz der Kristallisationsexperimente (manuell oder mittels Pipettierroboter Phoenix, ARI) wurden die Platten mit hängenden Tropfen in einem automatisierten Platten-Imager (Formulatrix) inkubiert und durch Aufnahme von Bildern sofort und nach 1, 3, 5, 8, 13 und 21 Tagen ausgewertet. Die Platten mit sitzenden Tropfen wurden aufgrund eines inkompatiblen Plattenformates z. T. manuell dokumentiert (Lichtmikroskop mit gekoppelter Kamera, siehe 2.8.1).

2.6.10.1 Löslichkeitstests

Um eine geeignete Proteinkonzentration für Kristallisationsansätze zu ermitteln, wurden Löslichkeitstests durchgeführt, bei denen der Einfluss verschiedener Fällungsmittel bzw. deren Konzentrationen auf die Präzipitation des entsprechenden Proteins getestet wurden. Hierzu wurden jeweils 0,5 μL Proteinlösung (10 mg/mL in 20 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl) mit jeweils 0,5 μL entsprechender Lösungen mit steigenden Konzentrationen der Fäl-

lungsmittel gemischt. Die Inkubation erfolgte in sitzenden Tropfen gegen 50 μL der jeweiligen Reservoir im Imager Formulatrix bei 20 °C. Anhand des Präzipitationsgrades der Proteine bei den verschiedenen Fällungsmittelkonzentrationen wurde dann ein geeigneter Konzentrationsbereich für weitere Kristallisationsansätze abgeschätzt. Die getesteten Fällungsmittel und Konzentrationen sind in folgender Tabelle angegeben.

Tabelle 2-8 Bedingungen der Löslichkeitstests

Fällungsmittel	Stammlösung	Konzentrationen der Reservoir-Lösungen
Ammoniumsulfat	3 M Ammoniumsulfat	1-3 M in 0,4 M-Schritten
2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)	100 % MPD	20-30 % (v/v) in 2-%-Schritten
PEG 400	100 % PEG 400	16-36 % (v/v) in 4-%-Schritten
PEG 3350	50 % (w/v) PEG 3350	16-26 % (w/v) in 2-%-Schritten

2.6.10.2 Evaluierung von Kristallisationsbedingungen

Zur Evaluierung von Kristallisationsbedingungen bieten sich kommerziell erhältliche Kits an. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die JCSGcore Suites I-IV (Qiagen) verwendet, deren Zusammensetzungen auf den Ergebnissen einer Vielzahl von Kristallisationsstudien basieren und welche insgesamt 384 (4 x 96) unterschiedliche Reservoirlösungen bereitstellen. Jeweils 0,2 μL dieser Lösungen wurden mittels Pipettierroboter (Phoenix, ARI) vorgelegt und mit jeweils 0,2 μL Proteinlösung (8 mg/mL in 20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl) gemischt. Die Inkubation erfolgte in sitzenden Tropfen gegen 50 μL Reservoir im Imager Formulatrix bei 20 °C.

2.6.10.3 Reproduktion und Verfeinerung

Bedingungen, welche in den Evaluierungsexperimenten zur Kristallisation des Proteins führten, wurden reproduziert und verfeinert. Dabei wurden die Zusammensetzungen der Reservoirlösungen variiert bzw. Additive zugesetzt sowie das Tropfenvolumen erhöht. Ferner wurden Ansätze bei unterschiedlichen Temperaturen getestet.

Sitzende und hängende Tropfen:

Neben der initial bereits angewendeten Methode der sitzenden Tropfen wurde in Verfeinerungsexperimenten auch die Kristallisation in hängenden Tropfen getestet.

Konzentrations- und pH-Reihen:

Die maßgeblichen Parameter für die potenzielle Kristallisation von Proteinen stellen u. a. die Konzentrationen der Fällungsmittel, die pH-Werte der Fällungslösungen und die Konzentrationen zusätzlicher Salze dar, weswegen verschiedene Kombinationen dieser Parameter getestet wurden. Alle Experimente besaßen einen Umfang von 24 Bedingungen, wobei die Konzentrationen der Fällungsmittel (sechsfach; 1-2 % (w/v)-Schritte) gegen die Konzentrationen der Salze (vierfach; 0,1 M- bzw. 0,25 M-Schritte) bzw. der pH-Wert (sechsfach; Schritte von 0,3-0,4 pH-Einheiten) gegen die Konzentrationen der Fällungsmittel (vierfach; 1-2 % (w/v)-Schritte) variiert wurden. Die Präzipitationslösungen wurden dabei jeweils aus wässrigen Stammlösungen der Fällungsmittel (50 % (w/v) oder Reinstoffe), Salze (1-3 M) und Pufferkomponenten (1 M) angesetzt, welche größtenteils aus der Lösungssammlung des Lehrstuhls für Biochemie, Universität Bayreuth, stammten. Jeweils 0,5 μ L Proteinlösungen (8 mg/mL in 20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl) wurden mit jeweils 0,5 μ L Präzipitationslösung gemischt und sowohl in sitzenden Tropfen (gegen 750 μ L Reservoir) als auch in hängenden Tropfen (gegen 500 μ L Reservoir) bei 20 °C inkubiert.

Additivscreening:

Um das Kristallwachstum zu optimieren, wurden ferner 96 kommerziell erhältliche Additive getestet (Additive Screen HT, Hampton Research). Dazu wurde die entsprechende Bedingung als 1,1-faches Konzentrat angesetzt und mit 1/10 Volumen der Additivlösungen versetzt. Die Kristallisationsansätze erfolgten als 0,2+0,2 μ L-Tropfen mittels Pipettierroboter (Phoenix, ARI) und Inkubation im Imager Formulatrix bei 20 °C.

Temperatur:

Neben der Standard-Kristallisationstemperatur von 20 °C (klimatisierter Kristallisationsraum bzw. Imager) wurden Kristallisationsansätze bei 4 °C im Kühlraum inkubiert, um ggf. langsames Kristallwachstum zu ermöglichen bzw. die Präzipitation der Proteine zu reduzieren.

2.6.10.4 Röntgendiffraktionsmessungen und Strukturlösung

Röntgenstrahlen, die auf einen Proteinkristall treffen, werden hauptsächlich von der Elektronenhülle der einzelnen Atome abgelenkt, was zur Bildung eines definierten Musters an Reflexen auf einem Detektor führt. Aus der Anordnung und Intensität von Reflexen einer Rotationsserie ist es möglich, Informationen über die Anordnung der Proteinmoleküle im Kristall zu erhalten. In der Folge kann daraus eine dreidimensionale Elektronendichtekarte (Elektronendichtefunktion) berechnet werden, in die die einzelnen Aminosäuren unter Berücksichtigung

ihrer Sequenz im Protein eingepasst werden können, was letztendlich zu einem Modell der räumlichen Proteinstruktur führt. Die Vorbereitung der Kristalle, Aufnahme von Diffraktionsbildern und die Lösung der Kristallstrukturen wurden von Dr. Melanie Gertz, Lehrstuhl für Biochemie (Prof. Dr. Clemens Steegborn), Universität Bayreuth, durchgeführt. Zunächst wurden Proteinkristalle mittels eines Cryo-Loops aus ihrer Mutterlösung in eine Cryolösung überführt (Mutterlösung inkl. 25 % (v/v) Glycerin) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und aufbewahrt. Optional wurden Kristalle vor dem Schockfrieren für 60 Minuten in der Cryo-Lösung, welcher 10 mM Magnesiumchlorid oder 50 μ M Zinkchlorid zugesetzt worden war, inkubiert. Die Aufnahme von Diffraktionsdatensätzen erfolgte an der Röntgenanlage des Lehrstuhls für Biochemie (Incoatec I μ S Röntgenquelle mit MAR 345 DTB-Detektor) sowie mittels Synchrotronstrahlung am BESSY II Elektronenspeicherring des Helmholtz-Zentrum Berlin (Mueller *et al.*, 2012) an der MX *beamline* BL14.1 unter Verwendung eines MX225 CCD-Detektors (Rayonix). Tabelle 2-9 fasst die Parameter der Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen und ausgewerteten Diffraktionsdatensätze zusammen.

Tabelle 2-9 Parameter von Röntgendiffraktionsmessungen

Parameter	Datensatz 1 ⁷	Datensatz 2 ⁸	Datensatz 3 ⁹
Temperatur	100 K	100 K	100 K
Wellenlänge (Å)	0,918	0,918	1,283
Rotationswinkel phi (°)	200	130	200
Rotations-Schrittweite (°)	1	1	0,5
Detektorabstand (mm)	299,6	198,0	120,0

Anschließend wurden die aufgenommenen Reflexe mit der Software XDS (Kabsch, 1993) indiziert, skaliert und vereinigt. Die Auflösungsgrenzen wurden nach einem kürzlich publizierten Modell (CC*) von Karplus und Diederichs gewählt (Karplus und Diederichs, 2012). Das bei der Lösung von Kristallstrukturen auftretende Phasenproblem (die Amplitude und Wellenlänge der Elektronendichtefunktion können aus den Daten ermittelt werden, jedoch nicht ihre Phase) wurde durch molekularen Ersatz gelöst, welcher auf der Patterson-Methode basiert (Patterson, 1934). Dabei kam das Softwarepaket Mr Bump (Keegan und Winn, 2007) zum Einsatz, wobei Strukturen homologer Proteine, die zuvor durch blastp-Suchen identifiziert worden waren, als Suchmodelle für den molekularen Ersatz eingesetzt wurden. Die Vervollständigung des initialen Strukturmodelles und die Optimierung von Mo-

⁷ Kristallform 1 (siehe Ergebnisse)

⁸ Kristallform 2 (siehe Ergebnisse)

⁹ Kristallform 2, inkubiert mit Zinkchlorid (siehe Ergebnisse)

lekülgeometrien erfolgte mit der Software Coot (Emsley und Cowtan, 2004), zur Verfeinerung des Modells wurde die Software Phenix verwendet (Adams *et al.*, 2002). Dabei wurden 5 % der Reflexe aus der Verfeinerung ausgeschlossen, um eine spätere Evaluierung zu ermöglichen (R_{free}). Weitere Strukturen konnten durch molekularen Ersatz unter Verwendung der zuvor ermittelten Proteinstruktur und des Algorithmus MolRep (Vagin und Isupov, 2001) gelöst werden. Die Vervollständigung und geometrische Optimierung erfolgte analog mit Coot, die Verfeinerung mit Phenix. Die Qualität der Strukturmodelle wurde anhand der R-Faktoren (R_{work} und R_{free}) beurteilt (Diederichs und Karplus, 1997).

2.7 Spektroskopische Methoden

2.7.1 Puffer und Lösungen

Die für spektroskopische Messungen verwendeten Puffer und Lösungen sind zusammen mit den Beschreibungen der jeweiligen Methoden in den folgenden Kapiteln angegeben. Alle Lösungen wurden mit MilliQ-gefiltertem Wasser hergestellt und nach dem Einstellen des jeweiligen pH-Wertes auf das Endvolumen aufgefüllt. Lösungen wurden filtriert (0,22 μm) mindestens 30 min unter Vakuum entgast.

2.7.2 Massenspektrometrie

Zur Größenanalyse von Proteinen und durch proteolytischen Verdau erhaltenen Peptiden wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei werden die entsprechenden Proteine in geeigneter Weise ionisiert, in der Gasphase in einem elektrischen Feld beschleunigt und in einem Analysator hinsichtlich ihres Masse-/Ladungs-Verhältnisses sortiert bzw. detektiert.

2.7.2.1 Probenvorbereitung

Um die Proben vor der Massenspektrometrie zu entsalzen bzw. in ein geeignetes Lösungsmittel zu überführen, wurden diese mit kommerziell erhältlichen ZipTip-Pipettenspitzen (Merck Millipore) behandelt. Diese bestehen aus einem hydrophob beschichteten Silicagel, an welches Proteine und Peptide binden, wogegen Salze etc. ausgewaschen werden können. Durch Zugabe von Acetonitril können die Proteine/Peptide schließlich eluiert werden. Die Probenvorbereitung für massenspektrometrische Untersuchungen erfolgte z. T. durch Dr. Martin Humenik, Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth. Im Rahmen dieser Arbeit wurden

ZipTip-Pipettenspitzen mit C4- und C18-Beschichtungen verwendet, wobei das pipettierte Volumen pro Schritt 10 μL betrug. Zunächst erfolgte die Aktivierung der ZipTip-Matrix durch zweimaliges Pipettieren von Aktivierungslösung. Nach zweimaligem Waschen (Waschlösung) erfolgte die Bindung der Proteine/Peptide durch fünfmaliges Auf-und-Ab-Pipettieren von jeweils 3 x 10 μL der entsprechenden Lösungen (0,5-1 mg/mL). Anschließend folgten erneut drei Waschschrte bevor die gebundenen Proteine/Peptide in 10 μL eluiert wurden (zehnmaliges Auf-und-Ab-Pipettieren in Elutionslösung).

Alternativ zur ZipTip-Behandlung wurden Proteine direkt in Wasser gelöst (1-2 mg/mL) und im Verhältnis 1:1 mit der Matrix-Lösung gemischt.

Aktivierungslösung	0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in Acetonitril
Waschlösung	0,2 % (v/v) TFA in MilliQ-Wasser
Elutionslösung	10 mg/mL α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure (CHCA), 60 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA
Matrix-Lösung (2 x)	20 mg/mL CHCA, 90 % (v/v) Acetonitril, 0,2 % (v/v) TFA

2.7.2.2 MALDI-TOF-MS

Die Massenspektrometrie mit Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation mit gekoppeltem Flugzeit- (*time-of-flight*)-Analysator (MALDI-TOF-MS) wurde von Christopher Synatschke am Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie II der Universität Bayreuth (Prof. Dr. A. Müller, jetzt Prof. Dr. A. Greiner) mit einem Reflex III-Massenspektrometer (Bruker) durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit mMass (Niedermeyer und Strohal, 2012).

2.7.2.3 LC-ESI-MS

Massenspektrometrische Messungen mittels LC-ESI-MS (Flüssigchromatographie-gekoppelte Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie) wurden von Dr. Frank Fischer am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth (Prof. Dr. C. Steegborn) durchgeführt. Dabei kamen eine Prominence HPLC-Anlage mit Sil20AC-Autosampler (Shimadzu) und ein LTQ XL-Massenspektrometer (Thermo Fisher) zum Einsatz. Die Peptide wurden mittels C18-Reversed-Phase-Chromatographie getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte durch den SEQUEST-Algorithmus sowie die Software Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific).

2.7.3 UV/VIS-Absorptionsspektrometrie

2.7.3.1 UV-Absorption von Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden UV-Absorptionsspektren von Proteinlösungen im Bereich von 240-340 nm mit den Spektralphotometern NanoDrop (Thermo Scientific) und Cary50 (Varian), ggf. unter Verwendung von 1 cm Quarzglas Suprasil-Küvetten (Hellma), aufgezeichnet. Da die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz linear von der Konzentration der absorbierenden Substanz abhängt, kann bei bekannten Extinktionskoeffizienten aus der Absorption die Proteinkonzentration berechnet werden (Formel 2-3). Ferner können anhand einer qualitativen Analyse der Spektren Aussagen über die Reinheit der Proteine getroffen werden.

Formel 2-3
$$c = \frac{\text{Abs}_{280}}{\epsilon_{280} \cdot d}$$

Abs ₂₈₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm
E ₂₈₀	molarer Extinktionskoeffizient (M ⁻¹ cm ⁻¹) bei einer Wellenlänge von 280 nm
c	Konzentration (M)
d	Schichtdicke (cm)

Die molaren Extinktionskoeffizienten von Proteinen lassen sich aus ihrer Aminosäurezusammensetzung ermitteln, da sie bei einer Wellenlänge von 280 nm hauptsächlich durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie Disulfidbrücken bedingt sind, wohingegen der Beitrag von Phenylalanin vernachlässigt werden kann (Edelhoch, 1967). Hierzu kam das Online-Tool ProtParam (www.expasy.org) zum Einsatz, welches die Extinktionskoeffizienten basierend auf den Beiträgen der einzelnen Komponenten berechnet (Gill und von Hippel, 1989; Pace *et al.*, 1995). Die ermittelten Extinktionskoeffizienten wurden für jede gereinigte Proteincharge durch Einwaage von Lyophilisaten überprüft und ggf. korrigiert.

2.7.3.2 UV-Absorption von DNA

Analog zur Proteinkonzentration wurde auch die Konzentration von DNA spektrophotometrisch bestimmt (NanoDrop, Thermo Scientific). Verwendet wurde der auf die Masse bezogene Extinktionskoeffizient von 0,02 (mg/L)⁻¹ cm⁻¹ bei 260 nm. In analoger Weise kann auch die Reinheit von DNA anhand der Qualität des UV-Spektrums abgeschätzt werden. Dabei gibt der Quotient der Absorptionswerte von 260 und 280 nm Auskunft über eine mögliche Vertei-

lung von DNA zu Protein in der Lösung, wobei ein Wert von 1,8 bis 2,0 reine DNA repräsentiert.

2.7.3.3 Absorptionsspektrometrie im visuellen Bereich

Absorptionsspektrometrie im visuellen (VIS) Bereich wurde im Rahmen der Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen (siehe 2.6.7) durchgeführt. Ferner wurden Absorptionsmessungen in 96-well-Platten mit einem automatisierten Plattenleser zur Auswertung statischer Kollagenbindungstests vorgenommen (siehe 2.9.2).

2.7.4 Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Moleküle besitzen im Infrarot-Bereich charakteristische Absorptionsspektren, da hier durch elektromagnetische Strahlung Schwingungen kovalenter Bindungen angeregt werden. Für die strukturelle Analyse von Proteinen ist insbesondere der Bereich zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} interessant, da hier die C=O-Streckschwingung der Peptidbindungen absorbiert (Amid-I-Bande) und stark von der räumlichen Anordnung dieser Bindungen beeinflusst wird. Durch Zerlegung der Amid-I-Bande in einzelne Komponenten lassen sich somit Aussagen über die Sekundärstrukturanteile von Proteinen treffen (Byler und Susi, 1986; Surewicz und Mantsch, 1988).

Durch die Verwendung fouriertransformierter IR-Spektroskopie lässt sich das Signal-Rausch-Verhältnis bei gleichzeitiger Verkürzung der Messzeit signifikant erhöhen. Hier wird zunächst mittels eines Michelson-Interferometers ein Interferogramm erzeugt, welches anschließend per Fourier-Transformation in ein Spektrum umgerechnet werden kann. FT-IR-Messungen erfolgten mit dem Spektrometer Tensor 27 (Bruker) unter Verwendung einer AquaSpec-Messzelle (temperiert auf 23 °C) und der Software OPUS bzw. des Moduls CONFOCHECK unter Verwendung der AquaSpec-Standard Einstellungen. Pro Messung wurden 10-20 μL Proteinlösung (3 mg/mL in 20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl) injiziert, wobei vor jeder Messung ein Nullabgleich mit dem Messpuffer vorgenommen wurde. Nach einer kurzen Temperierungsphase (ca. 30 s) wurden jeweils 100 Spektren mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen und akkumuliert.

Die Auswertung erfolgte qualitativ durch Vergleich der jeweiligen Amid-I-Banden (1700-1600 cm^{-1}). Die Zuordnung von Sekundärstrukturanteilen wurde anhand der jeweiligen zweiten Ableitung der Spektren in diesem Bereich vorgenommen (Dong *et al.*, 1990).

Tabelle 2-10 Zuordnung von Sekundärstrukturanteilen globulärer Proteine zu Fourier-selbstentfalteten FT-IR-Spektren im Bereich der Amid-I-Bande (nach Dong et al., 1990)

Mittlere Wellenzahl (cm ⁻¹)	Zuordnung	Mittlere Wellenzahl (cm ⁻¹)	Zuordnung
1624,0 ± 0,5	β-Faltblatt	1650,0 ± 1,0	Random Coil
1627,0 ± 1,0	β-Faltblatt	1656,0 ± 2,0	α-Helix
1632,0 ± 1,0	β-Faltblatt	1666,0 ± 1,0	Schleife
1638,0 ± 1,0	β-Faltblatt	1672,0 ± 1,0	Schleife
1642,0 ± 1,0	β-Faltblatt	1680,0 ± 1,0	Schleife
		1688,0 ± 1,0	Schleife

Eine Möglichkeit, die Bandenschärfe der einzelnen Komponenten zu erhöhen, bietet die Fourier-selbstentfaltung (*Fourier Self Deconvolution*, FSD) der Amid-I-Bande (Kauppinen *et al.*, 1981). Dabei wurden die FT-IR-Absorptionsspektren zunächst im Bereich von 1750-950 cm⁻¹ Basislinien-korrigiert und leicht geglättet (Software OPUS, Bruker). Anschließend erfolgte die FSD zwischen 1720 und 1590 cm⁻¹ unter Verwendung von Lorentzkurven mit einer Bandbreite von 26,5 cm⁻¹ bei einer Rauschunterdrückung von 0,3 (herstellerspezifische Einheit). Die Anteile der einzelnen Komponenten wurden anschließend durch Angleichung der erhaltenen dekonvolvierten Spektren mittels individueller Gauß-Funktionen bestimmt (Byler und Susi, 1986).

2.7.5 Zirkulardichroismusspektroskopie (CD)

Optisch aktive Moleküle zeigen unterschiedliche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht. Da Proteine aus L-Aminosäuren aufgebaut sind, tritt dieser als Zirkulardichroismus bezeichnete Effekt auch hier auf, insbesondere bei der Absorption ihrer Peptidbindungen im Fern-UV-Bereich. Da das Peptidrückgrat in Sekundärstrukturelementen stark fixiert vorliegt, besitzen diese Elemente charakteristische Fern-UV-CD-Spektren. Die Spektren helikaler Proteine zeigen demnach Minima bei 208 und 222 nm, wogegen β-Faltblattreiche Proteine ein weniger ausgeprägtes Minimum bei 218 nm aufweisen. Unstrukturierte (Random Coil) oder denaturierte Proteine besitzen ein charakteristisches Minimum bei 195 nm (Schmid, 1997). Kollagene, welche eine tripelhelikale Poly-L-prolin-II-ähnliche Struktur besitzen, zeigen ein Maximum bei 222 nm und ein Minimum bei 198 nm. Messungen wurden mit einem J-815 Spektropolarimeter (Jasco) in 1 mm Quarzglas Suprasil-Küvetten (Hellma) durchgeführt. Als Messgröße für den Zirkulardichroismus wird dabei die Elliptizität θ in mdeg (Milligrad) in Abhängigkeit der Wellenlänge ausgegeben. CD-Spektren von Proteinlösungen (0,2 mg/mL) wurden im Bereich von 260-190 nm aufgezeichnet (0,1 nm-Auflösung, 50 nm/min, Integrationszeit 2 s, Akkumulation von jeweils 3-5 Einzelspektren),

pufferkorrigiert und ggf. mittels eines Savitzky-Golay-Filters (Savitzky und Golay, 1964) geglättet (Origin 8.1; Polynom zweiten Grades, Fensterbreite 25-50 Punkte). Um die Spektren verschiedener Proteine zu vergleichen, wurde die gemessene Elliptizität in die molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta]_{\text{MRW}}$ umgerechnet (*mean residue weight*).

Formel 2-4
$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta \cdot 0,1 \cdot M}{c \cdot d \cdot N}$$

$[\theta]_{\text{MRW}}$	molare Elliptizität pro Aminosäurerest (deg cm ² dmol ⁻¹)
θ	Elliptizität (mdeg)
M	molare Masse (g/mol)
c	Konzentration (g/L)
d	Schichtdicke (cm)
N	Anzahl der Peptidbindungen

Zur Abschätzung von Sekundärstrukturanteilen aus CD-Spektren wurden gängige Algorithmen/Programme wie CDNN (Böhm *et al.*, 1992) und K2D3 (Louis-Jeune *et al.*, 2012) eingesetzt sowie die Algorithmen CONTIN (Provencher und Gloeckner, 1981), SELCON3 (Sreerama *et al.*, 1999) und CDSSTR (Compton und Johnson Jr, 1986), welche über die Plattform DichroWeb (Whitmore und Wallace, 2008) bereitgestellt werden.

Thermische Übergänge wurden unter konstanten Heiz- und Kühlraten von 1 °C/min durchgeführt, wobei das Signal bei 222 nm in 0,2-1 °C-Schritten aufgezeichnet und ggf. normiert wurde.

Für chemische Denaturierungen wurden Spektren von Proteinen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Guanidiniumhydrochlorid aufgezeichnet, pufferkorrigiert und geglättet. Anschließend wurde aus den prozessierten Kurven die Elliptizität bei 222 nm ermittelt, normiert und gegen die Denaturierungsmittelkonzentration aufgetragen. Die Berechnung physikalischer Parameter der Denaturierungskurven erfolgten mittels der Linearen Extrapolationsmethode (LEM) (Pace und Shaw, 2000). Dabei werden zunächst die Geradengleichungen der einzelnen Plateau-Abschnitte in den Kurven durch lineare Regression der entsprechenden Bereiche ermittelt. Daraus lassen sich die Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Messpunkte im Übergangsbereich der Denaturierungskurve berechnen:

Formel 2-5 $K = \frac{y_n - y}{y - y_d}$

K	Gleichgewichtskonstante
y	Messwert
y _n	Wert der Extrapolationsfunktion für den nativen Zustand
y _d	Wert der Extrapolationsfunktion für den denaturierten Zustand

Aus der ermittelten Gleichgewichtskonstante für jeden Messwert lässt sich mit der allgemeinen Gasgleichung die freie Enthalpie berechnen (Formel 2-6):

Formel 2-6 $\Delta G^0 = RT \ln K$

ΔG^0	freie Enthalpie (J mol ⁻¹)
R	allgemeine Gaskonstante (8,314 J mol ⁻¹ K ⁻¹)
T	Temperatur (K)
K	Gleichgewichtskonstante

Die Werte für ΔG^0 im Übergangsbereich stehen in einem linearen Zusammenhang mit der Denaturierungsmittelkonzentration, weswegen die freie Enthalpie für den nativen Zustand bzw. die konformationelle Stabilität des Proteins durch lineare Regression der entsprechenden Kurve und Extrapolation der Denaturierungsmittelkonzentration gegen 0 bestimmt werden kann (Formel 2-7). Der Übergangsmittelpunkt ist ferner durch den Abszissenabschnitt repräsentiert.

Formel 2-7 $\Delta G^0 = \Delta G^0(\text{H}_2\text{O}) - m[\text{GdmCl}]$

ΔG^0	freie Enthalpie (J mol ⁻¹)
$\Delta G^0(\text{H}_2\text{O})$	freie Enthalpie für den nativen Zustand ohne Denaturierungsmittel (J mol ⁻¹)
m	Steigung
[GdmCl]	Konzentration des Denaturierungsmittels Guanidiniumhydrochlorid

2.7.6 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (BIACORE)

Für Interaktions- bzw. Bindungsanalysen von Proteinen wurde Oberflächenresonanzspektroskopie (SPR) durchgeführt. Bei dieser Methode wird einer der Bindungspartner (Ligand) auf einem Messchip mit einer ca. 50 nm dicken Goldschicht auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Unterhalb des Chips wird in einem bestimmten Winkel polarisiertes Licht eingestrahlt

und reflektiert. Dadurch entsteht eine elektromagnetische Welle, welche als evaneszentes Feld über die Phasengrenze (Glas/Flüssigkeit) hinaus in die Flusszelle hineinreicht (messbar bis ca. 150 nm). Werden unter bestimmten Resonanzbedingungen (Einfallswinkel und Lichtenergie/Wellenlänge) auf dem Goldchip Oberflächenplasmonen angeregt, kann durch das evaneszente Feld Energie absorbiert werden, was in einer Verminderung der Intensität des reflektierten Lichts resultiert. Über eine Mikrofluidikeinheit wird der zweite Interaktionspartner (Analyt) in der flüssigen Phase auf den Chip aufgebracht. Durch die Bindung des Analyten an den Liganden ändert sich der Brechungsindex der Lösung an der Oberfläche, was eine mit hoher Sensitivität messbare Änderung des Resonanzwinkels zur Folge hat (Biacore *Sensor Surface Handbook* BR-1005-71 Edition AB, GE Healthcare). Die SPR-Messungen erfolgten in einem Biacore X SPR-Spektrometer (Biacore, GE Healthcare), welches zwei getrennt voneinander ansteuerbare Flusszellen (Fc1 und Fc2) besitzt. Für Bindungsanalysen wurde Kollagen I (Sigma-Aldrich C1809), analog zu publizierten Studien (Fresquet *et al.*, 2007; Romijn *et al.*, 2003; van der Plas *et al.*, 2000) als Ligand immobilisiert. Dazu kamen CM5-Sensorchips mit einer carboxymethylierten Dextranmatrix auf der Goldoberfläche zum Einsatz.

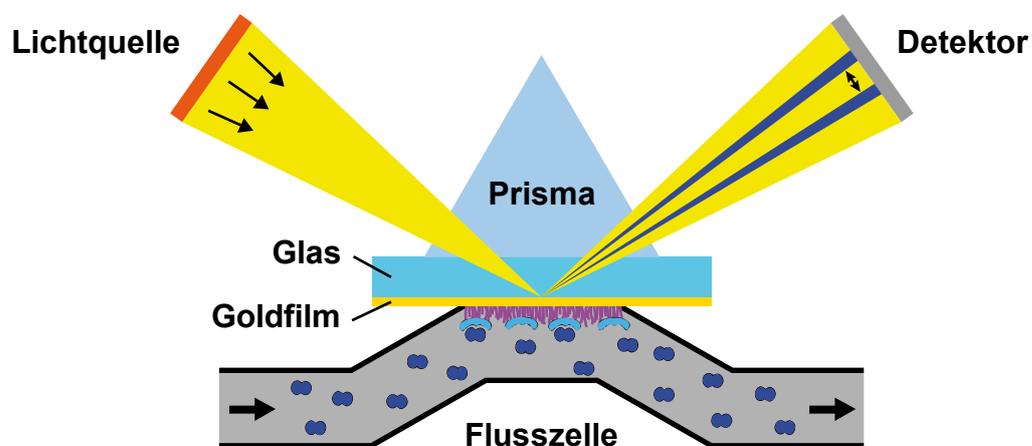


Abbildung 2-4 Aufbau und Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

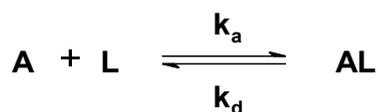
Die Immobilisierung erfolgte nach den Herstellerangaben (Biacore *Sensor Surface Handbook* BR-1005-71 Edition AB, GE Healthcare) mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS). Kollagen I wurde wie in 2.5.9 beschrieben in 1 % (v/v) Essigsäure gelöst (1 mg/mL), 1:10 mit Wasser verdünnt und der pH-Wert der Lösung mit 1 M Natronlauge auf pH 5 eingestellt. Nach anfänglicher Äquilibration in HBS-T-Puffer bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ erfolgte die Injektion von 70 μL einer 1:1-Mischung von EDC- und NHS-Lösung in beide Flusszellen des CM5-Chips. Nach einer

kurzen Waschphase mit HBS-T-Puffer wurden nacheinander 70 μL Kollagenlösung in die Messzelle (Fc1) und 70 μL Ligandenpuffer in die Referenzzelle (Fc2) injiziert, jeweils mit kurzen Waschschrritten mit HBS-T-Puffer nach jeder Injektion. Die Absättigung freier reaktiver Gruppen erfolgte anschließend durch Injektion von 70 μL Ethanolamin-Lösung in beide Flusszellen. Messungen zur Bindung von Proteinen an den kollagenbeschichteten Chip wurden in SPR-Messpuffer bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Dabei wurden pro Lauf 70 μL Proteinlösung (10 μM in SPR-Messpuffer) injiziert und die Flusszellen anschließend für mindestens 10 min mit SPR-Messpuffer gewaschen. Die Regeneration des Chips erfolgte durch Injektion von 70 μL einer entsprechenden Regenerationslösung.

HBS-T-Puffer	10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005 % (w/v) Tween 20
EDC-Lösung	0,4 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)
NHS-Lösung	0,1 M N-Hydroxysuccinimid (NHS)
Ethanolamin-Lösung	1 M Ethanolamin/HCl pH 8,5
Kollagenlösung pH 5	0,1 mg/mL Kollagen I (Sigma-Aldrich C1809), 16,6 mM Essigsäure, 4 mM NaOH
Ligandenpuffer	20 mM Natriumacetat/Essigsäure pH 5
SPR-Messpuffer	10 mM Natriumphosphat pH 7, 50-100 mM NaCl
Regenerationslösung	10 mM Natriumphosphat pH 7, 2 M NaCl

Datenauswertung:

Die Auswertung der Bindekurven erfolgte mit der Software BIAevaluation (Version 4.1.1, GE Healthcare). Dabei wurde zunächst das Signal der Referenzzelle vom Signal der Messzelle subtrahiert und die erhaltene Differenzkurve um das Signal vor der Injektion (Basislinie) korrigiert. Ferner wurde der Injektionsstart als zeitlicher Nullpunkt gesetzt. Die prozessierten Kurven wurden anschließend mittels eines in der BIAevaluation-Software implementiertem Regressionsmodell, welches auf einer 1:1-Langmuir-Bindung (Langmuir-Isotherme) basiert, ausgewertet:



A	Analyt	k_a	Assoziationsrate ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
L	freier Ligand	k_d	Dissoziationsrate (s^{-1})
AL	Analyt/Ligand -Komplex		

Zur simultanen Bestimmung der entsprechenden kinetischen Raten werden die Assoziations- und Dissoziationsphase mit einfachen Exponentialfunktionen unter Verwendung der folgenden Ratengleichungen angeglichen (Karlsson und Fält, 1997). Das gesamte Messsignal unterteilt sich dabei in einen Beitrag der Analytlösung (*bulk refractive index*) und den Beitrag des Analyt-Ligand-Komplexes.

Formel 2-8 $\frac{dL}{dt} = -(k_a \cdot A \cdot L - k_d \cdot AL)$ mit $L(0) = R_{\max}$

Formel 2-9 $\frac{dAL}{dt} = k_a \cdot A \cdot L - k_d \cdot AL$ mit $AL(0) = 0$

Formel 2-10 $R_{\text{total}} = AL + RI$

k_a	Assoziationsrate	AL	Analyt/Ligand-Komplex
k_d	Dissoziationsrate	R_{total}	Gesamtes Signal
A	Analyt (repräsentiert durch die Konzentration in der Injektionslösung)	RI	<i>bulk refractive index</i>
L	freier Ligand	R_{\max}	Signal des Analyt-Ligand-Komplexes bei Sättigung

Aus den ermittelten Ratenkonstanten lassen sich weitere Parameter wie Assoziations- und Dissoziationskonstanten berechnen (Formel 2-11).

Formel 2-11 $K_A = \frac{k_a}{k_d}$ $K_D = \frac{1}{K_A}$

k_a	Assoziationsrate ($M^{-1} s^{-1}$)	K_A	Assoziationskonstante (M^{-1})
k_d	Dissoziationsrate (s^{-1})	K_D	Dissoziationskonstante (M)

2.7.7 Statische Lichtstreuung

Durch die Messung der statischen Lichtstreuung bei mehreren Winkeln (Mehrwinkellichtstreuung, *multi wavelength light scattering*, MALS) können die molare Masse und der quadratische Mittelwert des Molekülradius (*root mean square radius*, r_{RMS}) von Proteinen bestimmt werden (Zimm, 1948). Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit Lichtstreuungsmessungen zur Analyse HPLC-getrennter Proteine/Proteingemische durchgeführt, wobei eine 1100 Series HPLC-Anlage (Agilent) mit einem MALS-Detektor (Wyatt Technology) sowie weiteren Flusszellendetektoren für die UV-Absorption bei 280 nm (G1314A *Variable Wavelength Detector*, Agilent) und den Brechungsindex (RI-71, Shodex) zum Einsatz

kamen. Die Trennung erfolgte stets mittels GPC (Superdex 200 GL 10/300, GE Life Sciences, siehe 2.6.6).

Zur Auswertung der Lichtstreuungsdaten wurde die Software Astra (Version 6.0.1, Wyatt Technology) verwendet. Die dabei zu Grunde liegenden Beziehungen sind im Folgenden aufgeführt (Zimm, 1948):

Formel 2-12
$$\frac{R_{\theta}}{K^*c} = MP(\theta) - 2A_2cM^2P^2(\theta)$$

R_{θ}	hintergrundkorrigiertes Rayleigh-Verhältnis in Abhängigkeit des Streuwinkels (cm^{-1}) (siehe Formel 2-13)
K^*	optische Konstante (siehe Formel 2-14)
c	Konzentration (mg/mL)
M	molare Masse (g/mol)
A_2	zweiter Virialkoeffizient (mol ml/g^2)
$P(\theta)$	theoretischer Formfaktor, der die Winkelabhängigkeit des gestreuten Lichts beschreibt (siehe Formel 2-15)

Formel 2-13
$$R_{\theta} = \frac{(I_{\theta} - I_{\theta,LM})r^2}{I_0V}$$

I_{θ}	Intensität des Streulichts im Winkel θ
$I_{\theta,LM}$	Beitrag des Lösungsmittels zur Intensität des Streulichts im Winkel θ
I_0	Intensität des einfallenden Lichts
V	Volumen der Streulicht-Quelle
r	Abstand der Streulichtquelle vom Detektor

Formel 2-14
$$K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{\lambda_0^4 N_A}$$

n_0	Brechungsindex des Lösungsmittels
dn/dc	differenzielles Brechungsindex-Inkrement (s. u.)
λ_0	Wellenlänge des eingestrahnten Lichts
N_A	Avogadro-Konstante ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

Formel 2-15
$$P(\theta) = 1 - \frac{2\mu^2 \langle r_g^2 \rangle}{3!} + \dots \quad \text{mit } \mu = \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right) \sin \left(\frac{\theta}{2} \right)$$

$\langle r_g^2 \rangle$	quadratischer Mittelwert des Molekülradius
λ	Wellenlänge
θ	Einstrahlwinkel

Die Gleichung aus Formel 2-12 kann durch verschiedene mathematische Ansätze gelöst werden, wobei im Rahmen dieser Arbeit das Zimm-Modell gewählt wurde (Zimm, 1948). Dabei wird eine vereinfachte Näherung der reziproke Gleichung aus Formel 2-12 verwendet.

$$\text{Formel 2-16} \quad \frac{K^*c}{R_\theta} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2c$$

R_θ	hintergrundkorrigiertes Rayleigh-Verhältnis in Abhängigkeit des Streuwinkels (cm^{-1})
K^*	optische Konstante (siehe Formel 2-14)
c	Konzentration (mg/mL)
M	molare Masse (g/mol)
A_2	zweiter Virialkoeffizient (mol ml/g^2)
$P(\theta)$	theoretischer Formfaktor (siehe Formel 2-15)

Die gemessenen Lichtstreudaten werden in Form von K^*c/R_θ gegen $\sin^2(\theta/2)$ aufgetragen und die molare Masse sowie der Formfaktor $P(\theta)$ und daraus r_{RMS} anschließend durch lineare Regression der entsprechenden Kurve und Extrapolation von $\theta \rightarrow 0$ berechnet.

$$\text{Formel 2-17} \quad M = \left(\frac{K^*c}{R_0} - 2A_2c \right)^{-1}$$

M	molare Masse (g/mol)
K^*	optische Konstante (siehe Formel 2-14)
c	Konzentration (mg/mL)
R_0	hintergrundkorrigiertes Rayleigh-Verhältnis für $\theta \rightarrow 0$ (cm^{-1})
A_2	zweiter Virialkoeffizient (mol ml/g^2)

$$\text{Formel 2-18} \quad \langle r_g^2 \rangle = \frac{3sM\lambda^2}{16\pi^2}$$

$\langle r_g^2 \rangle$	quadratischer Mittelwert des Molekülradius
s	Steigung der Regressionsgerade
M	molare Masse (g/mol)

MALS-Messungen erfolgten unter Verwendung von Laserlicht einer Wellenlänge von 690 nm, wobei Daten in 0,5 s-Intervallen aufgezeichnet wurden. Zur Berechnung des Molekulargewichts aus MALS-Messungen nach Formel 2-17 wird die Konzentration des Proteins im Eluat benötigt. Diese wurde durch die Messung des Brechungsindex des Eluats nach der HPLC bestimmt, unter der Annahme eines für Proteine konstanten differentiellen Brechungs-

index-Inkrement dn/dc von 0,185 mL/g. Die Abweichungen der damit berechneten Molekulargewichte von den theoretischen (ProtParam) betragen stets weniger als 2 %.

2.8 Mikroskopische Methoden

2.8.1 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Bilder wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse von Proteinkristallen aufgenommen (siehe 2.6.10). Dabei kamen ein mit einer Olympus E-620-Kamera gekoppeltes Olympus SZX16-Mikroskop sowie ein Nikon SMZ1500-Mikroskop (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Bayreuth) zum Einsatz.

2.8.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird eine Probe mit einem Elektronenstrahl rasterförmig abgetastet und von der Probe zurückgestreute bzw. emittierte Elektronen detektiert. Biologische Proben müssen dabei oftmals zur Erhöhung des Kontrastes mit einer dünnen Schicht aus Edelmetallen beschichtet werden. Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit an einem Jeol JSM 6400-Rasterelektronenmikroskop (Lehrstuhl für keramische Werkstoffe, Universität Bayreuth) durchgeführt. Dazu wurden zunächst Proben auf REM-Objektträger (Agar Scientific) mit Thermanox-Deckgläsern (Nunc) aufgebracht und mit einem leitfähigen Aluminiumklebeband (Scotch) versehen. Die Beschichtung von Proben mit Platin und REM-Messungen bei einer Spannung von 3 kV erfolgten durch Dr. Hendrik Bargel, Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth.

2.8.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie basiert auf einer rasterförmigen Abtastung einer Probe mit einem Cantilever, wobei dessen topographiebedingte Auslenkung in ein mikroskopisches Bild umgesetzt wird. Unter Verwendung geeigneter Messspitzen können damit nahezu atomare Auflösungen erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden AFM-Messungen am Lehrstuhl für Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth, mit einem Dimension 3100 AFM, ausgerüstet mit einer Nanoscope IV Kontrolleinheit und einem XY-closed-loop-Scanner (Veeco) durchgeführt¹⁰. Das Gerät wurde im Tapping-Modus (*tapping mode*) betrieben, bei dem die

¹⁰ z. T. wurden Messungen von Dr. Martin Humenik, Lehrstuhl Biomaterialien, durchgeführt.

Probe mit einer oszillierenden Sonde abgetastet wird. Verwendet wurden dabei OMCL-AC160TS-W2 Cantilever (Olympus) mit Federkonstanten von 42 N m^{-1} und Resonanzfrequenzen von 300 kHz. Die Abtastfrequenz betrug je nach Auflösung 1-2 Hz, die Auflösung stets 1024×1024 Bildpunkte. Die Regelgrößen betragen 1,3-1,4 V (*setpoint amplitude* - Regelwert für die aufgewendete Kraft der Abtastung), 174,4 mV (*driving amplitude* - Regelwert für die Amplitude der Cantileveroszillation) 0,37 (*integral gain* - integrale Verstärkung) und 0,882 (*proportional gain* - proportionale Verstärkung). Als Trägermaterial für die Proben wurde Muskovit verwendet, welches aufgrund seiner höchst vollkommenen Spaltbarkeit eine atomar flache Oberfläche besitzt. Zur Probenvorbereitung wurden mit einem Klebeband Muskovitschichten abgezogen und auf die frische Oberfläche 10-40 μL Probenlösung (Proteinkonzentration 0,05-0,1 mg/mL) pipettiert. Nach Inkubation für 1-3 min wurde die Lösung abgezogen. Pufferreste und nicht adhärierte Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit MilliQ-Wasser entfernt und die Probe vor der Messung an der Luft bzw. im Luftstrom getrocknet.

2.8.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) liegt in der Streuung von Elektronenstrahlen beim Durchtritt durch eine Probe und Detektion der abgelenkten Strahlen auf einem Röntgenshirm oder mittels CCD-Kamera. Dabei können bei entsprechendem Kontrast atomare Auflösungen erhalten werden. Um biologische Proben in dieser Weise aufzulösen, ist vor TEM-Messungen jedoch meistens eine Behandlung mit Kontrastmitteln nötig. Zur Probenvorbereitung wurden 10 μL Proteinlösung auf eine hydrophobe Oberfläche (Parafilm) pipettiert. Auf diesen Tropfen wurde ein mit Formvar (1 % Polyvinylformal) beschichteter TEM-Objektträger gelegt und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger zweimal für jeweils 10 s auf einen Wassertropfen und für 30 s auf einen Tropfen einer gesättigten Uranylacetatlösung (in MilliQ-Wasser) gesetzt. Nach einem erneuten Waschschrift mit MilliQ-Wasser wurde der Objektträger getrocknet. TEM-Messungen erfolgten mit Unterstützung von Kristin Schacht, Lehrstuhl Biomaterialien und Dr. Stefan Geimer, Elektronenmikroskopie, Universität Bayreuth. Dabei kam ein JEM-2100 Transmissionselektronenmikroskop (JEOL), ausgestattet mit einer ES500W Erlangshen CCD-Kamera (Gatan), zum Einsatz, wobei die Betriebsspannung 80 kV betrug.

2.9 Sonstige Methoden

2.9.1 Generierung eines Anti-PTMP1-Serums

Zur Detektionszwecken wurde von der Firma Pineda (Berlin) unter Verwendung eines Standard-Immunsierungsprotokolls (siehe Tabelle 2-11) in einem Kaninchen ein polyklonales Antiserum gegen rekombinant hergestelltes und gereinigtes PTMP1 generiert.

Tabelle 2-11 Immunsierungsprotokoll zur Generierung eines PTMP1-Antiserums

Immunsierungstag	Maßnahme
1	Präimmunsierung, intradermale Injektion (i. d.), komplettes Freund-Adjuvans (KFA)
20	1. Boost, subkutane Injektion (s. c.), inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA)
30	2. Boost, s. c., IFA
40	3. Boost, s. c., IFA, Blutentnahme
61	4. Boost, s. c., IFA
75	5. Boost, s. c., IFA, Blutentnahme
90	6. Boost, s. c., IFA
anschließend	14-tägiger Boost (s. c., IFA), 30-tägige Blutentnahme
220	totale Blutentnahme

2.9.2 Bildung von Kollagenfibrillen

Die Bildung von Fibrillen aus in verdünnter Essigsäure gelösten Kollagenen (siehe 2.5.9) erfolgte durch Erhöhung des pH-Wertes nach einem Protokoll von Williams *et al.* (Williams *et al.*, 1978). Dazu wurden die 1 mg/mL-Lösungen zehnfach in 1 x Natriumphosphatpuffer verdünnt, der pH-Wert mit Natronlauge auf pH 8 eingestellt und die entsprechenden Lösungen für 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ erfolgte die Verdünnung 1:1 mit Trispuffer und die Inkubation für 5 h bei Raumtemperatur. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Fibrillenbildung z. T. in Anwesenheit von PTMP1, welches optional aus einer höher konzentrierten Stammlösung zugegeben wurde.

Natriumphosphatpuffer (10 x)	100 mM Natriumphosphat pH 8, 1,5 M NaCl
Trispuffer (2 x)	40 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl, 140 mM NaOH

2.9.3 Statische Kollagenbindungstests (ELISA-ähnlicher Assay)

Zur Charakterisierung von Bindungseigenschaften rekombinanter Proteine wurden statische Tests nach einem indirekten-ELISA ähnlichen Prinzip (*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt (Lankhof *et al.*, 1996; Otten *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2002; van der Plas *et al.*, 2000). Dabei wird zunächst der eine Bindungspartner (Ligand) auf einer Oberfläche immobilisiert. Anschließend wird der zweite Bindungspartner (Analyt) zugegeben und nichtgebundener Analyt durch Waschen entfernt. Anschließend wird der gebundene Analyt in geeigneter Weise detektiert (z. B. durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers). Durch die Auswertung von Titrationsreihen mit steigender Analytkonzentration kann die Affinität des Analyten zum Liganden bestimmt werden.

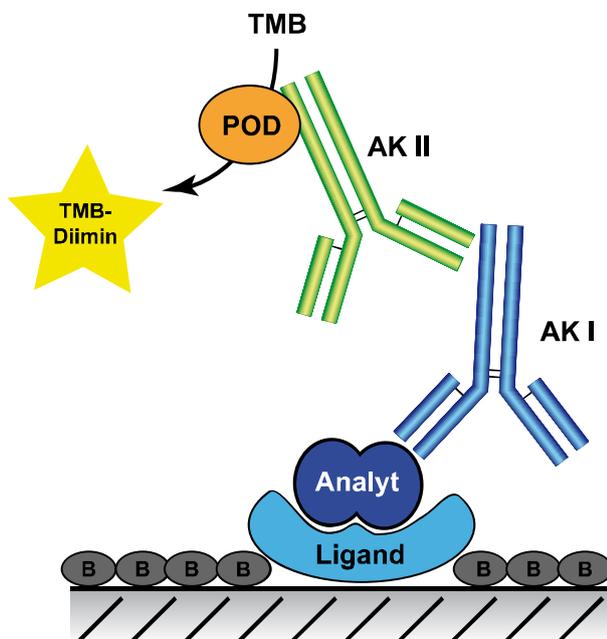


Abbildung 2-5 Schema des statischen Bindungstests (indirekter ELISA)

Der Ligand bindet an die Oberfläche, an der weitere potenzielle Bindestellen blockiert sind (B). An den Analyten bindet ein spezifischer Antikörper (AK I), der seinerseits wieder von einem Detektionsantikörper (AK II) gebunden wird. Durch die gekoppelte Peroxidase (POD) kann das Substrat TMB zum photometrisch nachweisbaren TMB-Diimin oxidiert werden (s. u.).

Vorbereiten des Liganden:

Zur Vorbereitung der Tests wurden gefriergetrocknete Kollagene gelöst (siehe 2.5.9), optional fibrillisiert (siehe 2.9.2) und mit Natriumacetatpuffer auf eine Konzentration von 20 µg/mL verdünnt. Alternativ wurde das Peptid (PPG)₁₀ (Berisio *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 1968) in 10 mM HCl gelöst (30 mg/mL) und ebenfalls auf 20 µg/mL mit Natriumacetatpuffer verdünnt.

Immobilisierung des Liganden:

Zur Immobilisierung des Liganden auf der Oberfläche stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die auf spezifischer Bindung, passiver Adsorption oder chemischer Kopplung

basieren. Spezifische Bindung kann, wie u. a. im klassischen Sandwich-ELISA, durch vorherige Modifikation von Oberflächen mit Antikörpern etc. vermittelt werden. Passive Adsorption dagegen basiert auf unspezifischen polaren, hydrophoben oder elektrostatischen Interaktionen des Liganden mit Oberflächen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene 96-well-Assay-Platten für passive und kovalente Immobilisierung getestet (Tabelle 2-12).

Tabelle 2-12 Verwendete Assayplatten

Assayplatte	Hersteller	Eigenschaften
MaxiSorp	Nunc	modifizierte Polystyroloberfläche mit hoher Affinität für polare Gruppen
PolySorp	Nunc	modifizierte Polystyroloberfläche, weniger polar als MaxiSorp, für den Einsatz bei starker Hintergrundbindung empfohlen
Microtest	BD Falcon	plasmabehandelte Standard-Gewebekulturplatte
Carbo-BIND	Corning	Polystyroloberfläche mit Hydrazid-Gruppen zur kovalenten Immobilisierung von Aldehyden (z. B. oxidierten Glycosyl-Resten)
Amine-binding-MAA	Pierce	Maleinsäureanhydridgruppen zur kovalenten Immobilisierung von Aminen

Für die kovalente Bindung an Carbo-BIND-Oberflächen wurden die Glycosylreste der verwendeten Kollagene zunächst oxidiert (Fischer *et al.*, 1998). Dazu wurden 100 µg/mL Kollagen in Natriumacetatpuffer mit 15 mM Natriumperiodat für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Immobilisierung auf den Carbo-BIND-Platten durch Zugabe von jeweils 100 µL pro Kavität und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zur kovalenten Immobilisierung auf aminbindende maleinsäureanhydridaktivierte Platten wurden die Kollagenstammlösungen (1 mg/mL in 1 % (v/v) Essigsäure) mit 100 mM Natriumphosphat pH 8 verdünnt. Anschließend erfolgte die Immobilisierung durch Zugabe von 100 µL pro Kavität und Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur. Die Immobilisierung durch passive Adsorption erfolgte durch Zugabe von jeweils 100 µL der entsprechenden Kollagen- bzw. Peptidlösungen pro Kavität und Inkubation der Platten bei 4 °C über Nacht.

Bindungsassay:

Nach der Immobilisierung wurden die Platten dreimal mit jeweils 300 µL TBS-Puffer pro Kavität gewaschen. Um unbesetzte Bindestellen abzusättigen folgte die Zugabe von jeweils 300 µL Blocking-Lösung und die Inkubation für 4-5 h bei Raumtemperatur oder 20 h bei 4 °C. Danach wurden die Platten erneut dreimal mit TBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 50 µL des Analyten in TBS-Puffer erfolgte die Inkubation der Platten für 2 h bei Raumtemperatur und anschließend erneut drei Waschschrte mit 300 µL TBS-Puffer. Zur Detektion wurden zunächst 50 µL PTMP1-Antiserum (1:20 000 in TBS) zugegeben, die Platten für

45 min inkubiert und zur Entfernung ungebundener Antikörper anschließend dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 50 μL eines meerrettichperoxidasegekoppelten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers (1: 20 000 in TBS) und die Inkubation für 45 min. Ungebundene Antikörper wurden anschließend erneut durch dreimaliges Waschen mit TBS-T und einmaliges Waschen mit TBS entfernt. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe von 50 μL Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), siehe Abbildung 2-6) und Stoppen der Reaktion nach fünf Minuten durch Zugabe von 50 μL Stopplösung. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Absorption der Lösungen bei 450 nm im Plattenleser Mittras LB 940 (Berthold), wobei jeweils fünf Einzelmessungen gemittelt wurden (Lampenintensität: 10 000, Messzeit: 0,2 – herstellereigene Einheiten).

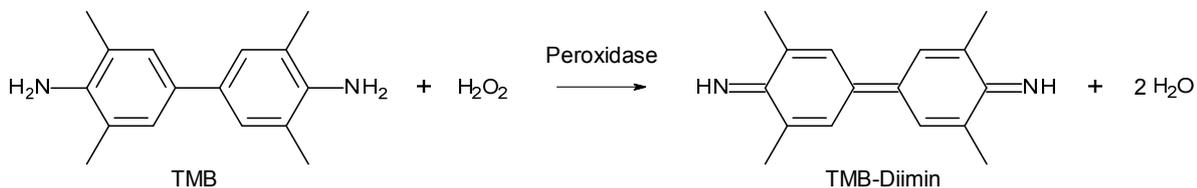


Abbildung 2-6 Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zu TMB-Diimin

Additive:

Die Abhängigkeit der Bindung von Cofaktoren wurde durch die Zugabe von Additiven zu den entsprechenden Lösungen der Analyten analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bivalente Metallionen (Magnesium, Calcium, Mangan, Zink) getestet, die Zugaben erfolgten in Konzentrationen von 100 μM bis 10 mM aus 1 M-Stammlösungen entsprechender Salze.

Kontrollexperimente:

Um die Qualität der entsprechenden Tests zu validieren, wurden diverse Kontrollexperimente durchgeführt. Diese beinhalteten jeweils Messungen der Bindung der einzelnen Antikörper an kollagenbeschichtete, blockierte oder nicht blockierte Oberflächen sowie die Hintergrundbindung der Analyten an Platten ohne Kollagenbeschichtung (blockiert und nicht blockiert). Um unspezifische Hintergrundbindungen zu vermindern, wurden ferner unterschiedliche Blockierungsbedingungen getestet (verschiedene Konzentrationen unterschiedlicher Blockierungsreagenzien wie Milchpulver, BSA, Laktose oder Lysozym). Zur Verminderung unspezifischer Antikörperbindung wurde TBS-Puffer mit bis zu 1 % (v/v) Tween 20 verwendet.

Natriumacetatpuffer	50 mM NaAc/Essigsäure pH 5
Natriumperiodat-Lösung (30 x)	450 mM Natriummetaperiodat
Natriumphosphat-Puffer pH 8 (10 x)	1 M Natriumphosphat pH 8
TBS-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,4, 115 mM NaCl
TBS-T-Puffer	0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS-Puffer
Blocking-Lösung	5 % (w/v) BSA in TBS-Puffer
Substratlösung	100 mM Natriumacetat, 4 mM Zitronensäure, 4,7 mM Wasserstoffperoxid, 0,1 mg/mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)
Stopplösung	0,5 M Schwefelsäure
Magnesiumchlorid-Lösung	1 M Magnesiumchlorid
Calciumchlorid-Lösung	1 M Calciumchlorid
Manganchlorid-Lösung	1 M Manganchlorid
Zinkchlorid-Lösung	1 M Zinkchlorid, angesäuert mit ~0,2 % (w/v) HCl

Datenauswertung:

Zur Datenauswertung wurden die ermittelten Absorptionswerte um das Signal ohne Analyten korrigiert und gegen die Analytkonzentration aufgetragen. Affinitätswerte wurden unter Annahme einer apparenten 1:1-Stöchiometrie der Bindung, analog zum Michaelis-Menten-Modell (Michaelis und Menten, 1913), durch nichtlineare Regression ermittelt (Formel 2-19).

Formel 2-19

$$\text{Abs} = \frac{\text{Abs}_{\text{max.}} \cdot c_{\text{Analyt}}}{\text{Abs}_{\text{max.}} + c_{\text{Analyt}}}$$

Abs	Absorption bei 450 nm
Abs _{max}	maximale Absorption bei 450 bei Sättigung
c _{Analyt}	Konzentration des Analyten

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Charakterisierung von Muschelbyssusproteinen

3.1.1 Evaluierung einer Muschelfuß-cDNA-Bank

Als Quelle der genetischen Sequenzen von Byssusproteinen bzw. an der Biosynthese des Byssus beteiligten Enzymen diente eine cDNA-Bank, welche von Dr. Anja Hagenau im Rahmen ihrer Dissertation erstellt bzw. beschrieben (Hagenau, 2011) und zur Verfügung gestellt wurde (Kap. 2.1.11). Von den in Form von bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen der beiden Teilbanken Mfl-1 und Mfl-2 wurden zunächst DNA-Pools beider Teilbanken generiert. Um eine repräsentative Anzahl von Klonen ($>10^8$ Zellen) einzusetzen, wurden jeweils 150 mL LB-Kanamycin-Medium mit 150 μL der Glycerinkulturen inokuliert und über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgten die Isolierung der Plasmid-DNA und ihre Aliquotierung. Zeitgleich wurden durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen die Titer erneut bestimmt, wobei sich, mitunter bedingt durch die Lagerzeit der Glycerinkulturen von ~ 22 Monaten bei -80 °C , signifikante Unterschiede zu den beschriebenen Werten (Hagenau, 2011) ergaben. Die erhaltenen Titer betragen 370 koloniebildende Einheiten pro Mikroliter ($\text{cfu}/\mu\text{L}$) für Mfl-1 und 1350 $\text{cfu}/\mu\text{L}$ für Mfl-2 was in etwa 22 % (Mfl-1) bzw. 25 % (Mfl-2) der ursprünglichen Werte entspricht. Um die Qualität der beiden Teilbanken zu evaluieren, wurden jeweils 24 Einzelklone isoliert und die entsprechenden pDONR222-Plasmide sequenziert, wobei 42 *expressed sequence tags* (ESTs) ermittelt werden konnten. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1 Analyse von Einzelklonen der cDNA-Bank

Zuordnung	Anzahl (Mfl-1)	Anzahl (Mfl-2)
Proteinbiosynthese (ribosomale Proteine, rRNA, Chaperone)	6	6
Cytoskelett	3	1
Zellzyklus/Metabolismus	1	1
Byssusproteine (preCols)	5	3
potenziell extrazelluläre Proteine (Immunsystem, extrazelluläre Matrix etc.)	5	2
Proteine mit unbekannter Funktion	3	3
kein Protein (kein sinnvoller Leserahmen)	0	3
nicht auswertbare Fragmente (keine ESTs)	1	5

Anhand der Tabelle ist zu ersehen, dass die einzelnen Sequenzen unterschiedlichen zellulären Funktionen zugeordnet werden können. Allerdings handelte es sich bei den meisten der detektierten Sequenzen um Fragmente, welche keinen vollständigen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) mit entsprechenden Start- und Stopcodons besaßen. Dieser Effekt zeigte sich besonders für die Teilbank mit den im Mittel kürzeren Integrationen (Mfl-2), weswegen für sämtliche weiteren Experimente dieser Arbeit ausschließlich Mfl-1 verwendet wurde. Hinsichtlich bekannter Byssusproteine wurden ausschließlich entsprechende cDNA-Sequenzen von PreCol-D und PreCol-NG detektiert, wobei nur ein einziger Klon einen potenziell vollständigen ORF aufwies.

Die verwendete cDNA-Bank erwies sich somit prinzipiell als geeignet. Aufgrund der großen Zahl detektierter Nicht-Byssusproteinsequenzen (Proteine unterschiedlicher zellulärer Funktionen) und der hohen Fragmentierungsrate der analysierten Sequenzen wurde auf die weitere Isolierung und Analyse von Einzelklonen verzichtet und die entsprechenden Sequenzen per PCR-Amplifikation gewonnen.

3.1.2 Catecholoxidase

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Sequenz einer bislang unbekanntem potenziellen Catecholoxidase, welche die Oxidation von DOPA-Resten in Muschelbyssusproteinen katalysieren könnte, in der cDNA-Bank ermittelt werden. Hierzu wurden PCR-basierte Ansätze verfolgt¹¹, welche u. a. auf der Verwendung von Primern unterschiedlichen Degenerierungsgrades basierten.

3.1.2.1 Identifikation

Die einzige Muschel mit zum Zeitpunkt dieser Analysen bekannter Sequenz einer potenziellen Catecholoxidase bzw. Tyrosinase stellte die Perlinauster (*Pinctada fucata*) dar (Nagai *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Eine Suche dieser Sequenzen mittels verschiedener BLAST-Algorithmen in der Datenbank MytiBase, einer Datenbank mit 18788 ESTs bzw. 7112 nicht-redundanten Sequenzen (4666 Einzelsequenzen und 2446 Cluster) aus 17 unterschiedlichen cDNA-Banken verschiedener Gewebe von *M. galloprovincialis* (Venier *et al.*, 2009), ergab auf DNA-Ebene keine Einträge mit signifikanter Homologie. Dagegen lieferten ein Abgleich der Proteinsequenzen mit der translatierten Datenbank (tblastn-Algorithmus) einen signifikan-

¹¹ Die praktischen Arbeiten hierzu wurden z. T. im Rahmen eines Forschungspraktikums von Erik Richter durchgeführt.

ten Treffer (Cluster MGC01495), welcher eine moderate Homologie zur entsprechenden Sequenz aufwies (siehe Abbildung 3-1). Dieser Cluster setzt sich aus zwei ESTs zusammen, welche aus unterschiedlichen cDNA-Banken gemischter Gewebe von *M. galloprovincialis* (jeweils einschließlich Muschelfußgewebe) stammen.

```
AAZ66340  317  YIDYVWQLFRRKLRNRLGIDPARDYLGHGGPAHAPNAPLLGLIPGWRNVHGYSNVFTQRVYRY
          +ID VW +F R LR+R  IDP  DY+      H P  +  L P  +N+ GYS+ F  +Y Y
MGC01495   2  FIDAVWTVFCRQLRHR-NIDPQDDYVIVDNKMHRPERYMDHLFP-MKNIDGYSDFANNIYSY
```

Abbildung 3-1 Ergebnis einer tblastn-Suche der Sequenz AAZ66340 in der MytiBase

Alignment der Sequenz einer Tyrosinase der Perlenauster *P. fucata* (GenBank AAZ66340) mit dem MytiBase-Eintrag MGC01495. Zwischen den Sequenzen ist der Konsensus dargestellt, wobei „+“ konservative Aminosäure-Austausche bezeichnen und „-“ Lücken.

Ein folgender Abgleich der translatierten Sequenz des Clusters MGC01495 mit der *non-redundant protein sequences* Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) mittels des blastp-Algorithmusses zeigte weitere signifikante Homologien der Sequenz zu Tyrosinasen bzw. Tyrosinase-ähnlichen Proteinen, z. B. aus *Caenorhabditis elegans*. Die Extraktion der entsprechenden Sequenz aus der cDNA-Bank erfolgte mittels PCR-Amplifikation. Dabei wurde ein zum 3'-Ende des entsprechenden ORFs komplementärer spezifischer Primer (MGC01495_rev) und ein entsprechender zum Vektor pDONR222 komplementärer 5'-Primer (M13_fwd) verwendet.

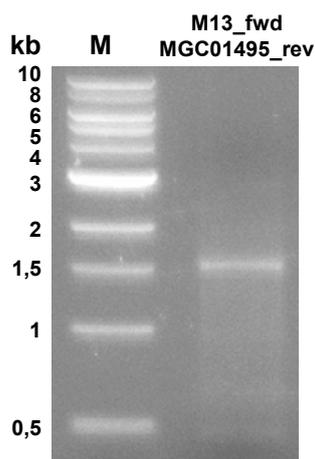


Abbildung 3-2
PCR-Amplifikation der Sequenz MGC01495

Amplifikation der cDNA-Sequenz des MytiBase-Clusters MGC01495 mittels Taq DNA-Polymerase und der Primer M13_fwd und MGC01495_rev unter Verwendung von Mfl-1 als Templat. M: 1kb-Marker

Das amplifizierte Fragment wurde aus dem Gel extrahiert, in den Vektor pGEM-T integriert und sequenziert.

Parallel zu diesem Ansatz wurden PCR-Experimente basierend auf der Konservierung der beiden Kupferbindestellen (CuA, CuB) in bekannten Catecholoxidasen/Tyrosinasen durchgeführt. Hierbei kamen PCR-Primer unterschiedlichen Degenerierungsgrades zum Einsatz (siehe Tabelle 3-2), welche durch reverse Translation der konservierten Proteinsequenzen in den entsprechenden Bereichen generiert wurden. Um den Grad der Degenerierung zu reduzieren, fanden dabei teilweise nur die von *M. galloprovincialis* hauptsächlich verwendeten Codons Verwendung (*Codon Usage Database*). Alle Primer wurden revers ausgerichtet und jeweils mit einem zum Vektor pDONR222 komplementärer 5'-Primer (M13_fwd) kombiniert. Die Ergebnisse der einzelnen PCR-Experimente sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst:

Tabelle 3-2 Amplifikation potenzieller Catecholoxidasesequenzen mittels degenerierter Primer

Der Degenerierungsgrad (kombinatorisch ermittelte Anzahl verschiedener Sequenzmöglichkeiten) jedes einzelnen Primers ist in den Bezeichnungen der Oligonukleotide enthalten.

Bezeichnung	Basis	Ziel	Ergebnis
CuA_65536	Alignment von neun unterschiedlichen Tyrosinasesequenzen ¹²	CuA, WHR-Motiv ¹³	kein eindeutiges PCR-Produkt
CuA_2048	<i>P. fucata</i> -Tyrosinasesequenzen (GenBank AAZ66340, BAF74507)	CuA, WHR-Motiv ¹³	mehrere PCR-Produkte mit unerwünschten Sequenzen
CuA_1536	<i>P. fucata</i> -Tyrosinase-sequenzen (GenBank AAZ66340, BAF74507)	CuA, WHR-Motiv ¹³	mehrere PCR-Produkte mit unerwünschten Sequenzen
CuA_1024	<i>P. fucata</i> -Tyrosinase	CuA, konservierter Bereich <i>upstream</i> des WHR-Motivs ¹³	kein eindeutiges PCR-Produkt
CuA_128	<i>P. fucata</i> -Tyrosinase	CuA, Bereich <i>downstream</i> des WHR-Motivs ¹³	zwei definierte PCR-Banden (siehe Text)
CuB_36863	Alignment von neun unterschiedlichen Tyrosinasesequenzen ¹²	CuB, Bereich des dritten Histidins	kein eindeutiges PCR-Produkt
CuB_576	<i>P. fucata</i> -Tyrosinase-sequenzen (GenBank AAZ66340, BAF74507)	CuB, Bereich des dritten Histidins	kein PCR-Produkt
CuB_128	<i>P. fucata</i> -Tyrosinase-sequenzen (GenBank AAZ66340, BAF74507)	CuB, Bereich des dritten Histidins	mehrere PCR-Produkte mit unerwünschten Sequenzen

Die jeweiligen Banden wurden aus Agarosegelen gereinigt, in den Vektor pGEM-T eingebaut und die Plasmid-DNA einzelner Klone sequenziert. Als zielführend erwies sich dabei einzig

¹² GenBank CAE01389, NP_851344, NP_989491, AJ297474, BAF42771, AAZ66340, AAP33665, AAB07484, XP_002381720

¹³ In allen bekannten Typ-3-Kupferproteinen liegt der dritte Histidinrest der CuA-Bindestelle in Form eines Tryptophan-Histidin-Arginin-Tripeptids (WHR) vor.

die Amplifikation mittels der Primer CuA_128 und M13_fwd, welche in einem Muster mit zwei definierten Banden (~650 bp, ~950 bp) resultierte (siehe Abbildung 3-3 A). Die anschließende Sequenzierung lieferte für beide Banden unerwünschte Sequenzen (z. B. Sequenzen bekannter Gene/Proteine, unsinnige Leserahmen), für die kürzere PCR-Bande konnte jedoch eine Sequenz detektiert werden, welche Homologie mit den *P. fucata*-Tyrosinasesequenzen aufwies. Basierend auf deren längsten sinnvollen ORF wurde ein spezifischer Vorwärtsprimer designt (CO_fwd) und zusammen mit einem zum Vektor pDONR222 komplementärer 3'-Primer (T7) in einer PCR eingesetzt. Die Reaktion lieferte eine einzige Bande mit ~1,8 kb (siehe Abbildung 3-3 B), die erneut extrahiert und in den Vektor pGEM-T eingebaut wurde.

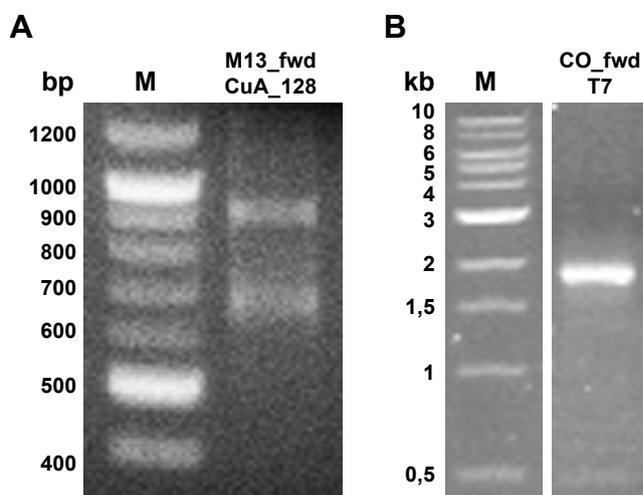


Abbildung 3-3
PCR-Amplifikation der Sequenz
einer potenziellen Catecholoxidase

(A) PCR mit den Primern M13_fwd und CuA_128 unter Verwendung von Taq DNA-Polymerase und Mfl-1 als Templat. M: 100 bp-Marker. (B) PCR mit den Primern CO_fwd und T7 unter Verwendung von Phusion Hot Start DNA-Polymerase und Mfl-1 als Templat. M: 1kb-Marker

Die erhaltene Sequenz erwies sich grundsätzlich als identisch mit der des MytiBase-Clusters MGC01495 (s. o.), mit Ausnahme einer Deletion von 62 bp am 3'-Ende des MGC01495-ORFs (siehe Abbildung 3-4A, rote Markierung), die zu einer Leserahmenverschiebung und zu einer Nonsensmutation (artifizielles Stopcodon) in der MytiBase-Sequenz führt, was den entsprechenden ORF um 71 Codons verkürzt.

Aus den beiden mit unterschiedlichen Ansätzen erhaltenen Sequenzen wurde die vollständige Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase zusammengesetzt (Abbildung 3-4).

A

```

1  ATAATACGCC GGCTTTTCAT TATATCAATG AAACCTACAT TACAACACT GCTATTGGTC
61 CTATGGCATT CCGTATTATT ATCAGTCTGT GATGTCATAA CTGACCAGTA TCCTGCTTTG
121 GTTTCCGAAT GTAGAGATCG TAACTCACAG AAGCAATATA AGTGTATACT GTCAAATCTT
181 GACAAAGCAG ATTGGTCACG TGACGATGCA GATGGTTTAA AACTGAGATT ACGACAAGAC
241 TTTTACTGGC ATCCAACAAA GAGGATACGG CGAGAATGTA GAGCACTAAC GAGAGAAGAA
301 TTTAAAGAAA TGGTCGATGC TATAAACGCT TTAAAGAAAAG ATAAAAGTAT GTCTCCGAAT
361 GTGTATGACT ACGTTGCTGA TTACCATAACA AACGAAGCAG TAAATTCGGT GCACTTTGGT
421 TCCAACTTTT TTGGCTGGCA TAAAATGTAT ATTCTAAAAT TTGAAGAGCT TCTACGAAAA
481 GTC AACCCAA ATGTAACATT GTGCTACTGG GATTCAAGAT TAGACCATCA TATGAAGGAC
541 CCTAAGAAAT CCATGATGTT TACATCCGAG TTTTTTGGTG ACGCTAGAGG TCCCATCCAA
601 ACAGGACCTT TTGCACGTTG GAAAACAATA AGAAATAAAC CTCTCTTTTCG AGACTTAGGA
661 AGAGAAGGAA ATCCAATATC TTATAAAGAT ATAAAACTG TATTATCAAA AAAGCACCAC
721 GTCCAAATAA CGAACCCGAC ATCGGATCCC AACAGTCAAG TCGAAATGAT GCATAATATG
781 GTCCATGCCT TCGTCGGTGG TCAAATGAAT GATTTCAATA CTAGTTCTCA AGATCCATTT
841 TTCTGGATTC ATCATGCTTT CATTGACGCA GTTTGGACCG TTTTTTGTCTG GCAGTTACGT
901 CATCGTAATA TAGATCCACA AGATGATTAC GTCATCGTCG ATAATAAAAT GCACAGACCC
961 GAGAGATATA TGGATCACTT ATTTCCGATG AAGAATATAG ATGGTTATAG CGATTACTTT
1021 GCCAATAACA TATATTCATA TGGTGATTTT GCAAATGTC CTACTTGTTT AAACTCTCCA
1081 TACCTAAAAT GCGACTATGC ATCAAACAAA TGTGTAGGCA TAGAGCTTCA CGAACCACGT
1141 AGAAGAGTGG AGACGCCACC AGAAAGAATA AAAACAAACC ATTTATCTAC ACCTCAAAAAT
1201 GATTTTACCG TACTGGCAGG AGATGATAAA AACTGGGTCT ATATCCCAGT TAAAATTATT
1261 GTTCGGAATG CTCTCGAAAA ATCCATTTAA AAAAATGTTA TCGGTGGATG TGAATATTTA
1321 GGAGCCGGAT ATGATAATCT ATGTTCAAAG TCTGTAGCCA TAGTACAATC CAATGGAATA
1381 ACGTACCACG GGACATATAG AAATTATATT GTAAACGATG CTTCTATTCC TCAGTGGTA
1441 TACGCATATG TGGGAGTTAA AGATCCAGGA ACAGGGTCCA GCCAGGCGTT CATCAGTGTA
1501 ACCGATAAAA ACCACCAGCC ATGTGATGCA TTTTGTCTTG ATCTAAAAGC GAAAAAGTAT
1561 CCGTCATGCC CAGGAGTAAT ATCCGTAACA AATAAGAAAC CAAGGCTGTA CTACAACACC
1621 CTTAAGGAAG CAGAGGAAAA TGGATATCCA TTTAATCCTT TAGAGGCGGA TACTTGTAT
1681 CCACGAATTA AAATGGCGTT CCTTTGCTAT TAAATCTGAT GGAAGGCAAA AAAAAAAAAA
1741 AAAAAAA

```

B

```

1  MKPTLQLLLL VLWHSVLLSV CDVITDQYPA LVSECRDRNS QKQYKCILSN LDKADWSRDD
61  ADGLKRLRQ DFYWHPTKRI RRECRALRE EFKEMVDAIN ALKKDKSMSP NVYDYVADYH
121 TNEAVNSVHF GSNFFGWHKM YILKFEELLR KVNPNVTLCY WDSRLDHHMK DPKKSMMFTS
181 EFFGDARGPI QTGPFARWKT IRNKPLFRDL GREGNPISYK DIKTVLSKKH HVQITNPTSD
241 PNSQVEMMHN MVHAFVGGQM NDFNTSSQDP FFWIHHAFID AVWTVFCRQL RHRNIDPQDD
301 YVIVDNKMRH PERYMDHLFP MKNIDGYSYD FANNIYSYGD FAKCPTCLNS PYLKCXYASN
361 KCVGIELHEP RRRVETPPER IKTNHLSTPQ NDFTVLAGDD KNWVYIPVKI IVRNALEKSI
421 KKNVIGGCEY LGAGYDNLCS KSVAIQVNSG IYHGTYRNY IVNDASIPQW VYAYVGVKDP
481 GTGSSQAFIS VTDKNHQPCD AFCLDLKAKK YRSCPGVISV TNKKPRLYYN TLKEAEENGY
541 PFNPLEADTL DPRIKMAFLC Y

```

Abbildung 3-4 Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase

(A) cDNA-Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase. Die 5'- und 3'-nicht-translatierten Bereiche sind grün dargestellt, die Deletion im Cluster MGC01495 rot (das entsprechende artifizielle Stopcodon, welches im publizierten Cluster zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen würde, ist blau hervorgehoben). (B) aus dem ORF abgeleitete Proteinsequenz

Eine Analyse von neun Einzelklonen lieferte sechs unterschiedliche DNA-Sequenzen, die für vier verschiedene Proteinsequenzen bzw. Isoformen codieren. Da bei den initialen Experimenten Taq-DNA-Polymerase ohne 3'-5'-Exonukleaseaktivität eingesetzt worden war, wurden die Sequenzen durch PCR-Experimente mit der Phusion Hot Start DNA-Polymerase, welche diese *proof-reading*-Aktivität besitzt, bestätigt. Die in Abbildung 3-4 dargestellte Pro-

teinsequenz stellt mit sechs zugehörigen DNA-Sequenzen die häufigste detektierte Isoform (Isoform 1) dar. Die anderen drei Proteinsequenzen, deren cDNAs nur jeweils einmal ermittelt wurden, unterscheiden sich von der Hauptsequenz in maximal zwei einzelnen Aminosäurepositionen im aminoterminalen Bereich.

```

Isoform 1  1  MKPTLQLLLLLVLWHSVLLSVCDVITDQYPALVSECRDRNSQKQYKCILSNLDKADWSRDD
Isoform 2  1  .....D.....
Isoform 3  1  .....I.....D.....
Isoform 4  1  .....T.....D.....

```

Abbildung 3-5 Isoformen der mutmaßlichen Catecholoxidase

Ausschnitt eines Alignments der Proteinsequenzen der mutmaßlichen Catecholoxidase
Punkte: identische Positionen

3.1.2.2 Bioinformatische Analysen

Die detektierte Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase wurde bezüglich ihrer potenziellen subzellulären Lokalisation mittels gängiger bioinformatischer Methoden nach einem Protokoll von Emanuelsson *et al.* (Emanuelsson *et al.*, 2007) eingehend analysiert. Ferner erfolgten Analysen zu möglichen posttranslationalen Modifikationen. Zur Identifizierung einer potenziellen Sekretionssignalsequenz am Aminoterminus wurde der SignalP 4.1 Server eingesetzt (Petersen *et al.*, 2011). Die Sequenz der potenziellen Catecholoxidase besitzt demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid mit einer Spaltstelle zwischen L18 und S19 (D-Score 0,787). Das translozierte Protein besitzt somit 543 Aminosäurereste, ein Molekulargewicht von 62977,5 Da und einen theoretischen pI von 8,58 (berechnet mit ProtParam).

Die Ergebnisse weiterer bioinformatischer Analysen sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Anhand der erhaltenen Ergebnisse bezüglich der subzellulären Lokalisation ist eine Sekretion der potenziellen Catecholoxidase wahrscheinlich, da das Protein zwar eine ER-Translokationsequenz, jedoch keine Retentionssequenzen besitzt. Als mögliche posttranslationale Modifikationen könnte das Protein ferner glykosyliert sowie phosphoryliert vorliegen.

Tabelle 3-3 Bioinformatische Analysen der Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase

Analyse	Online-Tool/Referenz	Ergebnis
ER-Translokationssignal	SignalP 4.1 Server (Petersen <i>et al.</i> , 2011)	Signalsequenz vorhanden (siehe Text)
Transmembranhelices	TMHMM Server v. 2.0 (Krogh <i>et al.</i> , 2001)	mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Transmembranregionen
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker	big-PI Predictor (Eisenhaber <i>et al.</i> , 1999)	kein GPI-Anker
ER-Retentionssignal	Anwesenheit einer carboxyterminalen KDEL- Sequenz (Munro und Pelham, 1987)	keine Retention im endoplasmatischen Retikulum (ER)
weitere Retentions- bzw. subzelluläre Lokalisierungssequenzen	WoLF PSORT (Horton <i>et al.</i> , 2007)	keine
C-Mannosylierung	NetCGlyc (Julenius, 2007)	keine
N-Glykosylierung	NetNGlyc (Blom <i>et al.</i> , 2004)	drei Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequons identifiziert; zwei mit hoher, eine mit mittlerer Wahrscheinlichkeit glykosyliert
O-Glykosylierung	NetOGlyc (Julenius <i>et al.</i> , 2005)	keine
Phosphorylierung	NetPhos (Blom <i>et al.</i> , 1999)	15 Serin-, 6 Threonin- und 11 Tyrosinreste potenziell phosphoryliert

Der Vergleich mit verschiedenen Sequenzen durch blastp-Suche gegen die *non-redundant protein sequences* Datenbank (NCBI) lieferte eine Vielzahl homologer Sequenzen von Tyrosinasen oder tyrosinaseähnlichen Proteinen (z. B. Hämocyanine). Die Homologie beschränkte sich dabei auf die konservierte gemeinsame zentrale Domäne von Tyrosinasen (*common central domain of tyrosinase*, PFAM PF00264), welche den Bereich P110-F286 des sekretierten Proteins umfasst, erweitert durch die angrenzenden Bereiche, sodass der gesamte homologe Bereich etwa von T77-Y338 reicht. Hier weisen die Sequenzen etwa 33 % Identität bzw. ~50 % ähnliche Aminosäurereste auf, wobei die bislang beschriebenen Molluskentyrosinasen (u. a. aus *Pinctada fucata*, *Chlamys farreri*, *Crassostrea gigas*, *Ilex argentinus* und *Sepia officinalis*) die größte Übereinstimmung zeigten. Maximale Identität zeigen alle Sequenzen im Bereich des katalytischen Zentrums (Bindestellen der beiden Cu²⁺-Ionen, CuA und CuB), wobei alle essenziellen Aminosäurereste, insbesondere die sechs kupferkoordinierenden Histidine, vorhanden sind (siehe Abbildung 3-6). Auffällig dabei ist, dass die identifizierte Sequenz als einzige aller homologen Sequenzen statt des nahezu vollständig konservierten WHR-Motivs im Bereich des dritten His-Restes der CuA-Bindestelle ein WHK-Motiv zeigt. Ergänzend dazu enthält der homologe Bereich drei Cysteine, welche jedoch evolutionär nicht

konserviert zu sein scheinen. Die in den meisten bekannten Tyrosinasesequenzen konservierten Cysteine fehlen in der detektierten Sequenz dagegen gänzlich.

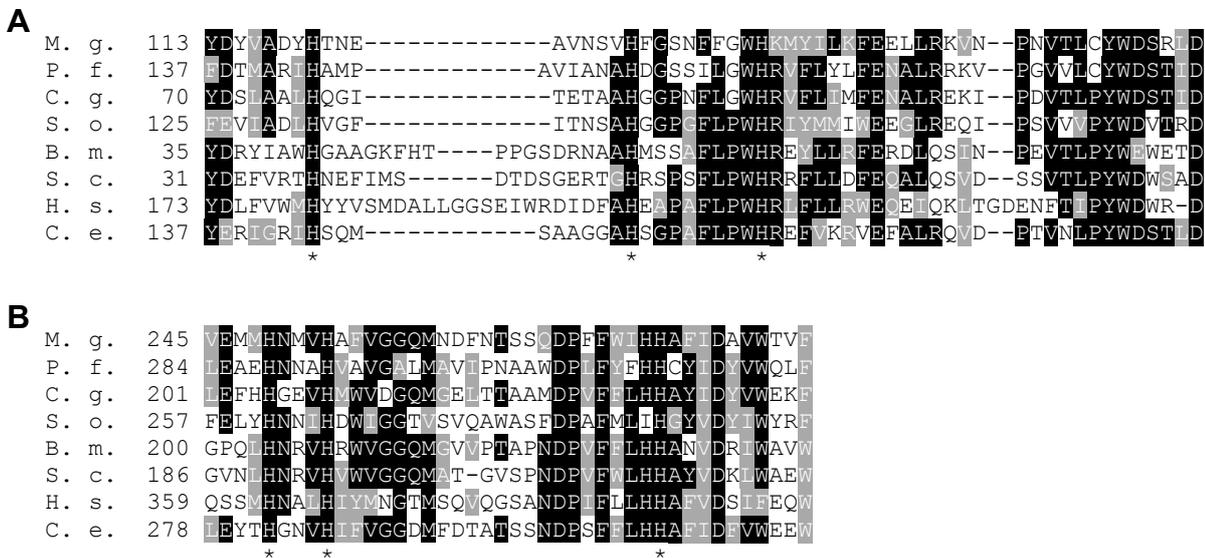


Abbildung 3-6 Sequenzvergleich der Kupferbindestellen verschiedener Tyrosinasesequenzen mit der identifizierten potenziellen Catecholoxidase

Alignment der Sequenzen verschiedener Tyrosinasen im Bereich der CuA- (A) bzw. CuB-Bindestelle (B). Konservierte Reste sind schwarz, weniger stark konservierte grau hinterlegt. Die metallbindenden Histidine sind durch Sterne markiert. M. g. *Mytilus galloprovincialis*; P. f. *Pinctada fucata*; C. g. *Crassostrea gigas*; S. o. *Sepia officinalis*; B. m. *Bacillus megaterium*; S. c. *Streptomyces castaneoglobisporus*; H. s. *Homo sapiens*; C. e. *Caenorhabditis elegans*

Der carboxyterminale Bereich (G339-Y561), welcher zehn der insgesamt 16 Cysteine besitzt, zeigt signifikante Ähnlichkeit (28 % identische, 43 % ähnliche Reste) mit einer Gruppe homologer Sequenzen, die im Rahmen der Sequenzierung des Genoms der pazifischen Auster (*Crassostrea gigas*) annotiert wurden (Zhang *et al.*, 2012). Weitere Daten/Publicationen existieren zu diesen „putative tyrosinase-like“-Proteinen bislang nicht. Der aminoterminaler Bereich (Aminosäuren 19-76) zeigt dagegen keinerlei Homologie mit bekannten Proteinsequenzen.

Mit dem PSIPRED-Algorithmus (Jones, 1999) wurden Sekundärstrukturanteile in der Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase vorhergesagt (Abbildung 3-7).

CO	19	SVCDVITDQYPALVSECRDRNSQKQYKILSNLDKADWSRDDADGLKLRRLRQDFYWHPTK
ss		ee [red] eeeeeeeeeeeeee → eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee
conf		931212300433200002237766401110776655675446431111247888667886
CO	79	RIRRECRALTREEFKEMVDAINALKKDKSMSPNVYDYVADYHTNEAVNSVHFGSNFFGWH
ss		eeeee [red] eeee [red] eeeeeeee [red]
conf		4323332499999999999999984299999955999999965183788779999985255
CO	139	KMYILKFEELLRKVNPNTLCYWDSRLDHHMKDPKKSMMFTSEFFGDARGPIQTGPFARW
ss		[red] eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee
conf		899999999963499996531224899999999768776788868999997559888986
CO	199	KTIRNKPLFRDLGREGNPISYKDIKTVLSKHHVQITNPTSDPNSQVEMMHNMVHAFVGG
ss		eeeee [red] eeeeeeeeeeeeeeee → ee
conf		0146988645889999989999999804873332278999998431111322121147
CO	259	QMNDFTSSQDPFFWIHHAFIDAVWTVFCRQLRHRNIDPQDDYVIVDNKMHRPERYMDHL
ss		eeeee [red] eeeeeeeeeeeeeeeeeeee
conf		67897647898548678788889999996407899999998544699899998857889
CO	319	FPMKNIDGYSDFANNIYSYGDFAKCPCLNSPYLKDYASNKCVGIELHEPRRRVETPP
ss		eeeee → ee → ee → ee → ee
conf		99755677664355660474777999999999421048999123320258852236999
CO	379	ERIKTNHLSTPQNDFTVLGDDKNWVYIPVKIIVRNALEKSIKKNVIGGCEYLGAGYDNL
ss		eeeee → ee → ee → ee → ee
conf		87655556788633842069940464051068855775321134205821037653334
CO	439	CSKSVAIVQSNGITYHGTYRNYIVNDASIPQWVYAYVGKDPGTGSSQAFISVTDKNHP
ss		ee → ee → ee → ee → ee → ee
conf		686436998215055122203465228997138999765199999536999972679986
CO	499	CDAFCLDLKAKKYRSPGVISVTNKKPRLYNTLKEAEENGYPFNPLEADTLDPRIKMAF
ss		eeeee [red] eeeeeeee [red]
conf		34621457999863477815851179910013987898829999999998999730899
CO	559	LCY
ss		→ ee
conf		809

Abbildung 3-7 Vorhersage der Sekundärstruktur der mutmaßlichen Catecholoxidase

Darstellung der mit PSIPRED vorhergesagten Sekundärstrukturanteile (ss) in der identifizierten Catecholoxidasesequenz. α -Helices sind rot, β -Faltblätter gelb dargestellt, Random Coil-Bereiche durch Spiralen. Die von PSIPRED für jeden Aminosäurerest ausgegebenen „confidence“-Werte (conf), welche ein Maß für die Güte der Vorhersage darstellen, sind angegeben (0: niedrige Glaubwürdigkeit; 9: hohe Glaubwürdigkeit). Der zu beschriebene Tyrosinasen bzw. tyrosinaseähnlichen Proteine homologe Bereich ist blau gekennzeichnet, die für die Metallkoordination essenziellen Histidinreste rot, Cysteine gelb.

An den von PSIPRED für jeden Aminosäurerest ausgegebenen „confidence“-Werten kann die Glaubwürdigkeit der Vorhersage abgeschätzt werden. Da insbesondere in den amino- und carboxyterminalen Bereichen homologe Strukturen fehlen, sind die Vorhersagen für diese Bereiche wesentlich weniger glaubwürdig als für die konservierte Tyrosinasedomäne und erlauben maximal einen groben Überblick. Die Länge und genauen Positionen vorhergesagter Sekundärstrukturanteile sind dagegen spekulativ.

Anhand der gezeigten bioinformatischen Analysen kann die Sequenz der potenziellen Catecholoxidase somit in drei Abschnitte/Domänen unterteilt werden, eine hauptsächlich unstrukturierte aminoterminal Expansion, die α -helikale katalytische Domäne und einen β -Faltblatt- und cysteinreichen carboxyterminalen Bereich.

Basierend auf der hohen Sequenzähnlichkeit der katalytischen Domäne mit Proteinen mit bekannter Struktur wurde mit dem Phyre²-Server (Kap. 2.4.3) ein Homologiemodell erstellt.

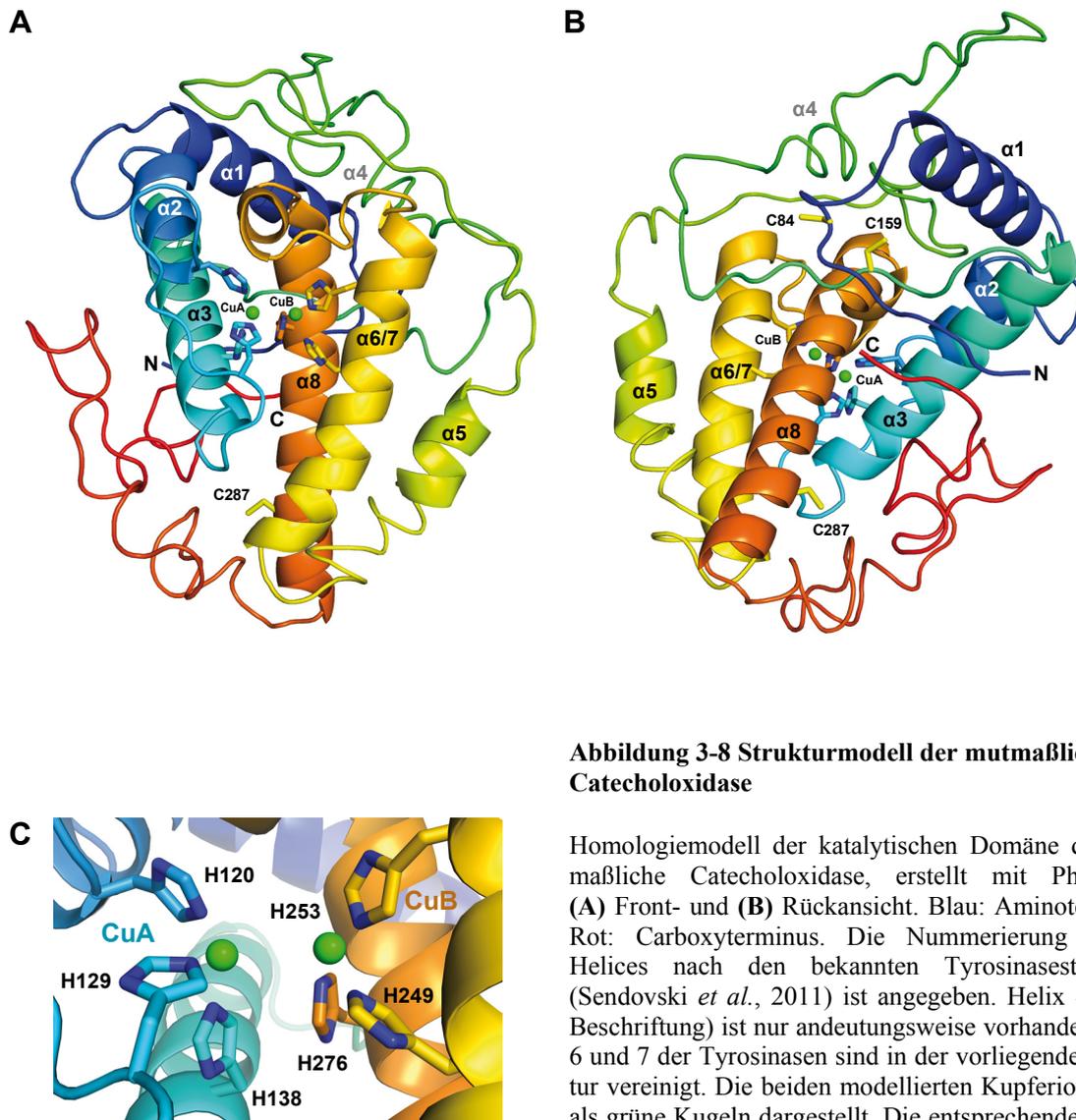


Abbildung 3-8 Strukturmodell der mutmaßlichen Catecholoxidase

Homologiemodell der katalytischen Domäne der mutmaßlichen Catecholoxidase, erstellt mit Phyre² in **(A)** Front- und **(B)** Rückansicht. Blau: Aminoterminal; Rot: Carboxyterminus. Die Nummerierung der α -Helices nach den bekannten Tyrosinasestrukturen (Sendovski *et al.*, 2011) ist angegeben. Helix 4 (graue Beschriftung) ist nur andeutungsweise vorhanden, Helix 6 und 7 der Tyrosinasen sind in der vorliegenden Struktur vereinigt. Die beiden modellierten Kupferionen sind als grüne Kugeln dargestellt. Die entsprechenden an der Kupferbindung beteiligten Histidinreste sowie die drei in der katalytischen Domäne befindlichen Cysteinreste sind in Stäbchendarstellung gezeigt. **(C)** Detailansicht der potenziellen Kupferbindestelle mit Annotation der beteiligten Histidinreste. Die beiden Kupferionen sind als grüne Kugeln dargestellt.

Von der Eingabesequenz (T77-Y338) konnten 260 von 262 Aminosäuren mit maximalem „confidence“-Wert modelliert werden, wobei für das finale Modell die sechs besten Einzelmodelle gewählt wurden. Diese basierten auf den Kristallstrukturen bzw. SCOP-Einträgen der Tyrosinasen aus *Bacillus megaterium* (PDB-ID 3NPY) und *Streptomyces castaneoglobisporus* (PDB-ID 1WX2) sowie den Hämocyaninen aus *Octopus dofleini* (PDB-ID 1JS8) und *Rapana thomasi* (PDB-ID 1LNL). Wie die bekannten Kristallstrukturen, zeigt auch das Homologiemodell ein Ensemble aus α -Helices, deren Positionen sich in allen bekannten Strukturen nahezu decken. Diese Helices sind analog zu den bekannten Strukturen durch zum Teil lange unstrukturierte Schleifen verbunden. Die auch in den Kristallstrukturen relativ schlecht definierte kurze Helix 4 ist im Modell nur andeutungsweise vorhanden. Ferner sind die Helices 6 und 7 der bekannten Tyrosinasen vereinigt, wodurch das Modell an dieser Position eher den Strukturen der Hämocyanine ähnelt (Perbandt *et al.*, 2003).

Die Kupferbindestellen CuA und CuB mit den modellierten Kupferionen zeigen, dass eine Metallbindung molekülgeometrisch möglich wäre, was ebenfalls durch Überlagerungen des erhaltenen Strukturmodells mit verschiedenen Kristallstrukturen bestätigt werden konnte.

Im Modell befinden sich die evolutionär nicht konservierten Cysteinreste 84 und 159 in räumlicher Nähe, wodurch eine Disulfidbrücke zwischen diesen Resten möglich bzw. wahrscheinlich ist. Ein weiteres Cystein (C287) befindet sich an der Domänenoberfläche und könnte somit ebenfalls an einer Disulfidbrücke beteiligt sein.

3.1.3 Proximales Fadenmatrixprotein 1 (PTMP1)

Die cDNA von PTMP1 wurde durch PCR unter Verwendung spezifischer Primer gegen die publizierte PTMP1-Sequenz (Sun *et al.*, 2002) amplifiziert. Die Reaktion resultierte in einer Einzelbande mit einer Größe von ca. 1,4 kb, welche zur Analyse mittels TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T integriert wurde.

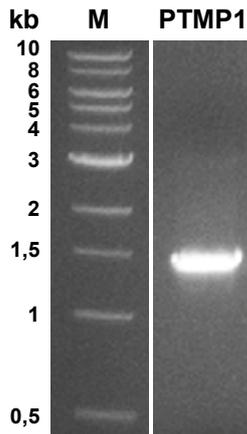


Abbildung 3-9 PCR-Amplifikation der PTMP1-cDNA

Amplifikation der cDNA-Sequenz von PTMP1 mittels Phusion Hot Start DNA-Polymerase und der Primer PTMP1_Nhe_fwd und PTMP1_Eco_rev unter Verwendung von Mfl-1 als Templat. M: 1kb-Marker

Die anschließende Analyse von sechs Einzelklonen lieferte fünf unterschiedliche Sequenzen, welche mit der publizierten PTMP1-Sequenz (UniProt Q8T5C2) verglichen wurden (Abbildung 3-10).

A

Q8T5C2	1	MGHHGVMPYEAVPVSYDPPAVAVEPPPYQPAVDPPPYQPGNTGKDAEECDVQADIIVLFD
PTMP1_1a	1K.....R.....
PTMP1_1b	1KP.....R.....
PTMP1_1c	1KP.....R.....
PTMP1_1d	1KP.....R.....
PTMP1_2	1K-----R.....

B

PTMP1_1a	E10K		Q38R		S328T
PTMP1_1b	E10K	A11P	Q38R		S328T
PTMP1_1c	E10K	A11P	Q38R		S328T G370R
PTMP1_1d	E10K	A11P	Q38R	N218D	S328A
PTMP1_2	E10K		Q38R		S328T

Abbildung 3-10 Vergleich von PTMP1-Isoformen mit der Datenbanksequenz Q8T5C2

(**A**) Ausschnitt eines Sequenzvergleichs von PTMP1-Isoformen (aminoterminaler Bereich), erstellt mit Clustal W mit manueller Korrektur der Lücken anhand eines entsprechenden DNA-Sequenzalignments. Punkte: identische Positionen; Striche: Lücken. (**B**) Übersicht über die detektierten Polymorphismen an Einzelpositionen (Darstellung der Änderungen gegenüber der Datenbanksequenz)

Alle erhaltenen Sequenzen weisen bis auf vereinzelte Positionen auf DNA- und Proteinebene (Abbildung 3-10 B) eine hohe Identität mit der publizierten PTMP1-Sequenz auf. Ferner wurde eine bislang nicht beschriebene Isoform 2 detektiert, deren Sequenz durch eine kurze Deletion (acht Aminosäuren am Aminoterminus) charakterisiert ist (Abbildung 3-10 A), wobei die entsprechende Lücke auch unter Berücksichtigung der entsprechenden DNA-Sequenzen im Alignment nicht eindeutig positioniert werden kann.

Aufgrund detektierter Diskrepanzen bei publizierten Sequenzen von Byssusproteinen (Hagenau, 2011) wurden die Identitäten der publizierten 5'- und 3'-Enden der ORFs bzw. der entsprechenden Amino- und Carboxytermini der resultierenden Proteine für PTMP1 (Sun *et al.*, 2002) untersucht. Dazu wurden die Produkte einer PCR mit jeweils einem PTMP1- und einem vektorspezifischen Primer direkt sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen der nichttranslatierten Regionen zeigten weitere Abweichungen von der publizierten Sequenz (GenBank AY053391) in zwei Basen (siehe Abbildung 3-11), wobei lediglich eine davon in einer Mutation im Signalpeptid resultiert (F→C). Die ORFs der publizierten Sequenz und der in der cDNA-Bank identifizierten Sequenzen sind demnach identisch.

A	AY053391	1	ATCTGACTTCGACC <u>ATGG</u> ACAGGATTGTGACGACGGGATTTTTGTTTTGTTTTGTTTT
	Sequenzierung	G.....
	AY053391	61	ATTATGCAAGCTCTATGGGACATCATGGGGTAATGCCATATGAAGCAGTGCCAGTTTCAT
	Sequenzierung	T.....A.....A.....
B	AY053391	1299	AAAAC TAGCCTGCATGAGTTGTAAACCACGTGCACACAA <u>GAAAGGATCAGGAGCCATTGG</u>
	Sequenzierung	
	AY053391	1359	<u>ATAA</u> AAGTGAGTTCCTAAGATGGCGGATGTATTATTACGGATTATTCCGGATGGACAGAA
	Sequenzierung	
	AY053391	1419	TAAAACATTTATGAAAATTGTAGAAATAAGTAAACTTATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	Sequenzierung	T.....

Abbildung 3-11 Vergleich der Sequenzierung der 5'- und 3'-UTR von PTMP1 mit der Datenbanksequenz AY053391

Vergleich von aus der cDNA-Bank amplifizierten Sequenzteilen von PTMP1 mit der publizierten Sequenz (GenBank AY053391) im Bereich der 5'-UTR (**A**) und 3'-UTR (**B**). Alignment erstellt mit Clustal W und formatiert mit BoxShade (Punkte: identische Positionen). Zur besseren Übersicht sind die UTRs grün markiert, die Signalsequenz ist blau dargestellt sowie die spezifischen Sequenzen der zur Klonierung verwendeten Primer rot. Entsprechende Start- und Stopcodons sind unterstrichen.

3.2 Rekombinante Produktion von Byssusproteinen

3.2.1 Expressionstests in *E. coli*

Um die Möglichkeit der rekombinanten Produktion von PTMP1 sowie der mutmaßlichen Catecholoxidase zu evaluieren, erfolgten Expressionsanalysen beider Proteine. Zur cytosolischen Expression kam dabei ein Standard-T7-System (pET28a(+)-Vektor) zum Einsatz, in das jeweils die entsprechenden cDNAs der Proteine subkloniert wurden¹⁴. Um Expression und die anschließende Reinigung der Proteine zu erleichtern, wurden zudem aminoterminal 6xHis-SUMO-Fusionstags (Malakhov *et al.*, 2004) angefügt. Dazu wurden die entsprechenden Sequenzen per PCR amplifiziert und in den Vektor pET28-SUMO eingebaut. Die jeweilige Verwendung eines aminoterminalen 6xHis-Tags eröffnete ferner Möglichkeiten zur immunchemischen Detektion sowie Reinigung per Affinitätschromatographie.

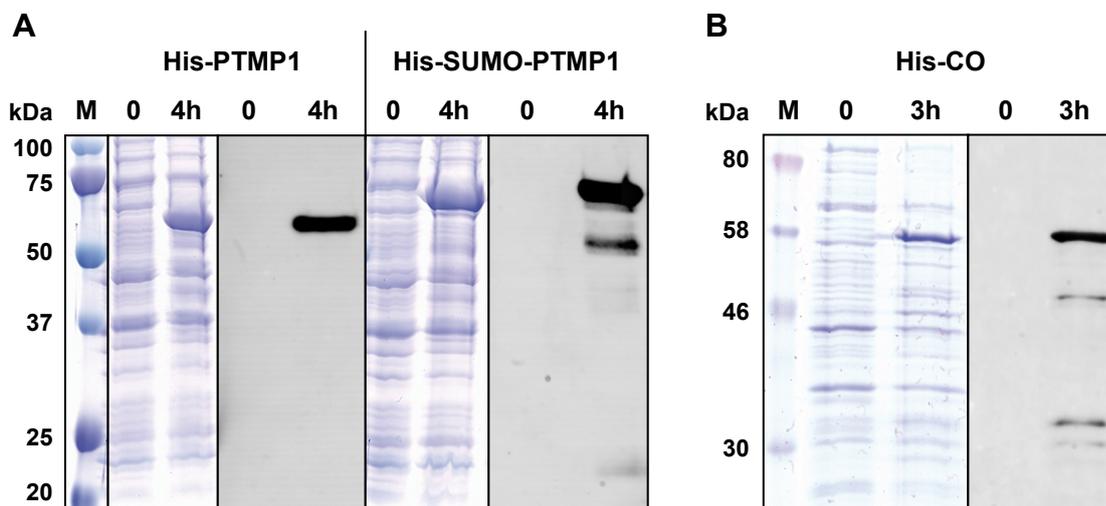


Abbildung 3-12 Expressionstests von Byssusproteinen in *E. coli*

Analyse von Expressionstests in *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)-RIPL per SDS-PAGE- und Anti-His-Tag-Westernblot. (A) PTMP1 als 6xHis- bzw. 6xHis-SUMO-Fusionskonstrukt; (B) mutmaßliche Catecholoxidase als 6xHis-Fusionskonstrukt. Die jeweiligen Expressionsdauern sind angegeben; M: Marker (mit Angabe der jeweiligen Molekulargewichte der Standardproteine)

3.2.2 Catecholoxidase

Die mutmaßliche Catecholoxidase ließ sich in *E. coli* in ausreichenden Mengen produzieren (Abbildung 3-12 B). Dabei resultierte die Expression verschiedener Konstrukte (CO mit

¹⁴ Als prozessierter Aminoterminus der mutmaßlichen Catecholoxidase wurde D22 gewählt, da die zum Zeitpunkt dieser Analysen aktuelle Version des SignalP-Servers (Version 3.0) diese Spaltstelle des Signalpeptids als geringfügig wahrscheinlicher angezeigt hatte.

6xHis-Tag, 6xHis-SUMO-Tag und Tag-freie Variante) in unterschiedlichen Stämmen jedoch stets in unlöslichem Protein in Form bakterieller Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies, IBs)¹⁵. Dabei wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet, jedoch weder die Absenkung der Expressionstemperatur auf 16 °C, die Reduktion der Induktorkonzentration auf 25 µg/L IPTG oder die Anwesenheit des 6xHis-SUMO-Fusionstags zeigten Einfluss auf die Löslichkeit der gebildeten Proteine. Die Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase enthält 16 Cysteinreste, die im nativen Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit in mehreren intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken vorliegen. Da die Bildung nativer Disulfidbrücken in rekombinanten Proteinen im *E. coli*-Expressionssystem aufgrund des eher reduzierenden Milieus im *E. coli*-Cytosol mit Schwierigkeiten verbunden ist, wurde die Expression in der Hefe *Pichia pastoris* getestet. Unter Verwendung entsprechender aminoterminaler Signalsequenzen ist mit diesem Expressionssystem die Sekretion rekombinant produzierter Proteine und somit korrekte Bildung von Disulfidbrücken im endoplasmatischen Retikulum (ER) möglich. Die Sequenz der mutmaßliche Catecholoxidase wurde nach PCR-Amplifikation mit den entsprechenden Primern in den Vektor pPICZαA, welcher für ein aminoterminales Sekretionssignal (α-Faktor (Brake *et al.*, 1984)) codiert, eingebaut und der *P. pastoris*-Stamm X33 mit diesem Konstrukt transformiert. Nach der anschließenden Selektion einzelner Transformanden wurde der Einbau der CO-Sequenz in das Hefegenom per PCR überprüft und bestätigt¹⁶, in anschließenden Expressionstests konnte jedoch die Produktion des Proteins in fünf unterschiedlichen Hefeklonen weder in SDS-PAGE (Coomassie- und Silberfärbung) noch in Immunoblotanalysen (α-His-, α-c-MYC-Antikörper) nachgewiesen werden.

Da die Produktion der mutmaßlichen Catecholoxidase ausschließlich in *E. coli* nachgewiesen werden konnte, wurden größere Mengen der verschiedenen Varianten (6xHis- bzw. 6xHis-SUMO-Fusionsprotein und Tag-freie Variante) per Fed-Batch-Fermentation entsprechend transformierter *E. coli*-BL21CodonPlus(DE3)-RIPL-Zellen hergestellt und anschließend die Inclusion Bodies isoliert. Versuche, mittels milder Extraktion mit verdünnter Essigsäure, Reduktionsmitteln, niedrigen Konzentrationen von Denaturierungsmitteln und/oder Detergenzien Protein aus den Inclusion Bodies zu lösen, erwiesen sich als nicht zielführend¹⁷, weswegen die Proteine vollständig denaturiert wurden (8 M Harnstoff bzw. Guanidiniumhydrochlorid). Mittels Affinitätschromatographie und Kationenaustauschchromatographie wurde das Protein

¹⁵ Die Experimente wurden z. T. im Rahmen der Forschungspraktika von Erik Richter und Philipp Schmid durchgeführt.

¹⁶ mit Unterstützung durch Aniela Heidebrecht

¹⁷ Die Experimente wurden im Rahmen eines Forschungspraktikums von Philipp Schmid durchgeführt.

in denaturiertem Zustand gereinigt (Reinheitsgrad > 90 %, Daten nicht gezeigt)¹⁸. Alle anschließenden Versuche zur Renaturierung des Proteins per Dialyse oder Verdünnung gegen bzw. in unterschiedliche Puffer mit verschiedenen Additiven (Reduktionsmittel, Denaturierungsmittel, Detergenzien, Salze, Arginin, Kupfer(II)-salze etc.) scheiterten jedoch¹⁹.

3.2.3 PTMP1

Für PTMP1 zeigten sich sowohl für das 6xHis-Tag- als auch das 6xHis-SUMO-Fusionskonstrukt starke Expressionslevel, wobei sich der 6xHis-SUMO-Tag positiv auf die Menge an gebildetem Protein auswirkt (Abbildung 3-12 A). Ferner zeigte die Verwendung des Stammes BL21CodonPlus(DE3)-RIPL ebenfalls stärkere Produktion als andere getestete Stämme, bedingt durch dessen zusätzliche Gene für tRNAs von *E. coli* selten verwendeter Codons, welche in eukaryotischen bzw. *M. galloprovincialis*-cDNA-Sequenzen jedoch mit größerer Häufigkeit auftreten. Expressionstests unter verschiedenen Bedingungen (u. a. Verwendung verschiedene Stämme, Reduktion der Induktorkonzentration bis 25 μ M sowie Expression bei niedrigeren Temperaturen (16 °C)) ergaben stets die unlösliche Produktion von PTMP1 in Form von Inclusion Bodies. Da die PTMP1-Sequenz sechs Cysteine enthält, wurde getestet, ob eine Bildung löslichen Proteins im *E. coli*-Periplasma, welches ein oxidierendes Milieu zur Bildung und Chaperon-assistierter Reformierung von Disulfidbrücken besitzt, möglich ist. Dabei kam zusätzlich ein schwächerer und zudem gut titrierbarer Promotor (tet) zum Einsatz. Zunächst wurden die Sequenzen von 6xHis-PTMP1, 6xHis-SUMO-PTMP sowie der jeweiligen C244S/C440S-Mutanten (s. u.) in den Vektor pASK-IBA32 eingebaut (PCR-Amplifikation mit den entsprechenden Primern). Die anschließenden Expressionsanalysen²⁰ zeigten unter keiner der getesteten Bedingungen (u. a. Absenkung der Induktorkonzentration bis auf 10 ng/mL Anhydrotetracyclin bzw. Senkung der Expressionstemperatur auf 16 °C) die Produktion löslichen Proteins im Periplasma an. Ebenso wenig zeigte die Anwesenheit des Helferplasmides pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006), durch welches zusätzliche konstitutiv exprimierte periplasmatische Chaperone bereitgestellt werden, auf die Löslichkeit des gebildeten Proteins eine positive Wirkung. Da somit eine rekombinante Produktion von PTMP1 in löslicher Form nicht möglich war, wurde das Protein aus Inclusion Bodies gereinigt und rückgefaltet.

¹⁸ im Rahmen eines Forschungspraktikums von Erik Richter

¹⁹ im Rahmen der Forschungspraktika von Erik Richter und Philipp Schmid sowie in weiterführenden Arbeiten von Martin Neuenfeldt

²⁰ mit Unterstützung durch Jasmin Wickinghoff

3.3 Reinigung und Rückfaltung von PTMP1

3.3.1 Generierung von PTMP1-Varianten/-Mutanten

Zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung des Matrixproteins PTMP1 erfolgte die Generierung verschiedener Mutanten mittels molekularbiologischer Methoden. Dabei wurden zwei bzw. alle sechs Cysteine von PTMP1 durch Serine ersetzt sowie einige verkürzte Varianten erzeugt, wie die beiden isolierten VWA-Domänen. Eine Übersicht über die PTMP1-Sequenz und die analysierten PTMP1-Varianten ist in Abbildung 3-13 dargestellt, einige sequenzbasierte Charakteristika der Proteine zeigt Tabelle 3-4.

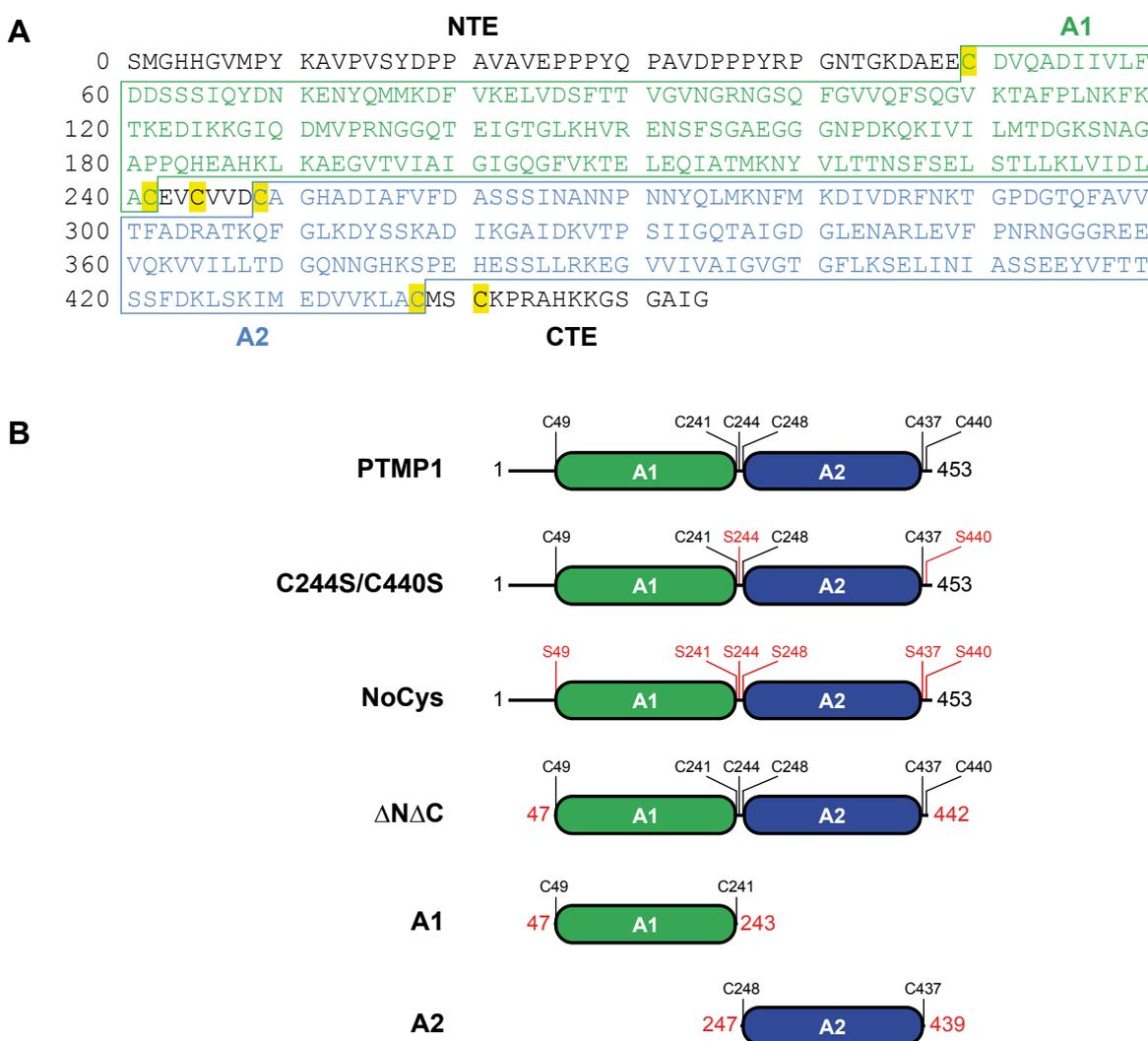


Abbildung 3-13 Übersicht über die PTMP1-Varianten

(A) Sequenz von PTMP1 mit Annotationen. Die beiden VWA-Domänen A1 und A2 sind grün bzw. blau markiert, Cysteine gelb. NTE: aminoterminaler Expansion; CTE: carboxyterminaler Expansion. (B) Schematische Darstellung aller im Rahmen dieser Arbeit analysierter Varianten von PTMP1. Die Abweichungen vom Wildtypprotein sind rot hervorgehoben.

Tabelle 3-4 Charakteristika analysierter PTMP1-Varianten

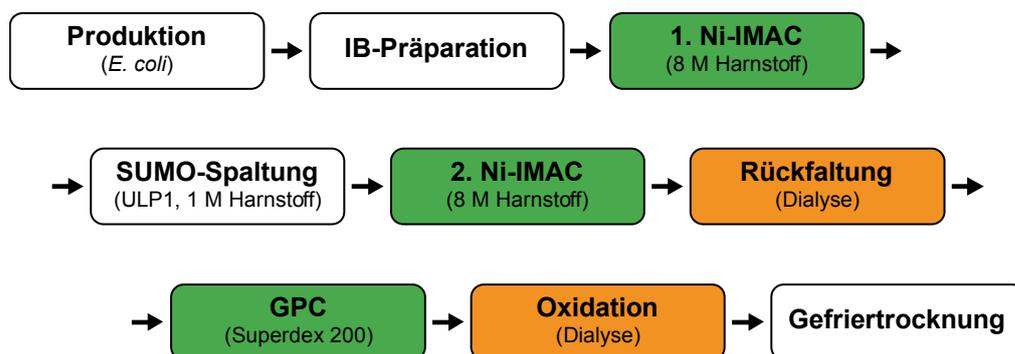
Werte berechnet mit ProtParam. N: Anzahl an Aminosäuren (inkl. zusätzlichem Serin am Aminoterminus).
 M: Molekulargewicht, pI: theoretischer isoelektrischer Punkt, ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient,
 Abs_{0,1} %: Absorption einer 1 mg/mL-Lösung in einer 1 cm-Küvette bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Bezeichnung	N	M (Da)	pI	ϵ_{280} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Abs _{0,1} %
PTMP1	454	48912,4	5,9	15275	0,312
C244S/C440S	454	48880,3	5,9	15150	0,310
NoCys	454	48816,1	5,9	14900	0,305
Δ N Δ C	397	42998,7	5,4	9315	0,217
A1	198	21520,3	5,3	4595	0,214
A2	194	20953,6	5,4	4595	0,219

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PTMP1-Varianten wurden als 6xHis-SUMO-Fusionsproteine (Malakhov *et al.*, 2004) hergestellt und besitzen somit ein artifizielles Serin am Aminoterminus (Bezeichnung S0, Klonierungsrelikt der BamHI-Restriktionsschnittstelle). Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt erst mit dem darauffolgenden Methionin (erste Aminosäure des sekretierten PTMP1).

3.3.2 Produktion, Reinigung und Rückfaltung

Analog zu PTMP1 erfolgten Expressions- und Löslichkeitstests der Varianten als 6xHis-SUMO-Fusionsproteine, wobei in allen Fällen größtenteils unlösliche Proteine gebildet wurden. Aus diesem Grund wurden alle Proteine aus Inclusion Bodies isoliert und in denaturiertem Zustand gereinigt.

**Abbildung 3-14 Schematischer Ablauf der Produktion und Reinigung von PTMP1 und seiner Varianten**

Übersicht über den Ablauf der rekombinanten Produktion und Reinigung der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proteine (für detaillierte Beschreibungen der einzelnen Schritte siehe Text). Chromatographische Schritte sind grün hinterlegt, Dialyseschritte orange.

Die Produktion aller 6xHis-SUMO-Fusionsproteine erfolgte durch Fermentation von mit entsprechenden Vektoren transformierten *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)-RIPL-Zellen in Batch-Kultur (PTMP1, C244S/C440S, NoCys) bzw. in Fed-Batch-Ansätzen (Δ NAC, A1 und A2)²¹. Anschließend wurden die Inclusion Bodies aus den Zellen isoliert. Da sich eine milde Extraktion (analog zur mutmaßlichen Catecholoxidase, s. o.) ebenfalls nicht als zielführend erwies, wurden die Inclusion Bodies in 8 M Harnstoff bzw. 8 M Guanidiniumhydrochlorid gelöst. Es folgte ein Reinigungsschritt mittels Ni-IMAC in Anwesenheit von 8 M Harnstoff und 5 mM DTT. Zur Abspaltung des 6xHis-SUMO-Fusionstags durch die Protease ULP1 wurden die Proteine anschließend gegen einen Puffer mit reduzierter Harnstoff- und Reduktionsmittelkonzentration (1 M Harnstoff/1 mM DTT) dialysiert. Nach der Spaltung erfolgte die Abtrennung nicht gespaltener 6xHis-SUMO-Fusionsproteine, des 6xHis-SUMO-Tags und der 6xHis-ULP1-Protease von den gespaltenen Proteinen durch einen erneuten Ni-IMAC-Chromatographieschritt in Anwesenheit von 8 M Harnstoff und 5 mM DTT. Da sich die Rückfaltung der Proteine durch Verdünnung konzentrierter Lösungen der denaturierten Proteine in Puffern ohne Denaturierungsmittel nicht als zielführend erwies, wurden alle Proteine durch Dialyse rückgefaltet. Diese erfolgte bei Proteinkonzentrationen von ca. 1 mg/mL, zunächst gegen einen Puffer mit reduzierter Harnstoffkonzentration (1 M Harnstoff, 5 mM DTT), anschließend für bis zu 48 Stunden gegen Puffer ohne Denaturierungs- und Reduktionsmittel und bis zu 48 Stunden gegen Lyophilisierungspuffer (10 mM Ammoniumhydrogencarbonat), um einen möglichst hohen Grad an Disulfidverbrückung des Proteins zu erreichen. Nach Lyophilisierung der Proteine wurden diese in GPC-Puffer gelöst und monomere von oligomeren Formen per Gelpermeationschromatographie getrennt. Monomere Proteine wurden zur vollständigen Disulfidverbrückung erneut intensiv (bis zu 120 Stunden) gegen Lyophilisierungspuffer dialysiert. Anschließend wurden alle Proteine aliquotiert und gefriergetrocknet. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte nach jedem Reinigungsschritt per SDS-PAGE und Coomassiefärbung. Die Identität und Integrität aller Proteine konnte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie zweifelsfrei bestätigt werden. Mittels GPC-MALS wurden ferner die Monomeranteile bestimmt bzw. überprüft (s. u.). Alle gefriergetrockneten monomeren Proteine ließen sich ferner problemlos und nahezu vollständig in Wasser oder Puffern lösen.

²¹ z. T. im Rahmen von Forschungspraktika von Stephanie Geißler und Michael Magdeburg

3.4 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von PTMP1

3.4.1 Charakterisierung rückgefalteter PTMP1-Formen

3.4.1.1 Oligomerisierung

Bei der Rückfaltung von PTMP1 und den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Varianten ergaben sich in allen Fällen spezifische Verteilungen monomerer und oligomerer Formen, welche mittels Gelpermeationschromatographie (Superdex 200-Matrix) separiert werden konnten. Für die Volllängenproteine (PTMP1, C244S/C440S, NoCys) konnten ferner zwei monomere Isoformen (M1 und M2) mit unterschiedlichen hydrodynamischem Verhalten detektiert werden. Repräsentative Chromatogramme rückgefalteter Proteine sind in Abbildung 3-15 zusammengestellt.

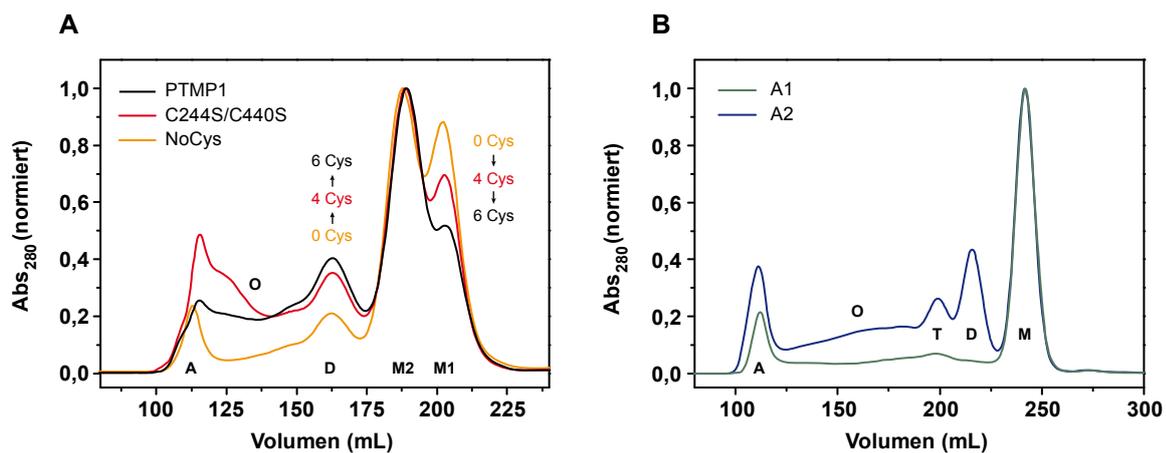


Abbildung 3-15 Gelpermeationschromatographie rückgefalteter PTMP1-Varianten

Chromatogramme präparativer GPC (HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule) einiger gereinigter und rückgefalteter Varianten von PTMP1. **(A)** PTMP1 und Cys→Ser-Varianten. **(B)** Isolierte VWA-Domänen. A: Auschlussvolumen; O: Oligomere; T: Trimer; D: Dimer; M, M1, M2: monomere Formen. Die jeweiligen Absorptionssignale bei 280 nm wurden auf ihr Maximum normiert.

Die einzelnen multimeren Formen konnten anhand ihrer Molekulargewichte mittels GPC-MALS eindeutig identifiziert werden (s. u.). Dabei zeigte sich im Falle der Volllängenproteine eine Abhängigkeit des Dimeranteils (D) sowie der Verteilung der beiden monomeren Isomere (M1, M2) von der Anzahl der in den jeweiligen Proteinen vorhandenen Cysteinreste (siehe Abbildung 3-15), was eine Beteiligung inter- bzw. intramolekularer Disulfidbrücken an der Bildung dieser Formen impliziert. Von den beiden isolierten VWA-Domänen zeigte A1 einen nahezu vollständigen Monomeranteil, wohingegen A2 auch Dimer (D), Trimer (T) und höhere Oligomere (O) aufwies. Alle Chromatogramme zeigen zudem Proteinaggregate im

Ausschlussvolumen (A) der Säule an, welche in allen folgenden Experimenten durch intensive Zentrifugation oder Ultrazentrifugation entfernt wurden.

In analytischen Rückfaltungstests wurde der Einfluss unterschiedlicher Rückfaltungsbedingungen auf die Verteilung oligomerer und monomerer Formen von PTMP1 analysiert, mit dem Ziel, die Monomerausbeuten bei der Proteinreinigung zu erhöhen. Dabei erwiesen sich verschiedenste Additive zu den Rückfaltungspuffern (z. B. Salze, Arginin etc.) als ineffektiv. Ebenso wenig zeigte sich ein signifikanter Einfluss des pH-Wertes der Rückfaltungspuffer, da sowohl Experimente in saurem als auch alkalischem Milieu gleiche Monomer-/Oligomer-Verteilungen ergaben. Die Rückfaltung im Bereich des isoelektrischen Punktes (pI) von PTMP1 (5,9) resultierte hingegen in verstärkter, jedoch interessanterweise nicht quantitativer Aggregation des Proteins. Ein höherer Monomeranteil wurde bei der Rückfaltung in Anwesenheit von Reduktionsmitteln beobachtet, weswegen in der Folge ein reduzierendes Milieu stets bis zur vollständigen Entfernung des Denaturierungsmittels aufrechterhalten wurde. Die Anwesenheit von Oxidationsmitteln oder Redoxsystemen (z. B. reduziertes und oxidiertes Glutathion in molarem Verhältnis von 1:1, 3:1 oder 5:1) wirkte sich dagegen generell kontraproduktiv auf die Monomerausbeuten aus. Grundsätzlich zeigte sich ein starker Einfluss der Proteinkonzentration auf den Oligomeranteil, weswegen präparative Rückfaltungen stets bei möglichst niedrigen Konzentrationen durchgeführt wurden. Die Verteilung der beiden monomeren Isoformen M1 und M2 erwies sich dagegen als unabhängig von der Proteinkonzentration.

Durch Fraktionierung wurden die einzelnen monomeren und oligomeren Formen der Proteine isoliert und nach Gefriertrocknung und Resolubilisierung per analytischer GPC mit Detektion der Molekulargewichte (mittels statischer Lichtstreuung, MALS) analysiert. Auch nach mehrwöchiger Inkubation niedrigkonzentrierter Proteinlösungen (~ 1 mg/mL) auf Eis zeigten die einzelnen Chromatogramme keine signifikanten Veränderungen, sodass ein Gleichgewicht zwischen Monomer und oligomeren Formen bzw. die quantitative Umwandlung zwischen diesen Formen ausgeschlossen werden kann. Bei Konzentrationen von ca. 3 mg/mL konnte in diesem Zeitraum dagegen eine tendenziell verstärkte Bildung oligomerer Formen beobachtet werden, die bei höheren Konzentrationen (~ 8 -10 mg/mL) und Temperaturen (RT) in irreversibler Aggregation von PTMP1 resultierte. Diese verlief dabei jedoch übergangslos ohne signifikante Bildung dimerer oder trimerer Formen. Ergänzend dazu zeigte sich, dass oligomere PTMP1-Formen sich durch Denaturierung und erneute Rückfaltung in Anwesenheit eines Reduktionsmittels nur bedingt bzw. nicht quantitativ in monomeres Protein überführen ließen.

3.4.1.2 Analyse monomerer Proteine mittels GPC-MALS

Die beiden isolierten monomeren Formen der Volllängenproteine PTMP1, C244S/C440S erwiesen sich auch nach der Gefrierdrying und Resolubilisierung als stabil, wohingegen Isomer M1 der cysteinfreien PTMP1-Variante (NoCys) größtenteils in M2 umgewandelt worden war (siehe Abbildung 3-16).

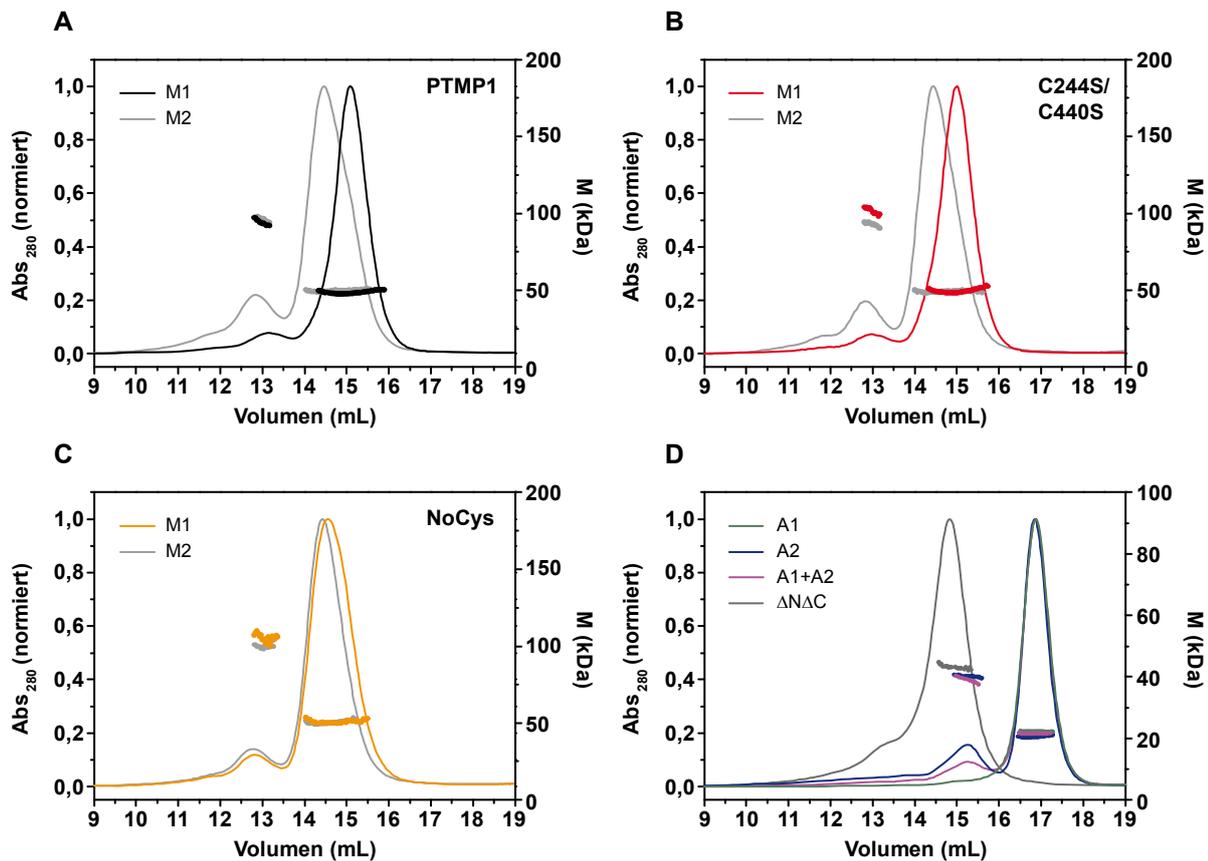


Abbildung 3-16 GPC-MALS-Analysen isolierter monomerer PTMP1-Varianten

Chromatogramme analytischer GPC mit anschließender MALS-Detektion. Monomere Formen (M1, M2) von PTMP1 (A), der Cys→Ser-Mutanten C244S/C440S (B) und NoCys (C) sowie die Deletionsmutante $\Delta N\Delta C$, die isolierten VWA-Domänen von PTMP1 (A1, A2) und eine 1:1-Mischung von A1 und A2 (D). Die Proteine wurden in GPC-Puffer resolubilisiert und mittels Superdex 200 10/300 GL-Säule analysiert. Linke Achse: UV-Absorption bei 280 nm (Linien), normiert auf das jeweilige Signalmaximum; rechte Achse: aus der statischen Lichtstreuung berechnetes Molekulargewicht (Punkte)

Analog dazu lagen die beiden isolierten VWA-Domänen von PTMP1 (A1, A2) und die Deletionsmutante $\Delta N\Delta C$ ebenfalls in monomerer Form vor. Analysen einer 1:1 (mol/mol)-Mischung der beiden isolierten Domänen zeigten keine heterodimere Interaktion (Pendant zur $\Delta N\Delta C$ -Mutante, jedoch ohne kovalente Verbindung) an, weder unmittelbar nach dem Lösen der gefriergetrockneten Proteine (Abbildung 3-16 D) noch nach 14-tägiger Inkubation auf Eis. Alle Proteine mit Ausnahme der isolierten VWA-Domäne A1 zeigten zudem einen geringen

Dimer-Anteil, der auf unvollständige Trennung bei der präparativen GPC zurückgeführt werden kann.

Der Vergleich der Chromatogramme der Vollängenproteine zeigt für die jeweiligen M2-Isomere nahezu identisches hydrodynamisches Laufverhalten (Abbildung 3-17). Die jeweiligen M1-Isomere unterscheiden sich dagegen signifikant, wobei die Isoform M1 von PTMP1, welche sechs Cysteine enthält, die längste Verweilzeit in der Säule aufwies und somit den geringsten hydrodynamischen Radius besitzt.

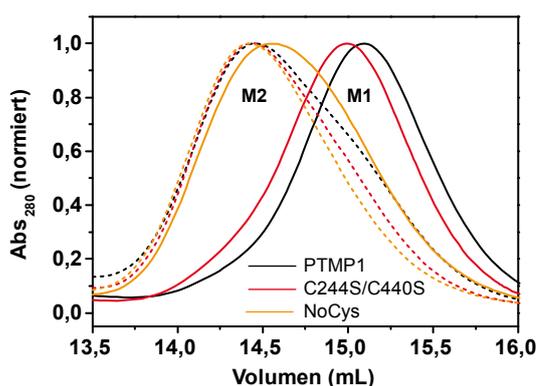


Abbildung 3-17 Vergleich des hydrodynamischen Laufverhaltens monomerer PTMP1-Vollängenvarianten

Überlagerung und Vergrößerung der Chromatogramme monomerer Formen (M1, M2) von PTMP1 und der Cys→Ser-Mutanten C244S/C440S und NoCys aus Abbildung 3-16 (analytische GPC, dargestellt ist die normierte UV-Absorption bei 280 nm). Durchgezogene Linien: Isoform M1; gestrichelte Linien: Isoform M2

Die Lösungen der einzelnen monomeren Proteine (1 mg/mL) wurden für mehrere Wochen auf Eis inkubiert, um eine eventuelle Umwandlung bzw. Gleichgewichte zwischen den Formen zu analysieren. Abbildung 3-18 zeigt die Verteilungen der beiden monomeren Isoformen direkt nach dem Lösen und nach 14-tägiger Inkubation.

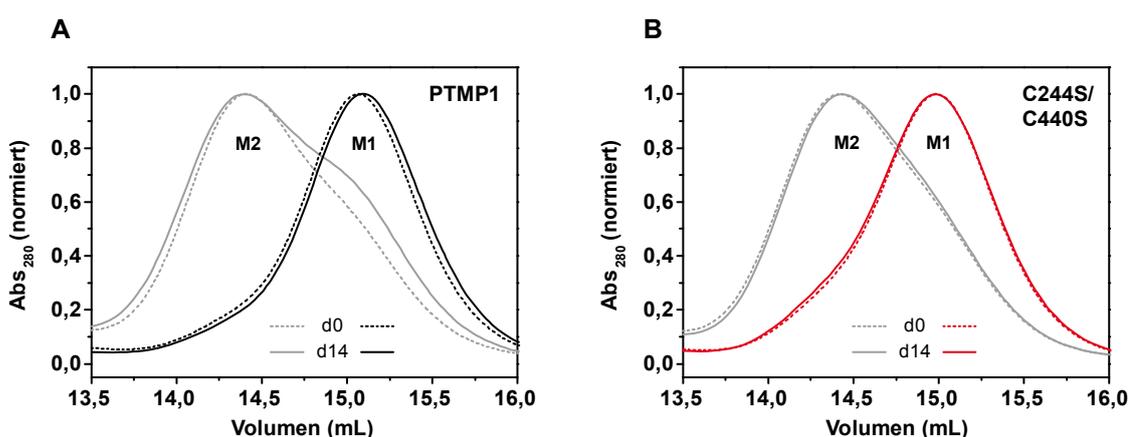


Abbildung 3-18 GPC-Analysen monomerer Isoformen

Chromatogramme analytischer GPC monomerer Formen (M1, M2) von PTMP1 (A) und der Cys→Ser-Mutanten C244S/C440S (B) vor (d0) und nach Inkubation für 14 Tage (d14) in GPC-Puffer. Verwendet wurde eine Superdex 200 10/300 GL-Säule, gezeigt ist die UV-Absorption bei 280 nm, normiert auf das jeweilige Signalmaximum.

PTMP1 wies hierbei eine minimale Tendenz zur Umwandlung von M2 in die etwas kompaktere Isoform M1 auf, wogegen die Umwandlung von M1 nach M2 nicht beobachtet wurde. Für die Mutante C244S/C440S scheinen dagegen beide Isoformen weitestgehend stabil zu sein.

Zur Analyse eines potenziellen Einflusses intramolekularer Disulfidbrücken auf die beobachtete Umwandlung von Isoform M2 in M1 wurden M2-Lösungen in Anwesenheit von Glutathion inkubiert. Dazu wurden die Proben mit 2 mM reduziertem Glutathion (GSH), 1 mM oxidiertem Glutathion (GSSG) oder einer 2:1 (mol/mol)-Mischung von GSH/GSSG versetzt. Nach viertägiger Inkubation auf Eis erfolgte die Dialyse der Proben über mehrere Tage, um Glutathion restlos zu entfernen und eine vollständige Disulfidverbrückung zu erreichen, was durch DTNB-Spaltung (Ellmans Assay) bestätigt werden konnte.

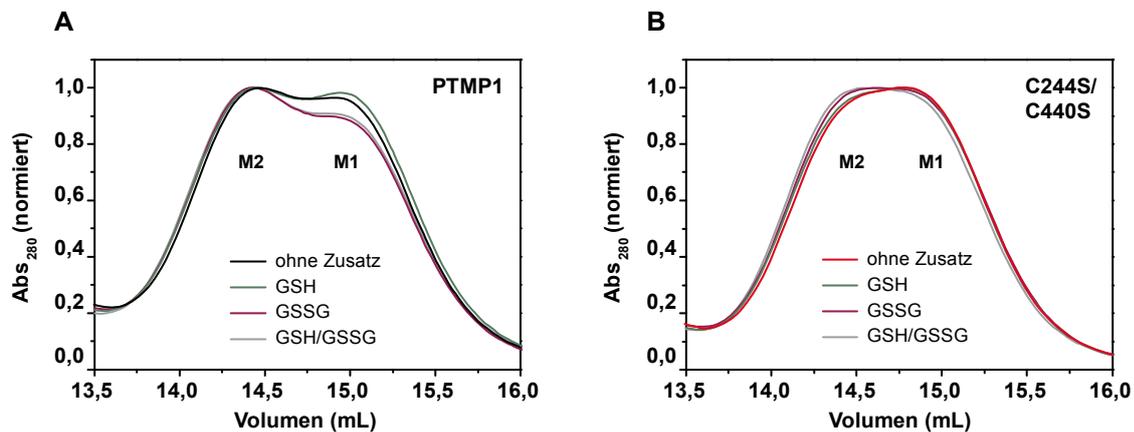


Abbildung 3-19 GPC-Analysen monomerer Isoformen nach Behandlung mit Glutathion

Chromatogramme analytischer GPC (Superdex 200 10/300 GL-Säule, UV-Absorption bei 280 nm, normiert auf das jeweilige Signalmaximum). Analysiert wurden monomere Isoformen (M1, M2) von PTMP1 (A) und der Cys→Ser-Mutante C244S/C440S (B) nach Inkubation in GPC-Puffer ohne und mit Zusätzen von reduziertem bzw. oxidiertem Glutathion und anschließender Dialyse.

Anders als bei Proteinlösungen, welche in abgeschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert worden waren (Abbildung 3-18), zeigte sich bei den dialysierten Proben ohne Zusatz von Reduktionsmittel eine klare Verschiebung von Isoform M2 zu M1 bzw. die Einstellung eines Gleichgewichts beider Isoformen. Die Anwesenheit von Reduktionsmitteln (GSH) wirkte sich dabei positiv auf die Bildung der kompakteren Isoform M1 aus, wohingegen sich die Anwesenheit eines Oxidationsmittels (GSSG) oder eines Redoxsystems (GSH/GSSG) als kontraproduktiv erwies. Analog zu den vorigen Ergebnissen zeigten sich auch diese Effekte für die Mutante C244S/C440S nur marginal.

3.4.1.3 Bestimmung freier Sulphydrylgruppen

Da sich für die Rückfaltung von PTMP1 eine eindeutige Abhängigkeit der Bildung oder Umwandlung verschiedener monomerer Formen von Cysteinresten bzw. intramolekularen Disulfidbrücken in den Proteine zeigte, wurden freie Sulphydryl-(SH)-gruppen in den Proteinen zu bestimmten Zeiten (Inkubation auf Eis) mittels DTNB-Spaltung (Ellmans Assay) detektiert.

Tabelle 3-5 Bestimmung freier Sulphydrylgruppen (SH)

Protein	Anzahl Cysteinreste	SH/Protein Tag 0	SH/Protein Tag 1	SH/Protein Tag 14
PTMP1 (M1)	6	1,5	0,8	0
PTMP1 (M2)	6	2,0	1,4	0
C244S/C440S (M1)	4	1,8	0,4	0
C244S/C440S (M2)	4	2,2	1,3	0
NoCys	0	0		
A1	2	1,0	0,5	0
A2	2	0,6	0,3	0

Für alle Proteine zeigte sich eine zeitabhängige Abnahme durchschnittlicher freier SH-Gruppen pro Proteinmolekül mit vollständiger Oxidation bzw. Disulfidverbrückung spätestens nach 14 Tagen. Um ggf. im Inneren der Proteine verborgene freie Cysteine zu detektieren, wurden die Analysen in Anwesenheit von ~7 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) wiederholt, wobei die erhaltenen Werte den zuvor bestimmten entsprachen. Interessanterweise zeigt der Vergleich von PTMP1 und der Mutante C244S/C440S, dass die beiden Cysteine C244 und C440 bei der Bildung der entsprechenden intramolekularen Disulfidbrücken keine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

3.4.1.4 Massenspektrometrische Analyse der Disulfidverbrückung von Isoform M2

Alle bisherigen Daten deuten auf eine unterschiedliche Disulfidverbrückung der beiden monomeren Isoformen von PTMP1 hin. Während die Lokalisierung der Disulfidbrücken für Isoform M1 mittels Röntgenkristallographie eindeutig geklärt werden konnte (s. u.), gelang dies für Isoform M2 aufgrund fehlgeschlagener Kristallisation nicht. Aus diesem Grund wurde die Disulfidverbrückung dieser Isoform massenspektrometrisch untersucht. Um die in frisch gelösten Proteinen mittels DTNB-Spaltung detektierten freien Cysteine eindeutig zu identifizieren, wurden diese zunächst mit 5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]-naphthalen-1-sulfonsäure (IAEDANS) markiert. Diese Modifikation resultiert in einer Vergrößerung des Molekulargewichts der entsprechenden Reste um 306,35 Da. Als Kontrollen dienten Proben, die nicht mit

IAEDANS versetzt, ansonsten jedoch gleich behandelt wurden. Ferner erfolgte die Analyse nichtreduzierter Proben, um disulfidverbrückte Peptide direkt zu detektieren. Die Proteine wurden mit Trypsin (Tryp), Chymotrypsin (Chy), Asp-N und Glu-C proteolytisch gespalten, wobei Asp-N und Glu-C in der Lage sind, die benachbarten Cysteine im mittleren Teil der PTMP1-Sequenz voneinander zu trennen (siehe Abbildung 3-13 A). Die resultierenden Peptide wurden mittels MALDI-TOF und LC-ESI-MS massenspektrometrisch untersucht, wobei für alle verwendeten Proteasen jeweils eine hohe Sequenzabdeckung detektierter Peptide erreicht werden konnte. Interessanterweise ließen sich dabei nur reduzierte bzw. markierte cysteinenthaltende Peptide detektieren, wohingegen disulfidverbrückte Peptide nicht detektiert werden konnten. Ferner konnten nur für Trypsin-, Chymotrypsin- und Asp-N-verdaute Proteine cysteinenthaltende Peptide identifiziert werden, während entsprechende Peptide aus Glu-C-verdauten Proteinen, u. a. bedingt durch eine unvorteilhafte Verteilung der Spaltstellen in der PTMP1-Sequenz, nicht nachweisbar waren.

Cystein C49

Für das am aminoterminalen Ende der Domäne A1 gelegene C49 konnte mittels MALDI-TOF-MS für beide analysierten Proteine (PTMP1 und C244S/C440S) eine schwache, wenig signifikante IAEDANS-Markierung nachgewiesen werden (Abbildung 3-20). Da zeitgleich mittels LC-ESI-MS mit hoher Signifikanz und Häufigkeit ausschließlich nicht markiertes C49 detektiert wurde, scheint C49 überwiegend in disulfidverbrückter Form vorzuliegen.

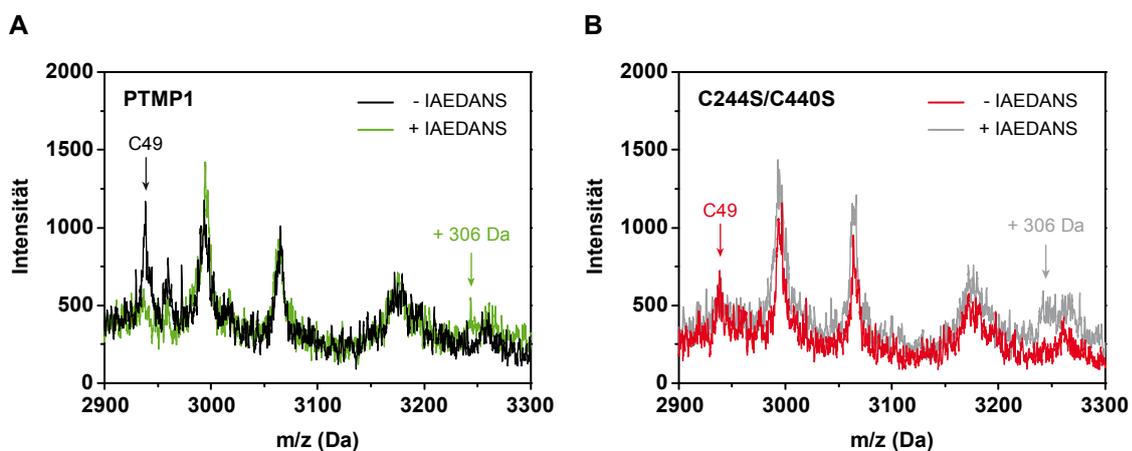


Abbildung 3-20 MALDI-TOF-massenspektrometrische Detektion von C49

MALDI-TOF-Massenspektren Trypsin-verdauter Proteine mit und ohne vorhergehende Markierung freier Cysteine mit IAEDANS. (A) PTMP1. (B) C244S/C440S. Die Positionen der entsprechenden Peptide ($z=1$) sind mit Pfeilen markiert.

Cysteine C241, C244 und C248

Für die im mittleren Teil der PTMP1-Sequenz in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen Cysteine C241, C244 und C248 wurde für PTMP1 mit beiden massenspektrometrischen Methoden eine einfache IAEDANS-Markierung nachgewiesen. Gleichzeitig konnte weder ein zwei- noch ein dreifach markiertes Peptid detektiert werden, was die Beteiligung dieser Reste an Disulfidbrücken indiziert. Da für die Mutante C244S/C440 das entsprechende Peptid keine Markierung aufwies (Abbildung 3-21), lässt sich die detektierte freie SH-Gruppe im Wildtypprotein dem Cysteinrest C244 zuordnen. Ferner ist aufgrund der unmittelbaren Nachbarschaft von C241 und C248 eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Resten wahrscheinlich.

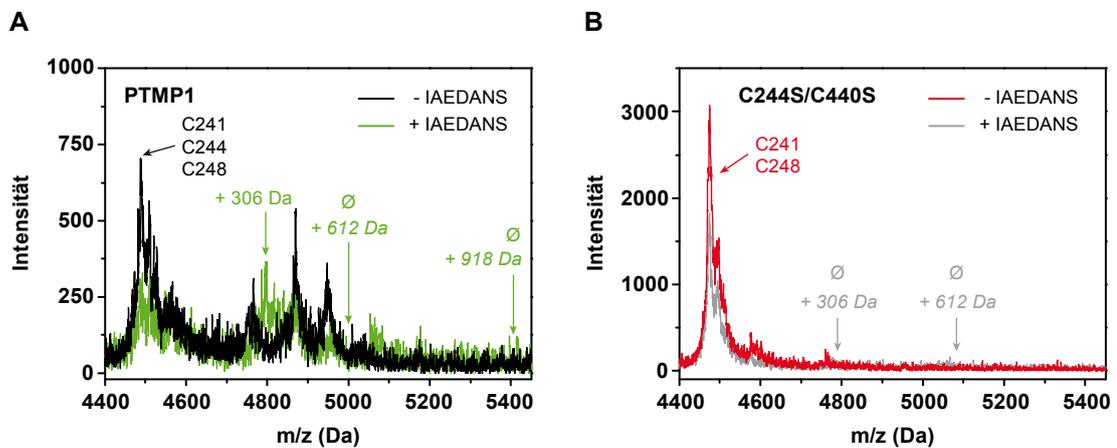


Abbildung 3-21 MALDI-TOF-massenspektrometrische Detektion von C241, C244 und C248

MALDI-TOF-Massenspektren Trypsin-verdauter Proteine mit und ohne vorhergehende Markierung freier Cysteine mit IAEDANS. **(A)** PTMP1. **(B)** C244S/C440S. Die Positionen der entsprechenden Peptide ($z=1$) sind mit Pfeilen markiert (Ø: Kennzeichnung fehlender Peptide).

Cysteine C437 und C440

Die am carboxyterminalen Ende gelegenen Cysteine C437 und C440 wurden sowohl in freier und einfach markierter Form (PTMP1 und C244S/C440S) als auch doppelt markiert (PTMP1) eindeutig nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine eindeutige Tendenz zur vollständigen Markierung der Cysteine. Abbildung 3-22 zeigt exemplarisch die MALDI-TOF-MS-Analyse Asp-N-verdauter Proteine.

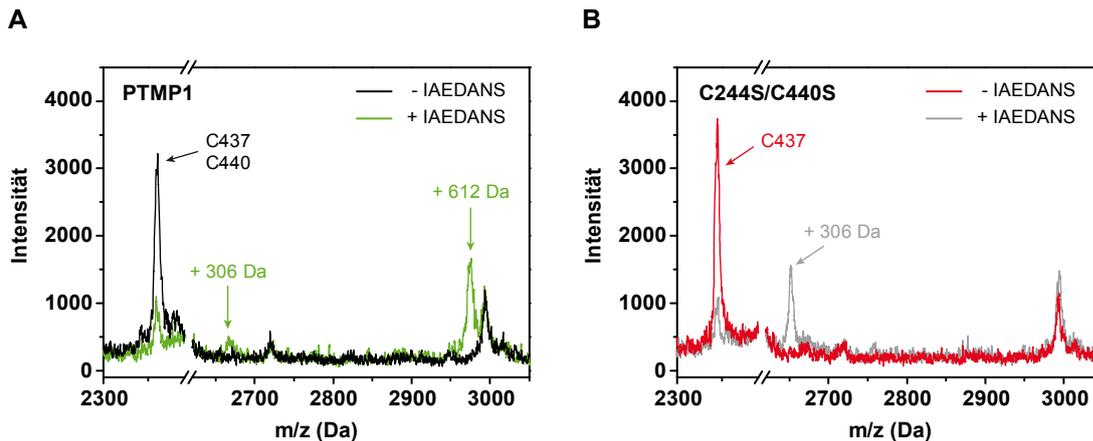


Abbildung 3-22 MALDI-TOF-massenspektrometrische Detektion von C437 und C440

MALDI-TOF-Massenspektren Asp-N-verdauter Proteine mit und ohne vorhergehende Markierung freier Cysteine mit IAEDANS. **(A)** PTMP1. **(B)** C244S/C440S. Die Positionen der entsprechenden Peptide ($z=1$) sind mit Pfeilen markiert. Zur besseren Übersicht wurden Achsenunterbrechungen in den Abszissen eingeführt.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen von Isoform M2 zeigen somit, dass die mittels Ellmans Assay detektieren freien SH-Gruppen (durchschnittlich ~ 2 SH/Proteinmolekül) in erster Linie den Cysteinen C437 und C440 zugeordnet werden können. Weitere wesentlich geringere Beiträge liefern demnach auch C244 und ggf. C49. Das hauptsächliche Unterscheidungsmerkmal der beiden monomeren Isoformen M1 und M2 stellt in diesem Fall jedoch die in M2 detektierten Disulfidbrücke zwischen C241 und C249 dar, die in M1 nicht vorliegt.

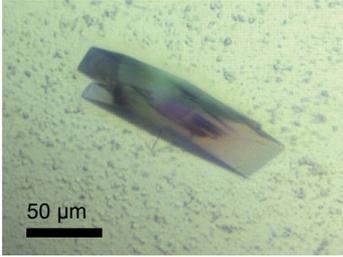
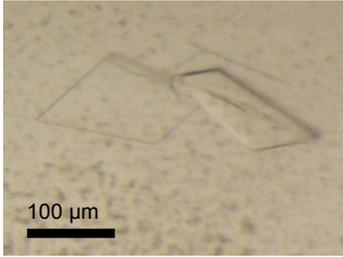
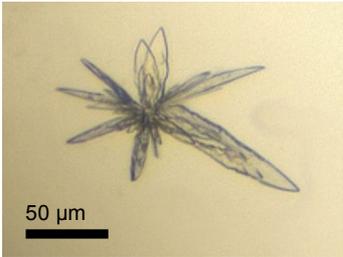
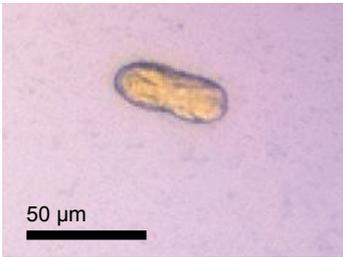
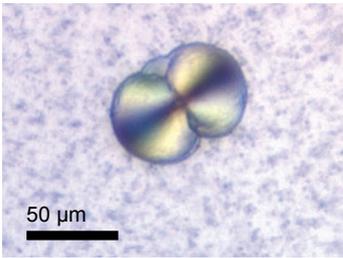
3.4.2 Strukturbestimmung von PTMP1

3.4.2.1 Kristallisation

Um die räumliche Struktur von PTMP1 zu analysieren, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Melanie Gertz, Lehrstuhl für Biochemie (Prof. Dr. Clemens Steegborn), Universität Bayreuth, kristallographische Dampfdiffusionsexperimente mit PTMP1, der Deletionsmutante $\Delta N\Delta C$ sowie den isolierten VWA-Domänen A1 und A2 durchgeführt. Zunächst wurde mittels eines Löslichkeitstests ein geeigneter Konzentrationsbereich von 7,5-8 mg/mL für Kristallisationsansätze ermittelt. Um eine Vielzahl von Kristallisationsbedingungen zu testen, erfolgten Screens mit kommerziell erhältlichen Kristallisationslösungen (JCSGcore Suites I-IV, 4x96 Bedingungen, Qiagen) bei 20 °C. Dabei zeigte sich unter einer der getesteten Bedingung für PTMP1 (Isoform M1) ein einzelner kompakter Kristall, für die Deletionsmutante $\Delta N\Delta C$ unter drei Bedingungen die Bildung stern- bzw. sphärolithförmiger Kristalle (Tabelle 3-6). Für die isolierten VWA-Domänen (A1 und A2) wurden dagegen keine Proteinkristalle detektiert.

Um die detektierten Kristalle zu reproduzieren und zu optimieren, wurden weitere Kristallisations- bzw. Verfeinerungsexperimente durchgeführt. Die Bedingung der sphärolithartigen Kristallform 3 von $\Delta N\Delta C$ wurde dabei in einem Additivscreening verfeinert, der jedoch erneut ausschließlich schnell wachsende sphärolithförmige Kristalle zeigte. Für die kompakte Kristallform 1 von PTMP1 sowie die sternförmige Kristallform 1 und die stäbchen- bzw. sphärolithförmige Kristallform 2 der Deletionsmutante $\Delta N\Delta C$ wurden die Fällungsmittelkonzentration gegen die Konzentration des entsprechenden Salzes variiert. Parallel dazu erfolgte die Variation der pH-Werte gegen die Fällungsmittelkonzentrationen. Die Ansätze erfolgten jeweils in sitzenden und hängenden Tropfen. Während für die Deletionsmutante $\Delta N\Delta C$ in den sitzenden Tropfen ausschließlich die bereits beobachteten Kristallformen erhalten werden konnten, zeigte sich für PTMP1 (Isoform M1) nach ca. acht Tagen die Bildung von bis zu 300-400 μm großen plattenförmigen Kristallen unter nahezu allen getesteten Bedingungen.

Tabelle 3-6 Ergebnisse der Kristallisationsversuche

Protein	Kristallform	Herkunft	Bedingung	Detektion	Abbildung
PTMP1 (M1)	1	JCSGcore Suite I Pos. 81	30 % (w/v) PEG2000-MME 0,2 M Ammoniumsulfat 0,1 M Natriumacetat pH 4,6	Tag 14	
PTMP1 (M1)	2	Optimierung	27-32 % (w/v) PEG2000-MME 0,2 M Ammoniumsulfat 0,1 M Natriumacetat pH 4,6	Tag 8	
Δ N Δ C	1	JCSGcore Suite IV Pos. 69	20 % (w/v) PEG3350 0,2 M Zinkacetat	Tag 1	
Δ N Δ C	2	JCSGcore Suite II Pos. 7	10 % (w/v) PEG6000 1 M Lithiumchlorid 0,1 M Bicin pH9	Tag 2	
Δ N Δ C	3	JCSGcore Suite II Pos. 14	40 % (v/v) PEG400 0,2 M Lithiumsulfat 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	Tag 1	

In hängenden Tropfen konnte dagegen nur ein einziger Kristall der PTMP1-Isoform M1 detektiert werden, welcher zudem erst nach ca. vier Wochen gebildet wurde. Analog dazu zeigten Ansätze bei 4 °C ebenfalls nur minimale bzw. verzögerte Kristallbildung. Versuche, die zweite Isoform von PTMP1 (M2) analog zu M1 unter identischen Bedingungen zu kristallisieren, scheiterten aufgrund vollständiger Präzipitation des Proteins.

3.4.2.2 Datenaufnahme und Strukturlösung

Da die PTMP1-Kristalle für kristallographische Untersuchungen geeignet erschienen, wurden an diesen Röntgenbeugungsmuster aufgenommen. Einzelne PTMP1-Kristalle der Form 2 wurden zuvor jeweils in magnesiumchlorid- bzw. zinkchloridhaltiger Cryo-Lösung inkubiert. Die Messungen erfolgten am BESSY II Elektronenspeicherring des Helmholtz-Zentrums Berlin (Mueller *et al.*, 2012). Abbildung 3-23 zeigt exemplarische Diffraktionsaufnahmen eines PTMP1-Kristalls (Kristallform 2). Dabei ist eine starke Anisotropie der Streuung über den aufgenommenen phi-Winkel zu beobachten (siehe Abbildung 3-23), bedingt durch die plattenförmige Gestalt der Kristalle. Für die flache Kristallseite konnte eine gute Datenqualität erreicht werden, wohingegen sich nach 90 °-Rotation elongierte und verschmierte Reflexe zeigten. Aus diesem Grund mussten einige Diffraktionsbilder zur Sicherung der Datenqualität vernachlässigt werden, was zu relativ hohen R_{merge} und R_{meas} -Werten im Vergleich zur Kristallform 1 führt (siehe Tabelle 3-7).

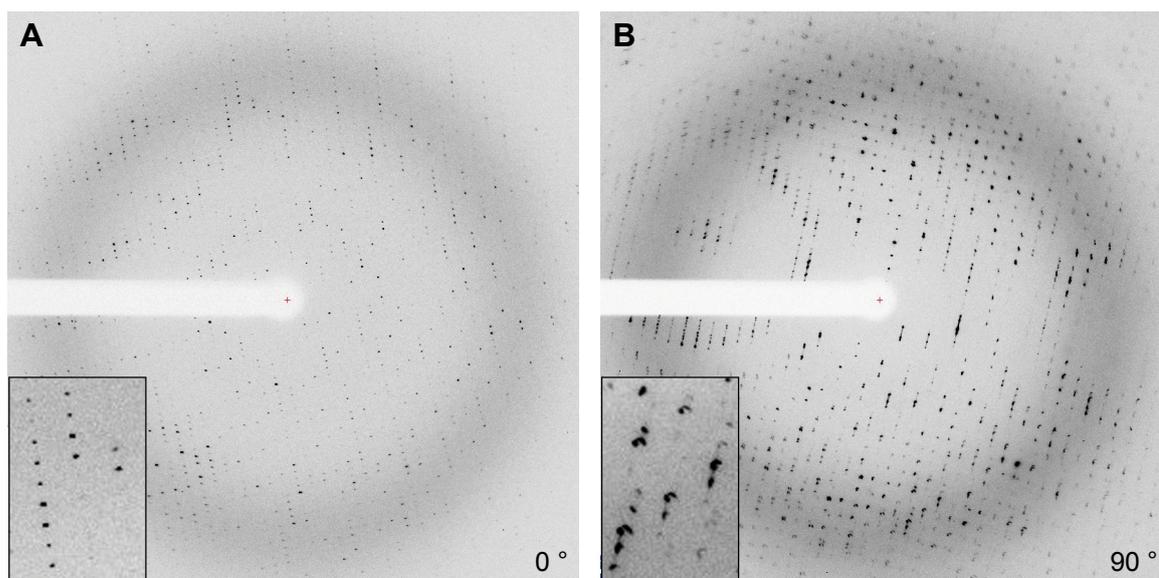


Abbildung 3-23 Diffraktionsdaten von PTMP1-Kristallen

Röntgendiffraktion an einem Kristall von PTMP1 (Kristallform 2) bei einem phi-Winkel von (A) 0 ° und (B) 90 °. Die maximale Auflösung betrug 1,95 Å. Zur Detailansicht wurden jeweils Ausschnitte vergrößert.

Anhand der erhaltenen Diffraktionsdaten wurden von Dr. Melanie Gertz die Strukturen von PTMP1 in Kristallform 1, 2 sowie einem in Anwesenheit von Zinkchlorid inkubierten Kristall gelöst (M. H. Suhre, M. Gertz, C. Steegborn und T. Scheibel bzw. M. H. Suhre, T. Scheibel, C. Steegborn und M. Gertz, *Manuskripte eingereicht*). Die Phasierung erfolgte durch molekularen Ersatz, wobei für beide Domänen manuell separate Homologiemodelle gewählt wurden.

Dabei diene die Struktur der I-Domäne von Integrin $\alpha 2$ (PDB 1AOX) zur Lösung der PTMP1-Domäne A1, die der I-Domäne von Integrin $\alpha 1$ (PDB 1QC5) zur Lösung der Domäne A2. Die einzelnen Strukturmodelle wurden dann als Suchmodelle in einem weiteren molekularen Ersatz eingesetzt, um die vollständige Proteinstruktur zu erhalten. Zunächst wurde die Struktur von PTMP1 in Kristallform 1 durch iterativen Modellbau unter Minimierung der R-Faktoren (R_{work} und R_{free}) gelöst. Anschließend diene diese Struktur als Suchmodell zur Lösung der Struktur in Kristallform 2. In analoger Weise wurden die Datensätze für die metallioneninkubierten Kristalle mit der Struktur der zweiten Kristallform ausgewertet. Dabei zeigten sich für den magnesiumchloridinkubierten Kristall keine Änderungen zum nichtinkubierten. Für den Kristall, welcher mit Zinkchlorid inkubiert worden war, wies die Elektronendichte deutliche Änderungen auf, die die Bindung von Zn^{2+} -Ionen an PTMP1 anzeigten. Da von diesem Kristall der Diffraktionsdatensatz an der Zinkkante aufgenommen worden war, konnte das entsprechende anomale Signal für Zink im Bereich der beobachteten Dichteunterschiede zur Bestätigung einer Bindung von Zn^{2+} -Ionen an PTMP1 herangezogen werden. Statistische Parameter der Datenprozessierung und Strukturlösung von PTMP1 in Kristallform 1 und 2 sowie im zinkchloridinkubierten Kristall sind in Tabelle 3-7 zusammengestellt.

Die Strukturmodelle zeigten insgesamt eine hohe Qualität, indiziert durch die entsprechend niedrigen R-Faktoren und nur geringe Abweichungen vom molekülgeometrischen Optimum (geringe mittlere Abweichungen der Bindungslängen und -winkel) bzw. den optimalen Ramachandranwinkeln. Die beiden morphologisch unterschiedlichen Kristallformen von PTMP1 besitzen unterschiedliche Raumgruppen (monoklin innenzentriertes Kristallgitter (C2) in Kristallform 1 sowie monoklin primitives Kristallgitter mit Schraubenachse (P2₁) in Kristallform 2) und Zellkonstanten mit einem oder zwei PTMP1-Molekülen pro asymmetrischer Einheit. Da die Struktur von PTMP1 aus Kristallform 2 die bessere Auflösung lieferte (1,9 Å), wurde diese als Hauptstruktur definiert.

Tabelle 3-7 Statistik der Datenprozessierung und Modellverfeinerung

Die jeweils in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf die äußerste Auflösungsschale.

	PTMP1 in Kristallform 1	PTMP1 in Kristallform 2	PTMP1 inkubiert mit Zinkchlorid
Raumgruppe	C2	P2 ₁	P2 ₁
Konstanten der Einheitszelle			
a / b / c (Å)	116,5 / 44,5 / 85,9	62,0 / 62,3 / 122,6	61,5 / 63,1 / 122,4
α / β / γ (°)	90 / 105,9 / 90	90 / 102,2 / 90	90 / 101,8 / 90
Auflösung ^a (Å)	56,0-2,45 (2,5-2,45)	55,3-1,95 (2,0-1,95)	43,6-1,9 (2,0-1,9)
unabhängige Reflexe	15438 (696)	63031 (4590)	72516 (10284)
Redundanz	4,1 (3,6)	2,0 (1,7)	4,1 (4,1)
<I/σ>	13,3 (1,7)	5,0 (0,9)	11,0 (1,5)
Vollständigkeit (%)	97,0 (74,6)	94,2 (93,0)	99,9 (99,9)
R _{merge} ^b (%)	10,0 (77,2)	16,7 (84,4)	9,6 (102,7)
R _{meas} ^c (%)	11,5 (90,8)	22,0 (118,3)	11,0 (118,2)
Auflösungsbereich für die Verfeinerung (Å)	30,8 - 2,45	39,0 - 1,95	43,6 - 1,9
Verwendete Reflexe	15437	63024	72507
Proteinmoleküle /-Atome (asymmetrische Einheit)	1 / 3419	2 / 6764	2 / 6903
Zn ²⁺ -Ionen (asymmetrische Einheit)	-	-	4
Lösungsmittelmoleküle (asym. Einheit)	23	22	46
Wassermoleküle (asymmetrische Einheit)	39	333	398
Matthewskoeffizient (Å ³ Da ⁻¹) / Lösungsmittelanteil (%)	2,32 / 47,0	2,38 / 48,3	2,32 / 47,1
Mittlere quadratische Abweichung der Bindungslängen (Å)	0,01	0,01	0,01
Mittlere quadratische Abweichung der Bindungswinkel (°)	0,8	1,0	1,1
Ramachandranverteilung (bevorzugte/erlaubte/verbotene Region) (%)	95,6 / 3,6 / 0,8	96,9 / 2,4 / 0,8	96,8 / 2,1 / 1,1
durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)	41,2	19,7	30,2
Finaler R-Faktor ^d / R _{free} ^e (%)	20,5 / 25,0	21,4 / 25,4	17,3 / 20,8

^a Die Auflösungsgrenze wurde mittels des CC*-Wertes nach einem Modell von Karplus und Diederichs bestimmt (Karplus und Diederichs, 2012).^b $R_{merge} = \frac{\sum(I - \langle I \rangle)}{\sum I}$, wobei I die Intensität einer einzelnen Messung bezeichnet und $\langle I \rangle$ den entsprechenden Durchschnittswert.^c $R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}}$ mit $\hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$ (Diederichs und Karplus, 1997).^d $R - Faktor = \frac{\sum ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$, wobei $|F_{obs}|$ die gemessene und $|F_{calc}|$ die berechnete Strukturfaktoramplitude darstellt.^e R_{free} berechnet aus 5 % der gemessenen Reflexe, welche von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden.

3.4.2.3 Kristallstruktur von PTMP1

Analog zu den chromatographischen Daten liegt PTMP1 auch im Kristall in monomerer Form vor, wobei auch die beiden PTMP1-Moleküle in der kristallinen Einheitszelle bzw. Moleküle in benachbarten Einheitszellen nur geringe Kontakte zueinander aufweisen.

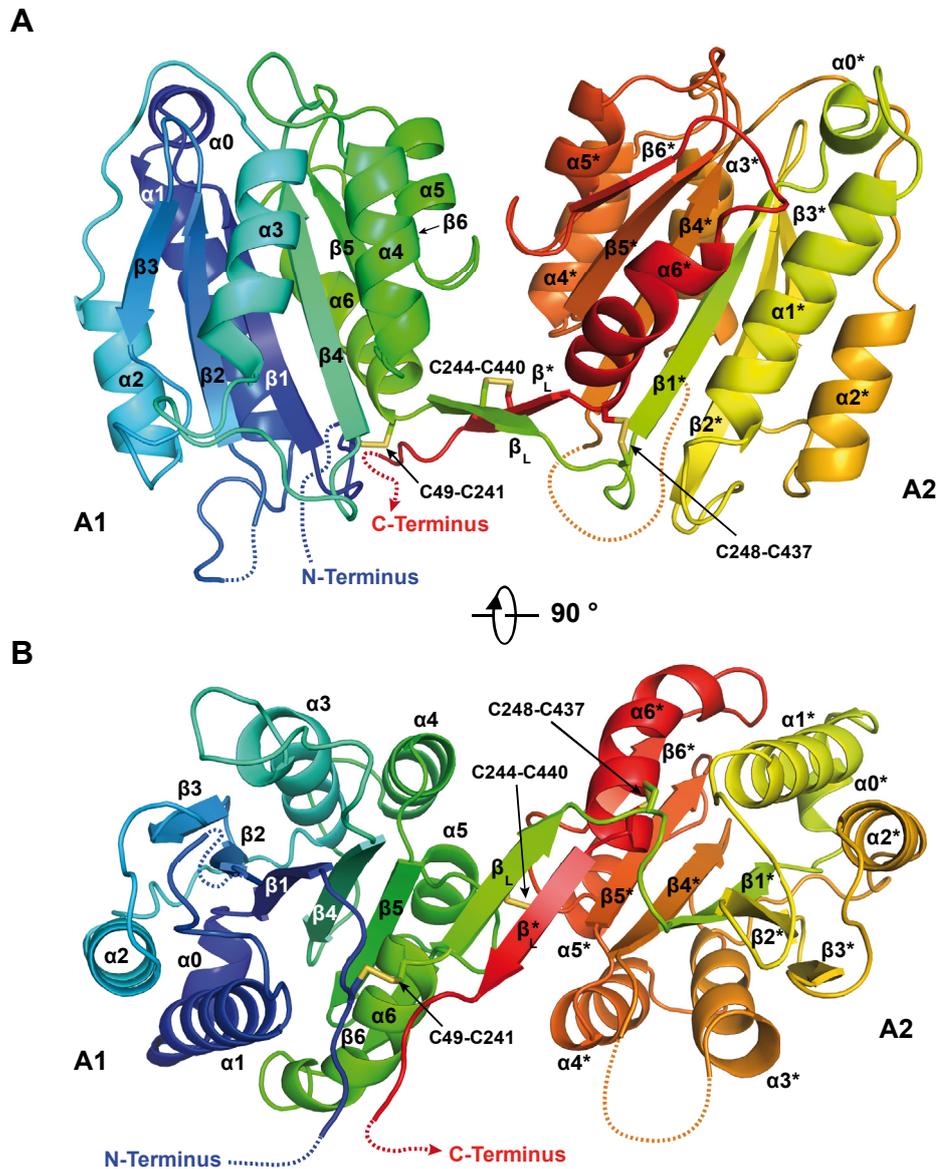


Abbildung 3-24 Kristallstruktur von PTMP1

Darstellung der Kristallstruktur von PTMP1 in (A) Frontansicht und (B) Ansicht von unten. Die Polypeptidkette ist als Cartoon illustriert und von blau (Aminoterminus) nach rot (Carboxyterminus) gefärbt. Nicht aufgelöste Bereiche sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente wurden analog zu publizierten Strukturen nummeriert (siehe Text), wobei die jeweiligen Elemente der Domäne A2 mit „*“ gekennzeichnet sind. Die Disulfidbrücken von PTMP1 sind als Stäbchen dargestellt. Weiterführungen der Polypeptidkette in Richtung Aminoterminus und Carboxyterminus sind angedeutet.

Die Struktur des PTMP1-Monomers zeigt eine „Rücken-an-Rücken“-Anordnung der beiden VWA-Domänen, von denen jede eine kompakte Rossmann-Faltung mit einem innen liegenden β -Faltblatt, umgeben von α -Helices aufweist. Trotz der hohen Qualität der Elektronendichtekarte konnten einige Aminosäuren nicht aufgelöst werden. Diese Teile besitzen offensichtlich eine hohe Flexibilität und umfassen die jeweiligen amino- und carboxyterminalen Expansionen von PTMP1 (S0-D45 bzw. G448-G453) sowie eine Schleife in der Domäne A2 (N351-E358), wobei die nicht aufgelösten Reste für die jeweiligen Strukturen leicht voneinander abwichen. Die Sekundärstrukturelemente wurden analog zu den publizierten homologen Strukturen nummeriert (Emsley *et al.*, 1997; Huizinga *et al.*, 1997; Rich *et al.*, 1999), wobei die der Domäne A2 zur Unterscheidung mit einem Stern markiert wurden. Zwischen Domäne A1 und A2 befindet sich ein rigider Linker, bestehend aus zwei gegenläufigen Strängen, die ein antiparalleles β -Faltblatt mit elf Wasserstoffbrücken bilden. Zusätzliche Stabilisierungen liefern eine Disulfidbrücke zwischen C244 und C440 sowie zwei weitere Disulfidbrücken, welche jeweils die Enden beider Domänen miteinander verbinden (C49-C241 in Domäne A1, C248-C437 in Domäne A2).

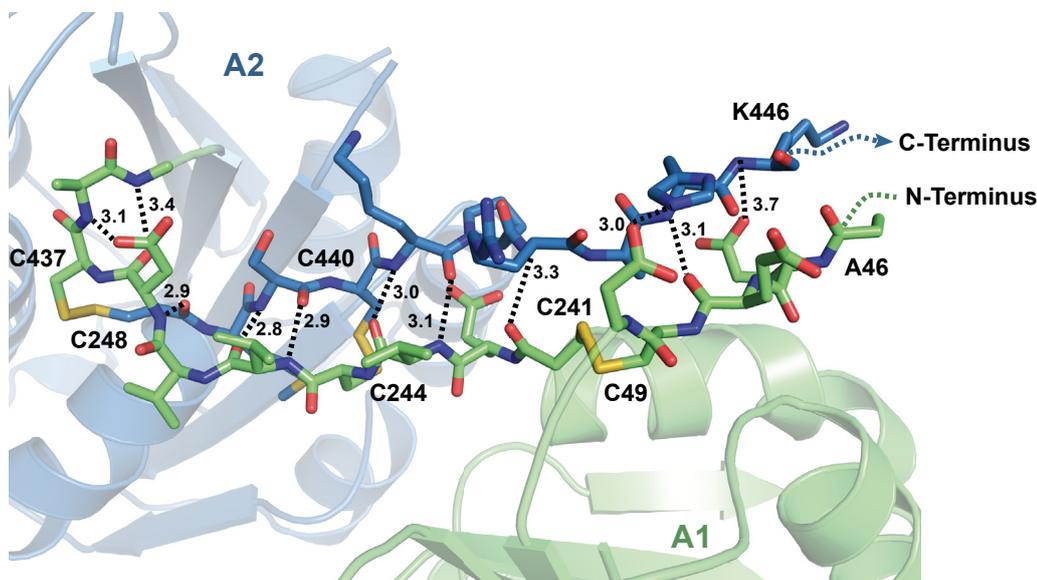


Abbildung 3-25 Detailansicht des Domänenlinkers von PTMP1

Stäbchendarstellung der beiden antiparallelen β -Faltblatt-Stränge des Domänen-Linkers von PTMP1. Disulfidbrücken sind gelb dargestellt, Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien mit Angabe der entsprechenden Distanzen in Å. Weiterführungen der Polypeptidkette Richtung Aminoterminus und Carboxyterminus sind angedeutet.

Abgesehen von diesem Linker weisen die beiden Domänen nur wenige weitere Kontakte auf, die hauptsächlich aus maximal fünf potenziellen Wasserstoffbrücken zwischen Seitenketten und Seitenketten bzw. Seitenketten und dem Peptidrückgrat bestehen (Q212-E413; K217-

S411; K217-I407, -N408 oder -A410; H187-E414; T215-Y415), was dem gesamten Molekül eine relativ offene Gestalt verleiht.

Die Überlagerung der PTMP1-Strukturen aus Kristallform 1 und 2 zeigt trotz gänzlich unterschiedlicher Kristallkontakte eine hohe Identität beider Strukturen (RMSD=0,526 Å), was dem gesamten PTMP1-Molekül bzw. der speziellen Anordnung seiner Domänen trotz fehlender Interdomänenkontakte eine hohe Stabilität attestiert.

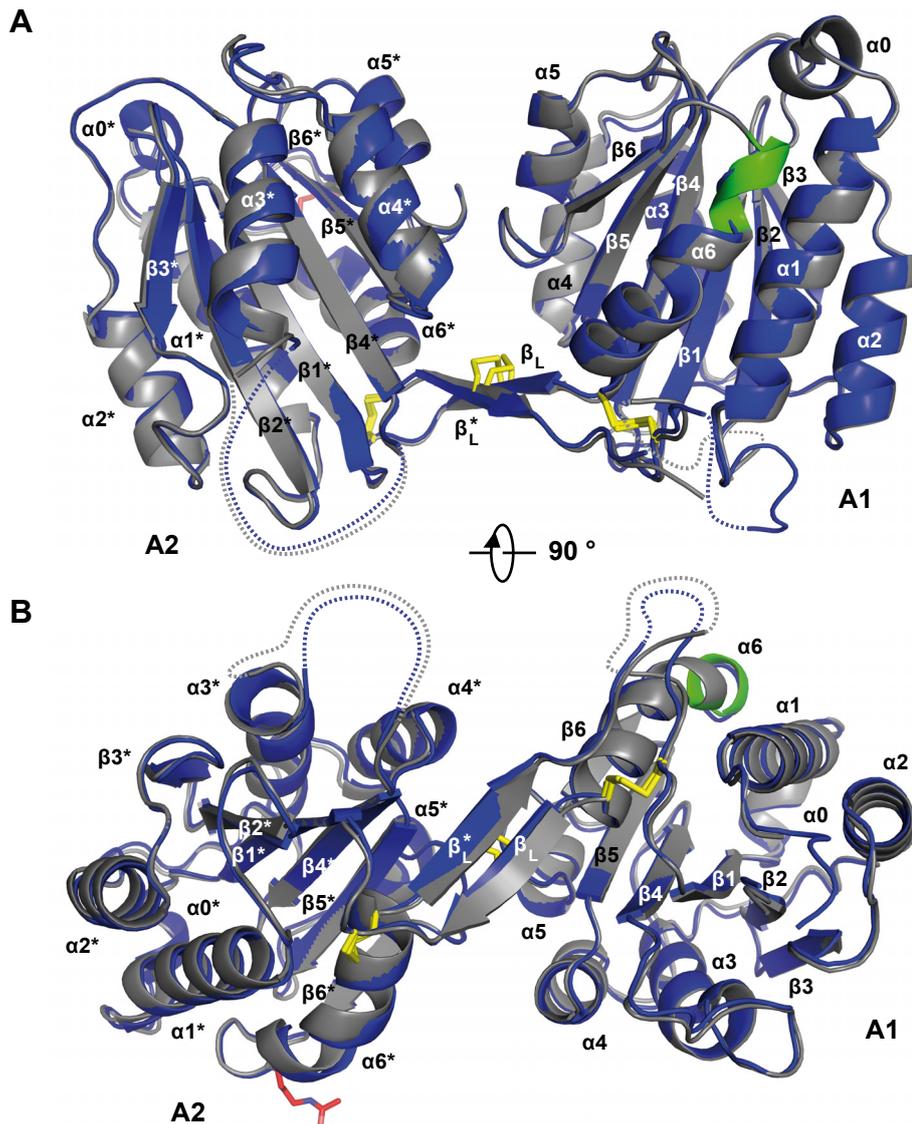


Abbildung 3-26 Vergleich der Strukturen aus unterschiedlichen Kristallformen

Überlagerung der beiden Strukturen von PTMP1 aus unterschiedlichen Kristallen (RMSD=0,526 Å) in (A) Rückansicht und (B) Ansicht von unten. Die Struktur aus Kristallform 1 ist grau dargestellt, die Struktur aus Kristallform 2 blau, Disulfidbrücken zur Übersicht gelb. Die jeweiligen Sekundärstrukturelemente sind angegeben. Unterschiede der beiden Strukturen im Bereich der α 6-Helix sind grün markiert, das in Kristallform 1 detektierte Acetyllysin rot.

Signifikante Unterschiede der beiden Strukturen aus unterschiedlichen Kristallformen finden sich demnach nicht in der Anordnung der Domänen, sondern lediglich in einer einzigen α -Helix (α_6), welche sich zwischen den Kristallformen um drei Aminosäuren (F226-E228) unterscheidet. Ferner besitzt das rekombinant in *E. coli* hergestellte PTMP1 ein acetyliertes Lysin (K424), welches jedoch nur in Kristallform 1 detektiert werden konnte, da dieser Rest hier durch entsprechende Kristallkontakte stabilisiert ist, die in Kristallform 2 fehlen. Analog zur Kristallstruktur wurde dieses Acetyllysin auch mittels LC-ESI-MS detektiert.

Mit APBS wurde das Oberflächenpotenzial von PTMP1 berechnet. Die Moleküloberfläche zeigt Ladungscluster für beide Domänen und den Interdomänenbereich, wobei entsprechend dem theoretischen isoelektrischen Punkt von PTMP1 ($pI = 5,9$) negative Ladungen überwiegen. Im Gegensatz dazu finden sich positive Ladungen eher homogen auf der Oberfläche verteilt.

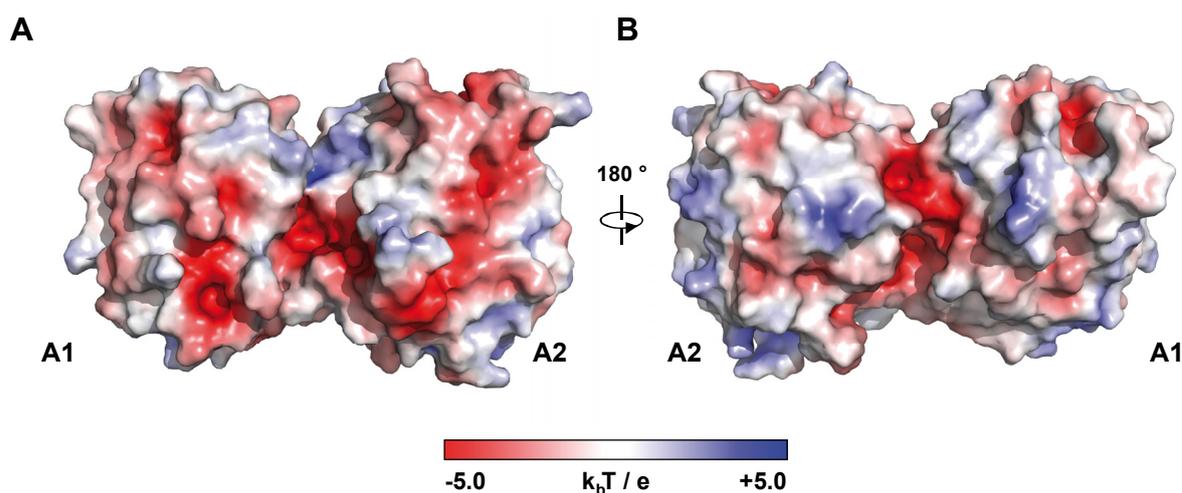


Abbildung 3-27 Oberflächenpotenzial von PTMP1

Molekulare Oberfläche von PTMP1 in (A) Frontansicht und (B) Rückansicht, eingefärbt nach ihrem elektrostatischen Potenzial (rot: negatives Potenzial, blau: positives Potenzial)

Ein Sequenzalignment beider Domänen von PTMP1 zeigt 46 % identische bzw. 60 % ähnliche Aminosäuren (Abbildung 3-28 A). Diese hohe Ähnlichkeit spiegelt sich auch in einer hohen strukturellen Identität wider, die sich bei Überlagerung der Domänen (RMSD=0,588 Å in Kristallform 1, RMSD=0,721 Å in Kristallform 2) zeigt (Abbildung 3-28 B, C). Größere Unterschiede zeigen sich lediglich in der α_1 - β_2 -Schleife, welche in A1 drei Aminosäuren mehr umfasst (G84-N96) sowie der α_3 - β_4 -Schleife, die in der Domäne A2 nicht vollständig aufgelöst werden konnte (s. o.). Ferner führt die bereits erwähnte Verkürzung der α_6 -Helix beider Kristallformen auch zu einem Unterschied zwischen den entsprechenden α_6 - und α_6^* -

Helices der jeweiligen Domänen in Kristallform 2, wohingegen diese in Kristallform 1 identische Längen besitzen.

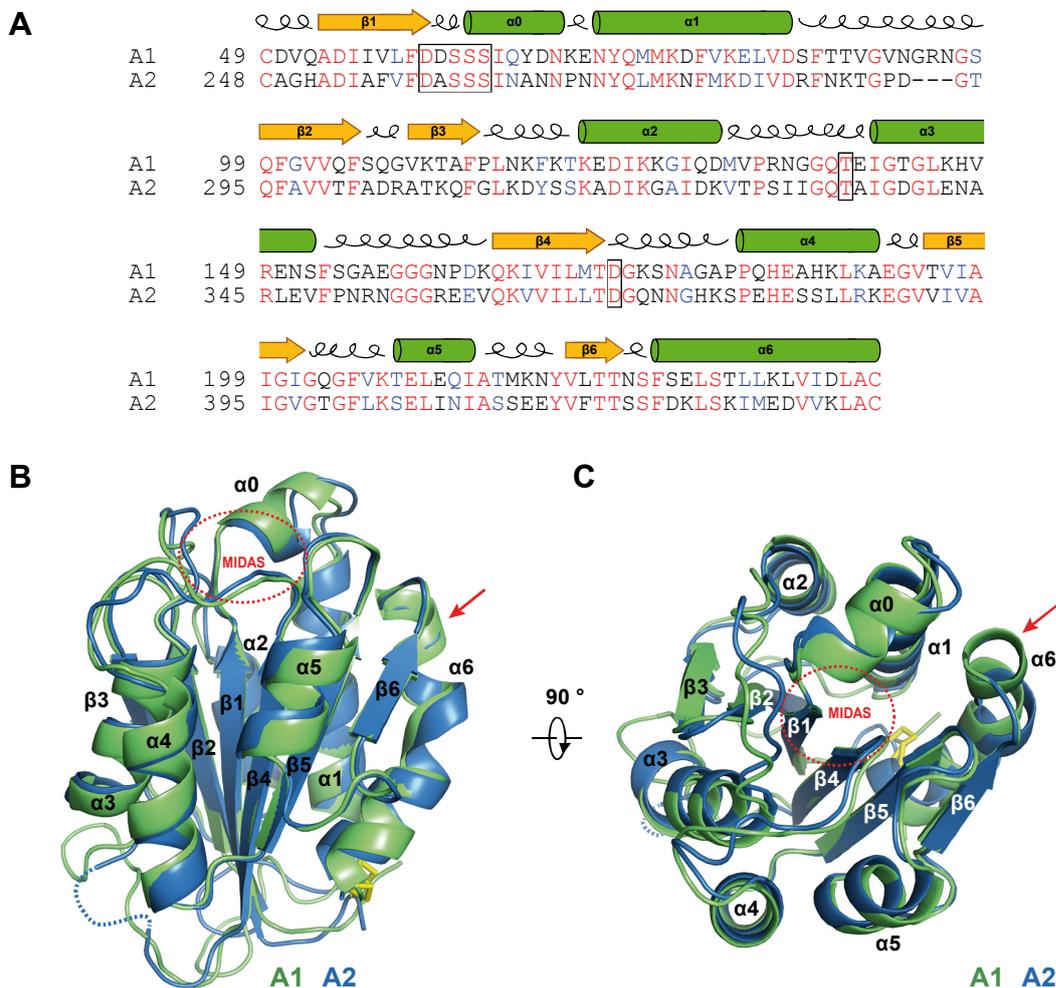


Abbildung 3-28 Vergleich der beiden Domänen von PTMP1

(A) Sequenzalignment der beiden VWA-Domänen (A1 und A2) von PTMP1 mit schematischer Darstellung der Sekundärstrukturen (α -Helices grün, β -Faltblätter gelb, Random Coil bzw. Schleifen spiralförmig). Identische Positionen sind rot markiert, ähnliche Positionen blau. Die Aminosäuren der beiden MIDAS-Sequenzmotive sind eingerahmt. (B) Überlagerung (RMSD=0,751 Å) der Strukturen von A1 (grün) und A2 (blau). Disulfidbrücken sind als gelbe Stäbchen dargestellt. Die Position des MIDAS-Motivs ist angegeben, die Position im Bereich der α 6-Helix, an der sich die beiden Domänen maßgeblich unterscheiden, durch einen Pfeil markiert. (C) Ansicht der überlagerten Strukturen aus (B) von oben

Im zinkchloridinkubierten Kristall wurden pro asymmetrischer Einheit vier gebundene Zn^{2+} -Ionen detektiert, jeweils zwei pro PTMP1-Molekül (siehe Tabelle 3-7), wobei beide Bindestellen im Kristall nicht vollständig besetzt waren. Die erste Bindestelle konnte im Bereich des MIDAS-Motivs in der Domäne A1 detektiert werden (Besetzung ca. 70 %). Das Zn^{2+} -Ion liegt dabei in sechsfacher Koordination vor, unter direkter Beteiligung der Sauerstoffatome von S62, S64 und D173. Die übrigen Koordinationsstellen sind von Wassermolekülen besetzt,

von denen eines durch Koordination der Sauerstoffatome von D60 und T139 stabilisiert ist. Die Bindungslängen zum Zn^{2+} -Ion betragen jeweils 2,1 Å, während die Abstände vom Protein zu den Wassermolekülen 2,7 Å betragen. Im Gegensatz zur Domäne A1 zeigte das MIDAS-Motiv der Domäne A2 weder Elektronendichte noch ein anomales Signal für ein gebundenes Zinkion. Die einzige Übereinstimmung bildet eines der auch in A1 detektierten Wassermoleküle, welches sich in einem Abstand von 2,6 Å vom Sauerstoffatom des S261-Restes befindet. Die zweite Zinkbindestelle (Besetzung ca. 50 %) liegt im Bereich des Domänenlinkers, wobei hier das Ion vierfach koordiniert vorliegt. Die Elektronenpaare stellen hier die beiden Sauerstoffatome von D50 (Bindungslängen 2,0 und 2,2 Å), ein Stickstoffatom von H445 (2,0 Å) sowie ein Wassermolekül (2,1 Å). Da die beiden beteiligten Reste sich in den jeweils gegenläufigen β -Faltblatt-Stränge (β_L , β_L^*) befinden, stabilisiert diese Metallbindung den Domänenlinker zusätzlich.

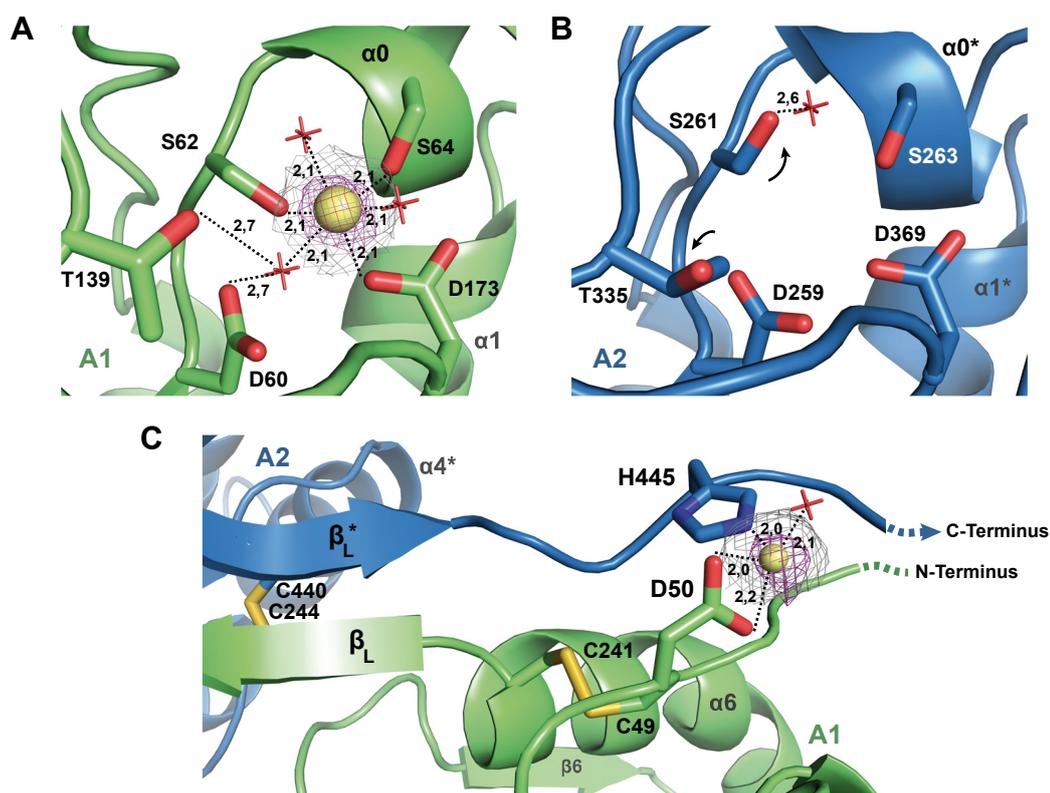


Abbildung 3-29 Metallbindestellen in PTMP1

Dargestellt sind vergrößerte Ausschnitte der PTMP1-Struktur aus einem zinkchloridinkubierten Kristall. **(A)** MIDAS-Motiv der Domäne A1 mit gebundenem Zn^{2+} -Ion. **(B)** MIDAS-Motiv der Domäne A2 mit gebundenem Wassermolekül. Abweichungen von der Struktur der A1-Domäne sind durch Pfeile markiert. **(C)** Zn^{2+} -Bindung im Bereich des Domänenlinkers. Die metallkoordinierenden Seitenketten und Disulfidbrücken sind als Stäbchen dargestellt, Wassermoleküle rot. Die Zn^{2+} -Ionen sind gelb dargestellt, die zugehörige Elektronendichte grau ($2F_o - F_c$ -Dichte, Konturlevel 2,0 σ) bzw. violett (anomale Dichte, Konturlevel (A) 2,5 bzw. (C) 1,0 σ). Die entsprechenden Abstände in Å sind angegeben. Zur Orientierung wurden entsprechende Sekundärstrukturelemente nummeriert.

Trotz einer geringen Sequenzidentität von nur ca. 20-25 % besitzen die PTMP1-Domänen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu bekannten VWA-Domänen wie die I-Domänen der Integrine oder die A-Domänen des Von-Willebrand-Faktors. Die Domänen unterscheiden sich dabei lediglich in den Längen der entsprechenden Sekundärstrukturelemente, insbesondere im carboxyterminalen Teil jeder Domäne. Einen weiteren signifikanten Unterschied zu diesen Strukturen stellt ferner die kurze α_0 -Helix im Bereich der MIDAS-Motive dar, welche weder die I-Domänen noch die A-Domänen des Von-Willebrand-Faktors besitzen und die in weiteren bekannten VWA-Strukturen bislang nur sporadisch beschrieben wurde. Abbildung 3-30 zeigt die Überlagerung der A1-Domäne von PTMP1 mit den publizierten Strukturen der A3-Domäne des humanen Von-Willebrand-Faktors sowie den I-Domänen der Integrinuntereinheiten α_1 und α_2 . Ein entsprechender Sequenzvergleich ist in Abbildung 3-31 dargestellt.

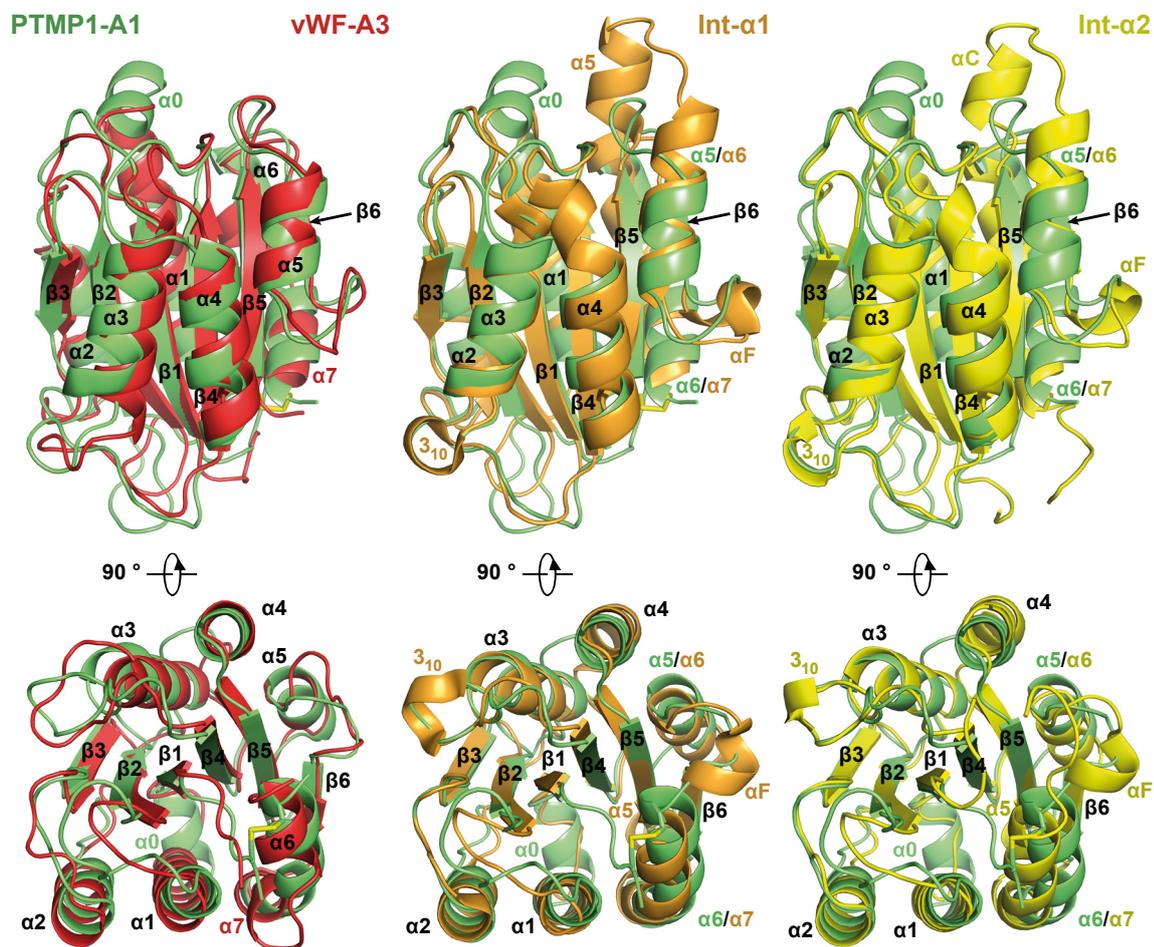


Abbildung 3-30 Vergleich von PTMP1 mit publizierten homologen Strukturen

Überlagerung der Strukturen von PTMP1 (Domäne A1, grün) und der A3-Domäne des humanen Von-Willebrand-Faktors (PDB 1ATZ, rot, RMSD=1,418 Å), der I-Domäne der Integrinuntereinheit α_1 (PDB 1QC5, orange, RMSD=0,769 Å) oder der Integrinuntereinheit α_2 (PDB 1AOX, gelb, RMSD=0,867 Å). Die Sekundärstrukturelemente sind nummeriert, wobei den überlagerten Strukturen gemeinsame Elemente schwarz, nur für einzelne Strukturen zutreffende Bezeichnungen in den jeweiligen Farben dargestellt sind.

			$\beta 1$	$\alpha 0$	$\alpha 1$		$\beta 2$
A1	49	CDVQ	ADIIVLFDDSSSIQYDNKENYQMMKDFVKELVDSFTTVGVNNGRNGSQFGVVQFSQG				
A2	248	CAGH	ADIAFVFDASSINANNPNNYQLMKNFMKDIVDRFNKTGPD---GTQFAVVTFADR				
vWFA3	1686	CSQP	LDVILLLDGSSSFP---ASYFDEMKSFAKAFISKANI-GPR---LTQVSVLQYGS				
$\alpha 1$ -I	167	CSTQ	LDIVIVLDGSNSIYP-----WDSVTAFLNDLLERMDI-GPK---QTQVGIVQYGEN				
$\alpha 2$ -I	169	CPSL	IDVVVVCDESNSIYP-----WDAVKNFLEKQVGLDI-GPT---KTQVGLIQYANN				
			$\beta 3$	$\alpha 2$	$\alpha 3$		$\beta 4$
A1	109	VKTAF	PLNKFKTKEDIKKGIQDMVPRNGGQTEIGTGLKHVRENSFSGAEGGGNPDKQKIV				
A2	305	ATKQF	GLKDYSSKADIKGAIDKVTPSIIIGQTAIGDGLLENARLEVFPNRNGGGREEVQKVV				
vWFA3	1739	TTIDV	PWNVPEKAHLLS-LVDVMQREGGSPQIGDALGFAVRYLTSEMHGARP GASKAVV				
$\alpha 1$ -I	218	VTHEF	NLNKYSSTEEVLVAKKIVQRGGRQTM TALGIDTARKEAFTEARGARRGV-KKVM				
$\alpha 2$ -I	220	PRVVF	NLNTYKTKEEMIVATSQTSQYGGDLTNTFGAIQYARKYAYS AASGGRRSA-TKVM				
			$\alpha 4$	$\beta 5$	$(\alpha C/\alpha 5)$	$\alpha 5 (\alpha 6)$	(αF)
A1	169	ILMT	DGKSNAGAPPQHEAHKLKAEGVTVIAIGIGQGFVK-----TELEQIATMKN-				
A2	365	ILLT	DGQNNGHKSPEHESSLRKEGVVIVAIGVGTGFLKK-----SELINIASSEE-				
vWFA3	1798	ILVTD	VSVD---VDAADAARSNRVTVFPIGIGDRYD-----AAQLRILAGPAGD				
$\alpha 1$ -I	277	VIVT	DGESHDNHRLLKQVQDCEDENIQRFSAIILGSYNRGNLSTEFKVEEIKSIASEPTE				
$\alpha 2$ -I	279	VVVT	DGESHDGSMKKAVIDQCNHDNILRFGI AVLGYLNRNALDTKNLIKEIKAIASIPTE				
			$\beta 6$	$\alpha 6 (\alpha 7)$	$(\alpha 7)$		
A1	219	-YVLT	TNSFSELSTL----LKLVIDLAC				
A2	415	-YVFT	TSSFDKLSKI----MEDVVKLAC				
vWFA3	1846	SNVVKL	QRIEDLPTMV-TLGNSFLHKLC				
$\alpha 1$ -I	337	KHFFNV	SDELALVTIVKTLGERIFALEA				
$\alpha 2$ -I	339	RYFFNV	SDEAALLEKAGTLGEQIFSIEG				

Abbildung 3-31 Sequenzvergleich der VWA-Domänen von PTMP1, Von-Willebrand-Faktor und Integrinen

Alignment der beiden Domänen von PTMP1 mit der Sequenz der A3-Domäne des humanen Von-Willebrand-Faktors (UniProt P04275) und den I-Domänen der Integrinuntereinheiten $\alpha 1$ (UniProt P56199) und $\alpha 2$ (UniProt P17301). Das Alignment wurde mit Clustal Omega erstellt, wobei die Lücken bezüglich der Sekundärstrukturelemente manuell korrigiert wurden. Die entsprechenden Elemente sind grün (α - bzw. 3_{10} -Helices) bzw. rötlich (β -Faltblätter) markiert. Ausschließlich den Integrinen zugeordnete Nummerierungen sind in Klammern dargestellt, dabei sind nur die PTMP1 betreffenden Elemente fett gedruckt, die vWF-A3-Domäne betreffende in normaler, die Integrine betreffenden in kursiver Schreibweise.

3.4.3 Strukturelle Unterschiede monomerer PTMP1-Isoformen

Da die Struktur der monomeren Isoform M1 von PTMP1 mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt werden konnte, die der Isoform M2 jedoch nicht, wurden vergleichende spektroskopische Analysen dieser beiden Proteine durchgeführt. Sowohl mittels CD- als auch FT-IR-Spektroskopie ließen sich Unterschiede in den jeweiligen Spektren beider monomeren Isoformen detektieren.

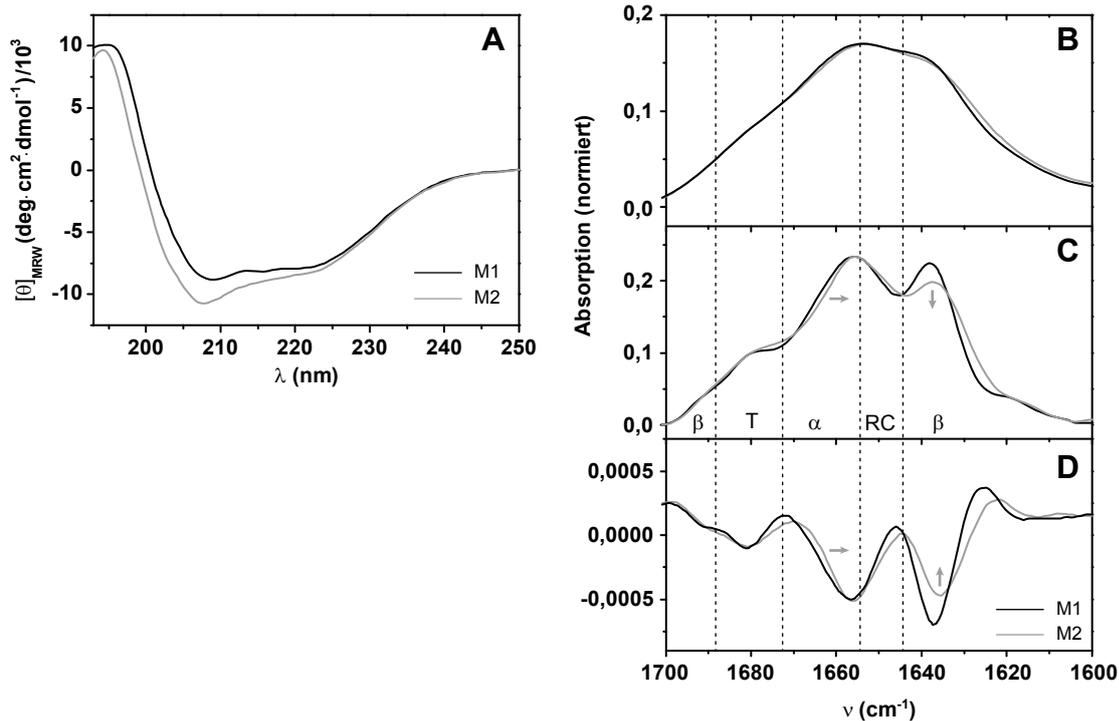


Abbildung 3-32 Strukturelle Unterschiede monomerer PTMP1-Isoformen

Sekundärstrukturanalysen der monomeren Isoformen M1 und M2. **(A)** Fern-UV-CD-Spektren der beiden Isoformen. **(B)** Ausschnitt aus FT-IR-Absorptionsspektren der beiden Isoformen (Amid-I-Bande). **(C)** Fourierselbstentfaltete Spektren. **(D)** Zweite Ableitung der FT-IR-Spektren aus (B). Die Zuordnungen der Sekundärstrukturelemente zu den Signalen (Dong *et al.*, 1990) sind angegeben (α : α -Helices; β : β -Faltblätter; RC: Random Coil; T: Schleifen/Turns). Signalverschiebungen zwischen Isoform M1 und M2 sind durch Pfeile angedeutet.

Das CD-Spektrum (Abbildung 3-32 A) zeigt für M1 im Vergleich zu M2 eine Signalreduktion im Bereich von 208 nm, welche ein charakteristisches Minimum α -helikaler Strukturen darstellt. Eine Signalabnahme in diesem Bereich könnte somit einer Reduzierung des α -helikalen Anteils in der Isoform M1 zugunsten anderer Sekundärstrukturen (β -Faltblätter bzw. Random Coil) entsprechen. Die Tatsache, dass die Signale im Bereich von 195 nm nahezu identisch sind, spricht in diesem Zusammenhang eher für einen erhöhten β -Faltblatt-Anteil in M1 als einem höheren Anteil an unstrukturierten Random Coil-Strukturen (welcher eine signifikante Signalreduktion bei 195 nm zur Folge hätte). Vorhersagen der Sekundärstrukturen aus den CD-Spektren mittels verschiedener Algorithmen (CDNN, K2D3, SELCON3, CONTIN, CDSSTR) zeigten mit hoher Konsistenz ebenfalls für die Isoform M1 einen signifikant erhöhten (~ 2 -3 %) Anteil an β -Faltblatt-Strukturen an. Dabei zeigten die mit allen Algorithmen berechneten Sekundärstrukturverteilungen generell gute Übereinstimmung mit den aus der Kristallstruktur ermittelten Werten von 31,3 % α -Helices, 19,6 % β -Faltblättern und 49,1 % Schleifen/Random Coil.

Die FT-IR-Spektren der beiden monomeren Isoformen (insbesondere nach Fourierselbstentfaltung bzw. Ableitung, Abbildung 3-32 C, D) weisen ebenfalls Unterschiede auf. Dabei besitzt Isoform M2 ein geringeres bzw. verändertes Signal von β -Faltblattanteilen gegenüber Isoform M1. Gleichzeitig zeigt die Überlagerungsbande für α -Helices und Random Coil-Anteile eine leichte Verschiebung zu einer niedrigeren Wellenzahl, was einen höheren Beitrag von Random Coil-Anteil zu dieser Bande anzeigt. Analog dazu lieferte die Angleichung der fourierselbstentfalteten Amid-I-Banden mit entsprechenden Gaußverteilungen und die Quantifizierung der entsprechenden Anteile aus den Kurvenintegralen für Isoform M2 einen geringeren β -Faltblatt-Anteil als für Isoform M1.

Tabelle 3-8 Errechnete Sekundärstrukturanteile nach Fourierselbstentfaltung der Amid-I-Banden monomerer PTMP1-Isoformen

Sekundärstrukturelement	M1	M2
α -Helices/Random Coil	56,3 %	64,3 %
β -Faltblätter	30,5 %	23,2 %
Schleifen	13,2 %	12,5 %

3.4.4 Strukturelle Stabilität von PTMP1

Zur Analyse der strukturellen Stabilität von PTMP1 wurde die Entfaltung des Proteins und seiner Varianten bei steigenden Temperaturen sowie in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Denaturierungsmittels Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie analysiert.

3.4.4.1 Thermische Stabilität

Thermische Schmelzkurven wurden für die Proteine PTMP1, C244S/C440S, NoCys, Δ N Δ C und die isolierten PTMP1-Domänen A1 und A2 aufgezeichnet. Optional wurden Proteine, welche Cysteine bzw. Disulfidbrücken enthielten, durch TCEP reduziert. Ferner erfolgten Analysen sowohl im alkalischen (pH 8) als auch im sauren (pH 4) Milieu. Abbildung 3-33 zeigt die Spektren und Übergänge von PTMP1 in oxidiertem Form bei pH 8.

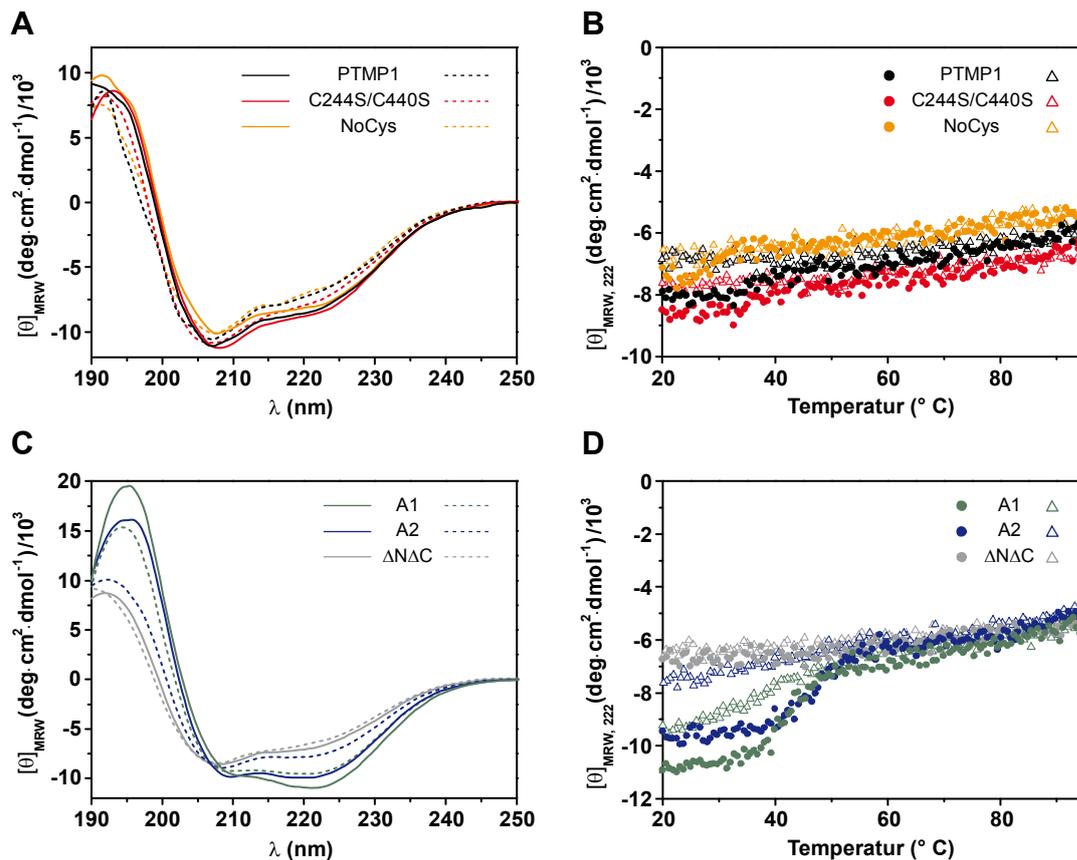


Abbildung 3-33 Analyse der thermischen Stabilität von PTMP1 und den Varianten bei pH 8

(A) Fern-UV-CD-Spektren von PTMP1, C244S/C440S und NoCys vor (glatte Linien) und nach (gestrichelte Linien) dem Erhitzen auf 95 °C. (B) Thermoübergänge von PTMP1, C244S/C440S und NoCys, dargestellt durch das CD-Signal bei 222 nm. Punkte: Aufheizen, Dreiecke: Abkühlen. (C) Fern-UV-CD-Spektren von A1, A2 und $\Delta N\Delta C$ vor (glatte Linien) und (gestrichelte Linien) nach dem Erhitzen auf 95 °C. (D) Thermoübergänge von A1, A2 und $\Delta N\Delta C$, dargestellt durch das CD-Signal bei 222 nm. Punkte: Aufheizen, Dreiecke: Abkühlen. Alle Experimente wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, durchgeführt.

Unter alkalischen Bedingungen (pH 8) wies PTMP1 generell eine hohe Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung auf, da in den entsprechenden Übergängen bzw. Fern-UV-CD-Spektren vor und nach dem Erhitzen nur marginale Änderungen detektiert werden konnten (Abbildung 3-33 A, B). Darüber hinaus zeigte PTMP1 unter diesen Bedingungen auch beim mehrfachen Erhitzen sowie bei Inkubation für mehrere Stunden bei hohen Temperaturen (>95 °C) keine Aggregation bzw. Entfaltung. Chromatographische Analysen erhitzter PTMP1-Lösungen mittels GPC zeigten ferner keinerlei Bildung oligomerer PTMP1-Formen oder andere Veränderungen im chromatographischen Laufverhalten des Proteins an. Der Einfluss von Disulfidbrücken auf die beobachtete thermische Stabilität wurde mittels der PTMP1-Varianten mit Cystein-zu-Serin-Austauschen (C244S/C440S bzw. NoCys) sowie durch Reduktion der entsprechenden Proteine durch Zugabe von 1 mM TCEP analysiert.

Auch hier zeigten die entsprechenden Übergänge keine Entfaltung der Proteine (Abbildung 3-34).

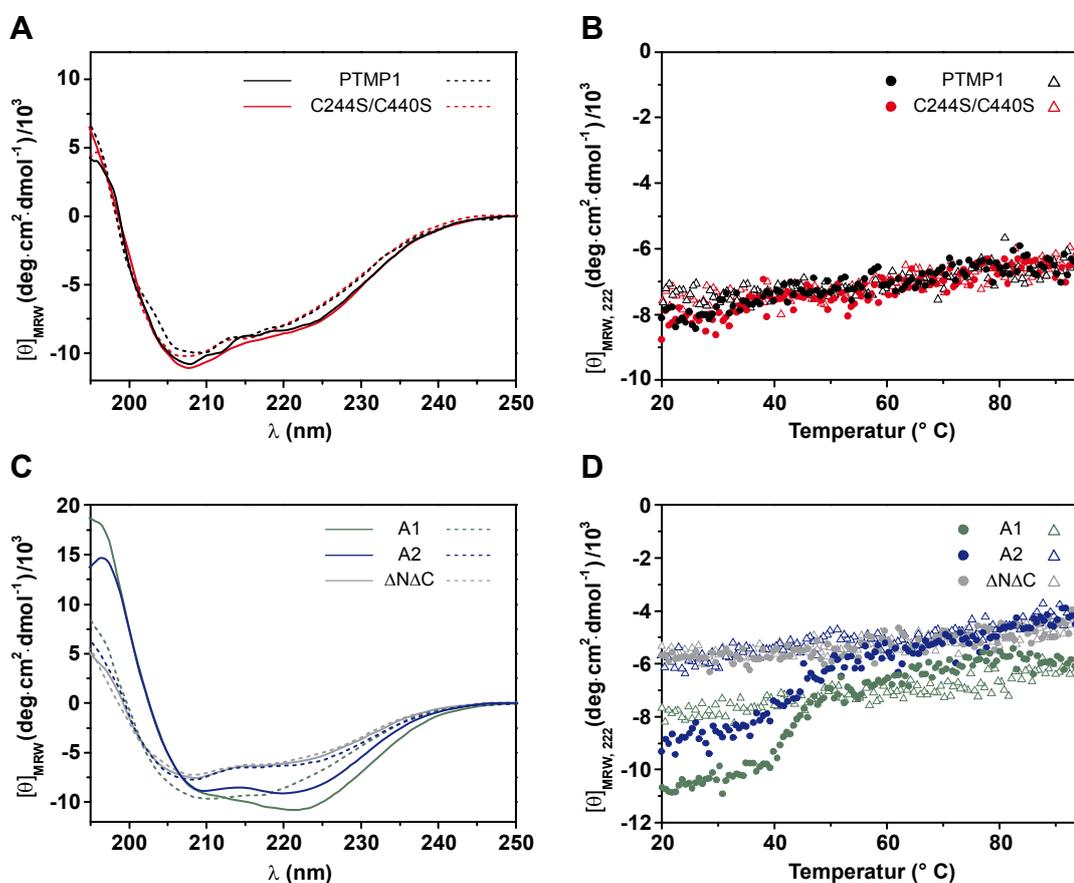


Abbildung 3-34 Analyse der thermischen Stabilität von PTMP1 und den Varianten im reduzierten Zustand bei pH 8

(A) Fern-UV-CD-Spektren von PTMP1 und C244S/C440S vor (glatte Linien) und (gestrichelte Linien) nach dem Erhitzen auf 95 °C. (B) Thermoübergänge von PTMP1 und C244S/C440S, dargestellt durch das CD-Signal bei 222 nm. Punkte: Aufheizen, Dreiecke: Abkühlen. (C) Fern-UV-CD-Spektren von A1, A2 und $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ vor (glatte Linien) und (gestrichelte Linien) nach dem Erhitzen auf 95 °C. (D) Thermoübergänge von A1, A2 und $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$, dargestellt durch das CD-Signal bei 222 nm. Punkte: Aufheizen, Dreiecke: Abkühlen. Alle Experimente wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, in Anwesenheit von 1 mM TCEP durchgeführt.

Neben der strukturellen Stabilität im alkalischen Milieu wurde diese auch bei pH 4 getestet. Unter diesen Bedingungen zeigten sich disulfidverbrückte Proteine (PTMP1 und C244S/C440S) thermisch stabil (Abbildung 3-35), wohingegen Proteine ohne Disulfidbrücken (reduziertes Protein und die NoCys-Variante) irreversibel und übergangslos (ohne signifikante Entfaltung der Sekundärstrukturelemente) aggregierten (Abbildung 3-36).

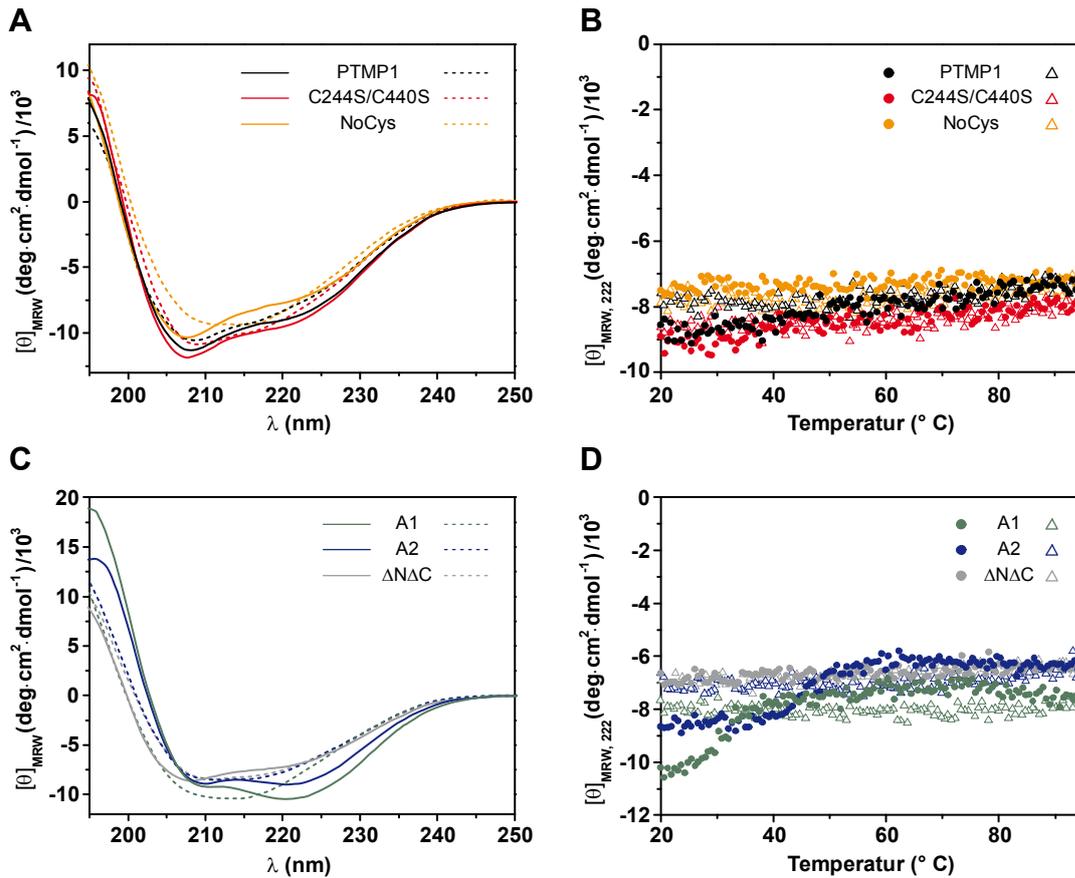


Abbildung 3-35 Analyse der thermischen Stabilität von PTMP1 und den Varianten bei pH 4

(A) Fern-UV-CD-Spektren von PTMP1, C244S/C440S und NoCys vor (glatte Linien) und (gestrichelte Linien) nach dem Erhitzen auf 95 °C. (B) Thermoübergänge von PTMP1, C244S/C440S und NoCys, dargestellt durch das CD-Signal bei 222 nm. Punkte: Aufheizen, Dreiecke: Abkühlen. (C) Fern-UV-CD-Spektren von A1, A2 und $\Delta N\Delta C$ vor (glatte Linien) und (gestrichelte Linien) nach dem Erhitzen auf 95 °C. (D) Thermoübergänge von A1, A2 und $\Delta N\Delta C$, dargestellt durch das CD-Signal bei 222 nm. Punkte: Aufheizen, Dreiecke: Abkühlen. Alle Experimente wurden in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 4, durchgeführt.

Die Deletionsmutante $\Delta N\Delta C$ zeigte sich analog zu den Volllängenproteinen im alkalischen Milieu stabil, wohingegen sie bei pH 4 sowohl im oxidierten (Abbildung 3-35) als auch reduzierten Zustand (Abbildung 3-36) irreversibel aggregierte.

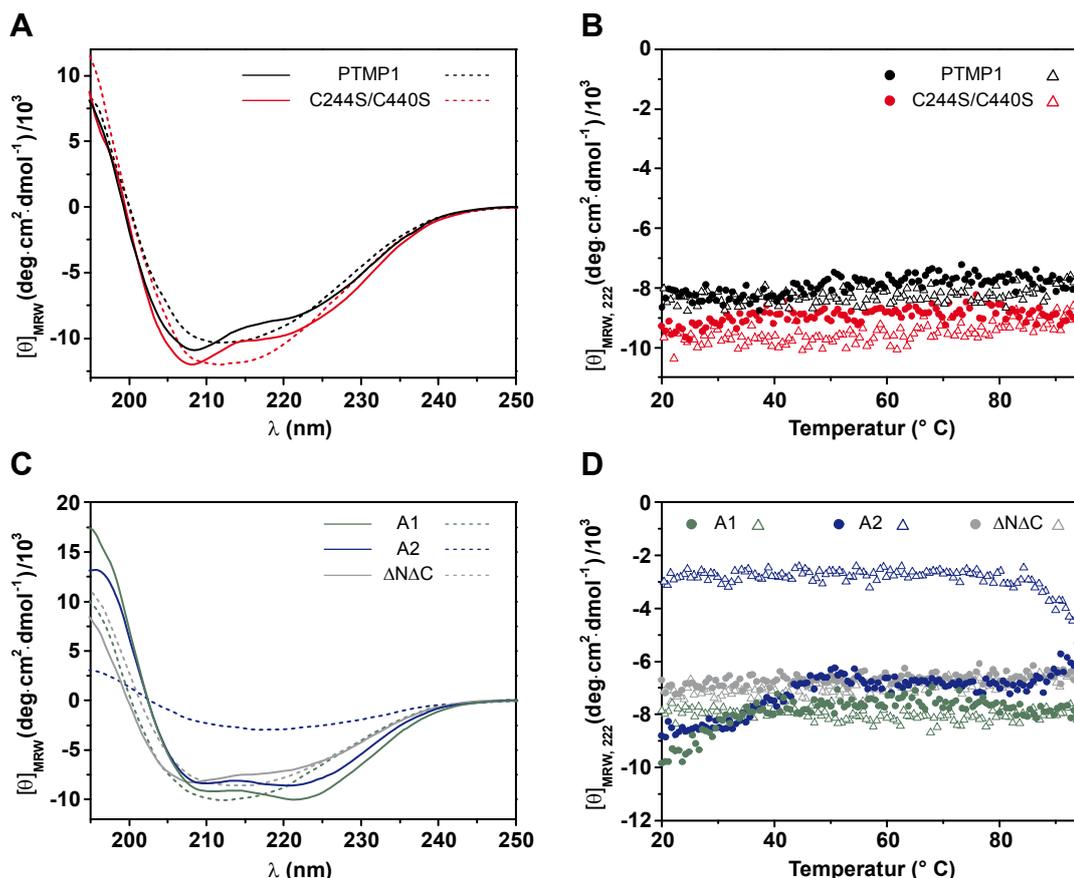


Abbildung 3-36 Analyse der thermischen Stabilität von PTMP1 und den Varianten im reduzierten Zustand bei pH 4

(A) Fern-UV-CD-Spektren von PTMP1 und C244S/C440S vor (glatte Linien) und (gestrichelte Linien) nach dem Erhitzen auf 95 °C. (B) Thermoübergänge von PTMP1 und C244S/C440S, dargestellt durch das CD-Signal bei 222 nm. Punkte: Aufheizen, Dreiecke: Abkühlen. (C) Fern-UV-CD-Spektren von A1, A2 und $\Delta N\Delta C$ vor (glatte Linien) und (gestrichelte Linien) nach dem Erhitzen auf 95 °C. (D) Thermoübergänge von A1, A2 und $\Delta N\Delta C$, dargestellt durch das CD-Signal bei 222 nm. Punkte: Aufheizen, Dreiecke: Abkühlen. Alle Experimente wurden in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 4, in Anwesenheit von 1 mM TCEP durchgeführt.

Anders als PTMP1-Varianten mit beiden Domänen (PTMP1, C244S/C440S, NoCys, $\Delta N\Delta C$) erwiesen sich die isolierten VWA-Domänen A1 und A2 thermisch generell wesentlich weniger stabil. Unter allen getesteten Bedingungen zeigten diese Proteine beim Erhitzen unspezifische Aggregation. Während A2 stets vollständig aggregierte, bildeten sich für A1 beim Abkühlen ein Teil der Sekundärstrukturelemente zurück (Abbildung 3-33 C, D). Analog zu den analysierten Zweidomänenproteinen erwiesen sich auch A1 und A2 im alkalischen Milieu stabiler als im sauren (Abbildung 3-35, Abbildung 3-36). Ebenso zeigte sich auch für die isolierten Domänen ein Einfluss der jeweiligen Disulfidbrücke auf die thermische Entfaltung, da die Proteine im reduzierten Zustand bei niedrigeren Temperaturen aggregierten (Abbildung 3-34, Abbildung 3-36). Tabelle 3-9 fasst die Ergebnisse der thermischen Stabilitätsanalysen zusammen.

Tabelle 3-9 Thermische Stabilität von PTMP1 und der Varianten

(grüne Haken: Protein stabil in Lösung ohne Veränderung des CD-Spektrums beim Erhitzen;
rote Kreuze: Aggregation des Proteins; Kreis: teilweise Rückfaltung beim Abkühlen)

Protein	pH 8		pH 4	
	oxidiert	reduziert	oxidiert	reduziert
PTMP1	✓	✓	✓	✗
C244S/C440S	✓	✓	✓	✗
NoCys		✓		✗
ΔNΔC	✓	✓	✗	✗
A1	○	✗	✗	✗
A2	✗	✗	✗	✗

Neben den beschriebenen Parametern wurde auch der Einfluss der Ionenstärke auf die thermische Stabilität der Proteine getestet, wobei sich in einem Bereich von 0-500 mM Natriumchlorid keine Änderungen in den CD-Spektren bzw. Thermoübergängen detektiert werden konnten. Stattdessen zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Proteinkonzentration auf die Stabilität der Proteine. Während alle Proteine bei niedrigen Proteinkonzentrationen (0,2 mg/mL) und pH 8 eine hohe Stabilität aufwiesen (s. o.), zeigten diese in höher konzentrierten Lösungen (~10 mg/mL) schon bei Raumtemperatur eine Tendenz zu unspezifischer Aggregation. Bei Inkubation unter niedrigen Temperaturen (4 °C oder auf Eis) erwiesen sich jedoch auch konzentrierte Lösungen über mehrere Wochen als stabil.

3.4.4.2 Denaturierung mit Guanidiniumhydrochlorid

Zur Analyse der strukturelle Stabilität von PTMP1 gegenüber chemischer Denaturierung wurden Proteinlösungen von PTMP1, C244S/C440S, NoCys und der isolierten Domänen A1 und A2 in Anwesenheit unterschiedlichen Konzentrationen GdmCl inkubiert, Fern-UV-Spektren aufgezeichnet und die CD-Signale bei 222 nm ausgewertet. Die Inkubation der Proben erfolgte stets über Nacht, um ein vollständiges Einstellen eines Entfaltungsgleichgewichts zu gewährleisten.

Für PTMP1 zeigte sich ein dreistufiger Entfaltungsübergang mit einem leichten Plateau bei ~1 M GdmCl, welches einem Entfaltungsintermediat zugeordnet wurde (Abbildung 3-37 A). Der erste Übergang (Nativ-Intermediat, N→I, Übergangsmittelpunkt 0,6 M GdmCl) beschränkt sich dabei auf einen relativ engen Konzentrationsbereich, wohingegen der zweite (Intermediat-Denaturiert, I→D, Übergangsmittelpunkt 3,3 M GdmCl) sich wesentlich ausgeprägter darstellt. Mittels linearer Extrapolation wurde die konformationelle Stabilität von na-

tivem PTMP1 ($\Delta G_0 = 4,9$ kJ/mol) sowie des Entfaltungsintermediates ($\Delta G_0 = 16,1$ kJ/mol) bestimmt (siehe Abbildung 3-37 E und Tabelle 3-10).

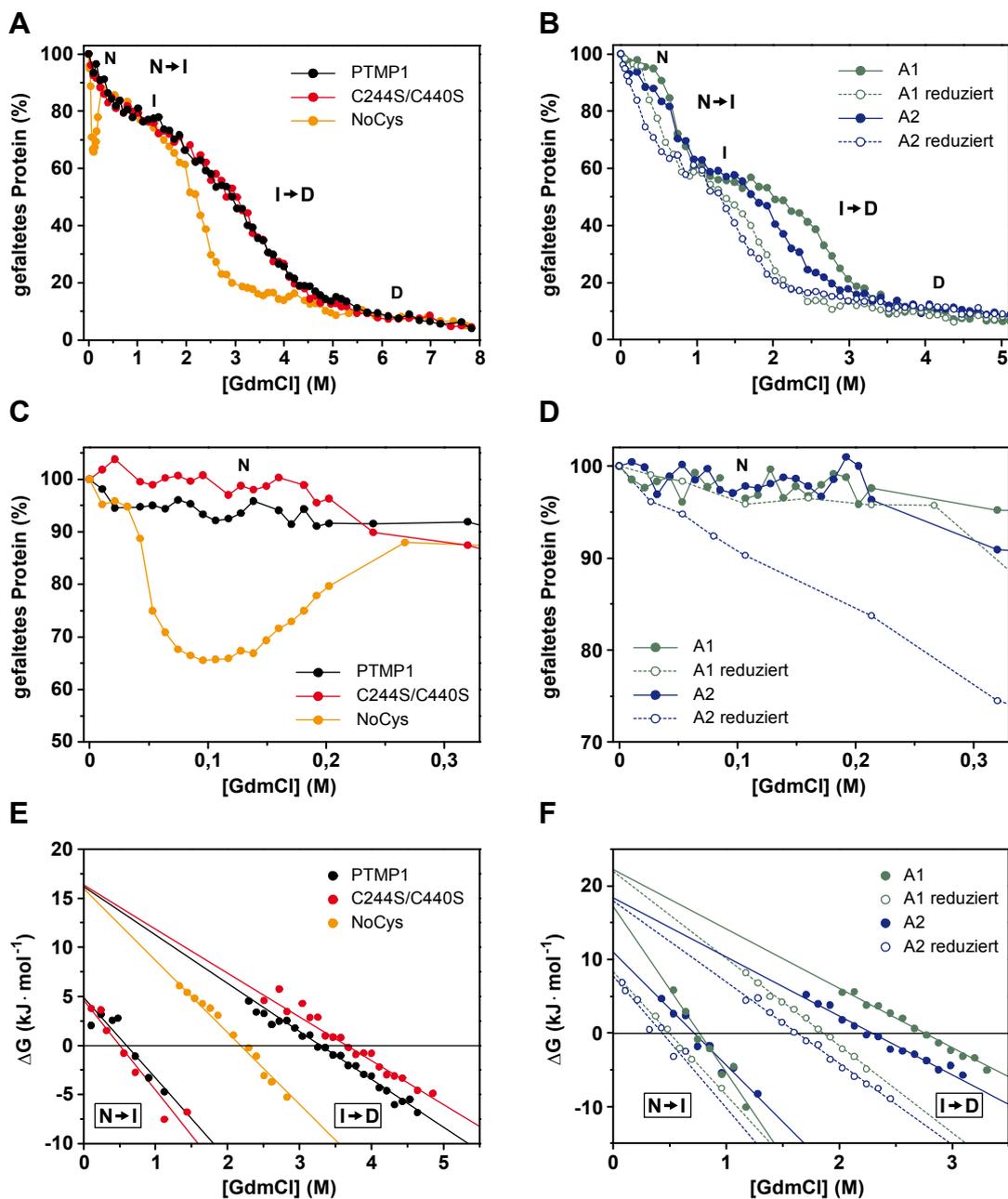


Abbildung 3-37 Analyse der Stabilität von PTMP1 gegenüber Guanidiniumhydrochlorid

(A) GdmCl-Übergänge von PTMP1, C244S/C440S und NoCys (jeweils 0,2 mg/mL in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 8). Dargestellt ist das normierte Fern-UV-CD-Signal bei 222 nm. N: nativer Zustand, I: Entfaltungs-Intermediat, D: denaturierter Zustand. (B) GdmCl-Übergänge der isolierten Domänen A1 und A2 (0,2 mg/mL in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 8) in Ab- und Anwesenheit von 1 mM TCEP. (C) Normierte Fern-UV-CD-Signale von PTMP1, C244S/C440S und NoCys bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen. (D) Normierte Fern-UV-CD-Signale von A1 und A2 in Ab- und Anwesenheit von 1 mM TCEP bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen. (E) Bestimmung der konformationellen Stabilität von PTMP1, C244S/C440S und NoCys. Aufgetragen wurde die freie Enthalpie der jeweiligen Messpunkte in den Übergangsbereichen der Entfaltungskurven sowie die extrapolierten Regressionsgeraden. (F) Bestimmung der konformationellen Stabilität der isolierten Domänen A1 und A2 im oxidierten und reduzierten Zustand (analog zu E)

Um den Einfluss der Disulfidbrücke im Domänenlinker zu testen, wurden analoge Messungen mit der Mutante C244S/C440S durchgeführt, wobei sich der erhaltenen Entfaltungsübergang nicht vom Wildtypprotein unterscheidet (siehe Abbildung 3-37 A, E und Tabelle 3-10). Dagegen wirkt sich die zusätzliche Entfernung der beiden domänenverbindenden Disulfidbrücken signifikant auf die Stabilität des Proteins aus, da die vollständig cysteindefiziente Mutante NoCys bei niedrigeren GdmCl-Konzentrationen entfaltet (Übergangsmittelpunkt I→D bei 2,2 M GdmCl). Für diese Mutante zeigte sich ferner der native Zustand und das Entfaltungsintermediat nur marginal, weswegen die konformationelle Stabilität für den Übergang N→I nicht bestimmt werden konnte. Stattdessen zeigte NoCys bei geringen GdmCl-Konzentrationen (50-250 mM) eine Tendenz zur irreversiblen Aggregation (siehe Abbildung 3-37 C) wohingegen das Protein bei Konzentrationen über 300 mM GdmCl erneut mit dem Wildtypprotein vergleichbare CD-Signale aufwies. Die berechnete konformationelle Stabilität der NoCys-Variante liegt trotz früherer Entfaltung in einem ähnlichen Bereich wie die von PTMP1 (vgl. Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10 Konformationelle Stabilität von PTMP1 und der Varianten

Protein	Übergang N→I			Übergang I→D		
	ΔG_0 (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	[GdmCl] _{1/2} (M)	ΔG_0 (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	[GdmCl] _{1/2} (M)
PTMP1	4,9 ± 1,0	8,2 ± 1,5	0,6	16,1 ± 0,7	4,9 ± 0,2	3,3
C244S/C440S	4,6 ± 0,9	9,2 ± 1,1	0,5	16,4 ± 1,4	4,5 ± 0,4	3,7
NoCys		n. b.		16,0 ± 0,8	7,3 ± 0,3	2,2
A1	17,2 ± 2,1	22,6 ± 2,4	0,8	22,2 ± 0,9	8,1 ± 0,3	2,8
A1 reduziert	8,3 ± 0,6	16,8 ± 1,0	0,5	22,0 ± 0,4	11,9 ± 0,2	1,9
A2	11,0 ± 1,2	15,4 ± 1,4	0,7	18,4 ± 1,0	8,0 ± 0,4	2,3
A2 reduziert	7,7 ± 0,9	18,0 ± 2,2	0,4	18,0 ± 0,6	11,1 ± 0,3	1,6

Um die Beiträge der einzelnen PTMP1-Domänen A1 und A2 zu den beobachteten Übergängen zu evaluieren, wurden auch die isolierten Domänen analysiert. Diese zeigten ebenfalls dreistufige Entfaltung (siehe Abbildung 3-37 B), wobei die Übergangsmittelpunkte generell bei niedrigeren GdmCl-Konzentrationen lagen als für das Wildtypprotein. Die Domäne A1 erwies sich dabei als stabiler als A2. Für beide Domänen zeigte sich, analog zur Analyse der NoCys-Mutante, ein starker Einfluss der jeweiligen Disulfidbrücke auf die Übergänge: für den Übergang N→I zeigte die Reduktion einen destabilisierenden Effekt, da die Freien Enthalpien für die reduzierten Zustände im Vergleich zu den oxidierten drastisch reduziert waren

(8,3 vs. 17,2 bzw. 7,7 vs. 11,0 kJ/mol). Die Domäne A2 zeigte bei Reduktion darüber hinaus, analog zur NoCys-Variante, irreversible Aggregation bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen (Abbildung 3-37 D). Für die I→D-Übergänge zeigte sich dagegen hauptsächlich eine Verschiebung der Übergangsmittelpunkte bei in etwa gleichbleibender konformationeller Stabilität der jeweiligen Entfaltungsintermediate. Insgesamt scheinen somit beide PTMP1-Domänen gleichmäßig zur Gesamtstabilität des Proteins beizutragen, wobei den beiden domänenverbindenden Disulfidbrücken eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der Struktur zugewiesen werden kann.

3.4.5 Bindung an Kollagen

Für PTMP1, welches aus dem Muschelbyssusfaden extrahiert worden war, wurde die Bindung an Kollagen mittels eines ELISA-ähnlichen Experiments nachgewiesen (Sun *et al.*, 2002) und basierend darauf ein funktionelles Modell des Proteins entwickelt (Waite *et al.*, 2002). Um die Kollagenbindung von PTMP1 näher zu spezifizieren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von PTMP1 und der Varianten an immobilisierte Kollagene mittels besagter ELISA-ähnlicher Tests sowie Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie analysiert.

3.4.5.1 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

Die Immobilisierung von Kollagen I auf der Oberfläche eines CM5-Chips (GE Healthcare) erfolgte analog zu früheren Studien (Fresquet *et al.*, 2007; Romijn *et al.*, 2003; van der Plas *et al.*, 2000). PTMP1 und die Varianten wurden im jeweiligen Laufpuffer gelöst, ultrazentrifugiert und verdünnte Lösungen (jeweils 10-20 μM im jeweiligen Laufpuffer) bei einem Fluss von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ in die Mikrofluidikeinheit injiziert. Das Signal der Messzelle (Flusszelle 1) wurde um das Signal der Referenzzelle ohne Kollagen (Flusszelle 2) korrigiert.

Eine Bindung an die kollagenbeschichtete Oberfläche konnte nur für PTMP1 und die Deletionsmutante $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ nachgewiesen werden, während die isolierten Domänen nur marginale Erhöhung des Differenzsignals anzeigten (Abbildung 3-38). Analog zu den GPC-Analysen wurde auch die Bindung einer 1:1-(mol/mol)-Mischung der beiden isolierten Domänen getestet, wobei auch diese keine wesentlich verbesserte Bindung (vgl. $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ -Mutante) zeigte. Um unspezifische Wechselwirkungen mit der Kollagenoberfläche zu evaluieren, wurden Kontrollen mit BSA, welches PTMP1 in seiner monomeren Molekülmasse (~ 66 kDa vs. ~ 49 kDa) sowie der Ladungsverteilung auf der Moleküloberfläche ($\text{pI} = 5,6$ vs. $5,9$) ähnelt, durchgeführt. Auch BSA zeigte eine Signalerhöhung durch Bindung an Kollagen, wobei die Kurven

sich in ihrem Verlauf signifikant von denen der anderen Proteine unterschieden. Der Vergleich der Differenzsensorgramme in Anwesenheit von 50 und 100 mM Natriumchlorid zeigte eine eindeutige Abhängigkeit der Bindung von der Ionenstärke an (Abbildung 3-38). Während die Bindung von PTMP1 und $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ stark reduzierte Signale aufwies, konnte diese für die isolierten Domänen und BSA nicht mehr nachgewiesen werden.

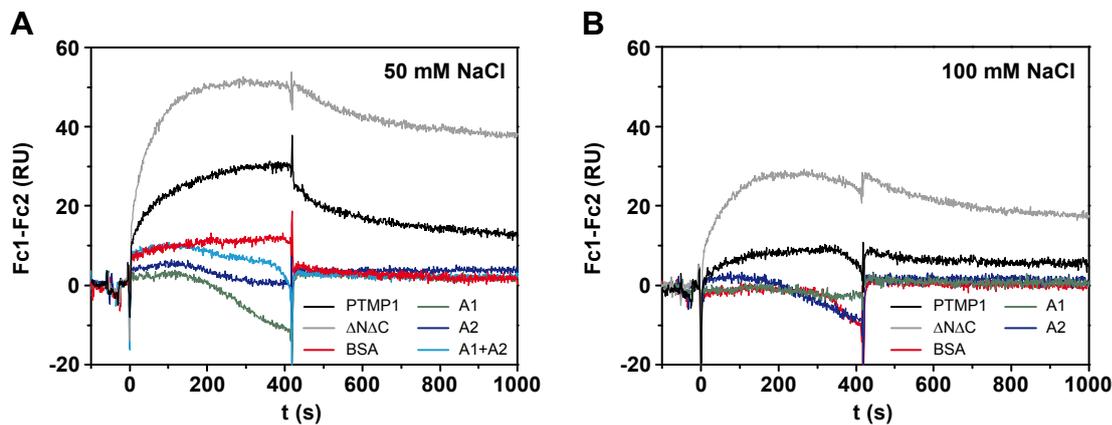


Abbildung 3-38 SPR-Analyse der Bindung von PTMP1 an Kollagen I

(A) Analyse der Bindung von PTMP1, $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$, BSA (jeweils 10 μM), A1, A2 (jeweils 20 μM) und einer 1:1 (mol/mol)-Mischung von A1 und A2 an immobilisiertes Kollagen I in 10 mM Natriumphosphat (pH 7) in Anwesenheit von 50 mM Natriumchlorid. (B) Analyse der Bindung in Anwesenheit von 100 mM Natriumchlorid. Gezeigt sind jeweils die Differenzsignale zwischen der Kollagenbeschichteten Flusszelle (Fc1) und der unbeschichteten Flusszelle (Fc2); RU = relative units (herstellerspezifische Einheit)

Aus den Bindekurven wurden, sofern möglich, durch Kurvenangleichung kinetische Parameter der Bindung ermittelt. Dabei kam ein Modell zum Einsatz, welchem eine 1:1-Stöchiometrie (Langmuir-Bindung) zu Grunde liegt und aus diesem Grund nur apparente Werte repräsentiert (Fresquet *et al.*, 2007; Romijn *et al.*, 2003; van der Plas *et al.*, 2000). Die entsprechenden χ^2 -Werte verlässlicher Kurvenangleichungen betragen dabei stets weniger als 0,5, was gemäß den Herstellerkonventionen (GE Healthcare) eine hohe Qualität der Angleichungen anzeigt. Für PTMP1 und $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ wurden Dissoziationskonstanten im submikromolaren Bereich erhalten, die eine hohe Affinität der Bindung anzeigen, wobei die Deletionsmutante eine signifikant stärkere Bindung als der Wildtyp aufwies. BSA zeigte im Unterschied zu PTMP1 eine wesentlich schwächere Bindung, deren kinetische Parameter nicht ermittelt werden konnten. Im Gegensatz zu den Zweidomänenproteinen konnten auch für die isolierten Domänen an den schwachen Bindesignalen keine sinnvollen Kurvenangleichungen durchgeführt werden.

Tabelle 3-11 Raten- und Dissoziationskonstanten der Proteine aus SPR-Analysen

Protein	50 mM NaCl			100 mM NaCl		
	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
PTMP1	950	0,00091	0,96	keine verlässliche Angleichung möglich		
$\Delta N\Delta C$	1780	0,00032	0,18	1190	0,00055	0,46
A1	keine Angleichung möglich			keine Bindung		
A2	keine Angleichung möglich			keine Bindung		
BSA	keine verlässliche Angleichung möglich			keine Bindung		

3.4.5.2 Statische Kollagenbindungstests (ELISA-ähnliche Assays)

Zum Nachweis der Kollagenbindung von PTMP1 mittels des beschriebenen ELISA-ähnlichen Tests (Sun *et al.*, 2002) wurde ein polyklonales Antiserum gegen das rekombinant produzierte PTMP1 generiert. Analysen hinsichtlich der Nachweisbarkeit von PTMP1 und aller generierter Varianten erfolgten mittels Immunoblotanalysen, wobei die Nachweisgrenzen für alle Proteine zwischen 100 pg und 1 ng/Gelspur lagen. Das verwendete Antiserum (90. Immunisierungstag) wurde für diese Experimente in 10 000-facher Verdünnung eingesetzt. Analog zu PTMP1, welches aus dem nativen Byssus extrahiert worden war (Sun *et al.*, 2002), zeigten auch die rekombinanten Varianten in Immunoblots Kreuzreaktivität mit einem Antiserum gegen den humanen Von-Willebrand-Faktor. Das kreuzreagierende Epitop konnte dabei interessanterweise auf den Bereich der terminalen Expansionen eingegrenzt werden, da nur die Volllängenproteine (PTMP1, C244S/C440S und NoCys), jedoch nicht die Deletionsmutanten ($\Delta N\Delta C$, A1, A2) Antikörperbindung aufwiesen.

Mit dem generierten PTMP1-Antiserum erfolgten statische, ELISA-ähnliche Bindungstests. Von verschiedenen getesteten Oberflächen für die Kollagenimmobilisierung erwies sich nur PolySorp (Nunc) als geeignet, da alle anderen Platten eine starke Hintergrundbindung der entsprechenden Analyten aufwiesen (starkes Detektionssignal auf nicht kollagenbeschichteten, ansonsten identisch behandelten Oberflächen). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung an unterschiedliche Kollagene (Typ I-V) sowie das kollagenähnliche tripelhelikale Peptid PPG₁₀ (Berisio *et al.*, 2002) analysiert. Abbildung 3-39 zeigt repräsentative Experimente für die Bindung an Kollagen I.

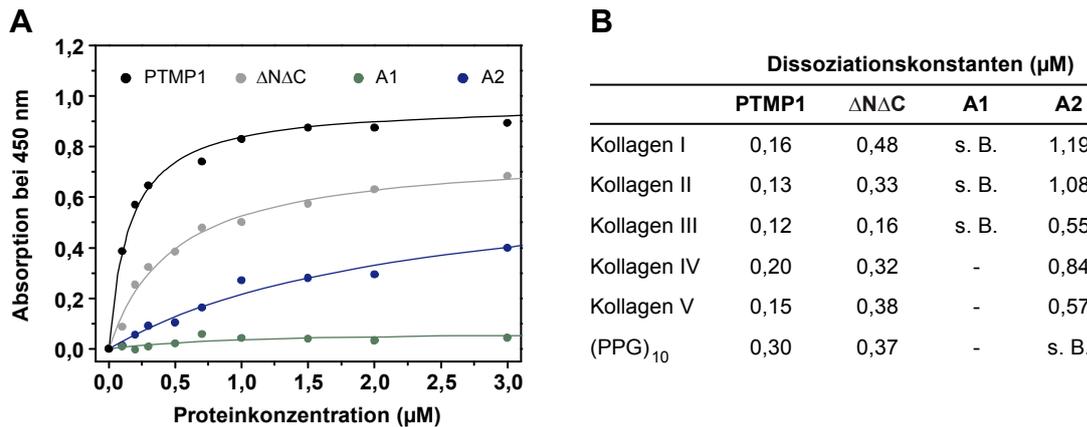


Abbildung 3-39 ELISA-ähnliche Tests der Kollagenbindung von PTMP1 und der verkürzten Varianten

(A) Analyse der Bindung von PTMP1, ΔNΔC, A1 und A2 an eine Kollagen I-beschichtete PolySorp-Oberfläche. Aufgetragen sind die Absorptionswerte bei 450 nm gegen die Proteinkonzentration sowie die Regressionskurven (Michaelis-Menten-Gleichung). (B) Tabellarische Auflistung der erhaltenen apparenten Dissoziationskonstanten (in µM) der entsprechenden Proteine und immobilisierten Kollagene sowie des kollagenähnlichen Peptids PPG₁₀, berechnet aus den halbmaximalen Sättigungen der entsprechenden Bindungskurven. Striche: keine Bindung; s. B.: schwache Bindung ohne sinnvolle Kurvenangleichung

Alle Bindungskurven wurden mittels eines 1:1-Modells unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Michaelis und Menten, 1913) angeglichen. Alternativ wurden die Kurven mit weiteren gängigen Verfahren, u. a. mittels Scatchard-Diagramm (Scatchard, 1949), ausgewertet, was in ähnlichen Werte resultierte.

PTMP1 zeigte auch in den statischen ELISA-ähnlichen Experimenten submikromolare Affinitäten für alle getesteten Kollagene sowie das tripelhelikale kollagenähnliche Peptid PPG₁₀. Die Deletionsmutante ΔNΔC wies hier, anders als zuvor in den SPR-Experimenten beobachtet, leicht niedrigere Affinitäten als das Wildtypprotein auf. Die isolierten Domänen zeigten ebenfalls ein wesentlich schwächeres Bindungsverhalten an den getesteten Oberflächen. Die Bindung von A2 an alle Kollagen-Typen erwies sich als schwach, aber quantifizierbar, wohingegen A1 nur marginale Bindung an Kollagene vom Typ I-III aufwies, welche jedoch nicht sinnvoll quantifiziert werden konnte. Analog zu löslichen Kollagenen wurde auch die Bindung an fibrilliertes Kollagen Typ I getestet. Die dabei erhaltenen Bindekurven entsprachen weitestgehend denen der löslichen Kollagene, analog zu für den humanen Von-Willebrand-Faktor publizierten Daten (van der Plas *et al.*, 2000).

Für PTMP1 wurde eine Abhängigkeit der Kollagenbindung von zweiwertigen Metallionen postuliert (Sun *et al.*, 2002; Waite *et al.*, 2002). Aus diesem Grund erfolgten im Rahmen dieser Arbeit ELISA-ähnliche Tests in Anwesenheit verschiedener Salze (Calciumchlorid, Mag-

nesiumchlorid, Mangan(II)-chlorid und Zinkchlorid) in den Analytlösungen getestet. Während Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} sich eher negativ auf die Kollagenbindung von PTMP1 auswirkten, konnte für Zn^{2+} ein affinitätssteigernder Einfluss nachgewiesen werden (Abbildung 3-40). Analog dazu verhielten sich die Deletionsmutante $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ sowie die isolierte A2-Domäne. Für die Domäne A1 konnte dagegen keine Affinitätssteigerung in Anwesenheit von Metallionen beobachtet werden.

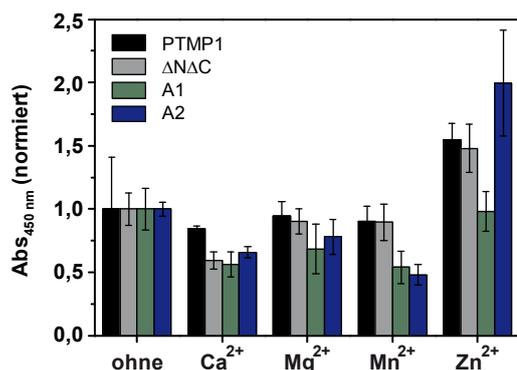


Abbildung 3-40 Abhängigkeit der Kollagenbindung von bivalenten Metallionen

Analyse der Bindung von PTMP1, $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$, A1 und A2 (jeweils $0,1 \mu\text{M}$) an eine Kollagen I-beschichtete PolySorp-Oberfläche in Ab- und Anwesenheit verschiedener bivalenter Metallionen (jeweils $100 \mu\text{M}$ der entsprechenden Metallchloride). Gezeigt sind die jeweils normierten Absorptionswerte bei 450 nm . Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung mit jeweiligem Abzug des Hintergrundsignals.

3.4.6 Einfluss von PTMP1 auf die Kollagenassemblierung

Da mittels SPR-Spektroskopie und statischen Bindungstests eine hochaffine Bindung von PTMP1 an Kollagen nachgewiesen werden konnte, wurde der Einfluss dieser Bindung auf Struktur, Stabilität und Assemblierung von Kollagenen untersucht.

3.4.6.1 Struktur und Stabilität der Kollagentripelhelix

Analog zu den Stabilitätsuntersuchungen der PTMP1-Struktur wurden thermische Übergänge von Kollagenen mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie analysiert. Dabei wurden Lösungen verschiedener Kollagene in Ab- und Anwesenheit von PTMP1 erhitzt und Fern-UV-CD-Spektren im Bereich von $190\text{-}250 \text{ nm}$ aufgezeichnet. Die Spektren (Abbildung 3-41 A) zeigen keine signifikanten Veränderungen der Sekundärstruktur der Kollagentripelhelix in Anwesenheit von PTMP1, da sich die Differenzspektren (Spektren der 1:1-(w/w)-Mischungen abzüglich des PTMP1-Spektrums) mit den Kollagenspektren vollständig decken. Ferner erwies sich die thermische Stabilität der Kollagen-Tripelhelix in Anwesenheit von PTMP1 nicht signifikant verändert (Abbildung 3-41 B), da die Entfaltung der Tripelhelix, angezeigt durch den Verlust des CD-Signals bei 222 nm , für alle getesteten Kollagene bei nahezu identischen Temperaturen erfolgte (Übergangsmittelpunkte stets bei $40\text{-}41 \text{ }^\circ\text{C}$).

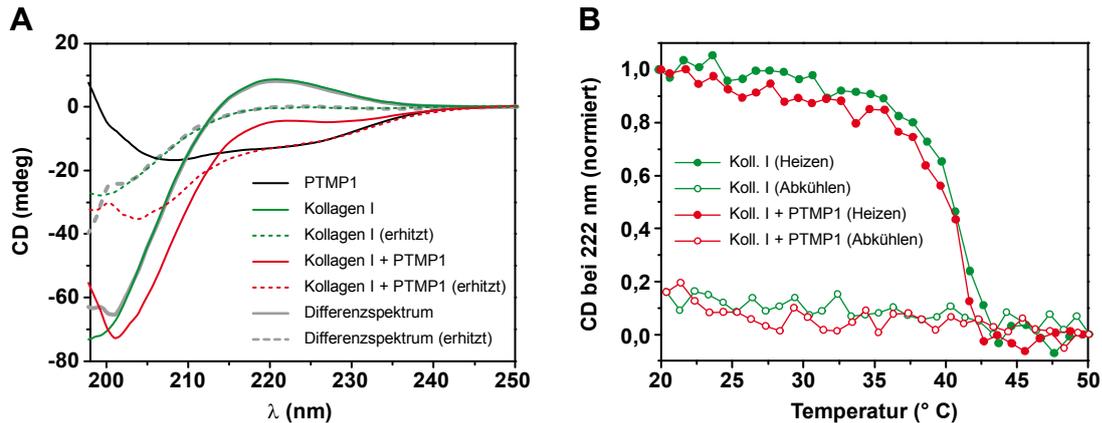


Abbildung 3-41 Einfluss von PTMP1 auf die Stabilität von löslichem Kollagen I

(A) Fern-UV-CD-Spektren von Kollagen I (0,2 mg/mL) und einer 1:1 (w/w)-Mischungen der beiden Proteine vor und nach dem Erhitzen auf 50 °C (50 mM Natriumphosphat, 25 mM Natriumacetat, pH 7,5). Das Spektrum von PTMP1 (0,2 mg/mL) ist zum Vergleich in schwarz dargestellt, die jeweiligen Differenzspektren der Mischungen vor und nach dem Erhitzen abzüglich des PTMP1-Spektrums in grau. (B) Thermoubergang von Kollagen I (Koll. I) in Ab- und Anwesenheit von PTMP1, dargestellt durch das normierte CD-Signal bei 222 nm

3.4.6.2 Kollagenassemblierung

Der Einfluss von PTMP1 auf die Assemblierung von Kollagen und die Struktur bzw. Morphologie gebildeter Fibrillen wurde mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Dabei erfolgten einerseits Analysen der Assemblierung präformierter Kollagen-Mikrofibrillen auf einer Glimmeroberfläche (Jiang *et al.*, 2004), andererseits der *de novo*-Bildung von Fibrillen aus gelösten Kollagenen in Ab- und Anwesenheit von PTMP1. Kollagen wurde bei basischem pH-Wert fibrilliert (Williams *et al.*, 1978). Anschließend wurden die entsprechenden Lösungen mit PTMP1 im Verhältnis 1:1 (w/w) versetzt, auf eine Glimmeroberfläche aufgebracht und mittels AFM untersucht.

Die Analyse der Proben von Kollagen in Anwesenheit von PTMP1 zeigte eine signifikante Veränderung des Assemblierungsverhaltens der präformierten Kollagen-Mikrofibrillen auf Glimmer (Abbildung 3-42 B). Während ohne PTMP1 eine gerichtete Anlagerung der Mikrofibrillen zu beobachten war, zeigte sich in Anwesenheit von PTMP1 keine Orientierung der Fibrillen, sondern eine vollständig isotrope Verteilung. In ähnlicher Weise, jedoch nicht so stark ausgeprägt, zeigte sich ein durch PTMP1 verursachter Verlust einer Orientierung bereits für frisch gelöstes Kollagen (Abbildung 3-42 A).

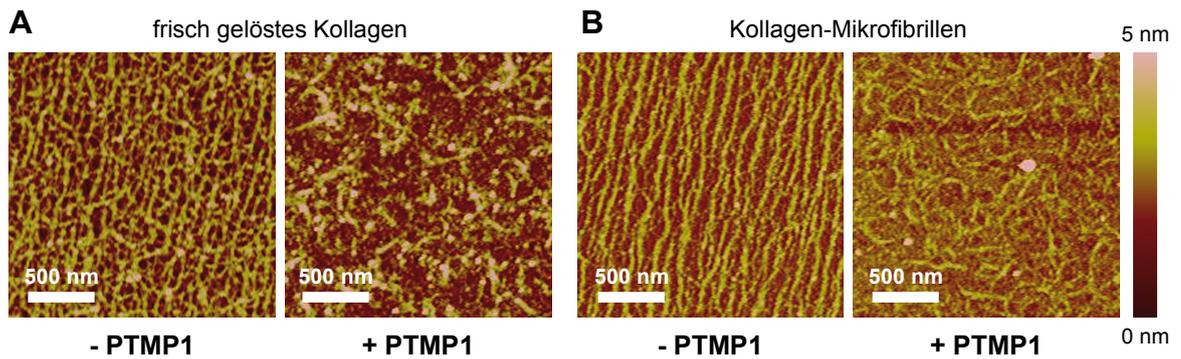


Abbildung 3-42 Einfluss von PTMP1 auf die Ausrichtung von Kollagen auf Glimmer

Tapping-Mode-AFM-Analysen (Höhenprofil) von (A) löslichem Kollagen I und (B) Kollagen-Mikrofibrillen auf Glimmer in Ab- und Anwesenheit von PTMP1 im Verhältnis 1:1 (w/w). Die Skalierung des Höhenprofils ist rechts angegeben.

Analog zum Einfluss auf die Orientierung präformierter Kollagenfibrillen wirkte sich die Anwesenheit PTMP1 während der Kollagenassemblierung signifikant auf die Morphologie größerer Fibrillen aus. Während sich in Abwesenheit von PTMP1 lange, gerade und gleichmäßige Fibrillen bildeten, erwiesen sich diese bei der Assemblierung in Anwesenheit von PTMP1 als kürzer, wesentlich unregelmäßiger und dünner (Abbildung 3-43).

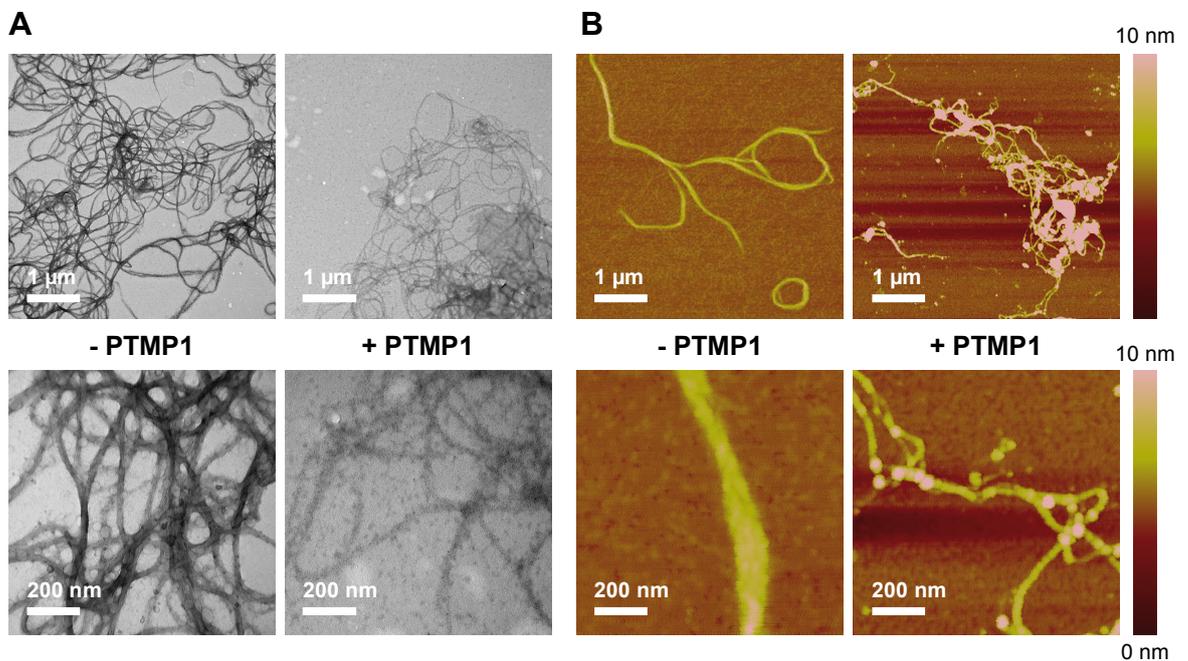


Abbildung 3-43 Einfluss von PTMP1 auf die Bildung von Kollagen I-Fibrillen

(A) TEM-Analysen und (B) Tapping-Mode-AFM-Analysen (Höhenprofil) von Kollagen I-Fibrillen, gebildet in Ab- und Anwesenheit von PTMP1 im Verhältnis 1:1 (w/w) bei zwei unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Skalierung des AFM-Höhenprofils ist rechts angegeben.

4 Diskussion

4.1 Byssuscatecholoxidase

In molekularbiologischen und bioinformatischen Analysen konnte im Rahmen dieser Arbeit die Sequenz einer mutmaßlichen Byssuscatecholoxidase in der cDNA-Bank des Muschelfußes der Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis* identifiziert werden (Kap. 3.1.2), was eine Expression des entsprechenden Gens im Muschelfuß und somit die Existenz im Byssus bzw. eine Beteiligung an Biosynthese oder Reifung desselben nahelegt. Die einzige umfassende Studie einer aus dem Byssus extrahierbaren Catecholoxidase (Waite, 1985) beschreibt ein Protein mit einem Molekulargewicht von 120-125 kDa, was in etwa einem Dimer des identifizierten Proteins (63 kDa) entspricht. Das Molekulargewicht des aus dem Byssus isolierten Enzyms wurde dabei zwar mittels SDS-PAGE nach Reduktion mit β -Mercaptoethanol bestimmt, aufgrund der hohen Anzahl an Cysteinen bzw. detektiertem Cystin kann eine unvollständige Reduktion nicht ausgeschlossen werden. Ferner wären, wie für die meisten Byssusproteine üblich (Sagert *et al.*, 2006), alternative kovalente Quervernetzungen innerhalb des dimeren Proteins denkbar. Zudem liegen auch Tyrosinasen anderer Organismen, z. B. von *Bacillus megaterium*, in dimerer Form vor (Sendovski *et al.*, 2011).

Der Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen des aus dem Byssusfaden isolierten Proteins (Waite, 1985) und der mutmaßlichen Catecholoxidase zeigt ebenfalls deutliche Ähnlichkeiten (Tabelle 4-1). Ein weiteres Merkmal der Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase stellt ein Überschuss basischer Aminosäuren dar (theoretischer pI = 8,6), analog zu den meisten im Byssus beschriebenen Proteinen, wie den PreCols (Waite *et al.*, 1998) oder Mfp-1 (Waite, 1983).

Tabelle 4-1 Aminosäurezusammensetzung der mutmaßlichen und der aus dem Byssusfaden extrahierten Catecholoxidase (Anteile in Molprozent, n. b.: nicht bestimmt)

Aminosäure	identifizierte CO (diese Arbeit)	isolierte CO (Waite, 1985)
Ala	5,2	5,8
Arg	5,7	6,3
Asn + Asp	14,7	12,8
Cys	2,9	1,9
Gln + Glu	7,0	10,0
Gly	4,6	9,2
His	3,5	1,2
Ile	5,5	4,6
Leu	6,1	6,2
Lys	7,7	7,2
Met	2,6	1,1
Phe	4,6	4,1
Pro	5,5	6,2
Ser	6,1	7,5
Thr	4,6	6,3
Trp	1,7	n. b.
Tyr	5,5	3,6
Val	6,4	5,5

Die Proteinsequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase besitzt am aminoterminalen Ende eine Signalsequenz für eine Translokation ins endoplasmatische Retikulum. Da in der Sequenz keine entsprechenden Sequenzen für eine Retention innerhalb des sekretorischen Wegs detektiert werden konnten, ist eine Sekretion des Proteins in den extrazellulären Raum wahrscheinlich. Zu der auf die Signalsequenz folgenden, 57 Aminosäuren umfassenden aminoterminalen Expansion konnten keine bekannten homologen Sequenzen detektiert werden. Da für diesen Abschnitt nur geringe Sekundärstrukturanteile vorhergesagt werden (Abbildung 3-7), scheint dieser einen hohen Grad an Flexibilität zu besitzen. Für viele Typ-3-Kupferproteine wurde eine Aktivierung der enzymatischen Aktivitäten durch Proteolyse beobachtet (van Gelder *et al.*, 1997). Ursächlich hierfür ist dabei stets die Entfernung inhibitorischer Bereiche der Proteine, welche das aktive Zentrum gänzlich oder zum Teil blockieren. So lässt sich beispielsweise in Hämocyaninen, welche im natürlichen Zustand ausschließlich ihre Funktion der Bindung von Sauerstoff ausüben, durch Proteolyse Tyrosinase- bzw. Catecholoxidaseaktivität stimulieren (Decker und Rimke, 1998). Für viele Tyrosinasen bzw. Polyphenoloxidasen, welche im Zusammenhang mit der Melaninproduktion bzw. der Immunantwort von Arthropoden und Mollusken beschrieben wurden, stellt diese Art der Aktivierung ferner ein wichtiges Regulationskriterium dar, da diese Proteine in der Regel als inaktive Proenzyme sekretiert werden (Decker und Terwilliger, 2000; Fairhead und Thony-Meyer, 2010). Analog dazu wurde

auch für die aus dem Byssus isolierte Catecholoxidase die Aktivierung der enzymatischen Aktivität durch Proteolyse beschrieben, da ein entsprechendes inaktives Proenzym aus dem Muschelfuß isoliert und nach Behandlung mit Chymotrypsin aktiviert werden konnte (Waite, 1985). Aufgrund der möglichen Flexibilität der aminoterminalen Expansion besitzt diese den Charakter einer solchen Prosequenz und die Aktivierung des Enzyms durch ihre Abspaltung wäre denkbar. Zudem finden sich im Bereich der aminoterminalen Grenze der katalytischen Domäne einige Schnittstellen für Chymotrypsin.

Neben der katalytischen Domänen und einer ggf. inhibitorisch wirksamen aminoterminalen Expansion besitzt die mutmaßliche Catecholoxidase eine zweite, carboxyterminal gelegene Domäne, welche etwa die gleiche Größe wie die katalytische Domäne besitzt. Für diesen Abschnitt wurde eine β -Faltblatt-reiche Struktur vorhergesagt (Abbildung 3-7), was der entsprechenden Domäne eine potenziell hohe strukturelle bzw. mechanische Stabilität zuweist, da β -Faltblätter oftmals stabilisierende Funktion in Strukturproteinen erfüllen (Eisoldt *et al.*, 2011; Hardy und Scheibel, 2010). Ferner befinden sich in diesem Abschnitt die meisten Cysteine der mutmaßlichen Catecholoxidase. Da diese in extrazellulären Proteinen bzw. Byssusproteinen nahezu immer in disulfidverbrückter Form vorliegen (Sun *et al.*, 2001), tragen auch diese Reste zu einer Stabilisierung der carboxyterminalen Domäne in Form möglicher intra- und intermolekularer Disulfidbrücken bei. Über die Funktion der carboxyterminalen Domäne kann lediglich spekuliert werden. Aufgrund der potenziell hohen Stabilität liegt ggf. eine strukturelle Beteiligung dieses Bereichs nahe, welcher zudem die Interaktion mit weiteren Proteinen im Byssusfaden bzw. den entsprechenden Substraten der Catecholoxidase vermitteln könnte. Das gesamte Protein könnte somit neben seiner enzymatischen Funktion auch strukturell am Aufbau des Byssusfadens beteiligt sein, wie für die Byssuscatecholoxidase bereits mehrfach postuliert wurde (Waite, 1990a, b).

Die katalytische Domäne zeigt Homologie zu Sequenzen einer Reihe strukturell und funktionell bekannter Catecholoxidasen bzw. Tyrosinasen, insbesondere im Bereich des aktiven Zentrums, welches für alle Typ-3-Kupferproteine (Tyrosinasen, Catecholoxidasen und Häemocyanine) evolutionär konserviert ist (Decker und Terwilliger, 2000). Basierend darauf konnte für diesen Sequenzabschnitt ein Homologiemodell berechnet werden (Abbildung 3-8), welches ebenfalls alle Vorgaben für eine mutmaßlich enzymatische Aktivität zu erfüllen scheint. Demnach liegen die sechs konservierten Histidinreste, welche die beiden Kupferbindestellen CuA und CuB bilden, in einer richtigen Anordnung bzw. den richtigen Abständen für eine effektive Koordination der beiden Kupferionen vor (Dokmanic *et al.*, 2008). Des

Weiteren befinden sich alle konservierten Reste der hydrophoben Schale, welche in Tyrosinasen das katalytische Zentrum auskleidet (Garcia-Borron und Solano, 2002), in entsprechenden räumlich äquivalenten Positionen. Zusätzlich besitzt auch die mutmaßliche Byssuscatecholoxidase einen konservierten Glutamatrest (E246) in räumlicher Nähe des katalytischen Zentrums, welchem eine Beteiligung als Protonenakzeptor und Protonendonator während der Substratumsetzung zugewiesen wurde (Klabunde *et al.*, 1998). Zwei der drei Cysteine innerhalb der katalytischen Domäne befinden sich in räumlicher Nähe, was eine stabilisierende Disulfidbrücke zwischen diesen Resten (C84, C159) möglich macht. Das dritte Cystein (C287) befindet sich in exponierter Lage an der Moleküloberfläche und könnte somit ebenfalls in einer intramolekularen Disulfidbrücke (z. B. mit der carboxyterminalen Domäne oder der aminoterminalen Expansion) vorliegen oder an einem intermolekularen Disulfid (zwischen zwei Catecholoxidasemolekülen oder zur Quervernetzung mit weiteren Byssusproteinen) beteiligt sein. Für einige Hämocyanine (hauptsächlich die der Mollusken) sowie manche Tyrosinasen wurde eine Thioetherbindung zwischen einem Cysteinrest und einem der Histidine des katalytischen Zentrums beschrieben (Gielens *et al.*, 1997; Ismaya *et al.*, 2011; Klabunde *et al.*, 1998; Lerch, 1982), deren Anwesenheit die Gruppe der Typ-3-Kupferproteine in zwei Subklassen unterteilt. Im Modell der mutmaßlichen Catecholoxidase liegt keiner der Cysteinreste an einer entsprechenden Position, so dass das identifizierte Enzym in diesem Zusammenhang strukturell eher den Vertebratentyrrosinasen ähnelt, als den pflanzlichen Catecholoxidasen oder Pilztyrosinasen.

Die Metallzentren aller Typ-3-Kupferproteine besitzen generell eine hohe strukturelle Homologie (Olivares und Solano, 2009). Aus diesem Grund konnten die Ursachen der Reaktionsspezifität von Catecholoxidasen für die Oxidation von Catecholen bei gleichzeitig fehlender Tyrosinhydroxylaseaktivität bislang nicht final geklärt werden. Im Falle pflanzlicher Catecholoxidasen scheint ein aromatischer Rest das katalytische Zentrum teilweise zu blockieren (Klabunde *et al.*, 1998), wodurch eines der Kupferatome für die Bindung von Monophenolen nicht zur Verfügung steht und diese aus diesem Grunde nicht umgesetzt werden können (Olivares *et al.*, 2001). Da die mutmaßliche Catecholoxidase ebenfalls ein Phenylalanin (F263) an äquivalenter Stelle besitzt, könnte dies eine Erklärung für die beobachtete Spezifität des Byssusenzym für Catechole (Waite, 1985) bieten. Die fehlende Tyrosinase- bzw. Cresolaseaktivität des Enzyms könnte ein wichtiges Regulationskriterium darstellen, da ausschließlich DOPA-Reste, jedoch keine Tyrosine in Byssusproteinen als Substrate fungieren können. Ergänzend dazu könnten weitere Regulationsmöglichkeiten der enzymatischen Aktivität durch posttranslationale Modifikationen bereitgestellt werden. Mittels bioinformatischer Me-

thoden wurden für die detektierte mutmaßliche Byssuscatecholoxidase u. a. Glycosylierungen vorhergesagt. Analog zur Vertebratentyrosinase, für die ein Einfluss von Glykanen auf ihre Aktivität beobachtet wurde (Olivares *et al.*, 2003), könnten diese auch im Byssus eine Rolle spielen. Ein weiteres auffälliges Merkmal der hier beschriebenen Catecholoxidase stellt der Austausch eines vollständig konservierten Aminosäurerests im Bereich der CuA-Bindestelle dar (Abbildung 3-6). Anders als alle bisher beschriebenen Typ-3-Kupferproteine weist die Sequenz anstatt eines Arginins, welches auf das dritte kupferbindende Histidin folgt, ein Lysin (K139) auf (WHK-Motiv anstatt eines WHR-Motives). Die starke Konservierung dieses Rests erklärt sich durch die wichtige strukturelle Beteiligung des Arginins, welches gleichzeitig eine Salzbrücke zu einem Aspartatrest der benachbarten α -Helix, und eine π -Kation-Interaktion mit einem Tryptophanrest in derselben α -Helix ausbildet (Garcia-Borrón und Solano, 2002). Durch den Austausch zu Lysin sind diese stabilisierenden Wechselwirkungen stark abgeschwächt, was zu einer Flexibilisierung der Struktur und somit evtl. ebenfalls einer Beeinflussung bzw. Steuerung der enzymatischen Funktion führen könnte.

Die detektierte Sequenz weist insgesamt einige Merkmale auf, die dem entsprechenden Protein die Funktion einer Byssuscatecholoxidase zuweisen könnten, ein finaler Identitätsbeweis ist jedoch, basierend auf den erhaltenen Daten, nicht möglich. Neben der Aktivität einer Catecholoxidase bei der chinonbasierten Gerbung des Muschelbyssus wurde die Aktivität dieser Enzyme auch im Zusammenhang mit dem Immunsystem der Muschel bzw. der dabei auftretenden Produktion von Melanin beschrieben, wobei die entsprechenden Aktivitäten Glykoproteine mit Molekulargewichten über 300 kDa zugeordnet wurden (Coles und Pipe, 1994; Renwrantz *et al.*, 1996). Ferner beschreiben einige Studien das Vorkommen von Tyrosinasen in der Muschelschale bzw. im Periostracum (Nagai *et al.*, 2007; Waite und Wilbur, 1976; Zhang *et al.*, 2006). Da auch diese Tyrosinasen bzw. Catecholoxidasen unterschiedliche Molekulargewichte besitzen, unterscheiden diese sich ebenfalls von der im Byssus aktiven Catecholoxidase (Waite, 1985). Ferner wurden, neben dem auch im Byssusfaden detektierten Enzym, weitere Proteine mit Catecholoxidaseaktivität im Muschelfuß nachgewiesen (Hellio *et al.*, 2000; Maruyama *et al.*, 1991), weswegen ggf. auch die Anwesenheit mehrerer Enzyme mit einer solchen Aktivität im Byssus möglich sein könnte, wenngleich im Rahmen dieser Arbeit trotz umfangreicher Analysen lediglich eine entsprechende Sequenz detektiert wurde. Ob die detektierte Sequenz also im direkten Zusammenhang mit Gerbungsvorgängen im Muschelbyssus steht, konnte im Rahmen dieser Arbeit, u. a. wegen fehlgeschlagener Rückfaltung des rekombinant produzierten Proteins, nicht final geklärt werden, wenngleich die Wahrscheinlichkeit dafür hoch erscheint (J. H. Waite, persönliche Kommunikation).

4.2 Struktur-/Funktionsbeziehung von PTMP1

4.2.1 Faltungsisoformen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde PTMP1 (Sun *et al.*, 2002) rekombinant in *E. coli* produziert und aus bakteriellen Inclusion Bodies gereinigt (Kap. 3.3). PTMP1 konnte anschließend verlustfrei durch Dialyse gegen wässrige Lösungen rückgefaltet werden. Trotzdem das rückgefaltete Protein gute Löslichkeit und außerordentliche strukturelle Stabilität zeigte, war die rekombinante Produktion *E. coli* in löslicher Form selbst unter Einsatz schwacher Promotoren sowie mittels periplasmatischer Expression nicht möglich. Darüber hinaus konnte die Löslichkeit des Proteins bei periplasmatischer Expression auch nicht durch Koexpression periplasmatischer Chaperone (Schlupschy *et al.*, 2006) erhöht werden. Bei der Rückfaltung entstanden neben monomerem Protein auch oligomere PTMP1-Formen (Abbildung 3-15). Diese Oligomerisierung erwies sich dabei als grundsätzlich unabhängig von der Anwesenheit von Cysteinen bzw. der Bildung intermolekularer Disulfidbrücken, da auch die cysteinfreie Variante NoCys Oligomerbildung aufwies, wohingegen die Anwesenheit von Cysteinen zu einer verstärkten Bildung oligomerer Formen führte. PTMP1 zeigt in diesem Zusammenhang ein ähnliches Verhalten wie Serumalbumin, welches ebenfalls sowohl zur Bildung disulfidverbrückter als auch disulfidunabhängiger oligomerer Formen neigt (Janatova *et al.*, 1968). Die Oligomerbildung wies eine starke Abhängigkeit von der Proteinkonzentration in den Rückfaltungsansätzen auf, sodass eine Bildung dieser Formen durch falsche intermolekulare Kontakte entsprechender vorstrukturierter Elemente wahrscheinlich ist. Ursächlich für die Bildung oligomerer Formen zeigte sich hauptsächlich die A2-Domäne, da A1 nahezu vollständig in monomerer Form rückfaltete (Abbildung 3-15). Analog dazu wies A1 im Vergleich zu A2 auch die geringere Tendenz zu Bildung von Inclusion Bodies in *E. coli* auf, so dass auch hier die Ursache für deren Bildung für das Volllängenprotein in der Faltung der zweiten Domäne zu liegen scheint.

Bei der Rückfaltung von PTMP1 bildeten sich konzentrationsunabhängig zwei stabile monomere Formen (M1 und M2) mit unterschiedlichem chromatographischen Laufverhalten bzw. hydrodynamischen Radii (Abbildung 3-16). Während die Rückfaltung und die Bildung von zwei der drei intramolekularen Disulfidbrücken relativ schnell abzulaufen scheinen, stellt die vollständige Bildung der dritten Disulfidbrücke einen eher langsamen Prozess dar (vgl. Tabelle 3-5). Final liegen sowohl M1 als auch M2 in vollständig disulfidverbrückter Form vor, weswegen die Ursache für einen unterschiedlichen hydrodynamischen Radius, nicht wie u. a.

für Lysozym beschrieben (Acharya und Taniuchi, 1977), in (noch) nicht gebildeten Disulfidbrücken zu liegen scheint. Die beiden Formen stehen zueinander in einem Faltungsgleichgewicht, welches sich bei der Rückfaltung oder bei Inkubation von Lösungen resolubilisierter Proteine einstellt. Dabei hängt die Kinetik der Umwandlung der Formen stark von der Anwesenheit intramolekularer Disulfidbrücken ab, welche die beiden Isoformen gewissermaßen fixieren. Eine ähnliche „kinetische Falle“ wurde auch für Insulin beschrieben, für das ebenfalls unterschiedlich disulfidverbrückte Isomere beschrieben wurden (Hua *et al.*, 1995).

Die Position der Disulfidbrücken in Isoform M1 konnte mittels Kristallstruktur eindeutig nachgewiesen werden. Da die Kristallisation von M2 in identischen Ansätzen aufgrund vollständiger Präzipitation des Proteins nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden für diese Isoform Disulfidbrücken bzw. freie Cysteine durch massenspektrometrische Analysen identifiziert (Kap. 3.4.1.4).

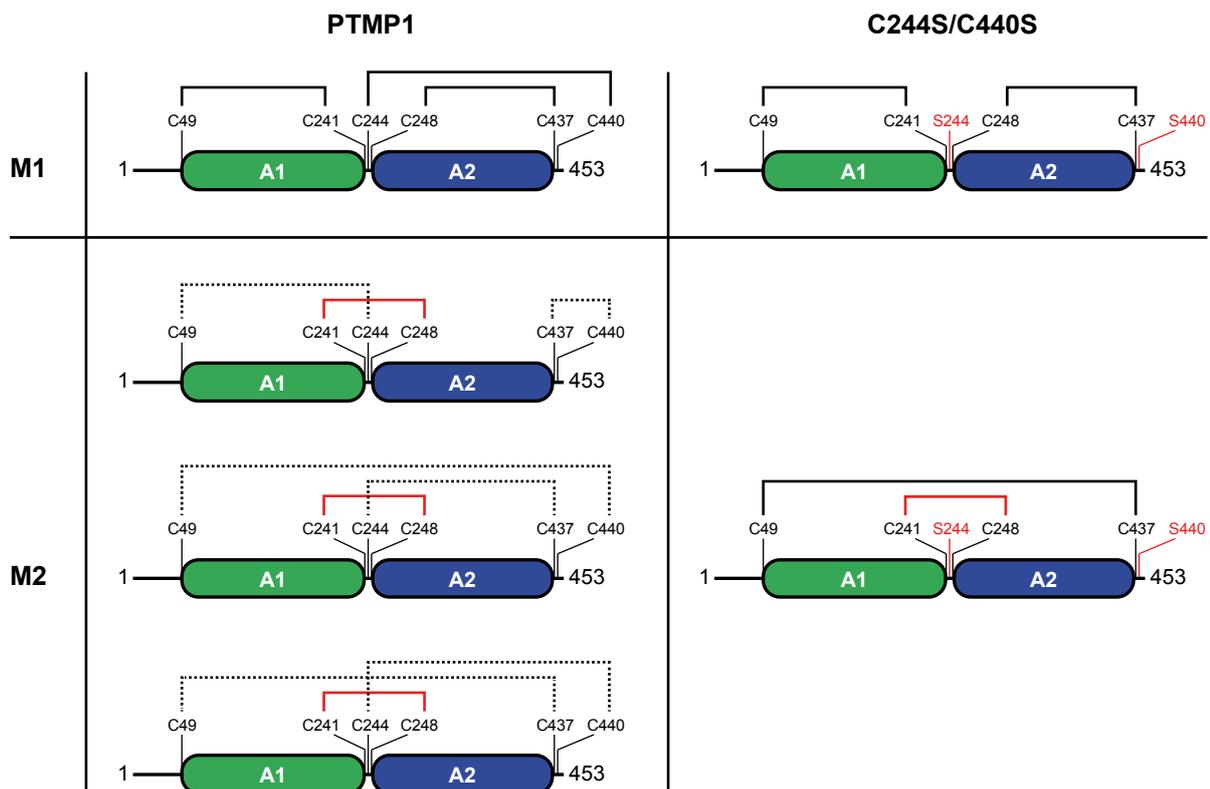


Abbildung 4-1 Disulfidverbrückung monomerer PTMP1-Isoformen

Schematische Darstellung der Disulfidverbrückung der vollständig oxidierten monomeren Isoformen M1 und M2 von PTMP1 und der Cys→Ser-Mutante C244S/C440S. Eindeutig identifizierte Disulfidbrücken sind als durchgehende Linien dargestellt (die massenspektrometrisch identifizierte rot). Kombinatorisch ermittelte Disulfidbrücken sind in Form gestrichelter Linien gezeigt.

Dabei konnte eine Disulfidbrücke von C241 nach C248 zweifelsfrei nachgewiesen werden, was die kombinatorische Gesamtzahl möglicher weiterer Disulfide auf drei (bzw. null für die C244S/C440S-Mutante) reduziert (siehe Abbildung 4-1).

Interessanterweise zeigen sowohl PTMP1 als auch die C244S/C440S-Mutante, welche zwei Cysteine weniger besitzt, nach der Rückfaltung zu den entsprechenden Zeitpunkten jeweils eine vergleichbare Anzahl freier SH-Gruppen (vgl. Tabelle 3-5). In massenspektrometrischen Analysen wurden diese freien SH-Gruppen markiert und für Isoform M2 hauptsächlich als C244, C437 und C440 identifiziert. Ergänzend dazu wurde in der unvollständig oxidierten Isoform M1 eine Disulfidbrücke von C49 zum Peptid mit C241/C244/C248 nachgewiesen, wobei die Cysteine C437 und C440 als freie SH-Gruppen identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die domänenverbindenden Disulfidbrücke in A1 (C49-C241) scheint sich demnach in M1 eher schnell zu bilden, wohingegen die Bildung weiterer Disulfidbrücken später zu erfolgen scheint. Im Faltungsisomer M2 findet statt einer Verbrückung von C49-C241 eine rasche Bildung des Disulfids zwischen den Cysteinen C241 und C248 statt, was vermuten lässt, dass diese Reste hier in räumlicher Nähe liegen. Im Vergleich dazu beträgt der Abstand dieser Reste in der M1-Kristallstruktur 23,6 Å. Die strukturellen Unterschiede zwischen M1 und M2, die sich in Fern-UV-CD- und FTIR-Spektren beider Isoformen deutlich zeigten (Kap. 3.4.3), liegen in einem unterschiedlichen Anteil an β -Faltblattstrukturen, welcher für M1 höher liegt. Die Kombination mit der beobachteten Disulfidbrücke zwischen C241 und C248 lässt darauf schließen, dass in Isoform M2 das antiparallele β -Faltblatt des domänenverbindenden Linkers nicht ausgebildet zu sein scheint.

Da die Isoform M1 kristallisiert werden konnte und beide Domänen hier die evolutionär konservierten domänenverbrückenden Disulfide enthalten, repräsentiert diese Isoform mit hoher Wahrscheinlichkeit die physiologische Form von PTMP1. Inwieweit die Isoform M2 physiologische Relevanz besitzt, ist dagegen fraglich. Die Bildung bzw. Identifikation alternativ disulfidverbrückter Isoformen wurden für verschiedene Proteine beschrieben, u. a. für Insulin oder Wachstumsfaktoren, bei denen ein Austausch von Disulfiden an der Inaktivierung der Moleküle oder ihrer Bindung an die entsprechenden Rezeptoren beteiligt sein könnten (Hober *et al.*, 1992; Hua *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 2000). Ferner wurden Disulfidisomere auch bei Antikörpern vom Typ IgG2 oder IgG4 beschrieben, welche möglicherweise Einflüsse auf die Antigenbindung nehmen oder einen möglichen Austausch von Proteinketten zwischen Antikörpermolekülen ermöglichen (Schuurman *et al.*, 2001; Wypych *et al.*, 2008). Gesetzt den Fall, dass PTMP1-Isoform M1 die einzige physiologisch relevante Isoform des Proteins dar-

stellt, ist bei der Biogenese des Byssus eine strenge Kontrolle bzw. Regulierung der Faltung des Proteins im endoplasmatischen Retikulum sekretorischer Zellen vonnöten. Dabei sollten, wie für viele sekretierte Proteine beschrieben, verschiedene Chaperone, u. a. mindestens eine Protein-Disulfidisomerase (Gruber *et al.*, 2006; Wilkinson und Gilbert, 2004), beteiligt sein.

4.2.2 Struktur und Stabilität von PTMP1

In der Kristallstruktur von PTMP1 (Abbildung 3-24) weisen beide PTMP1-Domänen eine kompakte Rossmann-Faltung auf, wie basierend auf der hohen strukturellen Homologie innerhalb der Familie der VWA-Domänen erwartet werden konnte. Im Vergleich zu bekannten Strukturen solcher Domänen wie den A-Domänen des Von-Willebrand-Faktors oder den I-Domänen von Integrinen zeigten sich die Positionen und Dimensionen der einzelnen Sekundärstrukturelemente nahezu vollständig identisch. Eine Besonderheit stellt dabei die in den PTMP1-Domänen enthaltene kurze α -Helix dar, welche im Bereich der jeweiligen MIDAS-Motive lokalisiert ist. Diese Helix wurde bislang nur vereinzelt für VWA-Domänen beschrieben, z. B. für SEC23 und SEC24, zwei Proteine des eukaryotischen Sekretionswegs (Mossessova *et al.*, 2003). Ferner wurden helikale Strukturen in diesem Bereich auch für die VWA-Domänen der DNA-Reparaturproteine Ku70 und Ku80 und des humanen Anthraxtoxinsrezeptors beschrieben (Lacy *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2001). Anders als PTMP1 bilden die entsprechenden Aminosäuren in diesen Fällen jedoch eine 3_{10} -Helix anstatt einer α -Helix. Da die Anwesenheit dieser helikalen Strukturmerkmale nicht mit speziell konservierten Sequenzen oder der Metallbindung an das MIDAS-Motiv korreliert, kann ihr derzeit keine definierte Funktion zugewiesen werden.

Beide PTMP1-Domänen befinden sich in einer „Rücken-an-Rücken“-Anordnung, verbunden durch einen Linker in Form eines antiparallelen β -Faltblattes. Neben elf Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats wird dieser Linker durch die drei Disulfidbrücken von PTMP1 stabilisiert (Abbildung 3-25). Ferner besitzen zwei der auf den gegenläufigen Strängen liegenden Aminosäuren die Fähigkeit, ein Zn^{2+} -Ion zu koordinieren und dadurch weitere Bindungen bereitzustellen (Abbildung 3-29). Diese Vielzahl an Stabilisierungen verleiht dem Linker einen hohen Grad an Rigidität, die sich u. a. darin zeigt, dass die beiden PTMP1-Domänen auch in Kristallen unterschiedlicher Raumgruppen und somit verschiedenen Kristallkontakten eine nahezu identische Orientierung einnehmen. Daneben bilden die beiden Domänen nur wenige weitere Kontakte aus, da ihre Kontaktfläche lediglich maximal fünf zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen aufweist. Diese nichtkovalenten Interdomänenkontakte reichen u. a. nicht aus, ein stabiles Heterodimer aus den beiden isolierten Domänen zu ermöglichen (Abbildung

3-16). Ferner wiesen die isolierten Domänen signifikant reduzierte Stabilitäten gegenüber thermischer und chemischer Denaturierung auf als Proteine mit beiden Domänen (Kap. 3.4.4), was die Wichtigkeit einer kovalenten Verbindung von A1 und A2 in der vorliegenden Form untermauert. Die beobachtete spezielle Anordnung zweier benachbarter VWA-Domänen konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden. Zwar wurden bislang mehrere Proteine mit Tandemanordnungen zweier oder mehrerer VWA-Domänen beschrieben, wie Cochlin, Vitrin oder Kollagen VI (Whittaker und Hynes, 2002), die jeweiligen räumlichen Orientierungen der Domänen sind dabei jedoch nicht bekannt. Da die Anzahlen der Aminosäuren zwischen den jeweiligen Domänen in etwa der zwischen den PTMP1-Domänen entsprechen, könnte die Struktur von PTMP1 als generelles Modell für die räumliche Anordnung solcher Multi-VWA-Domänenproteine dienen.

Für PTMP1 wurden in einem mit Zinkchlorid inkubierten Kristall die Bindung zweier Zn^{2+} -Ionen nachgewiesen, eines davon wie beschrieben im Bereich des Domänenlinkers, eines an das MIDAS-Motiv der A1-Domäne (Abbildung 3-29). Die Bindungslängen und Koordinationszahlen beider Bindungen erwiesen sich dabei als konsistent mit der Bindung von Zn^{2+} an andere Proteine (Dokmanic *et al.*, 2008). Ein Vergleich der homologen Strukturen der A1-Domäne von PTMP1, der A3-Domäne des humanen Von-Willebrand-Faktors sowie der I-Domäne von Integrin $\alpha 2$ zeigt, dass die MIDAS-Motive der Integrine und PTMP1 sich stark ähneln (Abbildung 4-2). Die A3-Domäne des Von-Willebrand-Faktors dagegen zeigt signifikante Abweichungen, die eine Bindung von Ionen in der für die Integrine und PTMP1 detektierten Form unmöglich machen. Ursächlich dafür ist eine strukturbedingte Verschiebung der Aminosäuren um eine Position, wodurch an die Stelle eines metallkoordinierenden Asparatrestes ein Threonin tritt (Bienkowska *et al.*, 1997).

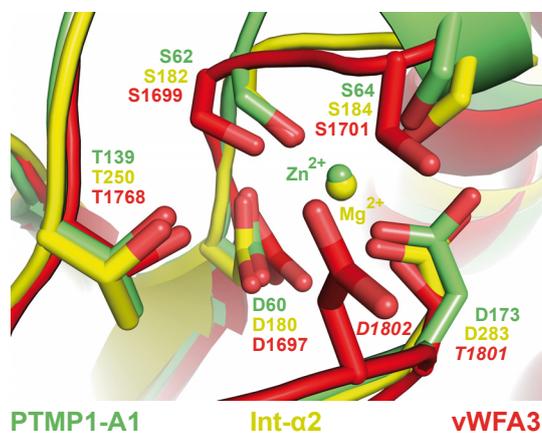


Abbildung 4-2 Vergleich der MIDAS-Motive von PTMP1, Integrin $\alpha 1$ und des Von-Willebrand-Faktors

Detailansicht einer Überlagerung der Kristallstrukturen der A1-Domäne von PTMP1 (grün) mit gebundenem Zn^{2+} -Ion, der I-Domäne von Integrin $\alpha 2$ (PDB 1AOX, gelb) mit gebundenem Mg^{2+} -Ion und der A3-Domäne des humanen Von-Willebrand-Faktors (PDB 1Atz, rot) im Bereich des MIDAS-Motivs. Entsprechende Aminosäurereste sind als Stäbchen dargestellt und annotiert.

Für das MIDAS-Motiv der A2-Domänen von PTMP1 konnte im Vergleich zu A1 keine Zinkbindung beobachtet werden, obwohl auch diese Domäne alle für eine effektive Metallbindung benötigten Aminosäurereste besitzt und somit die strukturellen Vorgaben für eine effektive Koordination erfüllt. Eine Bindung von Metallionen mit damit einhergehenden strukturellen Veränderungen/Umlagerungen wurde auch für strukturell wesentlich stärker von der in Integrinen beobachteten Form abweichende MIDAS-Motive postuliert bzw. nachgewiesen (Lacy *et al.*, 2004; Monferran *et al.*, 2004), sodass unter bestimmten Umständen auch eine Bindung ggf. anderer, im Rahmen dieser Arbeit nicht getesteter Metallionen an das A2-MIDAS-Motiv denkbar wäre.

PTMP1 erwies sich als außerordentlich stabil gegenüber thermischer Denaturierung, da das Protein bei hohen Temperaturen und unter alkalischen Bedingungen sowohl im oxidierten als auch reduzierten Zustand weder entfaltete noch aggregierte oder oligomere Spezies bildete (Kap. 3.4.4). Unter sauren Bedingungen zeigte sich PTMP1 dagegen destabilisiert, wobei sich unter diesen Bedingungen, ein stabilisierender Effekt der intramolekularen Disulfidbrücken zeigte. In natürlichen Byssusfäden wurde für viele an Bildung oder Reifung beteiligte Prozesse eine Abhängigkeit vom pH-Wert beobachtet. Im Falle der PreCols konnte gezeigt werden, dass diese nur unter basischen Bedingungen assemblieren (Harrington und Waite, 2008a). Ferner zeigen auch metallionenvermittelte Protein-/Protein-Interaktionen (Holten-Andersen *et al.*, 2011) oder die Deamidierung der TMPs (Sagert und Waite, 2009) eine starke pH-Abhängigkeit. In gleicher Weise könnte auch die beobachtete pH-Abhängigkeit der strukturellen Stabilität von PTMP1 physiologisch relevant sein. In Drüsensekreten, welche durch ein schwach saures Milieu (~pH 5,5) repräsentiert sind (Mellman *et al.*, 1986), besitzt PTMP1 demnach eine gewisse strukturelle Flexibilität. Nach dem Übergang in eine basische Umgebung, wie im Meerwasser meistens gegeben, besitzt das Protein eine hohe Stabilität, was wiederum die mechanischen Eigenschaften bzw. die kollagenbindende Funktion des Proteins (s. u.) signifikant beeinflussen könnte.

Die drei Disulfidbrücken von PTMP1 tragen nicht zu gleichen Teilen zur strukturellen Stabilität des Proteins bei, was die Analyse entsprechender Cys→Ser-Mutanten deutlich zeigt. Während sich unter alkalischen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in den thermischen Stabilitäten detektieren ließen, zeigten unter sauren Bedingungen nur Proteine Stabilität, welche intakte domänenverbrückende Disulfide (C49-C241, C248-C437) enthielten, wohingegen bei deren Fehlen (Reduktion oder NoCys-Mutante), die entsprechenden Proteine beim Erhitzen aggregierten (Abbildung 3-35, Abbildung 3-36). In gleicher Weise wiesen die isolierten

Domänen nach Reduktion der entsprechenden Disulfidbrücken eine niedrigere thermische Stabilität auf als im oxidierten Zustand. Die dritte im Zentralbereich des Domänenlinkers gelegene Disulfidbrücke (vgl. Abbildung 3-25) spielt somit für die strukturelle Stabilität von PTMP1 nur eine untergeordnete Rolle.

Analog zur thermischen Stabilität wirkten sich die in PTMP1 vorhandenen Disulfidbrücken auf die Denaturierung des Proteins mit Guanidiniumhydrochlorid aus (Abbildung 3-37). Während PTMP1 und die C244S/C440S-Mutante hier vergleichbare Stabilitäten aufwiesen, zeigte sich die NoCys-Variante strukturell stark destabilisiert und aggregierte darüber hinaus bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen irreversibel. Analog dazu verhielten sich auch hier die beiden isolierten Domänen, welche sich bei Reduktion ebenfalls signifikant instabiler erwiesen, was erneut die Bedeutung der domänenverbindenden Disulfidbrücken deutlich macht. Dabei tragen beide Domänen in ähnlicher Weise zur gesamten Stabilität von PTMP1 gegenüber GdmCl bei, da für beide isolierten Proteine jeweils ein Entfaltungsintermediat detektiert werden konnte, analog zu anderen Multi-VWA-Domänen-Proteinen wie dem Von-Willebrand-Faktor (Auton *et al.*, 2007).

4.2.3 Funktionelle Rolle von PTMP1 im Muschelbyssus

4.2.3.1 Kollagenbindung

Wie bereits für das aus dem Byssusfaden extrahierte Protein gezeigt (Sun *et al.*, 2002), bindet auch das im Rahmen dieser Arbeit analysierte rekombinant produzierte PTMP1 mit hoher Affinität an Kollagen. Dabei wurden sowohl mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Abbildung 3-38) als auch mittels statischer ELISA-ähnlicher Tests (Abbildung 3-39) Dissoziationskonstanten im submikromolaren Bereich ermittelt, wobei alle getesteten Kollagentypen (I-V) ähnlich stark gebunden wurden. Die Affinitäten liegen in einem ähnlichen Bereich wie die anderer kollagenbindender Proteine mit VWA-Domänen wie Integrine, der Von-Willebrand-Faktor oder Matrilin (Fresquet *et al.*, 2007; Pareti *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 2000). Alle verwendeten Kollagene besitzen eine hauptsächlich tripelhelikale Struktur sowie generell einen Überschuss positiv geladener Aminosäuren ($pI=7-10$), insbesondere im Bereich besagter tripelhelikaler Regionen. Der isoelektrische Punkt von PTMP1 liegt im schwach sauren Bereich ($pI=5,9$), was unter neutralen oder schwach alkalischen Bedingungen ionische Wechselwirkungen mit den basischen Kollagenen, vergleichbar mit bekannten Prozessen wie

komplexer Koazervation (Waite *et al.*, 2005), wahrscheinlich macht. Darüber hinaus weist PTMP1 auf seiner Moleküloberfläche negative Ladungscluster auf (Abbildung 3-27), welche mit den entsprechenden positiven Ladungen in den Kollagenen wechselwirken könnten. Auch die Byssuskollagene (PreCols) stellen generell basische Proteine dar (Waite *et al.*, 1998). Aus diesem Grund könnte die Bindung von PTMP1 an die PreCols im natürlichen Byssusfaden durch ionische Wechselwirkungen vermittelt werden, wenngleich eine spezifische Interaktion zwischen PTMP1 und PreCol-Molekülen im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert wurden. Da PTMP1 in den Drüsen (pH ~5,5) nur eine geringe Nettoladung aufweist, sollten ionische Wechselwirkungen mit den Byssuskollagenen jedoch erst verstärkt im Faden nach dem Wechsel zu höheren pH-Werten (Meerwasser) auftreten. Die ionische Natur der Bindung von PTMP1 an Kollagen zeigt sich zudem in einer Abhängigkeit der Affinität von der Salzkonzentration (Abbildung 3-38). Bei der Bildung von Byssusfäden findet analog zur beschriebenen Erhöhung des pH-Wertes ein Wechsel von niedrigeren Salzkonzentrationen zu höheren statt, wenn die frisch gebildeten Byssusfäden nach der Sekretion ins Meerwasser entlassen werden. Differenzielle pH- und salzgesteuerte Bindeeigenschaften von PTMP1 an die Byssuskollagene könnten somit einen Beitrag zu entsprechenden Bildungs- oder Reifungsprozessen des Byssusfadens leisten. Interessanterweise bindet PTMP1 auch an das immobilisierte Peptid PPG₁₀ (Abbildung 3-39), welches unter den getesteten Bedingungen in tripelhelikaler Form vorliegt (Berisio *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 1968). Da dieses Peptid außer den terminalen Ladungen keine weiteren besitzt, liegt der Schluss nahe, dass PTMP1 ggf. in der Lage ist, auch ohne Unterstützung durch ionische Wechselwirkungen an Kollagentripelhelices zu binden. Die molekularen Ursachen dieser Bindung sind dagegen völlig unklar. Aufschluss hierbei könnte die Co-Kristallisation von PTMP1 und PPG₁₀ liefern, welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Für eine effektive Kollagenbindung ist das Vorhandensein beider VWA-Domänen von PTMP1 essenziell, da die isolierten Domänen ein wesentlich schwächeres Bindungsverhalten aufweisen als Proteine mit beiden Domänen (vgl. Abbildung 3-38, Abbildung 3-39). Darüber hinaus scheint die Bindung stark von der in der Struktur beobachteten Domänenanordnung, stabilisiert durch den antiparallelen Linker, abhängig zu sein, da auch Mischungen beider isolierter Domänen keine signifikant stärkere Bindung zeigten als die einzelnen Domänen. Der Linker zwischen den beiden VWA-Domänen könnte somit eine entscheidende Rolle als stabiles Ligament oder molekulares Scharnier spielen, welches bei Bindung von Kollagenmolekülen den A1/A2/Kollagen-Komplex vermittelt oder stabilisiert. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu dem für PTMP1 postulierten Modell, in dem das Protein mit jeder seiner Do-

mänen ein Kollagenmolekül oder eine Kollagenfibrille bindet und diese somit quervernetzen kann (Waite *et al.*, 2002).

Analog zum aus dem Byssusfaden isolierten Protein (Sun *et al.*, 2002) konnte auch für das rekombinant produzierte PTMP1 keine essenzielle Abhängigkeit der Kollagenbindung von zweiwertigen Metallionen nachgewiesen werden (Abbildung 3-40). In diesem Zusammenhang unterscheidet sich PTMP1, trotz hoher struktureller Ähnlichkeit, stark von den Integrinen, für deren Kollagenbindungsverhalten zweiwertige Metallionen, welche an die entsprechenden MIDAS-Motive gebunden sind, notwendig sind (Emsley *et al.*, 2000). Von verschiedenen getesteten Metallionen zeigte sich ausschließlich in Anwesenheit von Zinkchlorid für PTMP1 ein geringer affinitätssteigernder Effekt gegenüber Kollagen. Interessanterweise wurde auch nur für Zn^{2+} die Bindung an die A1-Domäne von PTMP1 im Kristall nachgewiesen (Abbildung 3-29), was eine mögliche Beteiligung der gebundenen Ionen an der Kollagenbindung nahelegt. Im Widerspruch dazu zeigte jedoch die A1-Domäne im isolierten Zustand keine gesteigerte Kollagenbindung in Anwesenheit vergleichbarer Konzentrationen von Zinkchlorid. Analog dazu besitzt auch die Bindung des zweiten beobachteten Zn^{2+} -Ions im Bereich des Linkers keinen direkten Einfluss auf die Affinitätssteigerung. Es scheint somit kein direkter Zusammenhang zwischen gebundenen Zn^{2+} -Ionen und der Kollagenbindung von PTMP1 wie im Falle der Integrine vorzuliegen. Wahrscheinlicher ist ein unspezifischer stimulierender Einfluss gebundener Zn^{2+} -Ionen auf die Kollagenbindung, beispielsweise durch Vermittlung zusätzlicher, im PTMP1-Kristall nicht detektierbarer ionischer Wechselwirkungen zwischen Kollagen und PTMP1. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch für Matrilin 3 beschrieben, für das ebenfalls ein affinitätssteigernder Effekt von Zink auf die Bindung von Kollagen III nachgewiesen werden konnte (Fresquet *et al.*, 2007). Über die Lokalisierung einer oder mehrerer Kollagenbindestellen im PTMP1-Molekül konnten somit im Rahmen dieser Arbeit keine definitiven Aussagen gemacht werden, auch wenn die auf der Moleküloberfläche von PTMP1 befindlichen Cluster negativer Ladungen geeignete Interaktionsflächen mit positiv geladenen Arealen in den Kollagenmolekülen darstellen könnten. Bei Integrinen bindet eine spezifische Sequenz in der Kollagentripelhelix (GFOGER, O repräsentiert 4-Hydroxyprolin) an das MIDAS-Motiv der I-Domäne, wobei die Carboxylgruppe des entsprechenden Glutamatrests im Kollagen einen der Liganden am Metallzentrum bildet (Emsley *et al.*, 2000). Im Falle der A3-Domäne des Von-Willebrand-Faktors, in welcher die Kollagenbindung MIDAS-unabhängig erfolgt, ist die entsprechende Bindestelle für Kollagen Typ III durch ein Muster von Aminosäuren auf der Moleküloberfläche charakterisiert, welches ebenfalls eine spezielle Erkennungssequenz im Kollagenmolekül erkennt (Brondijk *et*

al., 2012). Es ist anzunehmen, dass auch in den PreCol-Molekülen Sequenzen vorhanden sind, die von PTMP1 spezifisch erkannt werden können, sodass die beobachtete ionische Interaktion ggf. nur einen Teil der Kollagenbindung repräsentiert. Die Aufklärung eines exakten molekularen Bindungsmechanismus von PTMP1 an die Byssuskollagene bzw. Lokalisierung entsprechender Bindestellen stellen daher zentrale Fragestellungen für künftige Arbeiten auf diesem Gebiet dar.

Neben einem affinitätssteigernden Effekt auf die Kollagenbindung könnte die Bindung von Metallionen an PTMP1 weitere Funktionen erfüllen. Bemerkenswert ist, dass im Falle der MIDAS-gebundenen Metallionen drei Koordinationsstellen mit Wassermolekülen besetzt sind, was die unvollständigen Besetzungen der entsprechenden Bindestelle erklärt. Analog dazu befindet sich auch in der zweiten Bindestelle im Domänenlinker ein koordiniertes Wassermolekül (Abbildung 3-29). Beide Bindestellen liegen an der Moleküloberfläche und können somit durch alternative Liganden besetzt werden. Für eine solche Besetzung spricht u. a. die Beobachtung im Rahmen der Proteinreinigung, dass sowohl PTMP1 als auch die isolierten Domänen im nativen Zustand auch ohne die Anwesenheit eines His-Tags mit einer Ni-IDA-Chromatographiematrix interagierten, im denaturierten Zustand der Proteine jedoch nicht. Im Byssusfaden sind diese Stellen wahrscheinlich mit Liganden aus weiteren Byssusproteinen besetzt, wobei als physiologische Bindungspartner evtl. Histidinresten in den terminalen Bereichen der PreCols (Waite *et al.*, 1998) oder DOPA-Reste in Mfp-1 (Harrington *et al.*, 2010) in Frage kämen. Diese Interaktionen könnten somit weitere dynamische bzw. reversible Quervernetzungen der Byssusproteine bereitstellen und ggf. deren mechanische Eigenschaften beeinflussen (Harrington *et al.*, 2009). Ergänzend dazu könnten, da nahezu alle bekannten Byssusproteine mit Ausnahme von PTMP1 isoelektrische Punkte im basischen Bereich besitzen, entsprechende metallionenbasierte Interaktionen durch generelle ionische Wechselwirkungen unterstützt werden.

Die terminalen Regionen von PTMP1 besitzen einen hohen Grad an Flexibilität, da sie in der Kristallstruktur nicht aufgelöst werden konnten. Diese Regionen beeinflussen die Bindung an Kollagen, da deren Deletion ein signifikant unterschiedliches Bindungsverhalten zur Folge hat (vgl. Abbildung 3-38 und Abbildung 3-39). Eine klare Tendenz zu einer affinitätssteigernden oder inhibitorischen Wirkung der Termini konnte nicht beobachtet werden, da die beiden unterschiedlichen Messmethoden (SPR und ELISA-ähnlicher Test) gegensätzliche Ergebnisse lieferten. Den Hauptanteil an diesem Effekt dürfte die aminoternale Expansion leisten, da diese im Vergleich zu den sechs carboxyterminalen Aminosäuren 48 Reste umfasst. Diese

Expansion weist mit 25 % Prolin-, 12,5 % Valin- und 10,4 % Alaninresten eine ungewöhnliche Aminosäureverteilung auf. Ferner besitzt dieser Teil repetitiven Charakter, da sich zwei Wiederholungssequenzen mit einem Konsensus von PAVAVDPPPYQ ermitteln lassen. Insbesondere der hohe Prolingehalt deutet Einschränkungen der Flexibilität der Polypeptidkette in diesem Bereich an, die jedoch für eine definitive Positionierung im Proteinkristall nicht auszureichen scheint. Ferner gliedert sich PTMP1 mit dieser Sequenz in eine Gruppe weiterer prolinreicher Byssusproteine wie Mfp-1 oder die PreCols ein, was ggf. für eine Beteiligung der aminoterminalen Expansion an der Interaktion zwischen PTMP1 und weiteren Byssusproteinen/-komponenten sprechen könnte.

PTMP1 wurde in einer früheren Studie als Glykoprotein identifiziert (Sun *et al.*, 2002). Basierend auf der Struktur von PTMP1 können die entsprechenden Bindestellen eingegrenzt werden. Beide VWA-Domänen von PTMP1 besitzen demnach ein für N-Glycosylierung notwendiges Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequon, wobei diese in Schleifen an der Moleküloberfläche positioniert sind ($\alpha 1$ - $\beta 2$ - und $\alpha 1^*$ - $\beta 1^*$ -Schleife). Eine N-Glycosylierung an diesen Positionen ist somit möglich und wahrscheinlich. Alternativ dazu könnte auch der einzige Threoninrest (T42) der aminoterminalen Expansion glykosyliert vorliegen, wie durch den NetOGlyc-Algorithmus vorhergesagt (Julenius *et al.*, 2005). In jedem Fall scheint die Bindung von Kollagenen durch PTMP1 nicht durch Glykane bedingt zu sein, da auch für die rekombinante, nichtglykosylierte Variante die Kollagenbindung nachgewiesen werden konnte und die Affinität für Kollagen sich nicht von denen des natürlichen PTMP1 (Sun *et al.*, 2002) unterscheidet.

4.2.3.2 Einfluss auf die Kollagenassemblierung

Die Assemblierung von Kollagen wird durch die Anwesenheit von PTMP1 signifikant beeinträchtigt, wie in mikroskopischen Analysen *de novo* aus gelöstem Kollagen I gebildeter Fibrillen demonstriert werden konnte (Abbildung 3-43). Dabei verhindert die Bindung von PTMP1 an die Kollagenmoleküle die Bildung geordneter geradliniger Fasern und führt zur Bildung kürzerer, dünnerer und ungeordneterer Fibrillen. Zusätzlich wirkt sich die Anwesenheit von PTMP1 signifikant auf die beschriebene Assemblierung bzw. gerichtete Ablagerung vorgeformter Kollagenfibrillen auf mineralischen Oberflächen (Jiang *et al.*, 2004) aus (Abbildung 3-42). In analoger Weise könnte PTMP1 auch im nativen Byssus bei der Regulation der Assemblierung der PreCols wirken. Da PTMP1 exklusiv im proximalen Teil des Byssusfadens nachgewiesen wurde (Sun *et al.*, 2002), stellen dabei ggf. PreCol-P und PreCol-NG die hauptsächlichen Interaktionspartner von PTMP1 dar. In mikroskopischen Studien

wurden eindeutige Unterschiede in der Morphologie der Kollagenfibrillen im proximalen und distalen Teil beschrieben (Bairati und Vitellaro-Zuccarello, 1976). Während die Fibrillen im distalen Fadenteil dicht gebündelt und gerade ausgerichtet vorliegen, sind diese im proximalen Teil zwar gerichtet, jedoch wesentlich lockerer angeordnet, wobei die einzelnen Fibrillen eine sinusförmige Gestalt aufweisen. Darüber hinaus sind die Fibrillen im proximalen Abschnitt von einer ausgeprägten im Transmissionselektronenmikroskop hell erscheinenden (elektronendurchlässigen) Matrix umgeben (Bairati und Vitellaro-Zuccarello, 1976). Diese Matrix zeigt eine granuläre Substruktur, die in ihrem Aussehen den im Rahmen dieser Arbeit von PTMP1 aufgenommenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen ähnelt (vgl. Abbildung 3-43). Der Vergleich der im Byssus detektierten Morphologien der unterschiedlichen Fibrillen mit denen in Ab- und Anwesenheit von PTMP1 *in vitro* gebildeten legt den Schluss einer Beteiligung von PTMP1 an der Assemblierung der Byssuskollagene nahe (Abbildung 4-3).

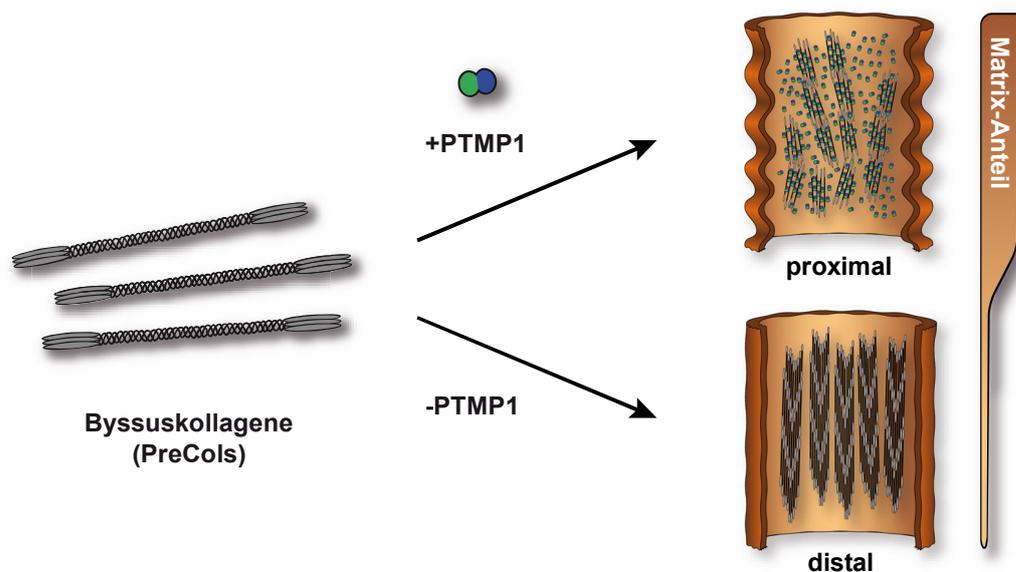


Abbildung 4-3 Schematische Darstellung der Funktion von PTMP1 im Byssusfaden

PTMP1, welches nur im proximalen Teil des Byssus detektiert wurde, beeinflusst die Assemblierung der PreCols zu den entsprechenden Fibrillen durch Anlagerung an einzelne Moleküle oder Fibrillen. Im distalen Teil, in dem PTMP1 fehlt, erscheinen die Fibrillen dichter gepackt und regelmäßiger angeordnet. Der Matrixanteil ist, mitunter bedingt durch PTMP1, im proximalen Teil wesentlich höher als im distalen.

Eine Rolle der Matrixproteine bei der Regulation der Fibrillendimensionen, evtl. durch Beeinflussung der Vororientierung bzw. Löslichkeit der PreCols in den sekretorischen Vesikeln, wurde bereits früher formuliert (Sagert und Waite, 2009). Diese Annahmen basierten auf Experimenten mit artifiziell aus isolierten PreCols gebildeten Fibrillen, welche große morphologische Unterschiede zu den natürlichen Byssusfäden aufwiesen (Harrington und Waite, 2008a, 2009). Mittels der hier beschriebenen Beobachtungen zum Einfluss von PTMP1 auf

die Kollagenassemblierung, v. a. für den proximalen Byssusteil, konnte dieses Modell bestätigt bzw. erweitert werden. Ergänzend dazu wurden auch Effekte anderer VWA-Domänen-Proteine wie Matrilin 3 auf die Assemblierung von Kollagen beschrieben (Otten *et al.*, 2010), wenn sich auch die Auswirkungen in diesem Fall nicht so ausgeprägt erwiesen wie für PTMP1. Die Regulation von Struktur und Assemblierung von Kollagenfibrillen durch Tandem- bzw. Multi-VWA-Domänen-Proteine stellt somit möglicherweise einen generellen Mechanismus der Funktion solcher Proteine dar, insbesondere im Bereich der extrazellulären Matrix, in der sowohl Kollagene als auch VWA-Domänen-Proteine ubiquitär auftreten.

Die große Abundanz von PTMP1 im proximalen Byssusteil in Kombination mit der beobachteten starken Bindung an Kollagen bzw. dem Einfluss von PTMP1 auf die Assemblierung der PreCols im Byssus legt ferner einen signifikanten Einfluss des Proteins auf die mechanischen Eigenschaften dieses Fadenabschnitts nahe. Darüber hinaus könnten in einer zur Morphologie analogen Weise auch die differenziellen Eigenschaften der entsprechenden proximalen und distalen Byssusteile durch PTMP1 gesteuert bzw. beeinflusst werden. Während der PTMP1-freie distale Teil eine hohe Steifigkeit aufweist, zeichnet sich der proximale Teil, in dem PTMP1 lokalisiert werden konnte, durch Elastizität aus (Bell und Gosline, 1996). Diese Eigenschaften wurden bislang ausschließlich den in beiden Teilen hauptsächlich detektierten unterschiedlichen PreCols, genauer gesagt den die Kollagendomäne flankierenden Regionen, zugeordnet (Coyne *et al.*, 1997; Hagenau *et al.*, 2011; Harrington *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 1997). Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Einfluss von PTMP1 auf die Morphologie gebildeter Kollagenfibrillen deutet jedoch auch eindeutig auf einen signifikanten Beitrag der Matrixproteine auf die Integrität und somit auch die mechanischen Eigenschaften des Byssusfadens hin. Artifiziiell aus isolierten PreCols gebildete Fäden weisen signifikante Unterschiede in ihrem mechanischen Verhalten zu natürlichen Byssusfäden auf (Harrington und Waite, 2008a, 2009) und es wurde den in diesen Fasern fehlenden Matrixproteinen eine Rolle als „Schmiermittel“ für die Kollagenfibrillen zugewiesen (Sagert und Waite, 2009). Die hohe Stabilität der PTMP1-Struktur und starke Affinität gegenüber Kollagenen zeichnet, in Kombination mit einer hohen PTMP1-Konzentration im proximalen Fadenteil, ein gänzlich anderes Bild von dessen Funktion. PTMP1 könnte demnach mehrere Rollen einnehmen, die, je nach Reifungsgrad des Byssus bzw. mechanischer Belastung, unterschiedliche Ausprägung finden. Unter relaxierten Bedingungen bindet PTMP1 (in Abhängigkeit von physikalischen Parametern wie pH-Wert und Ionenstärke) an die Byssuskollagene und separiert die Moleküle bzw. Fibrillen voneinander. Bei mechanischer Belastung kommt die starke Kollagenbildung zum Tragen und PTMP1 als Haftvermittler verleiht dem System Stabilität und Integrität, wo-

bei das Ausreißen von Fibrillen aus dem Fibrillen/Matrix-Verbund und ein Versagen der Struktur auf mikroskopischer Ebene verhindert werden. In analoger Weise könnte die bislang experimentell nicht nachgewiesene Bindung weiterer Byssuskomponenten zu diesen Funktionen beitragen. Durch diese Funktion als Haftvermittler könnte PTMP1 auch an der für den proximalen Fadenteil beschriebenen Versteifung bei zyklischer Belastung beitragen (Sun *et al.*, 2001; Waite *et al.*, 2002).

4.3 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten zu Struktur und Funktion von PTMP1 und einer mutmaßlichen Catecholoxidase des Muschelbyssus von *M. galloprovincialis* liefern einen Beitrag zum Verständnis der Struktur-/Funktionsbeziehung dieser Proteine und ihre mutmaßliche Rolle im Byssus. Des Weiteren bieten diese Informationen die Basis für eine technische Verwendung der einzelnen Proteine. Basierend auf der Sequenz der mutmaßlichen Catecholoxidase könnte deren rekombinante Produktion Möglichkeiten für eine Vielzahl industrieller Applikationen im Bereich bioadhäsiver Klebstoffe oder weiterer medizintechnischer Anwendungen bieten. Die entsprechenden DOPA-enhaltenden Byssusproteine bzw. bio-inspirierte Peptide oder Polymere wurden bislang durch Behandlung mit kommerziell erhältlicher Pilztyrosinase kovalent quervernetzt (Ito *et al.*, 1984; Marumo und Waite, 1986; Williams *et al.*, 1989; Yu und Deming, 1998). Die Verwendung einer substrat- und reaktionsspezifischen Catecholoxidase würde in diesem Zusammenhang eine wesentlich zielgerichteter und spezifischere Einführung der oxidativen Modifikationen erlauben, sodass z. B. DOPA-Reste (bzw. Catechole), jedoch keine Tyrosine (bzw. Monophenole) umgesetzt werden könnten. Ferner zeigt die Pilztyrosinase eine hohe Präferenz für niedermolekulare Substrate (z. B. Tyrosin), bei gleichzeitig schwacher Umsetzung von Phenolen in Makromolekülen (Cha *et al.*, 2009; Taylor, 2002), was den Einsatz eines proteinspezifischen Enzyms rechtfertigen könnte. Diese Spezifität eignet sich gleichsam auch für den Einsatz im Bereich der Biosensorik, in welcher Tyrosinasen bereits erfolgreich eingesetzt werden (Berenguer *et al.*, 1989; Fiorentino *et al.*, 2010).

Auch PTMP1 besitzt aufgrund der hier beschriebenen Fähigkeit zur Beeinflussung der Kollagenassemblierung eine materialwissenschaftliche Relevanz. Der Byssusfaden, insbesondere dessen proximaler Abschnitt, lässt sich in diesem Kontext als faserverstärkter Verbundwerkstoff interpretieren (Sun *et al.*, 2001), wobei die Byssuskollagenfasern in einer hauptsächlich

aus PTMP1 bestehenden Matrix eingebettet vorliegen. Analog zu synthetischen Verbundwerkstoffen liefert die Matrix dabei einen entscheidenden Beitrag zur Integrität des Materials sowie zu seinen mechanischen Eigenschaften (Cahn *et al.*, 2005). Im vorliegenden Fall ist v. a. die Elastizität des proximalen Byssusabschnitts und damit verbundene hohe Energieaufnahme-fähigkeit (Zähigkeit) von Bedeutung, welche mit der synthetischer Fasern wie Nylon oder Kevlar verglichen werden kann (Gosline *et al.*, 2002). Gleichsam stellt PTMP1 ein neues Modellsystem kollagenbindender Proteine dar, welches eine breite Palette von Möglichkeiten zur Steuerung von Kollagenassemblierung und somit auch den mechanischen Eigenschaften von Fibrillen bieten könnte. Die Möglichkeit, neben PTMP1 auch die Byssuskollagene oder davon inspirierte artifizielle Kollagene rekombinant herzustellen, erweitert das Spektrum potenzieller Anwendungen dieser neu geschaffenen bio-inspirierten Materialien (Hagenau und Scheibel, 2010). Beispiele wären die Erzeugung von graduell verteilten mechanischen Eigenschaften in Polymeren oder biopolymerbasierten Materialien (Claussen *et al.*, 2012a; Claussen *et al.*, 2012b) oder die Steuerung der mechanischen Eigenschaften von Kollagen-Netzwerken, z. B. im Bereich biomedizinischer Anwendungen wie des *Tissue Engineering* (Cen *et al.*, 2008; Hulmes, 2008; Piechocka *et al.*, 2011). Die hohe strukturelle Stabilität von PTMP1 stellt dabei eine wichtige Voraussetzung dar. Ergänzend dazu lassen sich PTMP1 bzw. Mutanten einfach reinigen und ggf. auch kristallisieren, was die Möglichkeit der Analyse molekularer Interaktionen von Tandem-VWA-Domänen-Proteinen und Kollagenen bieten könnte. Da VWA-Domänen-Proteine neben einer hohen strukturellen Homologie nur geringe Sequenzidentitäten aufweisen, besitzt PTMP1 ggf. einen hohen Spielraum für Variationen von Aminosäuren an der Moleküloberfläche, ohne dabei die globale Struktur signifikant zu verändern. Die Struktur von PTMP1 könnte somit ein geeignetes Templat für Protein-Engineering darstellen (Banta *et al.*, 2010; Brannigan und Wilkinson, 2002). Insgesamt tragen die in dieser Arbeit beschriebenen Grundlagen zu Struktur und Funktion von PTMP1 zum Grundverständnis kollagenbindender Matrixproteine bei und eröffnen eine Vielzahl von Möglichkeiten technischer Anwendungen dieser Proteine.

5 Zusammenfassung

Marine Muscheln der Gezeitenzone, wie die Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis*, haften mittels eines Byssus am Untergrund. Der Muschelbyssus besteht aus einzelnen Fäden, welche aufgrund von Strömungen und Wellengang extremen mechanischen Belastungen ausgeliefert sind und aus diesem Grund eine hohe Energieaufnahmefähigkeit besitzen. Unter anderem dieser Umstand macht die Byssusfäden zu einem interessanten biologischen Material. Byssusfäden gliedern sich in drei morphologisch unterscheidbare Abschnitte mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften, einen elastischen proximalen Teil, einen distalen Teil mit hoher Steifigkeit und einen adhäsiven Plaque, welcher die Substratbindestelle darstellt. Der Byssus besteht fast ausschließlich aus Proteinen, wovon wiederum ein großer Teil des Fadens durch fibrilläre Kollagene repräsentiert ist, welche in eine Proteinmatrix eingebettet sind.

Nahezu alle Proteine des Byssusfadens weisen z. T. einen hohen Grad an posttranslationalen Modifikationen auf, allen voran die Hydroxylierung von Tyrosinen zu 3,4-Dihydroxyphenylalaninen (DOPA). Diese Reste nehmen eine Schlüsselrolle für die kohäsiven und adhäsiven Eigenschaften der Byssusproteine ein. Ferner spielt die Oxidation von DOPA zum entsprechenden o-Chinon eine wichtige Rolle bei der Quervernetzung der Proteine im Zuge der Reifung bzw. chinonbasierter Gerbung (*quinone tanning*) der Fäden. Diese Reaktion wird von einer im Byssusfaden detektierten Catecholoxidase katalysiert, von der bis dato jedoch keine Aminosäuresequenz bekannt war. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Sequenz einer solchen mutmaßlichen Byssuscatecholoxidase in einer cDNA-Bank des Muschelfußes identifiziert und eingehend bioinformatisch hinsichtlich Lokalisierung und potenzieller Tertiärstruktur charakterisiert. Das entsprechende Protein weist einige Charakteristika auf, die die Identität mit einer von J. H. Waite aus dem Byssusfaden isolierten Catecholoxidase wahrscheinlich machen. Neben einer katalytischen Domäne, welche Homologie zu bekannten Catecholoxidasen bzw. Tyrosinasen aufweist, zeigt das Protein ferner weitere spezielle Bereiche, die eine strukturelle Beteiligung des Proteins am Byssusfaden nahelegen.

Den Hauptteil der Arbeit stellt die Analyse eines der bekannten Matrixproteine dar, des Proximalen Fadenmatrixproteins 1 (PTMP1), welches zwei Von-Willebrand-Faktor Typ A-ähnliche (VWA) Domänen besitzt. Hierzu wurde zunächst die Sequenz von PTMP1 aus einer cDNA-Bank des Muschelfußes isoliert und kloniert. Anschließend erfolgte die heterologe Expression und rekombinante Produktion des Proteins und einiger davon abgeleiteten Varianten in *E. coli*. Da alle Proteine in Form unlöslicher bakterieller Inclusion Bodies gebildet wurden, erfolgten die Etablierung einer Reinigungs- und Rückfaltungsstrategie sowie die chroma-

tographische Analyse und spektroskopische Charakterisierung. Dabei wies PTMP1 zwei monomere Isoformen mit unterschiedlicher Disulfidverbrückung auf. Die Kristallstruktur von PTMP1, welche die erste bekannte Kristallstruktur eines Byssusproteins darstellt, zeigte eine neuartige Anordnung der beiden VWA-Domänen, welche dabei durch einen hochgradig stabilisierten Linker verbunden sind. Ferner konnte im Kristall die Bindung zweier Zn^{2+} -Ionen an PTMP1 nachgewiesen werden, wobei jedoch nur das MIDAS-Motiv der A1-Domäne von PTMP1, jedoch nicht das der A2-Domäne diese Bindung aufwies. Die zweite Bindestelle wurde stattdessen im Bereich des Domänenlinkers detektiert. PTMP1 wies eine außergewöhnliche strukturelle Stabilität auf, insbesondere gegenüber thermischer Denaturierung. Die zuvor postulierte Fähigkeit von PTMP1 zur Bindung von Kollagenen konnte bestätigt und vertiefend analysiert werden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Bindung von der Ionenstärke, sodass von elektrostatischen Interaktionen zwischen PTMP1 und Kollagen ausgegangen werden kann. Darüber hinaus besitzt PTMP1 die Fähigkeit zur Bindung tripelhelikaler kollagenartiger Strukturen. Die geordnete Assemblierung präformierter Kollagenfibrillen erwies sich in Anwesenheit von PTMP1 als signifikant gestört. Darüber hinaus beeinflusst PTMP1 die Bildung von Fibrillen aus löslichem Kollagen, was eine Beteiligung dieses Matrixproteins an der Assemblierung der Byssuskollagene und somit einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des proximalen Byssusfadenteils nahelegt.

6 Summary

Marine mussels of the intertidal zone like the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* firmly attach to the substrate by the byssus. This holdfast apparatus consists of single threads that are, due to waves and currents, exposed to extreme mechanical challenges and, therefore, exhibit outstanding energy dissipating capacities. This property, among others, inspires many material scientists. The threads contain three morphologically distinct sections exhibiting different mechanical properties including a proximal elastic, a distal stiff portion and an adhesive plaque mediating interactions with substrates. Byssus is almost entirely composed of proteins with the prominent part being represented by fibrillar collagens, embedded in a proteinaceous matrix.

Nearly all known byssal proteins exhibit a high degree of posttranslational modifications, above all the presence of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) residues. These moieties play a key role in cohesive and adhesive capabilities of byssal proteins. Furthermore, the oxidation of DOPA residues to the respective o-quinones induces cross-linking of byssal proteins during byssus ageing and quinone tanning of the threads. This oxidation is catalyzed by a so far unknown catechol oxidase. Here, the sequence of a putative byssal catechol oxidase was identified in a mussel foot cDNA library, and the protein derived thereof was characterized by bioinformatical tools concerning potential localization and structure. The observed protein shares some characteristics with a catechol oxidase formerly extracted from the byssus by J. H. Waite. Besides a catalytic domain which exhibits homology to known catechol oxidases or tyrosinases, the putative byssal enzyme shows additional domains that suggest a structural contribution to the byssus.

The main focus of the present work was the analysis of one known byssal matrix protein, Proximal Thread Matrix Protein 1 (PTMP1), which contains two von Willebrand factor type A-like (VWA) domains. The cDNA of PTMP1 was amplified from a cDNA library of the mussel foot and cloned. Next, the protein and several variants thereof were recombinantly produced in *E. coli*. Since the expression of all constructs lead to formation of bacterial inclusion bodies, a purification and refolding strategy was established and the refolded forms of the proteins were analyzed chromatographically and spectroscopically. Recombinant PTMP1 exhibited two monomeric isoforms that are alternatively disulfide bonded. The crystal structure of PTMP1, being the first reported crystal structure of a protein from the byssus, exhibited a novel arrangement of the two VWA domains, interconnected by a highly stabilized linker. Furthermore, two binding sites for Zn²⁺ ions could be observed, one in the MIDAS-motif

of the A1 domain and one in the inter-domain linker. PTMP1 exhibited an outstanding stability against thermal denaturation. The formerly postulated capacity of PTMP1 for collagen binding was confirmed and analyzed. Here, a significant influence of the ionic strength on binding was observed, suggesting electrostatic interactions between PTMP1 and collagens. Moreover, PTMP1 exhibited a capability of binding triple-helical collagenous structures. The ordered alignment of preformed collagen fibrils was dramatically interfered by PTMP1. Furthermore, PTMP1 influenced the assembly of fibrils reconstituted from soluble collagens, suggesting a contribution of PTMP1 during the assembly of collagens and, therefore, an influence of the protein on the mechanical properties of the byssal thread.

7 Literatur

- Acharya, A. S. und Taniuchi, H. (1977). Formation of the four isomers of hen egg white lysozyme containing three native disulfide bonds and one open disulfide bond. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2362-2366.
- Adams, E. (1978). Invertebrate Collagens. *Science* **202**, 591-598.
- Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L.-W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., *et al.* (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **58**, 1948-1954.
- Arnold, A. A., Byette, F., Séguin-Heine, M.-O., LeBlanc, A., Sleno, L., *et al.* (2012). Solid-State NMR Structure Determination of Whole Anchoring Threads from the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Biomacromolecules* **14**, 132-141.
- Auton, M., Cruz, M. A. und Moake, J. (2007). Conformational stability and domain unfolding of the Von Willebrand factor A domains. *J. Mol. Biol.* **366**, 986-1000.
- Babarro, J. M. F. und Reiriz, M. J. F. (2010). Secretion of byssal threads in *Mytilus galloprovincialis*: quantitative and qualitative values after spawning stress. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **180**, 95-104.
- Bairati, A. und Vitellaro-Zuccarello, L. (1976). The ultrastructure of the byssal apparatus of *Mytilus galloprovincialis*. IV. Observations by transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res.* **166**, 219-234.
- Bairati, A. und Vitellaro Zuccarello, L. (1974). The Ultrastructure of the Byssal Apparatus of *Mytilus galloprovincialis*. II. Observations by Microdissection and Scanning Electron Microscopy. *Mar. Biol.* **28**, 145-158.
- Bairati, A. und Zuccarello, L. V. (1974). ULTRASTRUCTURE OF BYSSAL APPARATUS OF MYTILUS GALLOPROVINCIALIS. 3. Analysis of byssus characteristics by polarized-light microscopy. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **6**, 367-379.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. und McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10037-10041.
- Banta, S., Wheeldon, I. R. und Blenner, M. (2010). Protein Engineering in the Development of Functional Hydrogels. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **12**, 167-186.
- Banu, A., Shyamasundari, K. und Rao, K. H. (1980). Histological and Histochemical-Observations on the Foot Glands in Some Byssus-Bearing Bivalves of the Waltair Coast. *Histochem. J.* **12**, 553-563.
- Bdolah, A. und Keller, P. J. (1976). Isolation of Collagen Granules from Foot of Sea Mussel, *Mytilus-Californianus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* **55**, 171-174.
- Bell, E. und Gosline, J. (1996). Mechanical design of mussel byssus: material yield enhances attachment strength. *J. Exp. Biol.* **199**, 1005-1017.
- Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B. und Berman, H. (1994). Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **266**, 75-81.
- Benedict, C. V. und Waite, J. H. (1986). Location and analysis of byssal structural proteins of *Mytilus edulis*. *J. Morphol.* **189**, 171-181.

- Bennett-Lovsey, R. M., Herbert, A. D., Sternberg, M. J. E. und Kelley, L. A. (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins Struct. Funct. Bioinformat.* **70**, 611-625.
- Berenguer, J. J., Manjon, A. und Iborra, J. L. (1989). A pH-tyrosinase biosensor for aminoacids, catecholamines and adrenergic drugs determination. *Biotechnol. Tech.* **3**, 211-216.
- Berisio, R., Vitagliano, L., Mazzarella, L. und Zagari, A. (2002). Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly)₁₀]₃. *Protein Sci.* **11**, 262-270.
- Bienkowska, J., Cruz, M., Atiemo, A., Handin, R. und Liddington, R. (1997). The von Willebrand factor A3 domain does not contain a metal ion-dependent adhesion site motif. *J. Biol. Chem.* **272**, 25162-25167.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., *et al.* (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023-1031.
- Blom, N., Gammeltoft, S. und Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351-1362.
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. und Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633-1649.
- Böhm, G., Muhr, R. und Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* **5**, 191-195.
- Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. G., Heberlein, U. A., Masiarz, F. R., *et al.* (1984). Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4642-4646.
- Brannigan, J. A. und Wilkinson, A. J. (2002). Protein engineering 20 years on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 964-970.
- Brazeo, S. L. und Carrington, E. (2006). Interspecific comparison of the mechanical properties of mussel byssus. *Biol. Bull.* **211**, 263-274.
- Brondijk, T. H. C., Bihan, D., Fardale, R. W. und Huizinga, E. G. (2012). Implications for collagen I chain registry from the structure of the collagen von Willebrand factor A3 domain complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5253-5258.
- Brown, C. H. (1950a). Quinone Tanning in the Animal Kingdom. *Nature* **165**, 275-275.
- Brown, C. H. (1950b). A Review of the Methods available for the Determination of the Types of Forces Stabilizing Structural Proteins in Animals. *Q. J. Microsc. Sci.* **s3-91**, 331-339.
- Brown, C. H. (1952). Some Structural Proteins of *Mytilus edulis*. *Q. J. Microsc. Sci.* **93**, 487-502.
- Burzio, L. A. und Waite, J. H. (2000). Cross-linking in adhesive quinoproteins: Studies with model decapeptides. *Biochemistry* **39**, 11147-11153.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. und Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* **43**, 1-9.
- Byler, D. M. und Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **25**, 469-487.

- Cahn, R. W., Haasen, P., Kramer, E. J., Chou, T. W. und Williams, D. F. (2005). Materials science and technology: a comprehensive treatment. Structure and properties of composites. Medical and dental materials (Wiley-VCH).
- Carballal, M. J., Lopez, C., Azevedo, C. und Villalba, A. (1997). Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* **70**, 96-105.
- Carrington, E. (2002a). The ecomechanics of mussel attachment: From molecules to ecosystems. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 846-852.
- Carrington, E. (2002b). Seasonal variation in the attachment strength of blue mussels: Causes and consequences. *Limnol. Oceanogr.* **47**, 1723-1733.
- Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W. und Cao, Y. (2008). Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. *Pediatr. Res.* **63**, 492-496.
- Cerenius, L. und Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 116-126.
- Cha, H. J., Hwang, D. S., Lim, S., White, J., Matos-Perez, C., *et al.* (2009). Bulk adhesive strength of recombinant hybrid mussel adhesive protein. *Biofouling* **25**, 99-107.
- Choi, B. H., Choi, Y. S., Kang, D. G., Kim, B. J., Song, Y. H., *et al.* (2010). Cell behavior on extracellular matrix mimic materials based on mussel adhesive protein fused with functional peptides. *Biomaterials* **31**, 8980-8988.
- Claus, H. und Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 3-14.
- Claus, H. und Filip, Z. (1988). Behaviour of phenoloxidases in the presence of clays and other soil-related adsorbents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 506-511.
- Claussen, K. U., Giesa, R., Scheibel, T. und Schmidt, H.-W. (2012a). Learning From Nature: Synthesis and Characterization of Longitudinal Polymer Gradient Materials Inspired by Mussel Byssus Threads. *Macromol. Rapid Commun.* **33**, 206-211.
- Claussen, K. U., Scheibel, T., Schmidt, H.-W. und Giesa, R. (2012b). Polymer Gradient Materials: Can Nature Teach Us New Tricks? *Macromol. Mater. Eng.* **297**, 938-957.
- Coles, J. A. und Pipe, R. K. (1994). Phenoloxidase Activity in the Hemolymph and Hemocytes of the Marine Mussel *Mytilus-Edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* **4**, 337-352.
- Colombatti, A., Bonaldo, P. und Doliana, R. (1993). Type A Modules: Interacting Domains Found in Several Non-Fibrillar Collagens and in Other Extracellular Matrix Proteins. *Matrix* **13**, 297-306.
- Compton, L. A. und Johnson Jr, W. C. (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* **155**, 155-167.
- Condit, C. M. und Meagher, R. B. (1986). A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature* **323**, 178-181.
- Cong, R. S., Sun, W. J., Liu, G. X., Fan, T. J., Meng, X. H., *et al.* (2005). Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* **18**, 61-70.
- Coyne, K. J., Qin, X. X. und Waite, J. H. (1997). Extensible collagen in mussel byssus: a natural block copolymer. *Science* **277**, 1830-1832.

- Coyne, K. J. und Waite, J. H. (2000). In search of molecular dovetails in mussel byssus: from the threads to the stem. *J. Exp. Biol.* **203**, 1425-1431.
- Danner, E. W., Kan, Y., Hammer, M. U., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2012). Adhesion of Mussel Foot Protein Mefp-5 to Mica: An Underwater Superglue. *Biochemistry* **51**, 6511-6518.
- Deaton, L. E., Jordan, P. J. und Dankert, J. R. (1999). Phenoloxidase activity in the hemolymph of bivalve mollusks. *J. Shellfish Res.* **18**, 223-226.
- Decker, H. und Rimke, T. (1998). Tarantula Hemocyanin Shows Phenoloxidase Activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 25889-25892.
- Decker, H. und Terwilliger, N. (2000). Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.* **203**, 1777-1782.
- Deming, T. J. (1999). Mussel byssus and biomolecular materials. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 100-105.
- Dennell, R. (1949). Earthworm Chaetae. *Nature* **164**, 370-370.
- Diederichs, K. und Karplus, P. A. (1997). Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 269-275.
- Dokmanic, I., Sikic, M. und Tomic, S. (2008). Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **64**, 257-263.
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. und Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665-W667.
- Dong, A., Huang, P. und Caughey, W. S. (1990). Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* **29**, 3303-3308.
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- Eisenhaber, B., Bork, P. und Eisenhaber, F. (1999). Prediction of Potential GPI-modification Sites in Proprotein Sequences. *J. Mol. Biol.* **292**, 741-758.
- Eisoldt, L., Smith, A. und Scheibel, T. (2011). Decoding the secrets of spider silk. *Materials Today* **14**, 80-86.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protocols* **2**, 953-971.
- Emsley, J., King, S. L., Bergelson, J. M. und Liddington, R. C. (1997). Crystal Structure of the I Domain from Integrin $\alpha 2\beta 1$. *J. Biol. Chem.* **272**, 28512-28517.
- Emsley, J., Knight, C. G., Farnsdale, R. W., Barnes, M. J. und Liddington, R. C. (2000). Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin $\alpha 2\beta 1$. *Cell* **101**, 47-56.
- Emsley, P. und Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60**, 2126-2132.

- Fairhead, M. und Thony-Meyer, L. (2010). Role of the C-terminal extension in a bacterial tyrosinase. *FEBS J.* **277**, 2083-2095.
- Fant, C., Hedlund, J., Hook, F., Berglin, M., Fridell, E., *et al.* (2010). Investigation of Adsorption and Cross-Linking of a Mussel Adhesive Protein Using Attenuated Total Internal Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR). *J. Adhes.* **86**, 25-38.
- Filpula, D. R., Lee, S. M., Link, R. P., Strausberg, S. L. und Strausberg, R. L. (1990). Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnol. Prog.* **6**, 171-177.
- Fiorentino, D., Gallone, A., Fiocco, D., Palazzo, G. und Mallardi, A. (2010). Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2033-2037.
- Fischer, B., Thomas, K. B. und Dorner, F. (1998). Collagen covalently immobilized onto plastic surfaces simplifies measurement of von Willebrand factor-collagen binding activity. *Ann. Hematol.* **76**, 159-166.
- Florioli, R. Y., von Langen, J. und Waite, J. H. (2000). Marine Surfaces and the Expression of Specific Byssal Adhesive Protein Variants in Mytilus. *Mar. Biotechnol (N. Y.)* **2**, 352-363.
- Fresquet, M., Jowitt, T. A., Ylöstalo, J., Coffey, P., Meadows, R. S., *et al.* (2007). Structural and functional characterization of recombinant matrilin-3 a-domain and implications for human genetic bone diseases. *J. Biol. Chem.* **282**, 34634-34643.
- Garcia-Borron, J. C. und Solano, F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigm. Cell Res.* **15**, 162-173.
- Gaykema, W. P. J., Hol, W. G. J., Vereijken, J. M., Soeter, N. M., Bak, H. J., *et al.* (1984). 3.2 [angst] structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein Panulirus interruptus haemocyanin. *Nature* **309**, 23-29.
- Gielens, C., De Geest, N., Xin, X.-Q., Devreese, B., Van Beeumen, J., *et al.* (1997). Evidence for a Cysteine-Histidine Thioether Bridge in Functional Units of Molluscan Haemocyanins and Location of the Disulfide Bridges in Functional Units d and g of the β c-Haemocyanin of Helix Pomatia. *Eur. J. Biochem.* **248**, 879-888.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gim, Y., Hwang, D. S., Lim, S., Song, Y. H. und Cha, H. J. (2008). Production of Fusion Mussel Adhesive fp-353 in Escherichia coli. *Biotechnol. Prog.* **24**, 1272-1277.
- Golser, A. V. (2009). Die rekombinante Produktion der kollagenartigen Byssusproteine aus Mytilus galloprovincialis in der Hefe Pichia pastoris unter Koexpression der Muschel-Prolyl-4-Hydroxylase. *Masterarbeit, Lehrstuhl für Biomaterialien, Universität Bayreuth.*
- Gosline, J., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C., *et al.* (2002). Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357**, 121-132.
- Green, K., Berdecia, R. und Cheeks, L. (1987). Mussel Adhesive Protein - Permeability Characteristics When Used as a Basement-Membrane. *Curr. Eye Res.* **6**, 835-838.
- Gruber, C. W., Čemažar, M., Heras, B., Martin, J. L. und Craik, D. J. (2006). Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 455-464.

- Haemers, S., Koper, G. J. M. und Frens, G. (2003). Effect of oxidation rate on cross-linking of mussel adhesive proteins. *Biomacromolecules* **4**, 632-640.
- Hagenau, A. (2011). Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen natürlicher Muschelbyssusfäden der Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis*. *Dissertation, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München*.
- Hagenau, A., Papadopoulos, P., Kremer, F. und Scheibel, T. (2011). Mussel collagen molecules with silk-like domains as load-bearing elements in distal byssal threads. *J. Struct. Biol.* **175**, 339–347.
- Hagenau, A. und Scheibel, T. (2010). Towards the Recombinant Production of Mussel Byssal Collagens. *J. Adhes.* **86**, 10-24.
- Hagenau, A., Scheidt, H. A., Serpell, L., Huster, D. und Scheibel, T. (2009). Structural Analysis of Proteinaceous Components in Byssal Threads of the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Macromol. Biosci.* **9**, 162-168.
- Hansen, D. C., Corcoran, S. G. und Waite, J. H. (1998). Enzymatic tempering of a mussel adhesive protein film. *Langmuir* **14**, 1139-1147.
- Hardy, J. G. und Scheibel, T. R. (2010). Composite materials based on silk proteins. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 1093-1115.
- Harrington, M. J., Gupta, H. S., Fratzl, P. und Waite, J. H. (2009). Collagen insulated from tensile damage by domains that unfold reversibly: In situ X-ray investigation of mechanical yield and damage repair in the mussel byssus. *J. Struct. Biol.* **167**, 47-54.
- Harrington, M. J., Masic, A., Holten-Andersen, N., Waite, J. H. und Fratzl, P. (2010). Iron-Clad Fibers: A Metal-Based Biological Strategy for Hard Flexible Coatings. *Science* **328**, 216-220.
- Harrington, M. J. und Waite, J. H. (2007). Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads. *J. Exp. Biol.* **210**, 4307-4318.
- Harrington, M. J. und Waite, J. H. (2008a). pH-dependent locking of giant mesogens in fibers drawn from mussel byssal collagens. *Biomacromolecules* **9**, 1480-1486.
- Harrington, M. J. und Waite, J. H. (2008b). Short Order Tendons: Liquid Crystal Mesophases, Metal-Complexation and Protein Gradients in the Externalized Collagens of Mussel Byssal Threads. In: *Fibrous Proteins*, T. Scheibel, Ed. (Austin, Landes Bioscience), S. 30-45.
- Harrington, M. J. und Waite, J. H. (2009). How Nature Modulates a Fiber's Mechanical Properties: Mechanically Distinct Fibers Drawn from Natural Mesogenic Block Copolymer Variants. *Adv. Mater.* **21**, 440-444.
- Hassenkam, T., Gutschmann, T., Hansma, P., Sagert, J. und Waite, J. H. (2004). Giant bent-core mesogens in the thread forming process of marine mussels. *Biomacromolecules* **5**, 1351-1355.
- Hellio, C., Bourgougnon, N. und Le Gal, Y. (2000). Phenoloxidase (EC 1.14.18.1) from the byssus gland of *Mytilus edulis*: Purification, partial characterization and application for screening products with potential antifouling activities. *Biofouling* **16**, 235-244.
- Hober, S., Forsberg, G., Palm, G., Hartmanis, M. und Nilsson, B. (1992). Disulfide exchange folding of insulin-like growth factor I. *Biochemistry* **31**, 1749-1756.
- Holten-Andersen, N., Fantner, G. E., Hohlbauch, S., Waite, J. H. und Zok, F. W. (2007). Protective coatings on extensible biofibres. *Nat. Mater.* **6**, 669-672.

- Holten-Andersen, N., Harrington, M. J., Birkedal, H., Lee, B. P., Messersmith, P. B., *et al.* (2011). pH-induced metal-ligand cross-links inspired by mussel yield self-healing polymer networks with near-covalent elastic moduli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2651-2655.
- Holten-Andersen, N. und Waite, J. H. (2008). Mussel-designed Protective Coatings for Compliant Substrates. *J. Dent. Res.* **87**, 701-709.
- Holten-Andersen, N., Zhao, H. und Waite, J. H. (2009). Stiff Coatings on Compliant Biofibers: The Cuticle of *Mytilus californianus* Byssal Threads. *Biochemistry* **48**, 2752-2759.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., *et al.* (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* **35**, W585-W587.
- Hua, Q.-X., Gozani, S. N., Chance, R. E., Hoffmann, J. A., Frank, B. H., *et al.* (1995). Structure of a protein in a kinetic trap. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2**, 129-138.
- Huizinga, E. G., van der Plas, R. M., Kroon, J., Sixma, J. J. und Gros, P. (1997). Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* **5**, 1147-1156.
- Hulmes, D. J. S. (2002). Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J. Struct. Biol.* **137**, 2-10.
- Hulmes, D. J. S. (2008). Vertebrate Collagens - Structures, Functions and Biomedical Applications. In: Fibrous Proteins, T. Scheibel, Ed. (Austin, Landes Bioscience), S. 12-29.
- Hwang, D. S., Gim, Y. und Cha, H. J. (2005). Expression of functional recombinant mussel adhesive protein type 3A in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **21**, 965-970.
- Hwang, D. S., Gim, Y., Yoo, H. J. und Cha, H. J. (2007a). Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151. *Biomaterials* **28**, 3560-3568.
- Hwang, D. S., Sim, S. B. und Cha, H. J. (2007b). Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide. *Biomaterials* **28**, 4039-4046.
- Hwang, D. S., Yoo, H. J., Jun, J. H., Moon, W. K. und Cha, H. J. (2004). Expression of functional recombinant mussel adhesive protein Mgf-5 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3352-3359.
- Hwang, D. S., Zeng, H., Masic, A., Harrington, M. J., Israelachvili, J. N., *et al.* (2010). Protein- and metal-dependent interactions of a prominent protein in mussel adhesive plaques. *J. Biol. Chem.* **285**, 25850-25858.
- Inoue, K. und Odo, S. (1994). The adhesive protein cDNA of *Mytilus galloprovincialis* encodes decapeptide repeats but no hexapeptide motif. *Biol. Bull.* **186**, 349-355.
- Inoue, K., Takeuchi, Y., Miki, D. und Odo, S. (1995). Mussel adhesive plaque protein gene is a novel member of epidermal growth factor-like gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 6698-6701.
- Inoue, K., Takeuchi, Y., Miki, D., Odo, S., Harayama, S., *et al.* (1996a). Cloning, sequencing and sites of expression of genes for the hydroxyarginine-containing adhesive-plaque protein of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* **239**, 172-176.
- Inoue, K., Takeuchi, Y., Takeyama, S., Yamaha, E., Yamazaki, F., *et al.* (1996b). Adhesive protein cDNA sequence of the mussel *Mytilus coruscus* and its evolutionary implications. *J. Mol. Evol.* **43**, 348-356.

- Ismaya, W. T., Rozeboom, H. t. J., Weijn, A., Mes, J. J., Fusetti, F., *et al.* (2011). Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochemistry* **50**, 5477-5486.
- Ito, S., Kato, T., Shinpo, K. und Fujita, K. (1984). Oxidation of Tyrosine Residues in Proteins by Tyrosinase - Formation of Protein-Bonded 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-S-Cysteinyl-3,4-Dihydroxyphenylalanine. *Biochem. J.* **222**, 407-411.
- Janatova, J., Fuller, J. K. und Hunter, M. J. (1968). The Heterogeneity of Bovine Albumin with Respect to Sulfhydryl and Dimer Content. *J. Biol. Chem.* **243**, 3612-3622.
- Jiang, F., Hörber, H., Howard, J. und Müller, D. J. (2004). Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes. *J. Struct. Biol.* **148**, 268-278.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**, 195-202.
- Julenius, K. (2007). NetCGlyc 1.0: prediction of mammalian C-mannosylation sites. *Glycobiology* **17**, 868-876.
- Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R. und Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* **15**, 153-164.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795-800.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983). Dictionary of Protein Secondary Structure - Pattern-Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J. und Boot-Handford, R. P. (2007). Collagens at a glance. *J. Cell Sci.* **120**, 1955-1958.
- Karlsson, R. und Fält, A. (1997). Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J. Immunol. Methods* **200**, 121-133.
- Karplus, P. A. und Diederichs, K. (2012). Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**, 1030-1033.
- Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H. und Cameron, D. G. (1981). Fourier transforms in the computation of self-deconvoluted and first-order derivative spectra of overlapped band contours. *Anal. Chem.* **53**, 1454-1457.
- Keegan, R. M. und Winn, M. D. (2007). Automated search-model discovery and preparation for structure solution by molecular replacement. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **63**, 447-457.
- Kelley, L. A. und Sternberg, M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protocols* **4**, 363-371.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C. und Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1084-1090.
- Klatt, A. R., Paulsson, M., Becker, A. K. A., Neacsu, C. D. und Wagener, R. (2011). The matrilins: Modulators of extracellular matrix assembly. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 320-330.

- Krauss, S., Metzger, T. H., Fratzl, P. und Harrington, M. J. (2013). Self-Repair of a Biological Fiber Guided by an Ordered Elastic Framework. *Biomacromolecules* **14**, 1520-1528.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567-580.
- Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A. T. und Collier, R. J. (2004). Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: An anthrax toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6367-6372.
- Lankhof, H., van Hoeij, M., Schiphorst, M. E., Bracke, M., Wu, Y. P., *et al.* (1996). A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb. Haemostasis* **75**, 950-958.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lauren, M. H. und Wilker, J. J. (2007). Synergistic effects of metals and oxidants in the curing of marine mussel adhesive. *J. Mater. Sci.* **42**, 8934-8942.
- Lee, B. P., Dalsin, J. L. und Messersmith, P. B. (2006a). Biomimetic adhesive polymers based on mussel adhesive proteins. In: *Biological Adhesives*, A. M. Smith und J. A. Callow, Edn. (Heidelberger Platz 3, D-14197 Berlin, Germany, Springer-Verlag Berlin), S. 257-278.
- Lee, B. P., Messersmith, P. B., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2011). Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41**, 99-132.
- Lee, H., Scherer, N. F. und Messersmith, P. B. (2006b). Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12999-13003.
- Lerch, K. (1982). Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* **257**, 6414-6419.
- Lin, Q., Gourdon, D., Sun, C., Holtén-Andersen, N., Anderson, T. H., *et al.* (2007). Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3782-3786.
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A. und Perez-Iratxeta, C. (2012). Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins Struct. Funct. Bioinformat.* **80**, 374-381.
- Lucas, J. M., Vaccaro, E. und Waite, J. H. (2002). A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Biol.* **205**, 1807-1817.
- Malakhov, M., Mattern, M., Malakhova, O., Drinker, M., Weeks, S., *et al.* (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 75-86.
- Marumo, K. und Waite, J. H. (1986). Optimization of Hydroxylation of Tyrosine and Tyrosine-Containing Peptides by Mushroom Tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **872**, 98-103.
- Maruyama, N., Etoh, H., Sakata, K. und Ina, K. (1991). Studies on Phenoloxidase from *Mytilus-Edulis* Associated with Adhesion. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2887-2889.

- Mascolo, J. M. und Waite, J. H. (1986). Protein gradients in byssal threads of some marine bivalve molluscs. *J. Exp. Zool.* **240**, 1-7.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H. und Sugiyama, M. (2006). Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 8981-8990.
- McDowell, L. M., Burzio, L. A., Waite, J. H. und Schaefer, J. (1999). Rotational echo double resonance detection of cross-links formed in mussel byssus under high-flow stress. *J. Biol. Chem.* **274**, 20293-20295.
- Mellman, I., Fuchs, R. und Helenius, A. (1986). Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 663-700.
- Mercer, E. (1952). Observations of the molecular structure of byssus fibres. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* **3**, 199-204.
- Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B. und Hans Hopschneider, P. (1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3642-3646.
- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**, 333-369.
- Miki, D., Takeuchi, Y., Inoue, K. und Odo, S. (1996). Expression sites of two byssal protein genes of *Mytilus galloprovincialis*. *Biol. Bull.* **190**, 213-217.
- Moeser, G. M. und Carrington, E. (2006). Seasonal variation in mussel byssal thread mechanics. *J. Exp. Biol.* **209**, 1996-2003.
- Monahan, J. und Wilker, J. J. (2004). Cross-linking the protein precursor of marine mussel adhesives: Bulk measurements and reagents for curing. *Langmuir* **20**, 3724-3729.
- Monferran, S., Muller, C., Mourey, L., Frit, P. und Salles, B. (2004). The Membrane-associated Form of the DNA Repair Protein Ku is Involved in Cell Adhesion to Fibronectin. *J. Mol. Biol.* **337**, 503-511.
- Mossessova, E., Bickford, L. C. und Goldberg, J. (2003). SNARE Selectivity of the COPII Coat. *Cell* **114**, 483-495.
- Mossessova, E. und Lima, C. D. (2000). Ulp1-SUMO Crystal Structure and Genetic Analysis Reveal Conserved Interactions and a Regulatory Element Essential for Cell Growth in Yeast. *Mol. Cell* **5**, 865-876.
- Mueller, U., Darowski, N., Fuchs, M. R., Forster, R., Hellmig, M., *et al.* (2012). Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J. Synchrotron Rad.* **19**, 442-449.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific Synthesis of DNA In vitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain-Reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Munro, S. und Pelham, H. R. B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Nagai, K., Yano, M., Morimoto, K. und Miyamoto, H. (2007). Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* **146**, 207-214.

- Naraoka, T., Uchisawa, H., Mori, H., Matsue, H., Chiba, S., *et al.* (2003). Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4026-4038.
- Niedermeyer, T. H. J. und Strohalm, M. (2012). mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra. *Plos One* **7**, e44913.
- Olivares, C., García-Borrón, J. C. und Solano, F. (2001). Identification of Active Site Residues Involved in Metal Cofactor Binding and Stereospecific Substrate Recognition in Mammalian Tyrosinase. Implications to the Catalytic Cycle. *Biochemistry* **41**, 679-686.
- Olivares, C. und Solano, F. (2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigm. Cell Melanoma Res.* **22**, 750-760.
- Olivares, C., Solano, F. und García-Borrón, J. C. (2003). Conformation-dependent Post-translational Glycosylation of Tyrosinase: REQUIREMENT OF A SPECIFIC INTERACTION INVOLVING THE CuB METAL BINDING SITE. *J. Biol. Chem.* **278**, 15735-15743.
- Olivieri, M. P., Wollman, R. M., Hurley, M. I. und Swartz, M. F. (2010). Structural and Biophysical Characterization of a Cyclic Bioadhesive with Cell Attachment Ability. *J Adhesion* **86**, 111-130.
- Ottani, V., Martini, D., Franchi, M., Ruggeri, A. und Raspanti, M. (2002). Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* **33**, 587-596.
- Otten, C., Hansen, U., Talke, A., Wagener, R., Paulsson, M., *et al.* (2010). A matrilin-3 mutation associated with osteoarthritis does not affect collagen affinity but promotes the formation of wider cartilage collagen fibrils. *Hum. Mutat.* **31**, 254-263.
- Pace, C. N. und Shaw, K. L. (2000). Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **41**, 1-7.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- Palumbo, A., di Cosmo, A., Gesualdo, I. und Hearing, V. J. (1997). Subcellular localization and function of melanogenic enzymes in the ink gland of *Sepia officinalis*. *Biochem. J.* **323**, 749-756.
- Papov, V. V., Diamond, T. V., Biemann, K. und Waite, J. H. (1995). Hydroxyarginine-containing polyphenolic proteins in the adhesive plaques of the marine mussel *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 20183-20192.
- Pareti, F. I., Niiya, K., McPherson, J. M. und Ruggeri, Z. M. (1987). Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J. Biol. Chem.* **262**, 13835-13841.
- Patterson, A. L. (1934). A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Physical Review* **46**, 372-376.
- Perbandt, M., Guthöhrlein, E. W., Rypniewski, W., Idakieva, K., Stoeva, S., *et al.* (2003). The Structure of a Functional Unit from the Wall of a Gastropod Hemocyanin Offers a Possible Mechanism for Cooperativity. *Biochemistry* **42**, 6341-6346.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Meth.* **8**, 785-786.
- Piechocka, I. K., van Oosten, A. S. G., Breuls, R. G. M. und Koenderink, G. H. (2011). Rheology of Heterotypic Collagen Networks. *Biomacromolecules* **12**, 2797-2805.

- Pikkarainen, J., Rantanen, J., Vastamaki, M., Lapiaho, K., Kari, A., *et al.* (1968). On collagens of invertebrates with special reference to *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.* **4**, 555-560.
- Price, H. A. (1983). Structure and Formation of the Byssus Complex in *Mytilus* (Mollusca, Bivalvia). *J. Molluscan Stud.* **49**, 9-17.
- Provencher, S. W. und Gloeckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37.
- Pujol, J. P., Rolland, M., Lasry und Vinet, S. (1970). Comparative Study of Amino Acid Composition of Byssus in Some Common Bivalve Molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* **34**, 193-&.
- Qin, X. und Waite, J. H. (1995). Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis*. *J. Exp. Biol.* **198**, 633-644.
- Qin, X. X., Coyne, K. J. und Waite, J. H. (1997). Tough tendons. Mussel byssus has collagen with silk-like domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 32623-32627.
- Qin, X. X. und Waite, J. H. (1998). A potential mediator of collagenous block copolymer gradients in mussel byssal threads. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10517-10522.
- Renwranz, L., Schmalmack, W., Redel, R., Friebel, B. und Schneeweiss, H. (1996). Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **165**, 647-658.
- Reynolds, J. A. und Tanford, C. (1970). Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **66**, 1002-1007.
- Rich, R. L., Deivanayagam, C. C. S., Owens, R. T., Carson, M., Höök, A., *et al.* (1999). Trench-shaped Binding Sites Promote Multiple Classes of Interactions between Collagen and the Adherence Receptors, $\alpha 1\beta 1$ Integrin and Staphylococcus aureus Cna MSCRAMM. *J. Biol. Chem.* **274**, 24906-24913.
- Riddles, P. W., Blakeley, R. L. und Zerner, B. (1983). Reassessment of Ellman Reagent. *Methods Enzymol.* **91**, 49-60.
- Roberts, R. J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A. S., Bickle, T. A., *et al.* (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1805-1812.
- Romijn, R. A., Westein, E., Bouma, B., Schiphorst, M. E., Sixma, J. J., *et al.* (2003). Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 15035-15039.
- Rossmann, M. G. und Argos, P. (1981). Protein Folding. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 497-532.
- Rudall, K. M. (1955). The Distribution of Collagen and Chitin. In: *Fibrous Proteins and Their Biological Significance* (Cambridge University Press), 49-71.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. und Jaenicke, R. (1997). Folding Proteins. In: *Protein Function: A Practical Approach*, T. E. Creighton, Ed. (Oxford University Press, USA).
- Rzepecki, L. M., Hansen, K. M. und Waite, J. H. (1992). Characterization of a Cystine-Rich Polyphenolic Protein Family from the Blue Mussel *Mytilus-Edulis-L.* *Biol. Bull.* **183**, 123-137.

- Rzepecki, L. M., Nagafuchi, T. und Waite, J. H. (1991). Alpha,Beta-Dehydro-3,4-Dihydroxyphenylalanine Derivatives - Potential Schlerotization Intermediates in Natural Composite-Materials. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**, 17-26.
- Sagert, J., Sun, C. und Waite, J. H. (2006). Chemical subtleties of mussel and polychaete holdfasts. In: *Biological Adhesives*, A. M. Smith und J. A. Callow, Edn. (Heidelberger Platz 3, D-14197 Berlin, Germany, Springer-Verlag Berlin), S. 125-143.
- Sagert, J. und Waite, J. H. (2009). Hyperunstable matrix proteins in the byssus of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Biol.* **212**, 2224-2236.
- Sakakibara, S., Kishida, Y., Kikuchi, Y., Sakai, R. und Kakiuchi, K. (1968). Synthesis of Poly-(L-prolyl-L-prolylglycyl) of Defined Molecular Weights. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **41**, 1273-1273.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463-5467.
- Sato, A., Koyama, S., Yamada, H., Suzuki, S., Tamura, K., *et al.* (2000). Three-dimensional solution structure of a disulfide bond isomer of the human insulin-like growth factor-I. *J. Pept. Res.* **56**, 218-230.
- Savitzky, A. und Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* **36**, 1627-1639.
- Scatchard, G. (1949). THE ATTRACTIONS OF PROTEINS FOR SMALL MOLECULES AND IONS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672.
- Scheibel, T. (2008). *Fibrous proteins* (Landes Bioscience).
- Schlapschy, M., Grimm, S. und Skerra, A. (2006). A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 385-390.
- Schmid, F. X. (1997). Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: *Protein Structure: A Practical Approach*, T. E. Creighton, Ed. (Oxford University Press).
- Schuurman, J., Perdok, G. J., Gorter, A. D. und Aalberse, R. C. (2001). The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol. Immunol.* **38**, 1-8.
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V. S., Adir, N. und Fishman, A. (2011). First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. *J. Mol. Biol.* **405**, 227-237.
- Sever, M. J., Weisser, J. T., Monahan, J., Srinivasan, S. und Wilker, J. J. (2004). Metal-mediated cross-linking in the generation of a marine-mussel adhesive. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 448-450.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 1-6.
- Silverman, H. G. und Roberto, F. F. (2007). Understanding marine mussel adhesion. *Mar. Biotechnol (N. Y.)* **9**, 661-681.

- Smith, C., Estavillo, D., Emsley, J., Bankston, L. A., Liddington, R. C., *et al.* (2000). Mapping the Collagen-binding Site in the I Domain of the Glycoprotein Ia/IIa (Integrin $\alpha 2\beta 1$). *J. Biol. Chem.* **275**, 4205-4209.
- Smyth, J. D. (1954). A Technique for the Histochemical Demonstration of Polyphenol Oxidase and Its Application to Egg-Shell Formation in Helminths and Byssus Formation in Mytilus. *Q. J. Microsc. Sci.* **95**, 139-&.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M. und Machonkin, T. E. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563-2606.
- Sreerama, N., Venyaminov, S. Y. U. und Woody, R. W. (1999). Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* **8**, 370-380.
- Stellwagen, N. C. (2009). Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* **30**, S188-S195.
- Strausberg, R. L., Anderson, D. M., Filpula, D., Finkelman, M., Link, R., *et al.* (1989). Development of a Microbial System for Production of Mussel Adhesive Protein. *ACS Symp. Ser.* **385**, 462-464.
- Sun, C., Lucas, J. M. und Waite, J. H. (2002). Collagen-binding matrix proteins from elastomeric extraorganismic byssal fibers. *Biomacromolecules* **3**, 1240-1248.
- Sun, C., Vaccaro, E. und Waite, J. H. (2001). Oxidative stress and the mechanical properties of naturally occurring chimeric collagen-containing fibers. *Biophys. J.* **81**, 3590-3595.
- Sun, C. und Waite, J. H. (2005). Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads. *J. Biol. Chem.* **280**, 39332-39336.
- Surewicz, W. K. und Mantsch, H. H. (1988). New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **952**, 115-130.
- Sweeney, S. M., Orgel, J. P., Fertala, A., McAuliffe, J. D., Turner, K. R., *et al.* (2008). Candidate Cell and Matrix Interaction Domains on the Collagen Fibril, the Predominant Protein of Vertebrates. *J. Biol. Chem.* **283**, 21187-21197.
- Switzer III, R. C., Merrill, C. R. und Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **98**, 231-237.
- Tamarin, A., Lewis, P. und Askey, J. (1974). SPECIALIZED CILIA OF BYSSUS ATTACHMENT-PLAQUE FORMING REGION IN MYTILUS-CALIFORNIANUS. *J. Morphol.* **142**, 321-327.
- Tamarin, A., Lewis, P. und Askey, J. (1976). Structure and Formation of Byssus Attachment Plaque in Mytilus. *J. Morphol.* **149**, 199-221.
- Taylor, S. W. (2002). Chemoenzymatic Synthesis of Peptidyl 3,4-Dihydroxyphenylalanine for Structure-Activity Relationships in Marine Invertebrate Polypeptides. *Anal. Biochem.* **302**, 70-74.
- Taylor, S. W., Waite, J. H., Ross, M. M., Shabanowitz, J. und Hunt, D. F. (1994). Trans-2,3-Cis-3,4-Dihydroxyproline, a New Naturally-Occurring Amino-Acid, Is the 6th Residue in the Tandemly Repeated Consensus Decapeptides of an Adhesive Protein from Mytilus-Edulis. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10803-10804.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

- Ullmann, A., Jacob, F. und Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **24**, 339-343.
- Vaccaro, E. und Waite, J. H. (2001). Yield and post-yield behavior of mussel byssal thread: a self-healing biomolecular material. *Biomacromolecules* **2**, 906-911.
- Vagin, A. A. und Isupov, M. N. (2001). Spherically averaged phased translation function and its application to the search for molecules and fragments in electron-density maps. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **57**, 1451-1456.
- van der Plas, R. M., Gomes, L., Marquart, J. A., Vink, T., Meijers, J. C. M., *et al.* (2000). Binding of von Willebrand factor to collagen type III: Role of specific amino acids in the collagen binding domain of VWF and effects of neighboring domains. *Thromb. Haemostasis* **84**, 1005-1011.
- van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H. und Wichers, H. J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* **45**, 1309-1323.
- van Holde, K. E., Miller, K. I. und Decker, H. (2001). Hemocyanins and Invertebrate Evolution. *J. Biol. Chem.* **276**, 15563-15566.
- Venier, P., De Pitta, C., Bernante, F., Varotto, L., De Nardi, B., *et al.* (2009). MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics* **10**, 72.
- Vitellaro-Zuccarello, L. (1980). THE COLLAGEN GLAND OF MYTILUS-GALLOPROVINCIALIS - AN ULTRASTRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL STUDY ON SECRETORY GRANULES. *J. Ultrastruct. Res.* **73**, 135-147.
- Vitellaro-Zuccarello, L. (1981). Ultrastructural and cytochemical study on the enzyme gland of the foot of a mollusc. *Tissue Cell* **13**, 701-713.
- Vitellaro-Zuccarello, L. (1983). Ultrastructural and cytochemical study of a mucous gland of the foot of *Mytilus galloprovincialis*. *Basic Appl. Histochem.* **27**, 103-115.
- Vitellaro-Zuccarello, L., De Biasi, S. und Bairati, A. (1983). The ultrastructure of the byssal apparatus of a mussel. V. Localization of collagenic and elastic components in the threads. *Tissue Cell* **15**, 547-554.
- Vreeland, V., Waite, J. H. und Epstein, L. (1998). Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *J. Phycol.* **34**, 1-8.
- Waite, J. H. (1983). Evidence for a repeating 3,4-dihydroxyphenylalanine- and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L. *J. Biol. Chem.* **258**, 2911-2915.
- Waite, J. H. (1985). Catechol Oxidase in the Byssus of the Common Mussel, *Mytilus-Edulis*-L. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **65**, 359-371.
- Waite, J. H. (1990a). Marine Adhesive Proteins - Natural Composite Thermosets. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 139-144.
- Waite, J. H. (1990b). The phylogeny and chemical diversity of quinone-tanned glues and varnishes. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* **97**, 19-29.
- Waite, J. H. (1992). The Formation of Mussel Byssus: Anatomy of a Natural Manufacturing Process. *in: Structure, Cellular Synthesis and Assembly of Biopolymers. Results and Problems in Cell Differentiation*, S. T. Case, ed. (Springer-Verlag, Berlin), 27-54.

- Waite, J. H., Andersen, N. H., Jewhurst, S. und Sun, C. J. (2005). Mussel adhesion: Finding the tricks worth mimicking. *J. Adhes.* **81**, 297-317.
- Waite, J. H., Housley, T. J. und Tanzer, M. L. (1985). Peptide repeats in a mussel glue protein: theme and variations. *Biochemistry* **24**, 5010-5014.
- Waite, J. H., Lichtenegger, H. C., Stucky, G. D. und Hansma, P. (2004). Exploring molecular and mechanical gradients in structural bioscaffolds. *Biochemistry* **43**, 7653-7662.
- Waite, J. H. und Qin, X. (2001). Polyphosphoprotein from the adhesive pads of *Mytilus edulis*. *Biochemistry* **40**, 2887-2893.
- Waite, J. H., Qin, X. X. und Coyne, K. J. (1998). The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biol.* **17**, 93-106.
- Waite, J. H. und Tanzer, M. L. (1980). The bioadhesive of *Mytilus* byssus: a protein containing L-dopa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1554-1561.
- Waite, J. H. und Tanzer, M. L. (1981). Polyphenolic Substance of *Mytilus edulis*: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline. *Science* **212**, 1038-1040.
- Waite, J. H., Vaccaro, E., Sun, C. und Lucas, J. M. (2002). Elastomeric gradients: a hedge against stress concentration in marine holdfasts? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357**, 143-153.
- Walker, J. M. (2005). *The Proteomics Protocols Handbook* (Totowa, NJ, Humana Press Inc).
- Walker, J. R., Corpina, R. A. und Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607-614.
- Wang, J., Liu, C. S., Lu, X. und Yin, M. (2007). Co-polypeptides of 3,4-dihydroxyphenylalanine and L-lysine to mimic marine adhesive protein. *Biomaterials* **28**, 3456-3468.
- Warner, S. C. und Waite, J. H. (1999). Expression of multiple forms of an adhesive plaque protein in an individual mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **134**, 729-734.
- Wass, M. N., Kelley, L. A. und Sternberg, M. J. E. (2010). 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Res.* **38**, W469-W473.
- Westwood, G., Horton, T. N. und Wilker, J. J. (2007). Simplified polymer mimics of cross-linking adhesive proteins. *Macromolecules* **40**, 3960-3964.
- Whitmore, L. und Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392-400.
- Whittaker, C. A. und Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin a domains: Widely dispersed adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3369-3387.
- Wilkinson, B. und Gilbert, H. F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **1699**, 35-44.
- Williams, B. R., Gelman, R. A., Poppke, D. C. und Piez, K. A. (1978). Collagen fibril formation. Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results. *J. Biol. Chem.* **253**, 6578-6585.
- Williams, T., Marumo, K., Waite, J. H. und Henkens, R. W. (1989). Mussel Glue Protein Has an Open Conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 415-422.

- Wypych, J., Li, M., Guo, A., Zhang, Z., Martinez, T., *et al.* (2008). Human IgG2 Antibodies Display Disulfide-mediated Structural Isoforms. *J. Biol. Chem.* **283**, 16194-16205.
- Xu, Y., Gurusiddappa, S., Rich, R. L., Owens, R. T., Keene, D. R., *et al.* (2000). Multiple Binding Sites in Collagen Type I for the Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. *J. Biol. Chem.* **275**, 38981-38989.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yu, J., Wei, W., Danner, E., Ashley, R. K., Israelachvili, J. N., *et al.* (2011a). Mussel protein adhesion depends on interprotein thiol-mediated redox modulation. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 588-590.
- Yu, J., Wei, W., Danner, E., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2011b). Effects of Interfacial Redox in Mussel Adhesive Protein Films on Mica. *Adv. Mater.* **23**, 2362-2366.
- Yu, M. E. und Deming, T. J. (1998). Synthetic polypeptide mimics of marine adhesives. *Macromolecules* **31**, 4739-4745.
- Zeng, H. B., Hwang, D. S., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2010). Strong reversible Fe³⁺-mediated bridging between dopa-containing protein films in water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12850-12853.
- Zhang, C., Xie, L. P., Huang, J., Chen, L. und Zhang, R. Q. (2006). A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 632-639.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., *et al.* (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49-54.
- Zhao, H., Robertson, N. B., Jewhurst, S. A. und Waite, J. H. (2006). Probing the adhesive footprints of *Mytilus californianus* byssus. *J. Biol. Chem.* **281**, 11090-11096.
- Zhao, H. und Waite, J. H. (2005). Coating proteins: structure and cross-linking in fp-1 from the green shell mussel *Perna canaliculus*. *Biochemistry* **44**, 15915-15923.
- Zhao, H. und Waite, J. H. (2006a). Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of *Mytilus californianus*. *J. Biol. Chem.* **281**, 26150-26158.
- Zhao, H. und Waite, J. H. (2006b). Proteins in load-bearing junctions: the histidine-rich metal-binding protein of mussel byssus. *Biochemistry* **45**, 14223-14231.
- Zimm, B. H. (1948). The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *J. Chem. Phys.* **16**, 1093-1099.

8 Publikationen

Originalarbeiten:

Suhre, M. H., Scheibel, T., Steegborn, C. und Gertz, M. (2013). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Proximal Thread Matrix Protein 1 (PTMP1) from *Mytilus galloprovincialis*. *Manuskript eingereicht*.

Suhre, M. H., Gertz, M., Steegborn, C. und Scheibel, T. (2013). Structural and Functional Features of a High Affinity Collagen Binding Matrix Protein from the Mussel Byssus. *Manuskript eingereicht*.

Suhre, M. H. und Scheibel, T. (2013). Structural Diversity of a Collagen-Binding Matrix Protein from the Byssus of Blue Mussels upon Refolding. *Manuskript eingereicht*.

Übersichtsartikel:

Hagenau, A., Suhre, M. H. und Scheibel, T. (2013). Nature as a Blueprint for Polymer Material Concepts: Protein Fiber-reinforced Composites as Holdfasts of Mussels. *Manuskript eingereicht*.

9 Abkürzungen

A	Adenosin	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie	ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
AK	Antikörper	ESI	Elektrospray-Ionisation
Ala, A	Alanin	EST	<i>expressed sequence tag</i>
Amp	Ampicillin	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
APBS	Adaptiver Poisson-Boltzmann Solver	FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	FSD	<i>Fourier self-deconvolution</i> , Fourier-Selbstentfaltung
Arg, R	Arginin	FT-IR	Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie
Asn, N	Asparagin	G	Guanosin
Asp, D	Aspartat	g	Ortsfaktor (9,81 N kg ⁻¹)
Bicin	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin	GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	Gln, Q	Glutamin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	Glu, E	Glutamat
BMGY	<i>buffered medium (glycerol, yeast extract)</i> , gepuffertes Medium mit Glycerin und Hefeextrakt	Gly, G	Glycin
BMMY	<i>buffered medium (methanol, yeast extract)</i> , gepuffertes Medium mit Methanol und Hefeextrakt	GPC	Gel-Permeationschromatographie
bp	Basenpaar	GSH	Glutathion reduziert
BSA	bovines Serumalbumin	GSSG	Glutathion oxidiert
C	Cytidin	HCl	Salzsäure
CaCl ₂	Calciumchlorid	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>	His, H	Histidin
CD	Zirkulardichroismus	HMM	Hidden-Markov-Modell
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
cDNA	komplementäre DNA	i. d.	intradermal
cfu	<i>colony forming unit</i> (koloniebildende Einheit)	IAEDANS	5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]-naphthalen-1-sulfonsäure
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymizinsäure	IB	Inclusion Bodies
Chy	Chymotrypsin	IDA	Iminodiessigsäure (-acetat)
Cm	Chloramphenicol	IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans
cm ⁻¹	Reziproke Zentimeter/Wellenzahlen	IgG	Immunglobulin G
CO	Catecholoxidase	Ile, I	Isoleucin
COP	<i>copper binding site</i> , Kupferbindestelle	IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> , immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
Cys, C	Cystein	IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Kana	Kanamycin
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	kb	Kilobasen
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	KFA	Komplettes Freund-Adjuvans
DLS	<i>dynamic light scattering</i> , dynamische Lichtstreuung	LB	Luria-Bertami
DMF	Dimethylformamid	LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid	LEM	Lineare Extrapolations-Methode
dn/dc	differenzielles Brechungsindex-Inkrement	Leu, L	Leucin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LiCl	Lithiumchlorid
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat	Lys, K	Lysin
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin	M	Molar, Mol pro Liter
DTNB	Dithionitrobenzoesäure (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure))	MAA	Maleinsäureanhydrid-aktiviert
DTT	Dithiothreitol	MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	MALS	<i>multi angle light scattering</i> , Mehrwinkellichtstreuung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MCS	<i>multiple cloning site</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	MD	Minimal Dextrose-Medium
		Met, M	Methionin

Mfl	<i>Mussel foot library</i> (cDNA-Bank des Muschelfußes)	SH	Sulphydryl
Mfp	<i>mussel foot protein</i>	SMT3	<i>suppressor of mif two 3</i>
Mgfp	<i>Mytilus galloprovincialis foot protein</i>	SP	Sulfopropyl-
MM	Minimal Methanol-Medium	SPR	<i>surface plasmon resonance</i> , Oberflächenplasmonenresonanz
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid	SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol	SV	Säulenvolumen
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA	T	Thymidin
MRW	<i>mean residue weight</i>	TAE	Tris/Natriumacetat/EDTA-Puffer
MS	Massenspektrometrie	TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> , Molekulargewichts-Ausschlussgrenze	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
m/z	Masse-Ladungsverhältnis	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
NaAc	Natriumacetat	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
NaCl	Natriumchlorid	Tet	Tetracyclin
NaOH	Natriumhydroxid/Natronlauge	TFA	Trifluoressigsäure
NaSCN	Natriumthiocyanat	Thr, T	Threonin
n. b.	nicht bestimmt	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	TMP	<i>thread matrix protein</i> , Fadenmatrixprotein
NHS	N-Hydroxysuccinimid	TOF	<i>time-of-flight</i> , Flugzeit
nt	Nukleotid	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
NTCB	2-Nitro-5-Thiocyanobenzoessäure	Trp, W	Tryptophan
OD	optische Dichte	Tryp	Trypsin
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm	Tyr, Y	Tyrosin
ORF	<i>open reading frame</i>	u	<i>unit</i> (unterschiedlich definiertes Maß für die Aktivität von Enzymen)
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>	UV	ultraviolett
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	v/v	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung	Val, V	Valin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion	VE	vollentsalz
PEG	Polyethylenglycol	VIS	visuell
pH	<i>potentia hydrogenii</i>	w/v	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent
Phe, F	Phenylalanin	YNB	<i>yeast nitrogen base</i> , Hefe-Stickstoffquelle
pI	Isoelektrischer Punkt	YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	Zeo	Zeocin
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck		
POD	Peroxidase		
Pro, P	Prolin		
PTMP1	<i>Proximal Thread Matrix Protein 1</i> , Proximales Fadenmatrixprotein 1		
QELS	<i>quasi-elastic light scattering</i> , quasi-elastische Lichtstreuung		
REM	Rasterelektronenmikroskopie		
R _h	hydrodynamischer Radius		
RI	<i>refractive index</i> , Brechungsindex		
RMSD	<i>root mean square deviation</i> , Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung		
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure		
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)		
rRNA	ribosomale RNA		
s. c.	subkutan		
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat		
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie		
Ser, S	Serin		
S-Gal	3,4-Cyclohexenoesuleitin-β-D-galaktopyranosid		

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2009 bis Mai 2013 am Lehrstuhl Biomaterialien der Universität Bayreuth angefertigt.

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer und Mentor Herrn Prof. Dr. Thomas Scheibel für die Bereitstellung dieses spannenden und faszinierenden Themas, das viele große und kleine Herausforderungen mit sich brachte, für alles, was ich in unserer gemeinsamen Zeit von ihm lernen durfte und für die fortwährende freundschaftliche Unterstützung.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheibel, Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen beiden weiteren Mentoren, Herrn Prof. Dr. Olaf Stemmann und Herrn Dr. Stephan Schwarzinger für ihre Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. J. Herbert Waite, UCSB, USA, für seine jahrzehntelangen, richtungsweisenden und inspirierenden Arbeiten über den Muschelbyssus. Ferner danke ich ihm für die Möglichkeit, im Rahmen eines Besuches seiner Arbeitsgruppe im November 2011 einen Einblick in seine Sicht auf die Welt der Muschelbyssusproteine zu erhalten.

Bei Dr. Melanie Gertz und Prof. Dr. Clemens Steegborn möchte ich mich herzlich für die Kooperation und die Strukturlösung von PTMP1, für konstruktive Diskussionen und faszinierende Einblicke in die Welt der Strukturbiologie bedanken.

Ein besonderer Dank gilt allen, die mir bei der Durchführung, Auswertung und Interpretation von Experimenten geholfen haben:

- Dr. Anja Hagenau für die Erstellung und Bereitstellung der Muschelfuß-cDNA-Bank und viele konstruktive Diskussionen
- Andreas Schmidt und Johannes Diehl für die Hilfe bei Fermentationen
- Lukas Eisoldt für die Bereitstellung von ULP1-Protease
- Christopher Synatschke und Dr. Frank Fischer für die Durchführung und Auswertung massenspektrometrischer Analysen
- Dr. Melanie Gertz und Susanne Schäfer für ihre Hilfe bei Kristallisationsansätzen
- Dr. Michael Weyand, Dr. Sebastien Moniot und dem BESSY II-Team für die Durchführung von Röntgendiffraktionsmessungen

- Dr. Hendrik Bargel für REM-Aufnahmen
- Kristin Schacht und Dr. Stefan Geimer für TEM-Aufnahmen
- Dr. Martin Humenik für AFM-Aufnahmen und Massenspektrometrie
- Aniola Heidebrecht für ihre Hilfe mit *Pichia pastoris* und die Durchführung von PCR-Analysen
- Prof. Dr. Arne Skerra für die Bereitstellung des pTUM4-Helferplasmids
- Dr. Stefan Gilch für die Hilfestellung bei periplasmatischen Expressionsanalysen
- Jasmin Wickinghoff für Klonierungen und die Durchführung periplasmatischer Expressionsanalysen
- Daniela Suhre für Klonierungsarbeiten
- Meinen Praktikanten Erik Richter, Philipp Schmid, Stephanie Geißler und Michael Magdeburg für ihre Hilfe bei Klonierungen und Proteinreinigungen

Ein besonderer Dank gilt meinen beiden Bürokollegen Lukas Eisoldt und Dr. Martin Humenik für viele konstruktive Diskussionen, wissenschaftliche Hilfestellungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ferner bedanke ich mich herzlich bei beiden für ihre kritischen Kommentare zu den Entwürfen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Subgroup Aquatische Fasern (vormals Kollagene) für die gute Zusammenarbeit und viele konstruktive Diskussionen.

Weiter möchte ich mich bei allen technischen Assistenten des Lehrstuhls bedanken für den reibungslosen Laboralltag und für das gelegentliche „Hinterherräumen“.

Ein besonderer Dank gilt Susanne Schramm, die immer ein offenes Ohr für organisatorische Probleme hat sowie großes Geschick, diese im hohen Maße unbürokratisch zu lösen.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls Biomaterialien und ehemaligen Mitstreitern gebührt mein großer Dank für das angenehme Arbeitsklima und die freundschaftliche Gemeinschaft.

Zuletzt gehört mein allergrößter Dank meiner Familie, meiner Frau Daniela, meinen Kindern Franziska und Kilian sowie meinen Eltern Brigitte und Hans-Rudolf für ihr Verständnis, ihre Unterstützung und ihren immerwährenden Rückhalt.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Dissertation an einer Hochschule eingereicht oder mich jemals einer Doktorprüfung unterzogen habe. Zudem erkläre ich, dass ich weder Hilfe von einem gewerblichen Promotionsberater in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Bayreuth, November 2013