

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Bereich Organische Chemie und Biochemie  
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen natürlicher  
Muschelbyssusfäden der Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis***

Anja Hagenau

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Th. Kiefhaber

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
2. Univ.-Prof. Dr. Th. Scheibel (Universität Bayreuth)

Die Dissertation wurde am 12.07.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 15.09.2011 angenommen.



„Dass ich erkenne, was die Welt,  
Im Innersten zusammenhält“

*Faust. Der Tragödie erster Teil*  
Johann Wolfgang von Goethe





# Inhaltsverzeichnis

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Fibrilläre Kollagene .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Kollagene der Vertebraten .....  | 1         |
| 1.1.2      | Die Tripelhelix .....  | 2         |
| 1.1.3      | Biosynthese und Assemblierung fibrillärer Kollagene .....                              | 2         |
| 1.1.4      | Molekulare Auswirkungen äußerer mechanischer Belastung in fibrillären Kollagenen ..... | 5         |
| 1.1.5      | Fibrilläre Kollagene als Bestandteil natürlicher Kompositmaterialien .....             | 5         |
| 1.1.6      | Fibrilläre Kollagene der Invertebraten .....   | 6         |
| <b>1.2</b> | <b>Der Muschelbyssus .....</b>   | <b>7</b>  |
| 1.2.1      | Mechanische Eigenschaften des Muschelbyssus .....                                      | 8         |
| 1.2.2      | Produktion der Byssusfäden in der Muschel .....  | 8         |
| 1.2.3      | Aufbau des Byssusfadens .....  | 9         |
| 1.2.3.1    | Kutikula .....   | 10        |
| 1.2.3.2    | Proteinmatrix des Fadenkerns .....   | 11        |
| 1.2.3.3    | Kollagen-ähnliche Proteine des Fadenkerns (preCols) .....                              | 12        |
| 1.2.3.4    | Der Muschelbyssusfaden - ein Gradientenmaterial .....                                  | 14        |
| <b>1.3</b> | <b>Zielsetzung .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2</b>   | <b>Material und Methoden .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Material .....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1.1      | Chemikalien .....  | 17        |
| 2.1.2      | Puffer, Lösungen und Medien .....  | 18        |
| 2.1.3      | Plasmide .....   | 18        |
| 2.1.4      | Bakterienstämme und Muscheln .....   | 18        |
| 2.1.5      | Kits .....   | 19        |
| 2.1.6      | Standards und Enzyme .....   | 19        |
| 2.1.7      | Sonstige Materialien .....   | 19        |
| 2.1.8      | Geräte .....   | 20        |
| 2.1.9      | Sonstige Computerprogramme und Datenbanken .....                                       | 22        |
| <b>2.2</b> | <b>Fadenpräparation .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Bestimmung der Querschnittsfläche des Byssusfadens .....</b>                        | <b>23</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Mikroskopische Methoden .....</b>   | <b>23</b> |
| 2.4.1      | Lichtmikroskopie .....   | 23        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.4.2      | Rasterelektronenmikroskopie mit fokussiertem Ionenstrahl (focussed ion beam, FIB).....                    | 24        |
| <b>2.5</b> | <b>Mechanische Zugmessung .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Thermoanalysen.....</b>  | <b>27</b> |
| 2.6.1      | Thermomechanische Analyse (TMA) .....   | 27        |
| 2.6.2      | Bestimmung der temperaturabhängigen Änderung der Fadenmorphologie.....                                    | 29        |
| 2.6.3      | Dynamisch-Mechanische Thermoanalyse (DMTA).....   | 29        |
| 2.6.4      | Thermogravimetrische Analyse.....   | 31        |
| 2.6.5      | Dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry, DSC)...                              | 32        |
| 2.6.6      | Untersuchung des thermischen Proteinabbaus mittel SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....               | 33        |
| <b>2.7</b> | <b>Strukturanalysen .....</b>   | <b>34</b> |
| 2.7.1      | Festphasen-Kernspinresonanzspektroskopie (ssNMR, solid state nuclear magnetic resonance) .....            | 34        |
| 2.7.2      | Röntgenbeugungsanalysen am Muschelbyssusfaden .....   | 35        |
| 2.7.3      | Fourier-transformierte Infrarot (FTIR)-Spektroskopie.....   | 36        |
| 2.7.3.1    | FTIR-Spektroskopie zur Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen.....                                       | 36        |
| 2.7.3.2    | Polarisierte FTIR-Spektroskopie .....   | 37        |
| 2.7.3.3    | Polarisierte FTIR-Spektroskopie in Kombination mit äußerer mechanischer Belastung .....                   | 39        |
| 2.7.3.4    | Untersuchung der temperaturabhängigen Strukturänderung.....   | 40        |
| <b>2.8</b> | <b>Erstellung einer cDNA-Bank aus dem Gewebe des Muschelfußes .....</b>                                   | <b>41</b> |
| 2.8.1      | Präparation der Muschelfüße.....  | 42        |
| 2.8.2      | Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Muschelfußgewebe .....  | 42        |
| 2.8.3      | Anreicherung der mRNA.....  | 42        |
| 2.8.4      | Erstellung der cDNA-Bank .....  | 43        |
| 2.8.4.1    | Erststrangsynthese .....  | 43        |
| 2.8.4.2    | Analyse der Qualität der cDNA.....  | 43        |
| 2.8.4.3    | Herstellung doppelsträngiger cDNA mit Adaptoren für die Rekombination.....                                | 44        |
| 2.8.4.4    | Rekombinationsreaktion und Transformation.....  | 45        |
| 2.8.5      | Bestimmung des Titers der cDNA-Banken .....   | 45        |
| 2.8.6      | Bestimmung der Qualität der cDNA-Banken.....  | 46        |
| 2.8.7      | Sequenzvergleich der aus den cDNA-Banken isolierten preCol-Varianten mit den publizierten Sequenzen ..... | 46        |
| <b>2.9</b> | <b>Sequenzanalyse der Kollagenomäne der preCols.....</b>  | <b>47</b> |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>3</b>   | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>49</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>Morphologie des Muschelbyssusfadens der Muschel <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....</b>                       | <b>49</b>  |
| 3.1.1      | Optische Mikroskopie .....  | 49         |
| 3.1.2      | Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....   | 50         |
| 3.1.3      | Polarisierte optische Mikroskopie.....  | 52         |
| <b>3.2</b> | <b>Mechanische Eigenschaften des Muschelbyssusfadens .....</b>  | <b>54</b>  |
| <b>3.3</b> | <b>Thermisches Verhalten des Muschelbyssusfadens.....</b>   | <b>58</b>  |
| 3.3.1      | Thermomechanische Analyse des Byssusfadens .....  | 58         |
| 3.3.2      | Temperaturabhängige Änderung der Fadenmorphologie .....   | 61         |
| 3.3.3      | Dynamisch-Mechanische Thermoanalyse (DMTA) .....  | 61         |
| 3.3.4      | Thermogravimetrische Analyse des Byssusfadens (TGA) .....   | 65         |
| 3.3.5      | Dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry, DSC) ..  | 67         |
| 3.3.6      | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Analyse des thermischen Abbaus der Proteine im Byssusfaden ..... | 69         |
| <b>3.4</b> | <b>Protein-Strukturanalyse des Muschelbyssusfadens.....</b>   | <b>70</b>  |
| 3.4.1      | Festphasen-Kernspinresonanzspektroskopie (ssNMR, solid state nuclear magnetic resonance).....                       | 70         |
| 3.4.2      | Strukturuntersuchungen am Muschelbyssusfadens mittels FTIR-Spektroskopie .....                                      | 74         |
| 3.4.2.1    | FTIR-Spektroskopie des distalen und proximalen Byssusfadens .....   | 74         |
| 3.4.2.2    | Polarisierte FTIR-Spektroskopie des distalen Byssusfadens .....   | 78         |
| 3.4.3      | Analyse der Strukturänderung im distalen Faden bei mechanischer Belastung   | 81         |
| 3.4.4      | FTIR-Untersuchung der Struktur des distalen Fadenteils in Abhängigkeit von der Temperatur .....                     | 84         |
| 3.4.5      | Röntgenbeugungsanalysen am Muschelbyssusfaden.....  | 89         |
| <b>3.5</b> | <b>Erstellung einer cDNA-Bank aus dem Gewebe des Muschelfußes.....</b>  | <b>92</b>  |
| 3.5.1      | Sequenzvergleich der aus den cDNA-Banken isolierten preCol-Varianten mit publizierten Sequenzen .....               | 94         |
| <b>3.6</b> | <b>Sequenzanalyse der Kollagendomäne der preCols .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion.....</b>  | <b>103</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Die Mechanik des Muschelbyssusfadens.....</b>  | <b>103</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Die molekulare Struktur des Muschelbyssusfadens .....</b>  | <b>108</b> |
| 4.2.1      | Die preCol-Kollagendomäne .....   | 109        |
| 4.2.1.1    | Geometrie und Helixsymmetrie der tripelhelikalen preCol-Kollagendomäne  | 109        |
| 4.2.1.2    | Auswirkungen von Abweichungen im Triplettmuster GlyXaaYaa auf die tripelhelikale Struktur.....                      | 114        |
| 4.2.1.3    | Hydratation tripelhelikaler Strukturen .....  | 118        |

---

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.2.2      | Die flankierenden Domänen der preCols .....   | 119        |
| 4.2.3      | Die Anordnung der preCol-Moleküle im Byssusfaden .....  | 121        |
| <b>4.3</b> | <b>Struktur-Funktionsbeziehung im distalen Muschelbyssusfaden .....</b>                               | <b>126</b> |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung .....</b>  | <b>132</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literatur .....</b>  | <b>135</b> |
| <b>7</b>   | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>142</b> |
| <b>8</b>   | <b>Publikationen .....</b>  | <b>145</b> |
| <b>9</b>   | <b>Anhang .....</b>   | <b>146</b> |
| <b>9.1</b> | <b>Vektorkarten .....</b>   | <b>146</b> |
| 9.1.1      | pDONR™222 (Invitrogen CloneMiner cDNA Library Construction Kit) .....                                 | 146        |
| 9.1.2      | pUC 19 (GenBank Zugangsnummer: L09137) .....  | 147        |
| <b>9.2</b> | <b>Festphasen-Kernspinresonanzspektroskopie (ssNMR, solid state nuclear magnetic resonance) .....</b> | <b>148</b> |
| <b>9.3</b> | <b>Vergleich der DNA-Sequenzen .....</b>  | <b>151</b> |
| 9.3.1      | preCol P .....  | 152        |
| 9.3.2      | preCol D .....  | 153        |
| 9.3.3      | preCol NG .....   | 154        |





# 1 Einleitung

Biologische Materialien sind in ihrer Funktionalität und Effektivität bislang unerreicht. Mechanisch beanspruchte natürliche Materialien zeichnen sich dabei zumeist durch ihren Kompositcharakter aus, bei dem durch Optimierung und Anpassung über Millionen von Jahren das Zusammenspiel aller Elemente perfektioniert wurde. Bei natürlichen Verbundwerkstoffen wie Holz, Knochen, Sehnen, Zähnen aber auch Perlmutter beruht deren Erfolg auf dem Beitrag der Einzelkomponenten zur Gesamtfunktion. Aufgrund ihrer Zugfestigkeit und gleichzeitigen Elastizität bilden fibrilläre Kollagene häufig einen Baustein natürlicher Kompositmaterialien in biologischen Systemen.

## 1.1 Fibrilläre Kollagene

Fibrilläre Kollagene stellen als Bestandteil der extrazellulären Matrix einen evolutionären Meilenstein in der Entwicklung von Vielzellern dar (Boot-Handford & Tuckwell, 2003). Sowohl in der Gruppe der Wirbellosen (*Invertebrata*) als auch bei den Wirbeltieren (*Vertebrata*) bilden Kollagenfibrillen strukturelle Einheiten von Exoskeletten und Geweben bis hin zu Knochen und Sehnen höherer Wirbeltiere.

### 1.1.1 Kollagene der Vertebraten

Bisher wurden in Vertebraten 28 verschiedene Kollagentypen gefunden, welche von insgesamt 46 individuellen Polypeptidketten gebildet werden. Darüber hinaus enthalten viele weitere Proteine für Kollagen charakteristische tripelhelikale Domänen. Neben fibrillenbildenden Kollagenen gehören zu den Hauptfamilien die netzwerkbildenden, die fibrillenassoziierten (FACIT) und die mikrofibrillären Kollagene sowie Verankerungsfibrillen, Kollagene mit Transmembrandomänen und Multiplexins (Protein mit unterbrochenen tripelhelikalen Domänen) (Tab. 1-I) (Gelse et al., 2003).

Fibrilläre Kollagenen sind der Hauptbestandteil mechanisch beanspruchter Gewebe wie Knochen, Knorpel, Haut, Sehnen, Bänder und übernehmen Stützfunktionen in den Geweben der inneren Organe oder Blutgefäßen.

**Tab. 1-I Die Hauptfamilien der Vertebratenkollagene und die entsprechenden Kollagentypen (Gelse et al., 2003)**

| Hauptfamilie   | Kollagentyp                   |
|--|-------------------------------|
| Fibrilläre Kollagene   | I, II, III, V und XI          |
| Netzbildende Kollagene   | IV, VIII und X                |
| Fibrillenassoziierte Kollagene (FACIT)                           | IX, XII, XIV, XIX, XX und XXI |
| mikrofibrilläre Kollagene  | VI                            |
| Verankerungsfibrillen  | VII                           |
| Kollagene mit Transmembrandomänen                                | XIII, XVII,                   |
| Multiplexins ( <i>multiple triple helix with interruptions</i> ) | XV, XVI und XVIII             |

Sie bilden langgestreckte Fibrillen, die eine hohe Zugfestigkeit entlang der Fibrillenachse aufweisen. Die Kollagenfibrillen ordnen sich entsprechend der Richtung der einwirkenden Belastung an und verleihen somit dem Gewebe mechanische Stabilität. Die hohe Zugfestigkeit wird dabei auf molekularer Ebene durch das Strukturmotiv der Tripelhelix vermittelt.

### 1.1.2 Die Tripelhelix

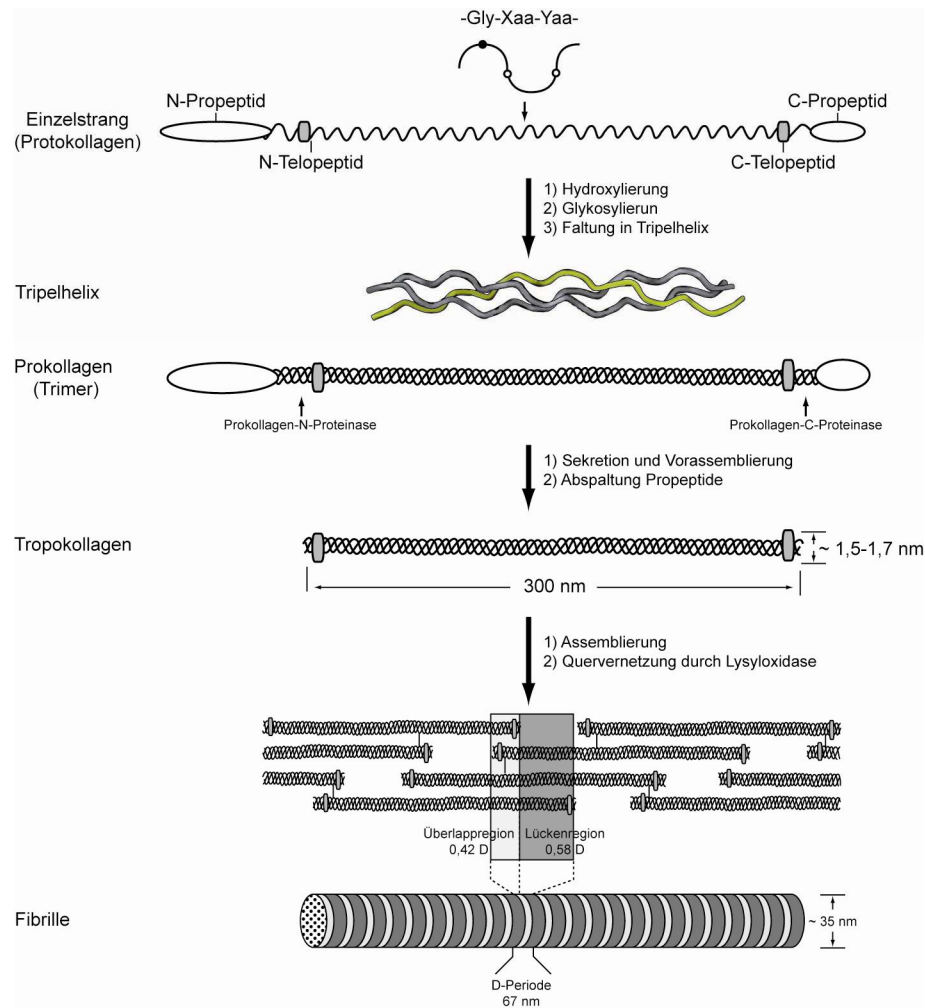
Alle Kollagene besitzen eine tripelhelikale Struktur, die auf der Wiederholung des Sequenzmotivs GlyXaaYaa (Xaa entspricht hauptsächlich Pro und Yaa Hyp) basiert (Abb. 1-1). Dabei falten drei linksgängige polyProlin II-Helices, in denen alle Peptidbindungen *trans*-Konformationen einnehmen, in eine rechtsgängige Tripelhelix, wobei Gly in den Helixkern gerichtet ist. Die einzelnen Peptidketten sind dabei um einen Aminosäurerest versetzt, und jedes Triplet bildet zur Stabilisation eine intermolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der N-H-Gruppe des Glycins und dem Carbonylsauerstoff eines Aminosäurerestes des Nachbarstranges aus (Shoulders & Raines, 2009). Für eine stabilen Tripelhelix ist ein hoher Iminosäuregehalt (Pro oder Hyp) und das Vorhandensein von Hyp in Yaa-Position unerlässlich, wodurch die Ausbildung eines regelmäßigen und hochgeordneten Wassernetzwerkes möglich ist (Bella et al., 2006; De Simone et al., 2008).

### 1.1.3 Biosynthese und Assemblierung fibrillärer Kollagene

Da die Mechanismen der Biosynthese fibrillärer Kollagene detailliert aufgeklärt sind, werden im Folgenden die einzelnen Schritte ab der Translation des Gens bis hin zur Assemblierung der Kollagenfibrille anhand von Säugetier-Kollagen Typ I erläutert (Abb.



1-1) (Gelse et al., 2003), einem Heterotrimer aus zwei  $\alpha 1(I)$ - und einer  $\alpha 2(I)$ -Polypeptidkette. Der tripelhelikale Bereich von Kollagen Typ I wird aminoterminal durch das N-Propeptid und das nicht-helikale N-Telozeptid und carboxyterminal durch das C-Propeptid und das C-Telozeptid flankiert (Abb. 1-1 Protokollagen).



**Abb. 1-1 Schematische Darstellung des hierarchischen Aufbaus fibrillärer Kollagene in Vertebraten und deren posttranslationaler Biosynthese**

Die Translation der entsprechenden mRNAs der Einzelstränge erfolgt als Protokollagen in das Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums. Nach Abspaltung des Signalpeptids wird das Protokollagenmolekül in mehreren Schritten posttranslational modifiziert. Dabei werden Prolyl-Reste enzymatisch durch Prolyl 3-hydroxylase bzw. Prolyl 4-hydroxylase hydroxyliert, und Lysyl-Reste sowohl mittels Lysylhydroxylase hydroxyliert als auch mit entsprechenden Glycosyl-Transferasen glykosyliert. Die Faltung in eine stabile tripelhelikale Struktur erfolgt gerichtet, wobei das C-Propeptid durch seine globuläre Struktur die Anlagerung dreier entsprechender Protokollagene dirigiert und das

so entstandene Trimer durch intermolekulare Disulfidbrücken stabilisiert (Gelse et al., 2003). Anschließend erfolgt die Faltung der Tripelhelix ausgehend vom C-Propeptid in Anwesenheit von Peptidyl-Prolyl *cis-trans*-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase und dem kollagenspezifischen Chaperon HSP47 (Gelse et al., 2003). Das gefaltete trimere Prokollagen (Abb. 1-1) wird nun über sekretorische Vesikel des Golgi-Apparates in den Interzellularraum entlassen. Während der Sekretion erfolgt eine laterale Vorassemblierung von bis zu fünf Prokollagenen, welche durch das C-Propeptid gesteuert wird (Silver et al., 2003). Nach Sekretion spalten Prokollagen-Proteinasen das C- und N-Propeptid (Abb. 1-1 Tropokollagen), da diese eine weitere Fibrillenbildung inhibieren (Kadler et al., 1996). Das entstandene Tropokollagen wird nun von den Telozeptiden flankiert. Während die Rolle des N-Propeptids noch nicht vollständig geklärt ist, initiiert das C-Telozeptid durch Interaktion mit spezifischen Bindestellen an tripelhelikalen Trimeren die weitere Fibrillogenese und vermittelt die versetzte Anordnung der Tropokollagene (Shoulders & Raines, 2009). Darüber hinaus erfolgt eine Quervernetzung von Lysinen und Hydroxylysinen der Teloceptide mittels Lysyloxidase, wobei bis zu vier Seitenketten verknüpft werden können, was die Zugfestigkeit und Stabilität der Kollagenfibrillen erhöht (Gelse et al., 2003).

Neben dem Einfluss des C-Teloceptids spielen auch hydrophobe und elektrostatische Interaktionen der Tropokollagenmoleküle eine Rolle bei der versetzten Assemblierung der Trimere in eine Kollagenfibrille. Dadurch entstehen Bereiche, in denen sich die Moleküle überlappen und Abschnitte mit Lücken. Der Abstand einer Überlapp- und Lückenregion entspricht der D-Periode und beträgt 67 nm. Diese Periodizität unterschiedlich dichter Bereiche führt zu dem für fibrilläre Kollagene charakteristischen gebänderten Muster (Abb. 1-1 Fibrille).

In der nächsten Hierarchieebene arrangieren sich Kollagenfibrillen zu Kollagenfasern, in denen die einzelnen Fibrillen über Proteoglykane wie Decorin quervernetzt sein können (Franchi et al., 2007). Diese Glykoproteine sind möglicherweise an der Anordnung, Orientierung und Ordnung der Kollagenfibrillen beteiligt. Ein Verbund von Kollagenfasern, Blutgefäßen und Nervenzellen bildet dann Gewebe wie Sehnen, Bänder und Knochen.

#### **1.1.4 Molekulare Auswirkungen äußerer mechanischer Belastung in fibrillären Kollagenen**

Bei mechanischer Beanspruchung fibrillärer Kollagene erfolgt eine Absorption und Ableitung der wirkenden Kraft strukturvermittelt. Röntgenbeugungsanalysen an Fibrillen des Kollagens Typ I (Fratzl et al., 1998) und nanomechanische Studien an Einzelmolekülen des Tropokollagens (Buehler et al., 2008) zeigen die molekularen Prozesse bei der axialen Streckung von fibrillären Kollagenen. In der ersten Phase, bei kleinen Dehnungswerten, werden Molekülbiegungen und -knicke durch die einwirkenden Zugkräfte gestreckt und die Fibrillen richten sich parallel aus. Des Weiteren kommt es zur Dissipation der mechanischen Energie durch molekulares Strecken der Tripelhelices. Dabei kann mehr Energie abgeleitet werden, je länger die Tripelhelix ist. Der Molekularstreckung wirken die intermolekularen Quervernetzungen in einer Tripelhelix (Wasserstoffbrücken) und zwischen Tripelhelices bzw. Fibrillen (Wassernetzwerk, Proteoglykane) entgegen, was zum Anstieg der Steifigkeit führt. Je mehr Quervernetzungen vorliegen, desto höher ist die Festigkeit des Kollagenmaterials. Allerdings führt eine zu große Vernetzungsdichte zur Verringerung der Deformationsfähigkeit der Fibrillen, was die Brüchigkeit des Materials erhöht. Bei einer Materialdehnung über 2 % wurde eine Vergrößerung der Lückenregionen der D-Periode beobachtet, was auf ein aneinander Vorbeigleiten benachbarter Moleküle hinweist (Fratzl et al., 1998). Dabei spielen Scherkräfte und Reibung zwischen den Molekülen eine entscheidende Rolle. Während diese an Regionen, die keine Quervernetzungen enthalten, homogen wirken können, staut sich die Kraft an Stellen mit einer lateralen Bindung, bis deren Kapazität erreicht ist und bricht (Buehler et al., 2008). Das interfibrilläre Gleiten wird außerdem durch die Viskosität zwischen den Molekülen bestimmt. Dabei haben neben den eben besprochenen Quervernetzungen auch entsprechende Matrixproteine und Wasser einen entscheidenden Einfluss. Die intermolekulare Reibung kann beispielsweise durch einen Wasserfilm zwischen den Fibrillen minimiert werden, was zu einer höheren Dehnbarkeit des Materials führen kann.

#### **1.1.5 Fibrilläre Kollagene als Bestandteil natürlicher Kompositmaterialien**

In natürlichen Kompositmaterialien tragen die Einzelkomponenten mit ihren Eigenschaften zur Gesamtfunktion des Materials bei. In Knochen wird beispielsweise dessen hohe mechanische Belastbarkeit durch ein Zusammenspiel von fibrillären

Kollagenen und mineralischen Einlagerungen vermittelt. Würden Knochen lediglich aus Kollagenfasern bestehen, wäre dieses Material trotz hoher Zugfestigkeit zu weich und elastisch, so dass ihre Stützfunktion nicht gegeben wäre. Einlagerungen von Hydroxyapatit-Kristallen (Biomineralisierung), welche allein zu hart und brüchig wären, geben dem Kollagen die für Knochengewebe nötige Steifigkeit (Silver et al., 2003).

Bei einer Biomineralisierung von Kollagenen wird kristallines Hydroxyapatit in Hohlräumen zwischen den Fibrillen aber auch in der Lückenregion der D-Periode eingelagert. Bei Akkumulation zwischen einzelnen Molekülen zeigt es hingegen eine amorphe Struktur (Silver et al., 2003). Dies schränkt die Bewegungsfreiheit der Kollagenfibrillen bzw. Einzelmoleküle ein und erhöht die Steifigkeit des Kollagenmaterials (Miles & Ghelashvili, 1999; Silver et al., 2003). Somit können die Eigenschaften fibrillärer Kollagene durch Variation der Anteile weicher und harter Komponenten sowie des Hydratationsgrads an die mechanischen Anforderungen angepasst werden.

### **1.1.6 Fibrilläre Kollagene der Invertebraten**

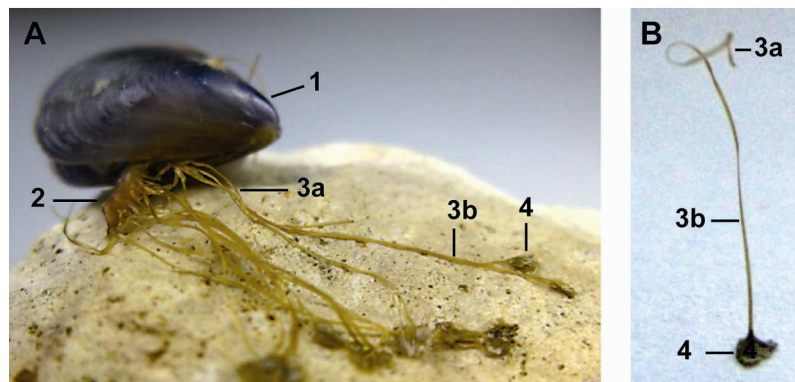
Während für die Kollagene der Vertebraten eine Vielzahl an Informationen zu Struktur, Modifizierung und Assemblierung verfügbar sind, gibt es nur wenige Studien zu fibrillären Kollagenen der Invertebraten. Untersuchungen von Fadenwürmern (*Nematoda*), Ringelwürmern (*Annelida*), Schwämmen (*Porifera*), Stachelhäuter (*Echinoderma*) und Nesseltieren (*Cnidaria*) zeigen, dass sich diese zumeist in ihrer Gesamtlänge, der Existenz nicht-kollagener Domänen und einem hohen Grad an für Vertebraten untypische Vernetzungen unterscheiden. Beispielsweise wurden in der Kutikula von Nematoden sehr kurze Kollagene gefunden, die denen der nicht-fibrillären Kollagene der Wirbeltiere ähneln und neben Disulfidbrücken auch Querverbindungen durch Tyrosinseitenketten bilden (Harel & Tanzer, 1993). Grundsätzlich jedoch besitzen die Kollagenfibrillen der Invertebraten in ihrem Aufbau, ihrer Struktur und Morphologie eine große Ähnlichkeit zu denen der Wirbeltiere (Adams, 1978; Boot-Handford & Tuckwell, 2003; Harel & Tanzer, 1993). Somit können viele strukturelle Informationen auch auf die fibrillären Kollagene der Invertebraten übertragen werden.

Ein außergewöhnliches, kollagenhaltiges Kompositmaterial in der Gruppe der Wirbellosen stellt der Byssusfaden von Miesmuscheln dar. Dieser zeichnet sich durch eine graduelle Verteilung elastischer und steifer mechanischer Eigenschaften entlang des Fadens aus, und

eignet sich als Modellsystem zur Untersuchung des Zusammenhangs der Funktionsweise eines Materials und dessen molekularen und strukturellen Aufbaus.

## 1.2 Der Muschelbyssus

Miesmuscheln (*Mytilidae*) gehören als Weichtiere (*Mollusca*) zur Klasse der Muscheln (*Bivalvia*) und bevölkern in Küstennähe weite Teile der Weltmeere. Während die Unterart *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) vornehmlich in Nord- und Ostsee sowie Ost- und West-Atlantik zu finden ist, kommt *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) im Mittelmeer, Ost-/West-Atlantik sowie im Ost-Pazifik und im Schwarzes Meer vor. Hier können sie große Muschelbänke mit Millionen von Individuen bilden, aber auch Hafenzwände, Pfähle und Steine besiedeln. Um eine Verdriftung (passives Wegspülen mit dem Wasserstrom) zu verhindern, besitzen Miesmuscheln ein Befestigungssystem - den Muschelbyssus (Abb. 1-2).



**Abb. 1-2 Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis* mit Byssusapparat (A) und ein entsprechender Einzelfaden (B)**

1 – Miesmuschel *M. galloprovincialis*, 2 – Byssusstamm, 3 – Byssusfaden, 3a – proximaler Fadenteil, 3b – distaler Fadenteil, 4 – Haftscheibe  
(Foto: Anja Hagenau)

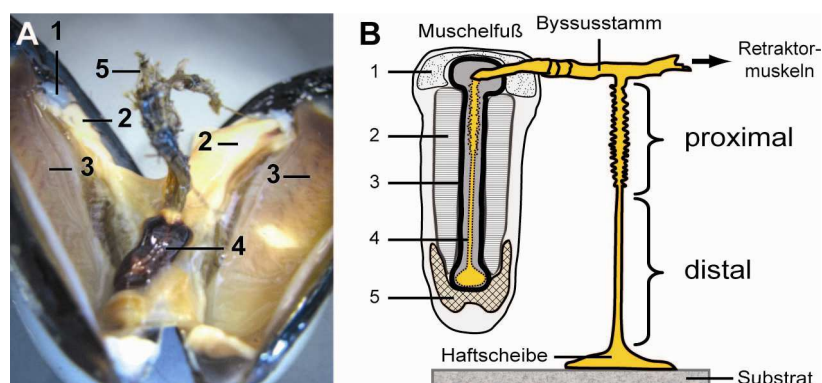
Der Muschelbyssus besteht aus einem Bündel dünner, extrakorporaler Fäden, die über den Byssustamm mit dem Retraktormuskel des Muschelgewebes verbunden sind, und deren Enden über Haftscheiben (Plaques) die Befestigung zum Untergrund vermitteln (Abb. 1-2). Wird diese nicht mehr benötigt, verursacht die Muschel durch Zug an einzelnen Fäden deren Zerreißen. Der Byssusfaden kann in einen proximalen (Muschel-naher Bereich) und distalen (Muschel-ferne Region) Fadenteil unterteilt werden, wobei sich beide Fadenteile in ihrer Morphologie, ihren mechanischen Eigenschaften und ihrem Aufbau unterscheiden.

### 1.2.1 Mechanische Eigenschaften des Muschelbyssus

Studien zu den mechanischen Eigenschaften der Byssusfäden zeigen, dass der distale Teil eine hohe Zugfestigkeit besitzt, damit die Muschel bei Wellenbewegungen nicht vom Stein gerissen wird, während der proximale sehr elastisch ist und somit als Stoßdämpfer wirkt (Waite et al., 2002). Dabei ändert sich die Steifigkeit des Byssusfadens graduell von einer geringen Materialsteife im proximalen Teil zu einer hohen Steifigkeit im distalen Bereich. Eine Besonderheit im mechanischen Verhalten zeigt der distale Byssusfadenteil. Während dieser bei kleinen Dehnungen sich wie Sehnenkollagen verhält, ändert sich ab einem kritischen Dehnungswert die Steifigkeit des Materials, wobei der Faden bei geringem Kraftaufwand verlängert wird (Brazee & Carrington, 2006; Vaccaro & Waite, 2001). Dieses sogenannte *Yield*-Verhalten erhöht die Zähigkeit des Byssusfadens und ermöglicht eine effektive Ableitung der mechanischen Energie (Aldred et al., 2007; Bertoldi & Boyce, 2007). Darüber hinaus zeigt der distale Fadenteil eine Fähigkeit zur „Selbstheilung“. Wird dieser bis in den *Yield*-Bereich gestreckt und die einwirkende Kraft eingestellt, ist das Material in der Lage, seine initialen mechanischen Eigenschaften teilweise wiederzuerlangen (Brazee & Carrington, 2006).

### 1.2.2 Produktion der Byssusfäden in der Muschel

Die Byssusfäden werden in einem speziellen Organ der Muschel hergestellt - dem Muschelfuß (Abb. 1-3A). Neben der Produktion des Byssusapparates dient dieser darüber hinaus der Fortbewegung, wie beispielsweise dem Eingraben in lockeren Sand, wodurch dieses Organ seine Bezeichnung erhielt.



**Abb. 1-3 Aufbau des Byssusapparates**

A) geöffnete Miesmuschel: 1 durchtrennter vorderer Schalenschließmuskel, 2 - Mantelgewebe, 3 - Kiemen, 4 - Muschelfuß, 5 - Byssusfäden; B) Schema des Muschelfußes und des Byssusfadens: 1 - Drüsen des Byssusstammes, 2 - Kollagendrüsen, 3 - akzessorische Drüsen, 4 - ventrale Rinne mit vorgeformtem Faden, 5 - phenolische Drüsen (Foto: Anja Hagenau)

Zur Produktion des Fadens elongiert der Muschelfuß und presst sich an einen geeigneten Untergrund (Price, 1983). Spezialisierte Drüsenzellen produzieren dabei die Komponenten des Byssusstamms, der Haftscheibe und des Fadens, welche in die ventrale Rinne des Muschelfußes sekretiert (Abb. 1-3B) und vergleichbar zu einem Spritzgussverfahren oder dem Formpressen zum Faden geformt werden. Die Drüsen des Byssusstamms produzieren dabei die Komponenten des Stammes, während die Zellen der Kollagendrüsen die Proteine des Fadenkerns sekretieren. Die Moleküle werden dabei bis zur Entlassung in die ventrale Rinne in den sekretorischen Vesikeln als vorgeformte fibrilläre Filamente gelagert (Zuccarello, 1980), wobei dieser Speicherzustand mit einer smektischen Phase von Flüssigkristallen verglichen wurde (Harrington & Waite, 2008b; Hassenkam et al., 2004). In den akzessorischen Drüsen erfolgt die Herstellung der Proteine der Fadenkutikula, der Schutzschicht des Byssusfadens, und die phenolischen Drüsen sind für die Produktion der Bestandteile der Haftscheibe (Proteine, Lipide, Carbohydrate) verantwortlich (Price, 1983; Tamarin & Keller, 1972). Die Sekretion aller Komponenten erfolgt gleichzeitig und von allen Seiten der ventralen Rinne. Die Komponenten der phenolischen Drüsen werden in die distale Mulde sekretiert und fließen dann Richtung proximaler Teil (Price, 1983). Nach Erreichen einer Haftung zum Substrat über den Plaque, wird zunächst der distale Fadenteil aus dem Muschelfuß entlassen, wobei von der Muschel mechanischer Zug auf den Faden ausgeübt wird. Nach vollständiger Aushärtung wird auch der proximale Fadenteil freigegeben und der Muschelfuß zieht sich in die Muschelschale zurück. Beim Verfestigen des Fadens spielen spontane und Enzym-regulierte quervernetzende Reaktionen eine große Rolle (Waite et al., 1998), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

### **1.2.3 Aufbau des Byssusfadens**

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von Fadenlängsschnitten (Bairati & Vitellaro Zuccarello, 1976; Vitellaro-Zuccarello et al., 1983) zeigen, dass der Byssusfaden aus einem Fadenkern besteht, der von einer elektronendichten Schicht, der Kutikula, umgeben ist. Vergleichbar zu einem faserverstärkten Verbundmaterial setzt sich der Fadenkern aus fibrillären Strukturen zusammen, welche in eine Matrix eingebettet sind. Dabei sind die Fibrillen des proximalen Fadenteils gewellt in einer lockeren Matrix angeordnet, während die Fibrillen des distalen Teils langgestreckt und von einer dichten Matrix umgeben sind. Bei Querschnitten des distalen Fadenteils wurde eine regelmäßige Anordnung der Fibrillen beobachtet, welche durch Hohlräume unterbrochen wurden, die

als Wasserspeicherreservoirs dienen könnten (Bairati & Vitellaro Zuccarello, 1976). Auch polarisationsmikroskopische Studien am Muschelbyssusfaden (Bairati & Zuccarello, 1974) und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Holten-Andersen & Waite, 2008; Holten-Andersen et al., 2007) bestätigen das Vorhandensein von hochgeordneten Fibrillen im Fadenkern.

#### 1.2.3.1 Kutikula

Die Kutikula des Byssusfadens und deren Funktionsweise wurden eingehend untersucht. Neben Metallionen (Eisen, Aluminium, Silizium, Kalzium) und einem hohen Gehalt an Fettsäuren (8 %) wird der Hauptbestandteil der Kutikula durch das Protein Mfp-1 (*muschel foot protein 1*) gebildet (Holten-Andersen & Waite, 2008; Sun & Waite, 2005). Dieses formt sowohl kugelförmige Strukturen (Granula) als auch die Matrix der Kutikula (Holten-Andersen et al., 2007). Die Aminosäuresequenz von Mfp-1 enthält 83-85 Wiederholungen des Motivs (Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-diHyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys), wobei DOPA der nicht-kanonischen Aminosäure L-3,4-Dihydroxyphenylalanin entspricht (Holten-Andersen & Waite, 2008; Inoue & Odo, 1994). Dieses neigt unter anderem zur Ausbildung von DOPA-Metall-Komplexen, welche eine stabile Quervernetzung darstellen und eine wesentliche Rolle bei der Funktionalität der Kutikula spielen (Harrington et al., 2010). Anhand von Raman-spektroskopischen Untersuchungen wurde ein Modell zur Komplexbildung dreiwertigen Eisens mit DOPA postuliert, welches eine bidentate Koordinierung (zwei Carbonyl-gruppen eines Chinons binden gleichzeitig an ein Metallion) eines Eisen(III)-Ions mit drei DOPA-Resten vorsieht.

Die Kutikula schützt zum einen den Fadenkern vor äußeren Einflüssen und muss zum anderen dessen Bewegungen folgen können. Somit wirken auf die Kutikula mechanische Belastungen wie Zug-, Kompressions- und Scherkräfte. Mechanische Zugmessungen ergaben, dass die granuläre Kutikula von *M. galloprovincialis* erst bei einer 70 %igen Fadendehnung reißt (Holten-Andersen et al., 2007). Dies wird durch das Entstehen von Mikrorissen in der Matrix der Kutikula erreicht, was eine Verteilung der Materialschädigung auf ein großes Volumen ermöglicht (Holten-Andersen & Waite, 2008). Es wird angenommen, dass diese Mikrorisse durch das Auflösen der DOPA-Eisen-Komplexe aufgrund mechanischer Belastung verursacht werden. Erst wenn die Mikrorisse zu groß werden und zusammenfließen, kommt es zum Reißen der Kutikula. Wird jedoch die Fadendehnung bei ca. 30 % eingestellt, können sich diese Chelat-Komplexe neu



formieren und die Mikrorisse geschlossen werden (Harrington et al., 2010), wodurch die Lebensdauer der Byssusfäden erhöht wird.

### 1.2.3.2 Proteinmatrix des Fadenkerns

Während der Anteil der Fadenkernmatrix im proximalen Teil 34 % des Gesamtprotein-gehaltes darstellt, entspricht er im distalen Bereich lediglich 4 % (Waite et al., 2002). Bislang konnten zwei potentielle Matrixproteine identifiziert werden. Das wasserlösliche Matrixprotein PTMP-1 (*proximal thread matrix protein 1*) wurde aus dem proximalen Fadenteil isoliert und besitzt einen hohen Anteil der Aminosäuren Gly, Asp und Asn sowie Glu und Gln (Sun et al., 2002). Für das gereinigte PTMP-1 konnten Glykosylierungen mit  $\alpha$ -D-Manno- und  $\alpha$ -D-Glukopyranosyl-Resten nachgewiesen und eine hohe Affinität des PTMP-1-Extraktes gegenüber Kollagen Typ I detektiert werden. Die cDNA-basierte Proteinsequenz zeigte zwei identische Motive, welche Ähnlichkeit zu den kollagenbindenden Domänen des van Willebrandt-Faktors und Integrin  $\alpha_1$ I besitzen (Sun et al., 2002). Diese Domänen bilden ein spezielles Sekundärstrukturmotiv aus, bei dem sechs  $\beta$ -Faltblätter von sechs  $\alpha$ -Helices umgeben sind (Qu, 1995; Sadler, 1998).

Ein weiteres Matrixprotein wurde durch Analysen des Extraktes distaler Fadenteile identifiziert (Sagert & Waite, 2009). Mit einem hohen Anteil an Gly, Tyr und Asn zeigt TMP (*thread matrix protein*) repetitive Sequenzmotive. Anhand der entsprechenden RNA-Verteilung konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein im gesamten Byssusfaden vorliegt. Eine Besonderheit der Proteinsequenz des TMPs ist die häufig auftretende Aminosäureabfolge Asn-Gly, welche zur spontanen Deaminierung zu iso-Asparaginsäure neigt. Dies kann neben der Einführung negativer Ladungen zu einer veränderten Verknüpfung des Peptidrückgrats führen, was tiefgreifende Auswirkungen auf die Proteinstruktur von TMP haben kann. Da diese Reaktion eine pH-Abhängigkeit zeigt (erhöhte Deaminierungsrate bei pH 8), könnte TMP eine Rolle im Assemblierungsmechanismus beim Byssusfadenbildungsprozess spielen (Sagert & Waite, 2009). Die genaue physiologische Relevanz der Deaminierung im Falle von Matrixproteinen des Byssusfadens ist jedoch bislang nicht geklärt.

### 1.2.3.3 Kollagen-ähnliche Proteine des Fadenkerns (*preCols*)

Mittels Röntgenbeugungsanalysen am distalen Byssusfaden konnten kollagenähnliche, tripelhelikale Strukturen nachgewiesen werden (Mercer, 1952; Rudall, 1955), was auf das Vorhandensein von Kollagenfibrillen im Muschelbyssusfaden hinweist.

In Byssusfadenextrakten wurden Proteine, die sogenannten *preCols*, identifiziert. Der Name *preCol* kennzeichnet die kollagen-ähnlichen Vollängenproteine des Byssusfadens und leitet sich historisch gesehen von *pre-pepsinized collagens* ab. Durch Pepsinierung der Byssusfäden wurden zunächst stabile Fragmente mit einer kollagen-ähnlichen Aminosäurezusammensetzung identifiziert (Qin & Waite, 1995). Anhand von Aminosäureanalysen und der Isolierung der Gensequenzen aus einer cDNA-Bank des Muschelfußes konnten später die vollständigen Proteinsequenzen der *preCols* aufgeklärt werden (Coyne et al., 1997; Lucas et al., 2002; Qin & Waite, 1998; Qin et al., 1997; Silver et al., 2003). Diese Proteine weisen eine graduelle Verteilung über den Faden auf (Abb. 1-4). Während *preCol P* Hauptbestandteil des proximalen Fadenteils ist, findet man *preCols D* vornehmlich im distalen Teil des Fadens. Die Verteilung dieser *preCols* erfolgt in einem stufenlosen Übergang entlang des Fadens (Qin & Waite, 1995). Ein drittes *preCol*-Protein wurde im gesamten Byssusfaden nachgewiesen und dementsprechend *preCol NG* (nicht-graduell) genannt (Qin & Waite, 1998).

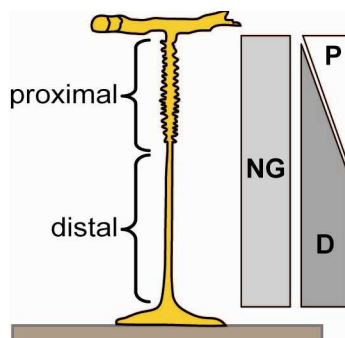
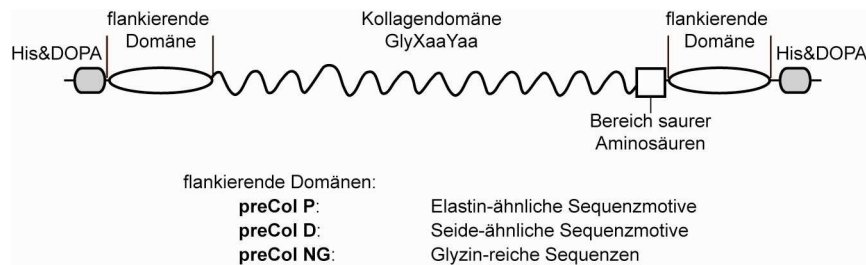


Abb. 1-4 Verteilung der *preCols* entlang des Byssusfadens

Die *preCols* weisen einen ausgeprägten Multidomänen-Charakter auf (Abb. 1-5). Sie besitzen eine zentrale Kollagendomäne, welche das für Kollagene charakteristische Sequenzmotiv GlyXaaYaa beinhaltet, wobei Xaa und Yaa beliebige Aminosäuren darstellen, allerdings zum großen Teil in Xaa-Position Prolin und in Yaa-Position Hydroxyprolin vorkommen. Eine solche Aminosäureabfolge bildet, wie in Kapitel 1.1.2 besprochen, in Kollagenen die Grundlage für die Faltung in eine tripelhelikale Struktur. Dieses regelmäßige Muster wird in einigen Triplets der *preCols* durch Deletionen und Substitutionen sowie Insertionen unterbrochen (Lucas et al., 2002; Waite et al., 1998). Es

wird angenommen, dass diese Abweichungen in einer Tripelhelix Molekülknicke verursachen können (Coyne et al., 1997; Harrington & Waite, 2008b; Qin & Waite, 1998; Qin et al., 1997).



**Abb. 1-5 Schematische Darstellung eines Einzelpeptidstranges der preCols**

Die preCols unterscheiden sich grundsätzlich in ihren flankierenden Domänen.

Die Kollagendomäne wird von Bereichen flankiert, welche Sequenzhomologien zu anderen Strukturproteinen aufweisen (Scheibel & Serpell, 2005). Die flankierenden Domänen unterscheiden sich zwischen den verschiedenen preCols in ihren Aminosäuremotiven. Während preCol P Sequenzmotive enthält, die auch in Proteinen wie Elastin, Resilin oder Flagelliform-Spinnenseide vorkommen (Coyne et al., 1997; Lucas et al., 2002), zeigen die des preCol Ds Ähnlichkeiten zu den repetitiven Sequenzen der Maulbeerspinnerseide oder der Spinnenseide des Abseilfadens von Radnetzspinnen (Lucas et al., 2002; Qin et al., 1997). Die flankierenden Bereiche des preCol NGs hingegen beinhalten hauptsächlich Glycin-reiche Sequenzen (Lucas et al., 2002; Qin & Waite, 1998).

An den jeweiligen Enden der preCol-Moleküle befinden sich des Weiteren Abschnitte mit einem hohen Anteil an Histidin und bis zu vier Tyrosinen und wurden somit als His&DOPA-Domänen bezeichnet (Lucas et al., 2002; Waite et al., 1998)(Abb. 1-5). Im natürlichen Byssusfaden konnten mittels Röntgenbeugung-Emissions-Spektroskopie Übergangsmetalle wie Zink, Kupfer und Eisen nachgewiesen werden (Vaccaro & Waite, 2001). Untersuchungen zum Einfluss der Metallkomplexe auf die Steifigkeit des Fadens zeigen, dass ein Vorhandensein von Metallionen unerlässlich für dessen mechanische Eigenschaften ist (Vaccaro & Waite, 2001). Da Histidin-Reste zur Koordinierung von zweiwertigen Metallen wie Kupfer(II)- und Zink(II)-Ionen tendieren, wird angenommen, dass die Histidin-reichen Termini der preCols durch Metall-Komplexierung eine axiale Quervernetzung vermitteln (Waite et al., 2002; Waite et al., 2004), und dass aufgrund der Reversibilität dieser Komplexbildung diese Sequenzbereiche maßgeblich am "Selbstheilungs"-Prozess der Byssusfäden beteiligt sind (Harrington & Waite, 2007;

Vaccaro & Waite, 2001). Die Tyrosine der carboxy- und aminoterminalen Domänen der preCols zeigen eine posttranslationelle Modifizierung zu DOPA (Qin et al., 1997). Diese können wie bei Mfp-1 (siehe Kapitel 1.2.3.1) intermolekulare Interaktionen über die Koordinierung von Eisen(III)-Ionen eingehen, aber auch kovalente Quervernetzungen zwischen benachbarten preCols ausbilden. Dabei reagiert die hochreaktive oxidierte Form des DOPAs (DOPA-Chinon) mit einer weiteren DOPA-Seitenkette zu diDOPA (Waite, 2002). Aber auch His-, Cys- und Lys-Seitengruppen können statt eines zweiten DOPAs involviert sein (Waite et al., 1998). Dadurch wird möglicherweise eine lineare Quervernetzung der preCols erreicht (Harrington & Waite, 2008b).

Somit spielen die His&DOPA-reichen Domänen der preCols sowohl bei der Vermittlung mechanischer Eigenschaften als auch bei der Assemblierung der preCols während des Fadenbildungsprozesses eine wichtige Rolle (Harrington & Waite, 2008b).

#### *1.2.3.4 Der Muschelbyssusfaden - ein Gradientenmaterial*

Die Ausbildung verschiedener mechanischer Eigenschaften entlang des Byssusfadens setzt den Einsatz von Materialien mit unterschiedlichen Steifigkeiten voraus. Bei einer Kombination weicher und harter Komponenten in einem Kompositmaterial bilden jedoch deren Kontaktstellen potentielle Schwachstellen. Die verschiedenen Steifigkeiten der einzelnen Komponenten zeigen bei mechanischer Belastung unterschiedliches Deformationsverhalten, was an den Grenzflächen zu einer Erhöhung der Spannungen zwischen den Materialien führt.

Im Byssusfadenkern bilden neben den Matrixproteinen die preCols den Hauptteil der funktionsvermittelnden Einheiten. Es wird davon ausgegangen, dass die preCols aufgrund ihrer Diversität der Aminosäuresequenzen der flankierenden Domänen unterschiedliche mechanische Eigenschaften vermitteln. Somit ergeben sich sowohl an den Grenzflächen zwischen der Fadenkernmatrix und den fibrillenbildenden preCols, als auch an den Kontaktpunkten der einzelnen preCols potentielle Materialschwachstellen im Byssusfaden (Waite et al., 2004). Um dies zu minimieren, sind die funktionsvermittelnden Komponenten (preCol P und D, PTMP-1) graduell über den Faden verteilt, wodurch großflächige Grenzbereiche vermindert und somit lokale Spannungen auf eine größere Fläche bzw. Volumen verteilt werden (Suresh, 2001). Zur Verbesserung der Interaktion an Kontaktflächen weisen die preCols einen hohen Vernetzungsgrad beispielsweise durch die Ausbildung von Metall-Chelatkomplexen in den His&DOPA-Domänen und kovalenten

intermolekularen diDOPA-Bindungen auf. Eine hohe Zahl an Quervernetzungen und der graduelle Verbund der einzelnen Komponenten des Byssusfadens tragen maßgeblich zu dessen Stabilität und mechanischer Belastbarkeit bei.

### 1.3 Zielsetzung

Byssusfäden von Miesmuscheln vereinen in einem mechanischen Gradienten elastisches Materialverhalten an einem Fadenende mit einer hohen Steifigkeit am anderen, was durch die Komposition und das Arrangement der Proteinkomponenten des Fadens maßgeblich bestimmt wird. Somit stellt der Byssusfaden ein Modellsystem für biologische Materialien mit strukturvermittelter Funktion dar. Den Hauptbestandteil der Byssusfäden bilden in eine Matrix eingebettete Proteinfibrillen, die aus kollagenähnlichen Multidomänenproteinen (preCols) bestehen und von denen angenommen wird, dass sie verantwortlich für die Ausbildung der mechanischen Eigenschaften des Byssusfadens sind. Trotz zahlreicher Studien zur Funktion des Byssusfadens und der Identifizierung seiner Bestandteile, ist die molekulare Struktur der Proteine, deren Anordnung und ihr funktionales Zusammenspiel nur teilweise verstanden. Ziel dieser Arbeit ist es, grundlegende Erkenntnisse zum strukturellen Aufbau und der Funktionsweise des natürlichen Byssusfadens zu erwerben, um so eine bessere Vorstellung vom Zusammenwirken der unterschiedlichen strukturellen Elemente bei der Vermittlung mechanischer Funktionalität zu erhalten.

Hierfür soll der natürliche Faden zunächst materialwissenschaftlich hinsichtlich seiner mechanischen Eigenschaften und thermischen Verhaltens analysiert werden. Darüber hinaus sollen Proteinstrukturanalysen einen detaillierten Einblick in die Struktur der Byssusproteine, insbesondere der preCols, und deren Arrangement im Faden geben.

Des Weiteren dient diese Arbeit zur Erstellung von cDNA-Banken aus dem Gewebe von Muschelfüßen, um die genetischen Informationen aller am Fadenbildungsprozess beteiligter Proteine wie preCols, Matrix- und Kutikulaproteine sowie essentielle Enzyme zugänglich zu machen. Bioinformatische Analysen der aus den cDNA-Banken isolierten preCol-Sequenzen sollen zusätzliche Informationen zur tripelhelikalen Konformation der Kollagendomäne geben, und klären, ob die bisherigen Modelle zur molekularen Struktur der preCols Bestand haben.

Die Erkenntnisse der Sequenzanalysen und der Strukturuntersuchungen in Kombination mit den Ergebnissen mechanischer Studien sollten zu einem besseren Verständnis der Funktionalität der einzelnen preCol-Domänen und auch deren Zusammenwirken im Byssusfaden führen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

##### Chemikalie

2-Mercaptoethanol  
Amersham Redivue™ <sup>32</sup>P-, <sup>33</sup>P-Nucleotide  
Ampicillin Natriumsalz, >99 %  
Brilliant Blau R 250  
Bromphenolblau  
CaCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
Chloroform  
DEPC (Diethyldicarbonat)  
Essigsäure  
Ethanol  
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA),  
Titriplex III  
Glyzerin  
Glycin  
HCl  
Isopropanol  
Kanamycinsulfat  
MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
NaCl  
NaHCO<sub>3</sub>  
NaOH  
Natriumacetat  
SDS  
Silica Orange Gel  
Tris  
TRIzol® Reagent

##### Firma

*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*GE Healthcare UK Unlimited, Buckinghamshire, UK*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Merck, Darmstadt, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Merck, Darmstadt, Deutschland*  
*Merck, Darmstadt, Deutschland*  
*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*  
*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*  
*Merck, Darmstadt, Deutschland*  
  
*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*  
*Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland*

### 2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

| <b>Puffer/Lösungen</b>              | <b>Zusammensetzung</b>  |
|-------------------------------------|---|
| 10x DNA-Auftragspuffer              | 50 % (v/v) Glycerin, 10 mM EDTA, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol  |
| 10x SDS-PAGE-Laufpuffer             | 0,25M Tris/HCl, 1,92M Glycin, 1 % w/v SDS (pH 8,3)  |
| 50x TAE-Puffer                      | 2 M Tris/Acetat, pH 8,0, 50 mM EDTA   |
| 5x SDS-PAGE-Auftragspuffer (Lämmli) | 10 % w/v SDS, 50 % v/v Glycerin, 312,5mM, Tris/HCl (pH 6,8), 0,005 % w/v Bromphenolblau, 25 % v/v 2-Mercaptoethanol   |
| Entfärbelösung D nach Fairbanks     | 10 % v/v Essigsäure; 0,002 %, Brilliant Blau R 250  |
| Färbelösung A nach Fairbanks        | 25 % v/v Isopropanol; 10 % v/v Essigsäure; 0,05 % w/v Brilliant Blau R 250  |
| Künstliches Meerwasser (KMW)        | 480 mM NaCl, 28 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 24 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 16 mM CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 2,4mM NaHCO <sub>3</sub> |
| RNase-freies Wasser                 | Wasser mit 0,1 % (v/v) DEPC für 1 Stunde bei 37°C inkubieren und anschließendes Autoklavieren zur Inaktivierung von DEPC  |

| <b>Medium</b> | <b>Zusammensetzung</b>   |
|---------------|--|
| S.O.C.-Medium | 20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose |
| LB-Medium     | 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Natriumchlorid, pH-Wert 7,2, für Platten: 15g/L Agar-Agar                |
| Antibiotika   | Kanamycin (35 µg/mL), Ampicillin (50 µg/mL)  |

### 2.1.3 Plasmide

| <b>Vektor</b>           | <b>Eigenschaften</b>   | <b>Firma</b>                                   |
|-------------------------|--|--|
| pDONR <sup>TM</sup> 222 | pUC ori, Kan <sup>R</sup> , ccd B, attP1, attP2, Cm <sup>R</sup> , | <i>Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |
| pUC 19                  | <i>lacZα</i> , origin, Amp <sup>R</sup>                            | <i>Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |

Kan<sup>R</sup> – Resistenz gegenüber Kanamycin, Cm<sup>R</sup> – Resistenz gegenüber Chloramphenicol, Amp<sup>R</sup> – Resistenz gegenüber Ampicillin

### 2.1.4 Bakterienstämme und Muscheln

| <b>Stamm</b>  | <b>Genotyp</b>  | <b>Firma</b>                                   |
|---|---|--|
| <i>Electromax<sup>TM</sup> DH10B<sup>TM</sup> T1 Phage</i><br>resistente Zellen | F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ<br>ΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara,<br>leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG tonA | <i>Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |



| <b>Species</b>   | <b>Herkunftsort</b>                   | <b>Firma</b>  |
|--|---------------------------------------|---|
| Miesmuschel<br><i>Mytilus galloprovincialis</i><br>(Lamarck, 1819) | Muschelfarm in<br>(Venetien, Italien) | Goro <i>Moby Dick Fisch, Geflügel und Delikatessen Handels GmbH, Zenettistr. 11, München, Deutschland</i> |

### 2.1.5 Kits

| <b>Kit</b>                                | <b>Firma</b>                                   |
|---|--|
| RNeasy Midi Kit                           | <i>Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland</i>        |
| RNase-freies DNase Set                    | <i>Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland</i>        |
| FastTrack®MAG Midi mRNA Isolation Kit     | <i>Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |
| CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit | <i>Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |
| Wizard Plus SV Miniprep Kit               | <i>Promega, Madison, Wisconsin, USA</i>        |

### 2.1.6 Standards und Enzyme

| <b>Standard/Enzym</b>  | <b>Firma</b>   |
|--|--|
| ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) | <i>New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M., Deutschland</i> |
| 1kB DNA-Längenstandard                                       | <i>PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland</i>   |
| λBstEII DNA-Längenstandard                                   | <i>New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M., Deutschland</i> |
| BsrGI  | <i>Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland</i>             |

### 2.1.7 Sonstige Materialien

| <b>Material</b>                | <b>Firma</b>   |
|--------------------------------|--|
| Plastik Modellbaukleber        | <i>UHU GmbH &amp; Co. KG, Bühl, Deutschland</i>            |
| Alox Tiegelchen für TGA        | <i>Mettler Toledo, Giessen, Deutschland</i>                |
| Bleikügelchen für TMA          | <i>TA Instruments, Eschborn, Deutschland</i>               |
| Alutiegel für DSC              | <i>Mettler Toledo, Giessen, Deutschland</i>                |
| REM-Probenhalter               | <i>Agar Scientific Ltd., Essex, UK</i>                     |
| SERVAGel™ TG 4-20              | <i>SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland</i> |
| CaF <sub>2</sub> -Objektträger | <i>Crystal GmbH, Berlin, Deutschland</i>                   |
| Glasobjektträger               | <i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>     |
| Deckgläschen                   | <i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>     |

## 2.1.8 Geräte

| <b>Gerät</b>  | <b>Modell</b>   | <b>Firma</b>  |
|---|---|---|
| Lichtmikroskop  | Leica DMI 3000 B mit einer Leica DFC340FX Schwarz-Weißkamera, Software: Leica Application Suite   | Leica Microsystems GmbH, Deutschland  |
| Lichtmikroskop  | Leica DMIL LED mit einer Leica DFC 295 Farbkamera, Software: Leica Application Suite  | Leica Microsystems GmbH, Deutschland  |
| Rasterelektronenmikroskop                             | 1540EsB Cross Beam mit Thermo Noran System Six EDX-System Focused Ion Beam  | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland  |
| FTIR-Spektrometer                                     | Bruker Tensor 27 IR-Spektrometer<br>Detektor: MCT<br>Messeinheit: MIRacle Germanium-ATR-Kristall<br>Mikroskop: Hyperion 1000<br>Objektiv: 15x IR-objektiv<br>Filter: Infrarot-Polarisator A675P1                  | Bruker, Rheinstetten, Deutschland   |
| FTIR-Spektrometer                                     | Bruker IFS 66/s Spektrometer<br>Mikroskop: IRscope II<br>Objektiv: 36x IR-objektiv  | Bruker, Rheinstetten, Deutschland   |
| FTIR-Spektrometer                                     | Varian FTS6000<br>Detektor: MCT<br>Mikroskop: UMA 500<br>Filter: ZnSe-Polarisationsfilter (motorbetrieben)<br>Klimakammer: ZnSe-Fenster, Temperatur- und RF-Kontrolle<br>Kraftsensor: Burster 8411-10 Kraftsensor | Varian Inc., Palo Alto, California, USA<br>Burster GmbH, Deutschland                                    |
| Dynamisch-mechanische ThermoAnalyse                   | DMTA IV   | Rheometric Scientific   |
| Thermomechanische Analyse                             | TMA2940 Thermomechanical Analyzer   | Waters GmbH, TA Instruments, Eschborn, Deutschland  |
| Kalorimeter   | DSC/SDTA 821e, Stare-Software   | Mettler Toledo, Giessen, Deutschland  |
| Thermogravimeter                                      | TGA/SDTA 851e, Stare-Software   | Mettler Toledo, Giessen, Deutschland  |
| Röntgenbeugungsanalysen mit Synchrotronstrahlung WAXS | Advanced Photon Source (APS) des Argonne National Laboratory  | Argonne, Illinois, USA<br>Department of Biochemistry, School of Life Sciences, University of Sussex, UK |
| NMR-Spektrometer                                      | Bruker Advance 750 NMR-Spektrometer   | Bruker, Rheinstetten, Deutschland   |
| Zugmaschine   | Bose ElectroForce 3220  | Bose ElectroForce Systems Group, Bose Corporation, Friedrichsdorf, Deutschland                          |

| <b>Gerät</b>                 | <b>Modell</b>                            | <b>Firma</b>   |
|------------------------------|--|--|
| Exsikkator                   |  | <i>VWR International GmbH,<br/>Darmstadt, Deutschland</i>                            |
| Feinwaage                    | CPA225D                                  | <i>Sartorius AG, Göttingen,<br/>Deutschland</i>                                      |
| Konzentrator                 | Savant SpeedVac Konzentrator             | <i>Thermo Fisher Scientific,</i>   |
| Kühlzentrifuge               | Avanti J-25, Rotor: JA 20.1              | <i>Beckman Coulter Inc.<br/>Fullerton, CA, USA</i>                                   |
| Laborkugelmühle              | Dismembrator S                           | <i>Sartorius Stedim, Biotech,<br/>Göttingen, Deutschland</i>                         |
| Ofen                         | Heraeus Function Line UT 20,             | <i>Thermo Fisher Scientific Inc.,<br/>Waltham, MA, USA</i>                           |
| Pipetten                     | Eppendorff Research                      | <i>Eppendorf AG, Hamburg,<br/>Deutschland</i>  |
| Reagenzglasschüttler         | Vortexer W3                              | <i>VWR International GmbH,<br/>Darmstadt, Deutschland</i>                            |
| Reaktionsgefäßständer        | Magna-Sep™ Magnetic Particle Separator   | <i>Invitrogen GmbH, Darmstadt,<br/>Deutschland</i>                                   |
| Rührer                       | Heidolph MR 3001                         | <i>VWR International GmbH,<br/>Darmstadt, Deutschland</i>                            |
| SDS-PAGE<br>Laufapparatur:   | Mighty Small II SE250 (10 x 8 cm), basic | <i>Hoefler Inc., Holliston, MA,<br/>USA</i>  |
| Stromversorgungsgerät        | BluePower™ 500 Plus,                     | <i>Serva Electrophoresis GmbH<br/>Heidelberg, Deutschland</i>                        |
| Thermomixer                  | Thermomixer compact/comfort              | <i>Eppendorf AG, Hamburg,<br/>Deutschland</i>  |
| Thermomixer                  | Thermomixer comfort 5355                 | <i>Eppendorf AG, Hamburg,<br/>Deutschland</i>  |
| UV/VIS-<br>Photospektrometer | NanoDrop ND-1000                         | <i>PEQLAB Biotechnologie<br/>GMBH, Erlangen,<br/>Deutschland</i>                     |
| Waage                        | Ohaus Pioneer                            | <i>VWR International GmbH,<br/>Darmstadt, Deutschland</i>                            |
| Wärme/Brutschrank            | WB 560 K                                 | <i>mytron Bio- und Solartechnik<br/>GmbH, Heilbad Heiligenstadt,<br/>Deutschland</i> |

Sonstige Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

### 2.1.9 Sonstige Computerprogramme und Datenbanken

| Computerprogramm                            | Firma   |
|---|---|
| 2DFit                                       | Copyright 1987-2005 Andy Hammersley, ESRF, Grenoble, Frankreich   |
| Adobe Acrobat 8.0 Professional              | Adobe Systems, San Jose, CA, USA  |
| Adobe Illustrator CS3                       | Adobe Systems, San Jose, CA, USA  |
| Adobe Photoshop CS3                         | Adobe Systems, San Jose, CA, USA  |
| Adobe Reader 9.0                            | Adobe Systems, San Jose, CA, USA  |
| CLC Sequence Viewer 6.4                     | CLC bio, Aarhus, Denmark  |
| Collagen Stability Calculator               | <a href="http://jupiter.umdj.edu/collagen_calculator/help.php">http://jupiter.umdj.edu/collagen_calculator/help.php</a><br>neue Version 2.1 unter:<br><a href="http://compbio.cs.princeton.edu/csc/">http://compbio.cs.princeton.edu/csc/</a> |
| ExPASy - SIB Bioinformatics Resource Portal | <a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>   |
| LALIGN                                      | <a href="http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html</a>   |
| Microsoft Office 2007                       | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA   |
| OriginPro 8.1G                              | OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA   |
| Proteindatenbank: UniProtKB                 | <a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>   |
| Swiss-PdB-Viewer Deep View v4.03            | SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Schweiz  |

## 2.2 Fadenpräparation

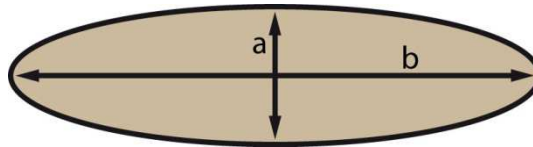
Marine Miesmuscheln der Art *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) wurden von einer Muschelfarm in Goro (Venetien, Italien) über einen Fischereigroßhandel bezogen. Die Muscheln wurden gewaschen und der Muschelbyssus nach Entfernung von der Muschel bei -20°C gelagert. Je nach Messmethode wurden die Byssusfäden individuell präpariert.

Nach Abtrennen von Byssusstamm und Plaque wurden die Einzelfäden in ihre Einzelbereiche durch Teilung am Übergangsbereich zwischen distal und proximal präpariert und unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Fadenteile wurden anschließend entweder in künstlichem Meerwasser (KMW) oder Reinstwasser (RW) bei 4°C inkubiert. KMW dient dabei zur Nachahmung der natürlichen Umweltbedingungen des Byssusfadens, während die Inkubation mit RW auf der Kutikula angelagerte und im Faden gebundene Salze entfernen soll.

Zur Dehydrierung wurden die Proben entweder über Nacht im Vakuum mit Trockenmittel Silica Orange oder mehrere Tage bei RT und einer RF von 20-25 % getrocknet.

### 2.3 Bestimmung der Querschnittsfläche des Byssusfadens

Für die Berechnung der elliptischen Querschnittsfläche des Byssusfadens (Abb. 2-1) wurden die Nebenachse ( $a$ ) und Hauptachse ( $b$ ) jedes einzelnen Fadens unter dem Lichtmikroskop Leica DMI 3000 B mittels der Auswerte-Software *Leica Application Suite* bestimmt (Kapitel 2.4.1).



**Abb. 2-1** Schema der elliptischen Querschnittsfläche des Muschelbyssusfadens  
 $a$  - Nebenachse;  $b$ - Hauptachse

Die Querschnittsfläche wurde gemäß folgender Gleichung berechnet:

$$A = \pi \cdot \frac{1}{2} a \cdot \frac{1}{2} b \quad (\text{Gleichung 2-1})$$

## 2.4 Mikroskopische Methoden

### 2.4.1 Lichtmikroskopie

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden für 50, 100, 200 und 400fache Vergrößerungen das Mikroskop Leica DMIL LED mit einer Leica DFC 295 Farbkamera bzw. das Leica DMI 3000 B mit einer Leica DFC340FX Schwarz/Weiß-Kamera verwendet, welches auch für polarisationsmikroskopische Analysen mit Polarisationsfiltern ausgestattet ist. Die Software *Leica Application Suite* wurde zur Bestimmung von Dimensionen wie Fadenlänge und Dicke genutzt. Dehydrierte Proben wurden auf einen Glasobjektträger gelegt, während hydrierte Fäden mit einem Tropfen Wasser fixiert wurden. Die Belichtungszeit betrug 30-150 ms.

#### **2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie mit fokussiertem Ionenstrahl (*focussed ion beam*, FIB)**

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden am Lehrstuhl Metallische Werkstoffe der Universität Bayreuth an einem 1540EsB Cross Beam Rasterelektronenmikroskop von Zeiss angefertigt.

Zunächst wurden die Proben im Vakuum getrocknet und mittels selbstklebenden Kohlenstoffplättchen auf Aluminium-Probenhaltern fixiert. Zur Vermittlung des Elektronenstroms wurde ein zusätzliches Aluminiumband über die Proben befestigt. Die Proben wurden anschließend bei 0,1 mbar und 30 mA für 40 sek oder zweimal 40 sek mit Gold besputtert. Die Dicke der Goldschicht betrug 10-20 nm.

Es wurden eine Beschleunigungsspannung von 3 kV und ein Arbeitsabstand von 4-5 mm verwendet. Die Signale der Detektoren InLens und SE2 wurden mit einem Faktor von 0,2503 gemixt. Bei Aufnahmen mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV wurde ein Abstand von 2,2 mm und ein Mix-Signal von 0,5 verwendet.

Zum Schneiden des Byssusfadens mit fokussiertem Ionenstrahl (*focussed ion beam*, FIB) wurden Stromstärken von 2 nA und 200 pA verwendet und das Material für 15, 30 oder 45 min geschnitten.

### **2.5 Mechanische Zugmessung**

Die mechanischen Eigenschaften eines Materials sind gekennzeichnet durch dessen Vermögen, sich bei Belastung zu verformen und somit die einwirkende Kraft abzuleiten. Zu mechanischen Belastungen zählen dabei Zug und Druck, Biegung und Torsion. Die mechanischen Eigenschaften der Muschelbyssusfäden wurden mittels mechanischen Zugmessungen bestimmt.

Die Fäden wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben in ihren distalen und proximalen Bereich unterteilt, in den entsprechenden Lösungen länger als eine Woche inkubiert und anschließend ein Teil der Proben getrocknet.

Als Probenhalter wurden lasergeschnittene Plastikrahmen mit einer Aussparung für eine definierte Probenlänge von 2 mm verwendet und die Fadenteile mit einem wasserunlöslichen Modellbaukleber (UHU plast Kunststoff Modellbau, UHU) mittig auf die Probenhalter geklebt. Nach Aushärten des Klebers wurden die hydrierten Proben bis

zur Messung in der entsprechenden Lösung und die dehydrierten Proben an Luft gelagert. Mit Hilfe des Lichtmikroskops wurden die Fadenquerschnittsflächen anhand der längsten und kürzesten Seite des Fadens bestimmt (Kapitel 2.3) und die Flächen mit Gleichung 2-1 berechnet.

Die mechanischen Zugmessungen wurden an einer Bose ElectroForce 3220 Zugmaschine durchgeführt, welche mit einer 250 g Kraftmessdose und einer Klimakammer, geeignet für Messungen in Lösung, ausgestattet ist. Mit einer Zuggeschwindigkeit von  $0,1 \text{ mm sek}^{-1}$  (entspricht  $5 \text{ \% sek}^{-1}$ ) wurden die Längenänderungen der Proben und die dabei aufgewendete Kraft über einen Zeitraum von 75-200 sek aufgenommen. Die Messungen der dehydrierten Proben erfolgten bei RT ( $20\text{-}23^\circ\text{C}$ ) und einer RF von 25-30 %, während die hydrierten Proben in Lösung gemessen wurden.

Zur Auswertung wurden Messungen ausgewählt, bei denen der Materialbruch in der Mitte des Fadens erfolgte. Dadurch konnten trotz einer hohen Probenanzahl (20-30 pro Probensatz) nur 6-9 Messungen pro Probensatz zur Bestimmung der die mechanischen Parameter herangezogen werden.

Zunächst wurden anhand der Längenänderung der Probe und der dabei aufgewendeten Kraft die nominelle Dehnung und technische Spannung mit folgenden Gleichungen berechnet:

$$\varepsilon = \Delta L / L_0 \quad (\text{Gleichung 2-2})$$

$$\sigma = F / A_0 \quad (\text{Gleichung 2-3}),$$

wobei  $\varepsilon$  der nominellen Dehnung,  $\Delta L$  der Längenänderung,  $L_0$  der Anfangslänge der Probe,  $\sigma$  der technischen Spannung,  $F$  der aufgewendeten Kraft und  $A_0$  der anfänglichen Fadenquerschnittsfläche entspricht.

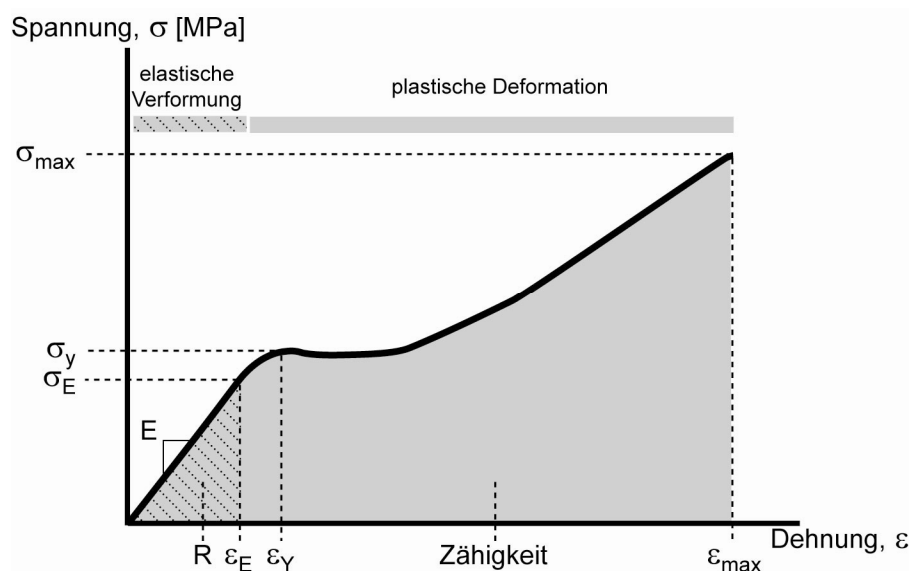
Da jedoch der Byssusfadens bei Streckung bei gleichbleibendem Volumen dünner wird, verkleinert sich die Querschnittsfläche, auf welche die Kraft wirkt (Pearce & Labarbera, 2009). Somit sind die Werte der technischen Spannungs-Dehnung-Kurve besonders im Bereich großer Dehnung zu niedrig bewertet. Die reale oder wahre Spannung und Dehnung lässt sich über folgende Gleichungen berechnen (Hepburn et al., 1979):

$$\varepsilon_r = \ln(1 + \varepsilon) \quad (\text{Gleichung 2-4})$$

$$\sigma_r = \sigma(1 + \varepsilon) \quad (\text{Gleichung 2-5}),$$

wobei  $\varepsilon_r$  und  $\sigma_r$  jeweils der realen Dehnung und Spannung entsprechen.

Eine Spannungs-Dehnungskurve eines viskoelastischen Werkstoffes ist in Abb. 2-2 schematisch dargestellt. Der Kurvenverlauf lässt sich in einen linear elastischen Bereich mit reversibler Verformung des Materials und einen plastischen Deformationsbereich unterscheiden.



**Abb. 2-2 Spannungs-Dehnungskurve eines viskoelastischen Materials**

$\sigma$  - Spannung,  $\varepsilon$  - Dehnung,  $\sigma_{max}$  - Zugfestigkeit,  $\varepsilon_{max}$  - Dehnbarkeit,  $\sigma_E$  - Spannung an der Elastizitätsgrenze,  $\varepsilon_E$  - Dehnung an der Elastizitätsgrenze,  $\sigma_Y$  - Spannung am Yield-Punkt,  $\varepsilon_Y$  - Dehnung am Yield-Punkt,  $E$  - E-Modul/Elastizitätsmodul/Young's Modul,  $R$  - Resilienz

Die Materialkenngrößen wurden anhand der Spannungs-Dehnungskurve wie folgt bestimmt:

Bei linearer Krafteinwirkung auf ein Material, wird dessen Steifigkeit durch den Elastizitätsmodul  $E$  (auch: E-Modul, Elastizitätskoeffizient oder Young's Modul) beschrieben, welcher den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung im linear elastischen Verhalten eines Materials beschreibt. Er entspricht der Proportionalitätskonstante des Hooke'schen Gesetzes (Gleichung 2-6) und somit dem Anstieg der Spannungs-Dehnungskurve im linear elastischen Bereich, welcher mittels linearer Regression in entsprechenden Kurvenbereich ermittelt werden kann.

$$\sigma = E * \varepsilon \quad \text{(Gleichung 2-6)}$$

Die Elastizitätsgrenze markiert das unmittelbare Ende des linear elastischen Bereiches.



Bei viskoelastischen Materialien ist der *Yield*-Punkt am Ende des linear elastischen Bereiches gekennzeichnet durch eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Änderung der Steifigkeit des Materials (Längenänderung mit geringem bis keinen Kraftaufwand) und somit in einer Änderung des Kurvenanstiegs. Dieser Punkt wurde durch den Schnittpunkt zweier Kurven-Tangenten im Bereich des *Yield*-Punktes bestimmt.

Die Zugfestigkeit, die der maximalen Spannung und somit der Bruchspannung ( $\sigma_{max}$ ) entspricht, und die Dehnbarkeit des Fadens (maximale Dehnung, Bruchdehnung,  $\varepsilon_{max}$ ) wurden dem Spannungs-Dehnungsdiagramm direkt entnommen.

Die Zähigkeit eines Materials beschreibt die gesamte Energie, die ein Material aufnehmen kann, ohne zu brechen und entspricht dem Integral der gesamten Spannungs-Dehnungskurve. Die Resilienz - die maximale Energie, die ein Werkstoff speichern kann ohne plastische Deformation und somit dem elastischen Verhalten des Materials entspricht, wurde aus der Kurvenfläche bis zur Elastizitätsgrenze bestimmt.

Zur Auswertung der mechanischen Parameter wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aller Messungen der jeweiligen Probensätze bestimmt.

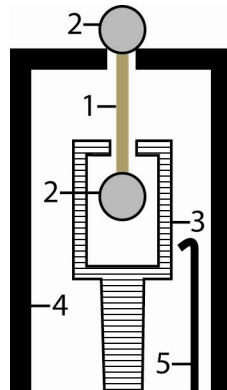
## 2.6 Thermoanalysen

### 2.6.1 Thermomechanische Analyse (TMA)

Die mechanischen Eigenschaften eines Materials können sich je nach Temperatur ändern. Dabei können thermische Effekte wie Materialerweichung und -versteifung, Schrumpfen, Deformation und Phasenumwandlungen auftreten. Die Thermomechanische Analyse (TMA) untersucht die temperaturabhängige Materialantwort unter minimaler mechanischer Belastung. Dabei können neben dem thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha$  auch Phasenübergänge und Schmelzprozesse ermittelt werden.

Die Änderung der Länge des Byssusfadens in Abhängigkeit der Temperatur wurde an einem TMA2940 *Thermomechanical Analyzer* (TA Instruments) mit einem Messaufbau für Längenänderungen (Abb. 2-3) analysiert. Die Byssusfäden wurden gemäß Kapitel 2.2 vorbereitet und anschließend die jeweiligen Enden des Fadens in Aluminiumkugeln mit einem Gewicht von ca. 46 mg eingespannt. Hydrierte Proben wurden bis zum Bestücken des Messgeräts in den entsprechenden Lösungen gelagert. Die präparierten

Proben wurden in den Messaufbau eingespannt und eine statische Kraft von 5-10 mN zum Straffen der Probe angelegt.



**Abb. 2-3 Messaufbau der thermomechanischen Analyse (TMA)**

Die jeweiligen Enden der Probe (1) wurden in Aluminiumkugeln (2) eingeklemmt und zwischen dem beweglichen Messarm (3) und der Aufhängung (4) mit einer geringen statischen Kraft von 5-10 mN gespannt. Der bewegliche Arm folgt der Längenänderung des Fadens, und die Temperatur wurde mittels Temperaturfühler (5) kontrolliert.

Vor jeder Messung wurde die Anfangslänge der Probe (5-11 mm) bestimmt. Anschließend wurde die Temperatur mit einem Gradienten von  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  bis  $300^{\circ}\text{C}$  erhöht und die Änderung der Fadenlänge aufgezeichnet.

Die Rohdaten wurden auf die Fadenanfangslänge, welche 100 % entspricht, normiert und die so erhaltene TMA-Kurve zeigt die Längenänderung des Materials. Die jeweilige Verkürzungsrate wurde durch lineare Regression in einem Temperaturbereich von  $40-170^{\circ}\text{C}$  (langsameres Schrumpfen) und von  $205-215^{\circ}\text{C}$  (abruptes Schrumpfen) ermittelt. Der Schnittpunkt beider Geraden bildet den Startpunkt des abrupten Schrumpfens. Das Minimum der Kurve und der Wert der maximalen Elongation des Fadens wurden der Kurve direkt entnommen.

Des Weiteren wurde der thermische Längenausdehnungskoeffizient  $\alpha$  bestimmt, welcher das Verhalten eines Materials bei Temperaturänderung charakterisiert. Dieser wurde gemäß Gleichung 2-7 berechnet und entspricht dem Anstieg der TMA-Kurve und somit deren erster Ableitung.

$$\alpha = 1/L_0 \cdot \Delta L/\Delta T \quad (\text{Gleichung 2-7}),$$

wobei  $L_0$  die Fadenausgangslänge,  $\Delta L$  die Änderung der Fadenlänge und  $\Delta T$  die Temperaturänderung beschreibt. Hierbei gilt, je höher der thermische Ausdehnungskoeffizient ist, desto weicher das Material.

### 2.6.2 Bestimmung der temperaturabhängigen Änderung der Fadenmorphologie

Zur Untersuchung der makroskopischen Dimensionsänderungen des Byssusfadens mit steigender Temperatur wurden distale Fäden gemäß Kapitel 2.2 in ca. 1 cm lange Stücke präpariert, unter Vakuum getrocknet und anschließend in Glaspetrischalen bei RT, 110, 190, 200, 210, 220 und 240°C für jeweils 30 min inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden am Lichtmikroskop Leica DMI 3000 B (Zeiss) bei einer 50-fachen Vergrößerung Bilder von den Fäden aufgenommen und der Durchmesser und die Länge mit der Software Leica *Application Suite* bestimmt. Die Längen- und Dickenwerte wurden anschließend auf die Anfangswerte normiert und in Abhängigkeit von der Temperatur graphisch dargestellt.

### 2.6.3 Dynamisch-Mechanische Thermoanalyse (DMTA)

Mit der Dynamisch-Mechanischen Thermoanalyse (DMTA) kann der Einfluss von Temperatur auf die mechanischen Eigenschaften eines Materials untersucht werden. Bei DMTA-Messungen wird die Probe mit einer Sinus-Frequenz um einen Dehnungswert, der im linear-elastischen Bereich der Probe liegt, gestrafft und bei steigender Temperatur der Speicher- und Verlustmodul sowie der Verlustfaktor  $\tan \delta$  ermittelt.

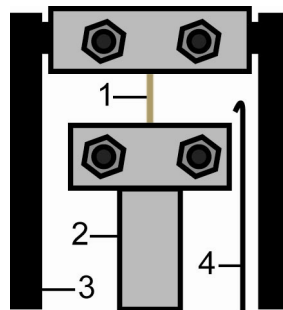
Bei viskoelastischen Materialien setzt sich der E-Modul sowohl aus einem elastischen Anteil, dem Speichermodul  $E'$ , als auch einem viskosen Anteil, dem Verlustmodul  $E''$  zusammen. Dabei entspricht  $E'$  der Steifigkeit, bei der mechanische Energie aufgenommen und wieder abgegeben werden kann, während  $E''$  den Anteil der Steifigkeit beschreibt, bei dem mechanische Energie durch Verformung in Reibungswärme umgewandelt wird. Durch Anlegen einer Sinus-Frequenz kann die zeitliche Verschiebung zwischen mechanischer Belastung und Materialantwort ermittelt werden. Die dabei auftretende Phasenverschiebung wird über den Winkel  $\delta$  angegeben. Hierbei gilt, je kleiner  $\delta$ , umso fester das Material (Ehrenstein et al., 1998). Mit dem Verlustwinkel  $\delta$  kann der E-Modul  $E$  anhand Gleichung 2-8 und der Betrag von  $|E|$  durch Gleichung 2-9 in seine Bestandteile  $E'$  und  $E''$  zerlegt werden kann.

$$E = E' + i E'' \quad (\text{Gleichung 2-8})$$

$$|E| = (E'^2 + E''^2)^{0,5} = E' / \cos \delta \quad (\text{Gleichung 2-9})$$

Der Verlustfaktor  $\tan \delta$  ergibt sich aus dem Verhältnis von  $E''$  und  $E'$  und ist ein Maß für die im Material dissipierte Energie.

Die DMTA-Messungen erfolgten an einem Rheometric Scientific DMTA IV-System mit einem Messaufbau für Zugspannung (Abb. 2-4). Hierfür wurden proximale und distale Byssusfäden präpariert und entsprechend in RW bzw. KMW inkubiert (Kapitel 2.2). Hydrierte Proben wurden feucht, während dehydrierte über mehrere Tage bei RT und einer RF von 20-25 % getrocknet in den Messaufbau eingespannt wurden. Der Fadendurchmesser wurde am Lichtmikroskop bestimmt und der Durchmesser der längsten und kürzesten Seite gemittelt, da bei der Messmethode vom Programm eine zylindrische Rundstab-Geometrie vorgegeben wurde. Somit ergaben sich Fadendurchmesser zwischen 50-100  $\mu\text{m}$ . Die distalen Fäden wurden mit einer Länge von 3-12 mm und die proximalen mit 1-2 mm jeweils an ihren Enden zwischen zwei Metallbacken festgeschraubt.



**Abb. 2-4 Messaufbau der DMTA**

Die jeweiligen Enden der Probe (1) wurden zwischen Metallbacken des beweglichen Messarm (2) und der Aufhängung (3) eingespannt. Die Proben wurden bis max. 2 % gedehnt und eine Sinusfrequenz von 1 Hz angelegt. Der Messarm registriert die entstehende Kraft, aus der die Parameter  $E'$ ,  $E''$  und  $\tan \delta$  abgeleitet werden. Die Probe wurde mit  $2^\circ\text{C min}^{-1}$  auf  $300^\circ\text{C}$  erhitzt und die Temperatur mittels Temperaturfühler (4) kontrolliert.

Vor jeder DMTA-Messung wurden mechanische Zugmessungen für kleine Kraft- und Dehnungswerte durchgeführt, um den linear-elastischen Bereich der Probe zu ermitteln. Dabei wurden bei distalen Proben Dehnungswerte zwischen 0,05-0,2 % und Kräfte von 1-10 mN als Startwert für die DMTA-Messung ausgewählt. Zu hohe Anfangswerte für Kraft und Dehnung können bei höheren Temperaturen ein Reißen des Fadens verursachen. Im Fall der proximalen Fäden wurden Dehnungen von 0,05-2 % und Kräfte von 5-20 mN verwendet.

Anschließend wurde an die gestrafften Fäden eine Sinus-Frequenz von 1 Hz angelegt. Die Temperaturerhöhung auf  $300^\circ\text{C}$  erfolgte mit einer Geschwindigkeit von  $2^\circ\text{C min}^{-1}$ . Mittels der Programmsoftware wurde direkt das Speichermodul  $E'$  und das Verlustmodul  $E''$  sowie den Verlustfaktor  $\tan \delta$  der Fäden bestimmt.

Die Werte  $E'$ ,  $E''$  und  $\tan \delta$  wurden in Abhängigkeit von der Temperatur graphisch dargestellt, wobei  $E'$  und  $E''$  logarithmisch skaliert wurden. Der Anfangswert einer Änderung in  $E'$  wurde über den Schnittpunkt zweier Tangenten im entsprechenden Kurvenbereich ermittelt. Für  $E''$  und  $\tan \delta$  wurden jeweils die Maxima direkt der Kurve entnommen.

#### 2.6.4 Thermogravimetrische Analyse

Bei der Thermogravimetrischen Analyse (TGA) wird die temperatur- und zeitabhängige Masseänderung einer Probe untersucht, um so Informationen über deren Zusammensetzung zu erhalten. Ein Gewichtsverlust wird dabei durch physikalische Prozesse wie Verdampfen, Desorption und Austrocknen oder Sublimieren und durch chemische Reaktionen wie Zersetzung, Verbrennung und Reduktion von Metalloxiden verursacht. Oxidationsreaktionen und Adsorptionsprozesse mit Spülgas können hingegen zu einer Zunahme der Masse führen.

Zur Untersuchung der Masseänderung bei steigender Temperatur wurden distale und proximale Teile der Fäden präpariert (Kapitel 2.2) und entsprechend in KMW und RW inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Vakuum mit Trockenmittel (Silica Orange Gel) über Nacht getrocknet und in 1-5 mm Stücke zerkleinert. In Aluminiumoxid-Tiegeln mit einem Fassungsvermögen von 700  $\mu\text{L}$  wurden pro Messung 4-13 mg eingewogen. Die TGA-Messungen wurden an einem TGA/SDTA 851e System (Mettler Toledo, Schweiz) durchgeführt, dessen Mikrowaage eine Genauigkeit von 1  $\mu\text{g}$  besitzt. Bei einer Heizrate von  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  wurden die Proben in einer sauerstoffreichen Atmosphäre (Spülrate  $50 \text{ mL min}^{-1}$ ) von 25 auf  $800^\circ\text{C}$  bzw.  $1100^\circ\text{C}$  erhitzt. Pro Probensatz wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

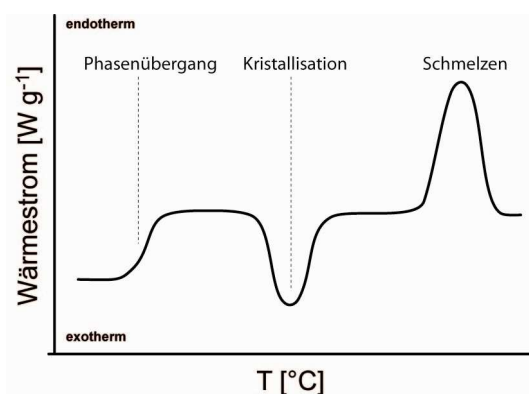
Das gemessene Gewicht wurde auf das Ausgangsgewicht der Probe normiert. Der Anfangspunkt einer Masseänderung wurde durch den Schnittpunkt zweier Tangenten im entsprechenden Kurvenbereich bestimmt. Die maximale Masseänderung eines Umsatzprozesses entspricht dem Wendepunkt ( $Wp$ ) der TGA-Kurve und wurde über die Minima der ersten Ableitung berechnet. Bei einer mehrstufigen Masseabnahme können sich Umsatzreaktionen überlagern. Dabei bleibt die Masse zwischen zwei Stufen nicht konstant, die TGA-Kurve erreicht kein Plateau. In dem Fall wurde der Mittelpunkt der beiden Umsetzungen als Definition des Temperaturbereiches eines Prozesses herangezogen.

### 2.6.5 Dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC)

Mit der Dynamischen Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) können temperaturabhängige Änderungen im Material untersucht werden, die mit einem endo- oder exothermen Wärmeeffekt einhergehen. Somit können mittels der Wärmeumsätze spezifische Wärmekapazitäten bestimmt, aber auch physikalische Prozesse wie Phasenbildungen und -umwandlungen, Kristallisationen, Verdampfen und Schmelzen und chemische Reaktionen wie Zersetzungen untersucht werden.

Für die DSC-Messungen wurden gesamte Byssusfäden, aber auch distale und proximale Teile, präpariert (Kapitel 2.2) und entsprechend in KMW und RW inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Vakuum mit Trockenmittel (Silica Orange Gel) über Nacht getrocknet und in 1-5 mm Stücke zerkleinert. Pro Messung wurden 3-6 mg Probe in Aluminium-Tiegeln eingewogen. Die DSC-Messungen wurden an einem Mettler Toledo DSC/SDTA 821e System (Mettler Toledo, Schweiz), ausgestattet mit einer keramischen Sensorplatte mit 56-fachen Au-AuPd Temperaturfühlern, durchgeführt. Die kalorimetrische Messeinheit besitzt eine Empfindlichkeit von  $7 \mu\text{W}$ . Bei einer Heizrate von  $2^\circ\text{C min}^{-1}$  wurden die Proben in einer Stickstoff-Atmosphäre (Spülrate  $20 \text{ ml min}^{-1}$ ) von  $20^\circ\text{C}$  auf  $350^\circ\text{C}$  erhitzt. Zur besseren Auflösung der Umsatzprozesse des Temperaturbereiches zwischen 20 und  $100^\circ\text{C}$  wurde zunächst auf  $100^\circ\text{C}$  aufgeheizt und nach 10-minütiger isothermer Inkubation auf  $-50^\circ\text{C}$  abgekühlt. Anschließend wurde die Probe erneut auf  $350^\circ\text{C}$  erhitzt.

Der Wärmestrom bezogen auf die Ausgangsmasse der Probe wurde gegen die Temperatur aufgetragen. Anhand dieser Kurve können nun typische Wärmeeffekte ermittelt werden (Abb. 2-5).



**Abb. 2-5 DSC-Kurve typischer thermischer Wärmeeffekte**

Ein endothermer Kurvenversatz entspricht einem Phasenübergang, während bei Kristallisationen exotherme Peaks und bei Schmelzvorgängen endotherme Peaks erhalten werden.

Nach Basislinienkorrektur wurde der Temperaturbereich eines Wärmeumsatzpeaks über den Schnittpunkt der Grundlinie zwischen rechtem und linkem Minimum mit den Tangenten an den Peakanstiegs- und -abstiegsflanken bestimmt. Der Wendepunkt von Kurvenversätzen entspricht dem Minimum der ersten Ableitung im entsprechenden Kurvenbereich. Die Enthalpie eines Wärmeumsatzes wurde durch Integration der Peakfläche berechnet.

### **2.6.6 Untersuchung des thermischen Proteinabbaus mittel SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Um zu untersuchen, inwieweit die Proteine des Byssusfadens thermisch zersetzt werden, wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Mit dieser Methode können Proteine eines Gemisches durch ihre Bewegungseigenschaften durch eine Polyacrylamid-Gelmatrix in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei bestimmen Größe des Proteins, Ladung und Molekülform die Wanderrichtung und Geschwindigkeit. Durch die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS), welches die Eigenladungen des Proteins maskiert, kann eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erreicht werden.

Distale Byssusfäden wurden gemäß Kapitel 2.2 präpariert, an Luft getrocknet und in flüssigen Stickstoff mit einem Mörser zerkleinert. Anschließend wurden die Proben in Glaspetrischalen im Ofen bei 80, 110, 150, 190, 200, 210, 220, 230 und 240°C für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 µL Probenauftragspuffer (Laemmli, 1970) wurden die Proben zur vollständigen Denaturierung der Proteine des Byssusfadens bei 95°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und 10 µL auf das Gel aufgetragen. Es wurde ein kommerzielles Tris/Glycin Gradientengel (ServaGel<sup>TM</sup> TG 4-20) verwendet und die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA für 60 min. Als Proteinstandard wurde der *Color Plus Prestained Protein Marker Broad Range* (NEB) zur Einordnung der Molekulargewichte verwendet.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden durch Anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blau nach Fairbank (Fairbank et al., 1971) sichtbar gemacht. Hierfür wurde das Gel in Fairbanks-Lösung A in der Mikrowelle aufgeköcht und 30 min darin geschwenkt. Anschließend wurde zum Entfernen nichtgebundenen Farbstoffs das Gel mehrmals in Fairbanks-Lösung D inkubiert.

## 2.7 Strukturanalysen

### 2.7.1 Festphasen-Kernspinresonanzspektroskopie (ssNMR, *solid state nuclear magnetic resonance*)

Alle beschriebenen ssNMR-Messungen wurden von Holger A. Scheidt am Institut Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg unter der Betreuung von Prof. Daniel Huster (Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Leipzig) durchgeführt.

Für die ssNMR-Analysen wurden sowohl Gesamtbyssus als auch proximale und distalen Fadenteile präpariert (Kapitel 2.2) und in RW bis zur Messung gelagert. Für die Messungen wurde das natürliche Vorkommen von  $^{13}\text{C}$ -Atomen in biologischen Materialien genutzt. Die Experimente wurden an einem Bruker Advance 750 NMR-Spektrometer mit einer Resonanzfrequenz von 188,5 MHz für  $^{13}\text{C}$  und 749,7 MHz für  $^1\text{H}$  durchgeführt, wobei hydrierte Byssusfäden in einem 4 mm *magic angle spinning* (MAS) Rotor mit Tefloneinsatz (Volumen ca. 50  $\mu\text{l}$ ) befestigt wurden. Der Doppelresonanz-MAS-Messkopf war mit einem 4 mm *spinning*-Modul ausgestattet und die MAS-Frequenz betrug 7 kHz bei 20°C. Die Länge des  $^{13}\text{C}$ -90°-Pulses betrug 7  $\mu\text{s}$ . Eine Kreuzpolarisation (*cross polarization*, CP) wurde erreicht mittels eines  $^1\text{H}$ -90°-Puls von 4  $\mu\text{s}$  über eine CP-Kontaktzeit von 700  $\mu\text{s}$ . Während der heteronuklearen Entkopplung wurde eine Feldstärke von 65 kHz für die Radiofrequenz von  $^1\text{H}$  genutzt unter Verwendung einer *two pulse phase*-Modulation (TPPM) (Bennett et al., 1995). Direkt angeregte  $^{13}\text{C}$ -Spektren (Bloch-Spektren) wurden mit Protonen-Entkopplungsstärken von 20 dB und 6,5 dB aufgenommen. Als externer Standard für die chemische Verschiebung von  $^{13}\text{C}$  wurde das  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Signal eines  $^{13}\text{C}$ -markierten Glycins bei 176,45 ppm verwendet. Für das Signal von Tetramethylsilan (TMS) (Morcombe & Zilm, 2003) wurde eine chemische Verschiebung von 0 ppm festgelegt.

In DIPSHIFT-Experimenten wurde die Stärke der  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -dipolaren Entkopplung bestimmt (Munovitz et al., 1981). Für das  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -homopolare Entkoppeln wurde die *frequency switched Lee Goldberg* (FSLG) Sequenz (Hong et al., 1997). verwendet. Im Falle der Übereinstimmung des dipolar-induzierten Signalverlustes mit der Rotorperiode, wurde nur eine Rotorperiode in indirekter Dimension herangezogen. Das dipolare, phasenverschobene Signal wurde für jeden aufgelösten Peak entnommen und über die



Rotorperiodenzeit gefittet, um so Kopplungsstärke und C-H-Ordnungsparameter zu bestimmen. Mit dem  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ - Ordnungsparameter erhält man Informationen über die Bewegungsamplitude des  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Bindungsvektors. Ein Ordnungsparameter von 0 bedeutet isotrope Bewegung des betrachteten Moleküls und ein Wert von 1 steht für absolute Rigidität.

### 2.7.2 Röntgenbeugungsanalysen am Muschelbyssusfaden

Die Röntgenbeugungsanalyse wird in der Proteinbiochemie zur Strukturaufklärung an Proteinkristallen verwendet. Aber auch Proteinfibrillen, die eine hohe Ordnung von Proteinstrukturen besitzen, können mit dieser Methode untersucht werden. Hierbei werden Proben mit kurzwelliger Röntgenstrahlung bestrahlt, wobei ein Teil dieser Strahlung mit der Elektronenhülle der Atome wechselwirkt. Bei periodisch wiederkehrenden Strukturanordnungen, wie in Proteinkristallen, kommt es somit zu einer destruktiven oder konstruktiven Interferenz der emittierten Strahlung. Der emittierte Strahl zeigt dann bezogen auf den Primärstrahl eine Beugung, welche vom Kristallgitter abhängig ist. Somit erhält man bei einer regelmäßigen Anordnung sich wiederholender Proteinstrukturen ein für das Protein bzw. das Material spezifisches Beugungsmuster (Richter, 2003).

Röntgenbeugungsanalysen wurden von Dr. Louise Serpell an der University of Sussex durchgeführt und ausgewertet. Muschelbyssusfäden wurden entsprechend in distale und proximale Fadenteile präpariert (Kapitel 2.2), in RW gewaschen und in einem Glaskapillar-Röhrchen fixiert, welches auf dem Goniometer-Kopf befestigt wurde. Es wurde eine Rikuga CuK  $\alpha$ -Drehanode und ein R-Achsen 4++ Detektor mit einem Proben-Detektor-Abstand von 160 mm verwendet. Die Belichtungszeiten betragen 10-20 min. Die Darstellung der Röntgenbeugungsmuster erfolgte unter Verwendung der CrystalClear-Software (MSC). Die Auswertung der Positionen der Beugungssignale erfolgte mit Mosflm (CCP4).

Röntgenbeugungsanalysen mit höherer Auflösung wurden unter Verwendung einer Synchrotron-Quelle am *Advanced Photon Source* (APS) des *Argonne National Laboratory* in Argonne, Illinois, USA durchgeführt. Bei diesem Teilchenbeschleuniger der dritten Generation hat die produzierte Synchrotronstrahlung eine hohe Intensität und kann besser fokussiert werden als bei herkömmlichen Röntgenstrahlungsgeneratoren. Dies ermöglicht eine höhere Auflösung der Beugungsmuster. Vollängen-Byssusfäden wurden in KMW und RW über mehrere Tage inkubiert und anschließend getrocknet. Einzelne Fäden und

Fadenbündel wurden auf Papierrahmen mit einer Aussparung von 1x1 cm aufgeklebt. Zur Verringerung von störenden Hintergrundsignalen wurden die Fäden zusätzlich ohne Papierrahmen mit Metallklammern im Strahlengang fixiert. Für die Aufnahme der Röntgenbeugung wurden Wellenlängen von 1,329 bzw. 1,033 nm verwendet und der Proben-Detektor-Abstand betrug 230,000 bzw. 254,418 mm. Die Beugungsmuster wurden mittels Fit2D-Software ausgewertet. Hierbei wurden entsprechende Bereiche des Beugungsmusters hinsichtlich der Intensität der Signale ausgewertet und die Signalintensität in Abhängigkeit der Distanz graphisch dargestellt.

### 2.7.3 Fourier-transformierte Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

FTIR-Spektroskopie stellt eine nicht-invasive Methode dar, welche Schwingungsübergänge von Bindungen untersucht und zur Strukturaufklärung von Proteinen, aber auch zur Untersuchung von Material-Anisotropien genutzt werden kann.

#### 2.7.3.1 FTIR-Spektroskopie zur Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen

Zur Analyse der Sekundärstrukturanteile im proximalen und distalen Fadenteil wurden FTIR-Messungen in Kooperation mit Dr. Sebastian Rammensee (Department Physik der TU München) an einem Bruker IFS 66/s Spektrometer mit IRscope II-Mikroskop unter Verwendung eines 36x IR-Objektiv (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden Querschnitte von proximalen und distalen Proben angefertigt und getrocknet. Anschließend wurden die Proben zwischen zwei CaF<sub>2</sub>-Probenträgern gepresst, um so eine möglichst dünne Probe zu erhalten. Die IR-Messungen erfolgten bei RT am IR-Mikroskop im Transmissionsmodus in einem Spektralbereich von 700-6000 cm<sup>-1</sup> und einer Auflösung von 4 cm<sup>-1</sup>.

Bei allen Abbildungen und Auswertungen wurden grundsätzlich Absorptionsspektren verwendet. Die Absorption  $A(\square)$  bei einer Wellenzahl  $\square$  ist definiert durch:

$$A(\square) = -\lg(I_0/I) \quad (\text{Gleichung 2-10}),$$

wobei  $I_0$  und  $I$  der Intensität des einfallenden und transmittierten IR-Lichtes entsprechen.

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur in den entsprechenden Fadenteilen wurden zunächst die Peakmaxima der Amid I und II-Banden in erster Ableitung gemäß Tab. 2-I den jeweiligen Proteinstrukturen zugeordnet.

**Tab. 2-I Absorptionsbereiche der Amid I und II-Bande und deren Zuordnung zu Sekundärstrukturen von Proteinen und Peptiden in Wasser.**

| Sekundärstruktur                      | Maximum der Amid I-Bande                                     | Maximum der Amid II-Bande    |  |
|---------------------------------------|--|------------------------------|--|
| $\alpha$ -Helix                       | 1648 – 1657 $\text{cm}^{-1}$                                 | 1545 – 1550 $\text{cm}^{-1}$ | (Fabian & Schultz, 2000; Goormaghtigh et al., 1994; Tatulian et al., 1997) |
| $\beta$ -Faltblatt                    | 1623 – 1641 $\text{cm}^{-1}$<br>1674 – 1695 $\text{cm}^{-1}$ | 1525 – 1532 $\text{cm}^{-1}$ |  |
| $\beta$ - Schleifen                   | 1662 – 1682 $\text{cm}^{-1}$                                 |                              |  |
| unstrukturiert ( <i>random coil</i> ) | 1642 – 1657 $\text{cm}^{-1}$                                 |                              |  |
| Tripelhelix                           | 1633-1640 $\text{cm}^{-1}$                                   |                              | (Lazarev et al., 1985; Vidal & Mello, 2011)                                |
| Seitengruppen                         | 1610-1628 $\text{cm}^{-1}$                                   |                              | (Goormaghtigh et al., 1994; Tatulian et al., 1997)                         |

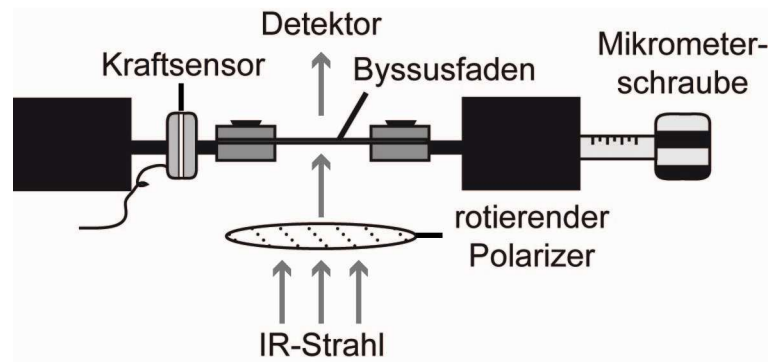
Des Weiteren wurde zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile nach Basislinienkorrektur eine Dekonvolution der Amid I-Bande mit Lorentz-Oszillatoren (OriginPro 7.5) durchgeführt.

### 2.7.3.2 Polarisierte FTIR-Spektroskopie

Für weitere FTIR-spektroskopische Messungen wurde das Bruker Tensor 27 IR-Spektrometer mit einem Trockenluft-gespülten MIRacle Ge (Germanium)-ATR (*attenuated total reflection*)-Kristall bzw. das IR-Mikroskop Hyperion 1000 im Transmissionsmodus mit einem 15x IR-Objektiv verwendet. Beide Geräte waren jeweils mit einem stickstoffgekühlten MCT (Mercury Cadmium Telluride)-Detektor ausgestattet. Bei einer Auflösung von 2  $\text{cm}^{-1}$  und einer Akkumulation von 20 Spektren bei ATR-Messungen und 80-120 Spektren bei Transmissionsmessung wurden im Spektralbereich von 4000-700  $\text{cm}^{-1}$  sowohl Gesamtbyssusfäden als auch Fadenquerschnitte und Einzelfibrillen des Fadenkerns untersucht. Für polarisierte FTIR-spektroskopische Untersuchungen wurde am Hyperion IR-Mikroskop ein manuell einstellbarer IR-Polarisationsfilter verwendet. Da die Spektrenqualität stark durch die Dicke der Probe beeinflusst wird, erlauben Transmissionsmessungen am gesamten Byssusfaden eine gute Auflösung der Amid III- und *fingerprint*-Region, während die Amid I und II-Banden durch zu hohe Absorption nicht aufgelöst werden können.

Die detaillierten Untersuchungen zur Ausrichtung der Strukturelemente im distalen Byssusfaden und deren Reaktion auf äußere mechanische Belastung wurde in Kooperation

mit Dr. Periklis Papadopoulos (Institut für Experimentelle Physik der Universität Leipzig) durchgeführt. Für die FTIR-Messungen wurde ein Messaufbau (Abb. 2-6) verwendet, welcher schon in früheren Publikationen beschrieben wurde (Ene et al., 2009; Ene et al., 2010; Hagenau et al., 2011; Papadopoulos et al., 2007; Papadopoulos et al., 2009a; Papadopoulos et al., 2009b).



**Abb. 2-6 Messaufbau für polarisierte FTIR-Messungen in Kombination mit einem Mikro-Manipulator zur Untersuchung des Einflusses äußerer mechanischer Belastung auf die Probe (Hagenau et al., 2011)**

Es wurde ein FTIR-Spektrometer Varian FTS6000 ausgestattet mit einem UMA 500 IR-Mikroskop und einem photovoltaischen MCT-Detektor verwendet. Die IR-Spektren wurden mit einer Auflösung von  $2 \text{ cm}^{-1}$  und einer Akkumulation von 256 (hydrierte Proben) und 1024 Einzelspektren (dehydrierte Proben) aufgenommen. Zur Untersuchung des Dichroismus der Proben wurde ein motorbetriebener, rotierender ZnSe-Polarisationsfilter im IR-Strahl verwendet. IR-Spektren wurden bei Polarisationswinkeln zwischen  $0^\circ$  und  $180^\circ$  in  $18^\circ$ -Schritten aufgenommen.

Dehydrierte distale Proben wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben präpariert und auf Papprahmen mit einer Aussparung für eine Probenlänge von 5 mm mit wasserunlöslichem Modellbaukleber (UHU plast Kunststoff Modellbau, UHU) fixiert. Anschließend wurden sie in den Probenhaltern des Messaufbaus eingespannt, und die Messungen erfolgten an Luft bei RT und einer RF von 20-30 %. Analysen hydrierter Proben erfolgten in einer Klimakammer mit einer kontrollierten RF von 100 %.

Die Spektren wurden basislinienkorrigiert und zwischen 0 und 1 normiert.

Bei anisotropen Materialien hängt die Absorption von der Polarisationsrichtung des IR-Strahls bezüglich der Symmetrieachse ab. Sind beispielsweise alle Übergangsmomente

entlang der Achse ausgerichtet, erhält man bei senkrechter Polarisation keine Absorption. Diese Abhängigkeit kann wie folgt beschrieben werden:

$$A(\square, \Omega) = -\log_{10} (10^{-A_{par}(\square)} \cos^2 (\Omega - \Omega_0) + 10^{-A_{per}(\square)} \sin^2 (\Omega - \Omega_0)) \quad (\text{Gleichung 2-11})$$

Dabei entspricht  $\Omega$  dem Polarisationswinkel,  $\Omega_0$  der mögliche Fehlausrichtung des Byssusfadens in der Messapparatur, und  $A_{par}$  und  $A_{per}$  den Absorptionswerten bei paralleler und senkrechter Polarisation. Der Ordnungsparameter  $S^{mol}$  beschreibt die Ausrichtung und den Grad der Orientierung einer Schwingung. Dieser wird bei zylindrischer Probengeometrie mit Gleichung 2-12 bestimmt.

$$S^{mol} = (A_{par} - A_{per}) / (A_{par} + 2 A_{per}) \quad (\text{Gleichung 2-12})$$

Da der Byssusfaden jedoch eine elliptische Querschnittsgeometrie (Kapitel 2.3, Abb. 2-1) besitzt, sollten die angegebenen  $S^{mol}$ -Werte als Näherung betrachtet werden. Hierbei gilt: Schwingungen mit Dipolübergangsmomenten, die parallel zur Fadenachse ausgerichtet sind, besitzen einen Ordnungsparameter zwischen 0 und 1, wobei ein Wert von 1 perfekte Ausrichtung und 0 isotrope Anordnung beschreibt. Liegt der Wert zwischen 0 und -0,5 sind die Schwingungen senkrecht angeordnet.

Für die Analyse der Ausrichtung der Molekülschwingungen im Byssusfaden wurden die Peakflächen der betrachteten Absorptionsbanden bei Polarisationswinkeln zwischen 0 und 180° durch manuelle Gauss-Fits (Origin 8G) nach Basislinienkorrektur (gerade Linie zwischen rechten und linken Peakminimum) bestimmt. Da sich die Schwingungen bei Polarisationswinkeln zwischen 0-180° genauso verhalten wie zwischen 180-360°, wurden die erhaltenen Werte der Peakflächen zur kompletten graphischen Darstellung in Polardiagrammen entsprechend den Winkeln bis 360° zugeordnet. Zum Fitten der Polardiagramme wurde die von Dr. Periklis Papadopoulos für Origin 8G entwickelte Fitfunktion "orderArea" benutzt. Diese kombiniert die Gleichungen 2-11 sowie 2-12, und erleichtert die Bestimmung von  $S^{mol}$  anhand der Polardiagramme.

### 2.7.3.3 *Polarisierte FTIR-Spektroskopie in Kombination mit äußerer mechanischer Belastung*

Bei äußerer, linearer mechanischer Belastung kann die externe Kraft bis auf die Molekülbindungen wirken. Entsprechend des Quantenmechanischen Modells (Schwabl,

2002) kommt es dabei je nach Eigenschaften der entsprechenden Schwingung zu einer Änderung der IR-Bandenparameter.

Zur Untersuchung des Einflusses äußerer, linearer mechanischer Belastung auf die Molekülschwingungen im Byssusfaden wurde der Messaufbau in Abb. 2-6 verwendet und die Dehnung des Fadens mit Mikrometerschrauben (Genauigkeit 5  $\mu\text{m}$ ) schrittweise erhöht. Die dabei ausgeübte Kraft wurde mit einem Burster 8411-10 Kraftsensor (Burster GmbH, Deutschland) gemessen. FTIR-Messungen wurden mit Einstellen einer konstanten Kraft nach ca. 10-20 min gestartet. Zur Bestimmung der mechanischen Spannung wurde der Kraftwert nach Erreichen einer konstanten Kraft verwendet und mit Gleichung 2-5 in reale Spannung umgerechnet.

Zur Analyse der Effekte mechanischer Belastung auf einzelne Absorptionsbanden der Fingerprintregion wurde von Dr. Periklis Papadopoulos ein Algorithmus für Origin 8G (Fitprogramm: "fit collagen") entwickelt, der automatisch für jeden Faden-Dehnungswert einzelne Banden von Spektren, die bei 0 und 90° aufgenommen wurden, hinsichtlich Peakmitte, Peakbreite, maximale Absorption des Peaks und Ordnungsparameter  $S^{mol}$  auswertet. Dieses Programm basiert auf der Bestimmung einer geraden Basislinie zwischen rechtem und linkem Peakminimum und entsprechenden Gauss-Fits.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Wellenzahlverschiebung unterschiedlicher Banden wurde jeweils die Differenz  $\Delta\tilde{\nu}$  zwischen der Bandenmitte bei 0 % Dehnung und der bei höheren Dehnungen ermittelt. Diese wurde gegen die reale Spannung aufgetragen und mittels linearer Regression im entsprechenden Bereich die Bandenverschiebung pro GPa bestimmt.

#### 2.7.3.4 Untersuchung der temperaturabhängigen Strukturänderung

Die Untersuchung der temperaturabhängigen Änderungen der Protein-Sekundärstrukturen wurden am Tensor 27 IR-Spektrometer mit ATR-Kristall durchgeführt, da hier eine bessere Auflösung der Amid I-Bande erreicht werden konnte als am IR-Mikroskop Hyperion 1000 im Transmissionsmodus. Hierfür wurden distale Byssusfäden präpariert (Kapitel 2.2), an Luft getrocknet und in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Anschließend wurden die Proben in Glaspetrischalen im Ofen bei 80, 110, 150, 190, 200, 210, 220, 230 und 240°C für 30 min inkubiert. Die Proben wurden auf den ATR-Kristall angepresst und FTIR-Spektren mit einer Auflösung von 2  $\text{cm}^{-1}$  und einer Akkumulation von 20 Spektren

im Bereich  $750\text{-}5000\text{ cm}^{-1}$  bei RT aufgenommen. Pro Temperaturschritt wurden drei Probenmessungen durchgeführt.

Weitere FTIR-spektroskopische Analysen der Temperatureffekte auf Molekülschwingungen des Byssusfadens wurden in einer temperierbaren Klimakammer mit präziser Temperatursteuerung von Dr. Periklis Papadopoulos durchgeführt. Die distalen Byssusfäden wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben präpariert und in der Klimakammer fixiert. Die Temperatur wurde in  $10^\circ\text{C}$ -Schritten auf  $260^\circ\text{C}$  erhöht und anschließend wieder schrittweise auf  $30^\circ\text{C}$  abgekühlt. Nach Einstellen einer konstanten Temperatur (nach ca. 5-10 min) wurden FTIR-Messungen im Transmissionsmodus mit einer Auflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$  und einer Akkumulation von 256 Spektren durchgeführt.

Die Spektren wurden zunächst basislinienkorrigiert und normiert. Zur Auswertung der Sekundärstrukturänderung anhand der Amid I-Bande wurde eine gerade Linie vom rechten und linken Minimum des Peaks als Basislinie abgezogen und der Bereich von  $1580\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$  normiert. Anschließend wurden Differenzspektren errechnet und die qualitative Änderung der Sekundärstrukturanteile anhand der Abhängigkeit der IR-Absorption von der Temperatur bei spezifischen Wellenzahlen analysiert.

Absorptionsbanden in der *fingerprint*-Region wurden wie in Abschnitt 2.7.3.3 beschrieben mit dem Algorithmus "fit collagen" hinsichtlich maximaler Absorption und Bandenbreite analysiert.

## **2.8 Erstellung einer cDNA-Bank aus dem Gewebe des Muschelfußes**

Der Muschelfuß ist für die Produktion des Muschelbyssusfadens in der Muschel verantwortlich. Hier werden alle Bestandteile des Fadens wie preCols, Matrix- und Kutikulaproteine sowie die für den Fadenbildungsprozess notwendigen Enzyme (Hydroxylasen oder Oxidasen) hergestellt. Aus Muschelfüßen wurden die mRNAs extrahiert, um eine stabile cDNA-Bank zu erstellen.

Die Arbeiten zur Herstellung einer cDNA-Bank aus dem Gewebe des Muschelfußes erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. Jerzy Adamski des Genomanalyse-Zentrums des Instituts für Experimentelle Genetik des GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (heute Helmholtz-Zentrum München).

### 2.8.1 Präparation der Muschelfüße

Unter Durchtrennung des Schalen-Schließmuskels wurden die Muscheln geöffnet. Die Muschelfüße wurden vom restlichen Muschelgewebe separiert und bei -20°C gelagert.

### 2.8.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Muschelfußgewebe

Muschelfüße von vier Individuen wurden ausgewählt und nach Vorkühlen auf -80°C in der Laborkugelmühle Mikro-Dismembrator S in zwei Durchgängen bei 2000 rpm für 45 sek zerkleinert. Das pulverisierte Gewebe wurde anschließend mit 4 mL Trizol suspendiert und in ein 15 mL Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 mL Chloroform wurde der Ansatz weitere 15 sek geschüttelt und anschließend bei RT drei Minuten inkubiert. Nach 15minütiger Zentrifugation mit einer Geschwindigkeit von 14.000xg bei 4°C wurde die obere Phase des Ansatzes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0,53 Volumen Ethanol tröpfchenweise unter Schütteln zugegeben. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem *RNeasy Midi Kit* nach dem Protokoll für die Extraktion von RNA aus tierischem Gewebe. Als zusätzlicher Schritt wurde zur Entfernung von DNA ein DNase-Verdau mit dem *RNase-freien DNase Set* direkt auf den Säulchen durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde mit 500 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Zur anschließenden RNA-Fällung wurde das Eluat mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt und 2,5 Volumen Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte bei -20°C für 40 min. Die gefällte RNA wurde zweimal mit 500 µL 75 %igem Ethanol gewaschen und danach in einem Speedvac-Konzentrator getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 80 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration der Gesamt-RNA mittels Nanodrop-UV/VIS-Photometer bestimmt.

### 2.8.3 Anreicherung der mRNA

Zur Anreicherung der mRNA aus dem Gesamt-RNA-Ansatz wurde der *FastTrack<sup>®</sup>MAG Midi mRNA Isolation Kit* verwendet, welcher auf der Wechselwirkung von polyA-Sequenzen der mRNA mit poly(dT)-Oligomeren basiert, welche an magnetische Partikel gebunden sind, wodurch die mRNA spezifisch aus einem RNA-Gemisch isoliert werden kann. Der Gesamt-RNA-Ansatz jeweils zweier Muschelfüße wurde vereint und die mRNA isoliert. Um auch mRNAs mit verkürzten polyA-Sequenzen effektiv zu binden, wurde eine 20minütige Inkubationszeit gewählt. Die zweifache Elution mit je 15 µL RNase-freiem Wasser erfolgte bei 37°C für 7 min. Um die für die Konstruktion der



cDNA-Bank benötigte mRNA-Menge von 5 µg in 6 µL zu erhalten, wurde die mRNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol für 2 Stunden bei -20°C gefällt und inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 14.500 rpm für 20 min bei 4°C wurde das Pellet zweimal mit 80 %igem Ethanol gewaschen, an Luft getrocknet und in 8 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen.

#### **2.8.4 Erstellung der cDNA-Bank**

Zur Erstellung der cDNA-Bank aus der isolierten mRNA wurde der *Clone Miner™ cDNA Library Construction Kit* verwendet. Dieser nutzt ein Restriktionsenzym-freies System, bei der zunächst die reverse Transkription mittels einer *SuperScript II Reverse Transcriptase* erfolgt und die resultierenden cDNA-Konstrukte über Rekombinationssequenzen (*attB1*- und *attB2*-Adapter) durch homologe Rekombination in den Zielvektor eingebracht werden (*Gateway®* Technologie, Invitrogen).

##### *2.8.4.1 Erststrangsynthese*

Bei der Erststrangsynthese wird unter Verwendung eines oligo(dT)-Primers, welcher zusätzlich die Sequenz für den ersten Rekombinationsadapter *attB2* beinhaltet, die mRNA revers transkribiert. Hierfür wurde die isolierte mRNA in zwei Ansätze aufgeteilt, wobei einer zur Erstellung der cDNA-Bank und ein weiterer zur Überprüfung der Qualität der cDNA-Bank genutzt wurde. Die Qualitätsbestimmung der cDNA basiert auf der Effizienz des Einbaus radioaktiv markierten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTPs während der Erststrangsynthese. Während bei dem Probenansatz für die Konstruktion der cDNA-Bank 5,5 µg mRNA eingesetzt wurden, wurden für die Bestimmung der cDNA-Qualität 1,5 µg isolierte mRNA bzw. 2 µg Kontroll-mRNA und radioaktiv markierte Nukleotide (*Amersham Redivue™ <sup>32</sup>P*-, *<sup>33</sup>P*-Nukleotide) verwendet. Bei der Erststrangsynthese wurde den Anweisungen der Gebrauchsanleitung des *CloneMiner™* Kits gefolgt.

##### *2.8.4.2 Analyse der Qualität der cDNA*

Nach Beendigung der reversen Transkription wurden zur Überprüfung der cDNA-Qualität und somit der Qualität der Ausgangs-mRNA von den Proben je 10 µL auf Filterpapier pipettiert. Pro Probe wurde ein Filterpapier laut Protokoll des Kits gewaschen und ein weiteres verblieb ungewaschen. In Scintillationsmessungen wurde anschließend die Radioaktivität der einzelnen Proben als cpm-Werte bestimmt. Die Auswertung der Scintillationsmessungen erfolgte gemäß den Angaben des *Clone Miner™ cDNA Library*

*Construction Kits*. Die spezifische Aktivität ( $sA$ ) von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  entspricht der Gesamtradioaktivität bezogen auf die vorhandene Menge an  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  im Reaktionsansatz (Gleichung 2-13).

$$sA [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP} = \frac{\text{cpm (ungewaschener Filter)}}{200 \text{ pmol } [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}} \quad \text{Gleichung 2-13}$$

Dabei kann die Ausbeute der erhaltenen cDNA mit Gleichung 2-14 bestimmt werden.

$$\begin{aligned} \text{cDNA Ausbeute} &= \frac{\text{cpm (ungewaschener Filter)} \cdot 50 \cdot (4 \text{ pmol dNTP} / \text{pmol dCTP})}{sA (\text{cpm/pmol dCTP}) \cdot (3030 \text{ pmol dNTP} / \text{g cDNA})} \\ &= \frac{\text{cpm (ungewaschener Filter)} \cdot 200}{sA \cdot 3030} \end{aligned} \quad \text{Gleichung 2-14}$$

Mit dem prozentualen Einbau von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ , welcher mit Gleichung 2-15 errechnet wird, kann nun die cDNA-Qualität und somit auch die der isolierten mRNA abgeschätzt werden.

$$\text{Einbau (\%)} = \frac{\text{cDNA Ausbeute } (\mu\text{g})}{\text{eingesetzte mRNA } (\mu\text{g})} \quad \text{Gleichung 2-15}$$

Ein Prozentsatz von 20-50 %  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ -Einbau entspricht einer cDNA-Bank mit überwiegend großen Klonen, während ein Einbau von weniger als 10 % darauf hinweist, dass Klone mit einer geringen Größe enthalten sind. In diesem Fall ist die cDNA-Qualität als schlecht und nicht repräsentativ zu bewerten.

#### 2.8.4.3 Herstellung doppelsträngiger cDNA mit Adaptern für die Rekombination

Die Synthese des zweiten Stranges aus dem DNA-Strang der Erststrangsynthese erfolgte gemäß den Angaben des *CloneMiner™-Kits*. Anschließend wurde der zweite Rekombinations-Adapter *attB1* mit der doppelsträngigen cDNA ligiert. Durch Größenausschlußchromatographie mit Sephacryl® S-500 HR-Säulchen (1 mL) wurden zum einen überschüssige Adapter-Oligomere abgetrennt und zum anderen die cDNA-Fragmente des Ansatzes nach ihrer Größe in 30-40  $\mu\text{L}$  fraktioniert. Dabei enthalten frühe Fraktionen große Konstrukte und späte eher kürzere cDNAs. Die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden mittels Nanodrop-Photometer bestimmt. Die Fraktionen 4-7 wurden zur cDNA-Teilbank MfL-1 (*mussel feet library-1*) vereint, welche potentiell

größere Konstrukte enthalten sollten, während die Fraktionen 8-11 mit größtenteils kürzeren cDNAs in der cDNA-Teilbank MfL-2 (*mussel feet library-2*) zusammengeführt wurden.

#### 2.8.4.4 Rekombinationsreaktion und Transformation

Die Integration der cDNA-Fragmente beider Teilbanken in den Donor-Vektor erfolgte wie in der Anleitung des *CloneMiner™-Kits* beschrieben, mittels homologer Rekombination der Adapter mit dem Vektor pDONR™222. Für alle Rekombinationsansätze wurden 250 ng Vektor-DNA eingesetzt, die cDNA-Menge bei MfL-1 betrug 106 ng bzw. 121 ng bei MfL-2. Als Negativkontrolle der Rekombination wurde ein Ansatz ohne DNA verwendet, die Positivkontrolle enthielt 50 ng der im Kit enthaltenen pEXP7-tet Kontroll-DNA. Anschließend wurden *Electromax™ DH10B™ T1 Phage* resistente Zellen mit den Rekombinationsansätzen transformiert. Die Elektroporation von 50 µL Zellen erfolgte mit 1,5 µL DNA in Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm und bei einer Stromstärke von 2,0 kV, einem Widerstand von 200 Ω sowie einer elektrischen Kapazität von 25 µF. Als Positivkontrolle für die Transformation wurden 10 pg des Vektors pUC19 eingesetzt. Insgesamt wurden jeweils sechs Transformationen für die cDNA-Banken MfL-1 und MfL-2 sowie je zwei Ansätze für die Kontrollen der Rekombinationsreaktion durchgeführt. Die Zellen wurden nach Elektroporation in 2 mL S.O.C-Medium resuspendiert, in ein 15 mL Kulturröhrchen überführt und eine Stunde bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen der jeweiligen cDNA-Bank vereint und mit dem gleichen Volumen Glycerol-S.O.C.-Medium versetzt. Es wurden anschließend 500 µL-Aliquots gebildet und diese bei -80°C gelagert.

#### 2.8.5 Bestimmung des Titers der cDNA-Banken

Zur Bestimmung der Gesamtzahl aller Konstrukte der cDNA-Bank wurde der Titer der transformierten Zellen bestimmt, wobei eine koloniebildende Einheit (KBE) ein Konstrukt der Bank repräsentiert. Es wurden Doppelbestimmungen von 1:100, 1:1.000 und 1:10.000-Verdünnungen der MfL-1, MfL-2, der Positiv- und Negativkontrolle der Rekombinationsreaktion sowie eine 1:100 Verdünnung der Transformationskontrolle auf LB-Nähragarplatten mit Kanamycin (35 µg/mL) bzw. Ampicillin (50 µg/mL) durchgeführt. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die KBEs jeder Platte ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Neben dem durchschnittlichen Titer pro mL wurde auch der Gesamt-Titer der einzelnen cDNA-Banken bestimmt.

### 2.8.6 Bestimmung der Qualität der cDNA-Banken

Zur Bestimmung der cDNA-Bank-Qualität wurde neben der Größe der rekombinierten Konstrukte auch der Erfolg der Rekombination bestimmt.

Hierfür wurden von den Verdünnungsausstrichen der Titerbestimmung (siehe oben) pro cDNA-Bank 24 isolierte Klone jeweils in 5 mL LB-Medium mit Kanamycin (35 µg/mL) über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte eine Plasmidisolierung mit dem *Wizard Plus SV Miniprep Kit*. Die isolierten Plasmide wurden mit 50 µL sterilem Wasser eluiert. Zur Analyse der Größe der rekombinierten Konstrukte wurde zunächst ein analytischer Restriktionsverdau in einem Volumen von 20 µL durchgeführt. Dabei wurde die Plasmid-DNA mit 5 U des Restriktionsenzym *BsrGI* im entsprechenden Puffer unter BSA-Zugabe bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Die Detektion der entstandenen Fragmente erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Mit dieser Methode können linearisierte DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden, da ihre Wandergeschwindigkeit in einem elektrischen Feld in einer Gelmatrix nur von ihrer Masse abhängt. Für 1 %ige Agarosegele wurden entsprechende Mengen an Agarose in TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid (0,04 % (w/v) Endkonzentration) zugesetzt, welches in DNA interkaliert und dadurch ihre Detektion unter UV-Licht (254 nm) ermöglicht. Die Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Einschätzung der Fragmentgröße wurden entsprechende Standards verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TAE und die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V für 45 min. Anhand der Anzahl der Klone, die ein entsprechendes DNA-Fragment der cDNA-Bank tragen, im Verhältnis zu den analysierten Klonen wurde die Effizienz der Rekombination ermittelt.

### 2.8.7 Sequenzvergleich der aus den cDNA-Banken isolierten preCol-Varianten mit den publizierten Sequenzen

Im Rahmen der Doktorarbeiten von Michael Suhre und Adrian Golser wurden die Sequenzen der Proteine preCol NG, P und D aus den cDNA-Banken isoliert und sequenziert. Für den Vergleich der DNA-Sequenzen dieser preCol-Klone mit den bereits publizierten wurde das Programm CLC Sequence Viewer 6.4 verwendet, während für die

Aminosäuresequenzen der online verfügbare Algorithmus LALIGN<sup>1</sup> (Huang & Miller, 1991) genutzt wurde.

## 2.9 Sequenzanalyse der Kollagendomäne der preCols

Die Sequenzen der preCol-Kollagendomänen der aus den cDNA-Bank isolierten Sequenzen von preCol P, D und NG wurden hinsichtlich ihrer Aminosäure-Zusammensetzung analysiert, um Aussagen über eine mögliche Konformation der Tripelhelix zu treffen.

Zunächst wurden die Aminosäure-Triplets in iminosäurehaltige Triplets (GlyProPro, GlyXaaPro, und GlyProYaa, wobei Pro auch gleichbedeutend mit Hyp ist und Xaa sowie Yaa beliebigen Aminosäuren entsprechen) und iminosäurefreie Triplets (GlyXaaYaa) klassifiziert. Da die Stabilität der Tripelhelix von der Aminosäuresequenz der Triplets abhängig ist, wurden anschließend die einzelnen Triplets gemäß ihrer Sequenz in stabilisierende und destabilisierende Triplets eingeteilt. Diese Einteilung beruhte auf Analysen des natürlichen Vorkommens der Triplets in Kollagenen (Ramshaw et al., 1998) und Untersuchungen der thermischen Stabilität von Modellpeptiden (Brodsky & Ramshaw, 1997; Brodsky et al., 2008; Persikov et al., 2000). Darüber hinaus geben Röntgenbeugungsstudien an Modellpeptiden Informationen zur tripelhelikalen Konformation und somit zur Packungsdichte. Bei der Einteilung der Triplets der preCol-Kollagendomäne gelten somit folgende Aspekte:

GlyProPro entspricht dem Triplet mit der höchsten Stabilität und faltet in eine sehr dichte Tripelhelix. Triplets ohne Iminosäuren (GlyXaaYaa) zeigen eine lockere, eher relaxierte Faltungssymmetrie. Bei Triplets mit einer Iminosäure wirken weitere Aminosäuren mehr oder weniger stabilisierend je nach Position der Iminosäure im Triplet. Dabei gilt bei GlyProYaa-Motiven für Aminosäuren in der Yaa-Position folgende Rangliste (Persikov et al., 2000).

Pro/Hyp > Glu > Ala > Lys > Arg > Gln > Asp > Leu > Val > Met > Ile > Asn >  
Ser > His > Thr > Cys > Tyr > Phe > Gly > Trp

Bei GlyXaaPro-Triplets gilt für die Xaa-Position hinsichtlich des stabilisierenden Effektes der Aminosäuren (Persikov et al., 2000):

---

<sup>1</sup> [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html), Parameter: Opening gap penalty = -14, Extending gap penalty = -4

Pro/Hyp > Arg > Met > Ile > Gln > Ala > Val > Glu > Thr > Cys > Lys >  
His > Ser > Asp > Gly > Leu > Asn > Tyr > Phe > Trp

Zusätzlich wurden die Sequenzen der Kollagendomänen mit dem Algorithmus *Collagen Stability Calculator*<sup>2</sup> analysiert, welcher auf experimentellen Daten zur thermischen Stabilität von Modellpeptiden basiert und die Stabilität der Triplets einer Sequenz anhand einer Modellierung der Schmelztemperatur unter Standard-Bedingungen (Konzentration 1 mg mL<sup>-1</sup> in PBS pH 7.0, durchschnittliche Heizrate 0.1 K min<sup>-1</sup>) vorhersagt (Persikov et al., 2005). Bei der Bestimmung der Stabilität wurde angenommen, dass alle Pro in Yaa-Position der Triplets hydroxyliert vorliegen.

---

<sup>2</sup> [http://jupiter.umdj.edu/collagen\\_calculator/index.php](http://jupiter.umdj.edu/collagen_calculator/index.php)

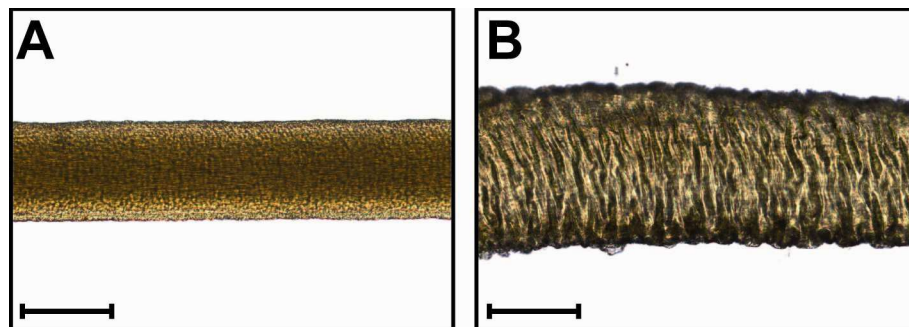
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Morphologie des Muschelbyssusfadens der Muschel *Mytilus galloprovincialis*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Muschelbyssusfäden mit einer durchschnittlichen Länge von 1,5-2,5 cm verwendet. Der distale Fadenteil bildet mit 1-2 cm Länge den größten Anteil des Fadens und ist im trockenen Zustand geradlinig gestreckt. Der proximale Teil hingegen weist mit einer Länge von 0,1-0,5 cm eine gebogene Form auf. Während dehydrierte Fäden eine gewisse Starrheit besitzen, sind hydrierte Fäden sehr biegsam.

##### 3.1.1 Optische Mikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen (Kapitel 2.4.1) bei einer 200-fachen Vergrößerung zeigen, dass der distale Fadenteil (Abb. 3-1A) gerade und seine Oberfläche eben ist, während der proximale Teil (Abb. 3-1B) eine wellige Struktur zeigt.



**Abb. 3-1** Lichtmikroskopische Aufnahmen des distalen und proximalen Teils eines Byssusfadens bei einer 200-fachen Vergrößerung mit Phasenkontrast

A) distaler Faden, B) proximaler Faden

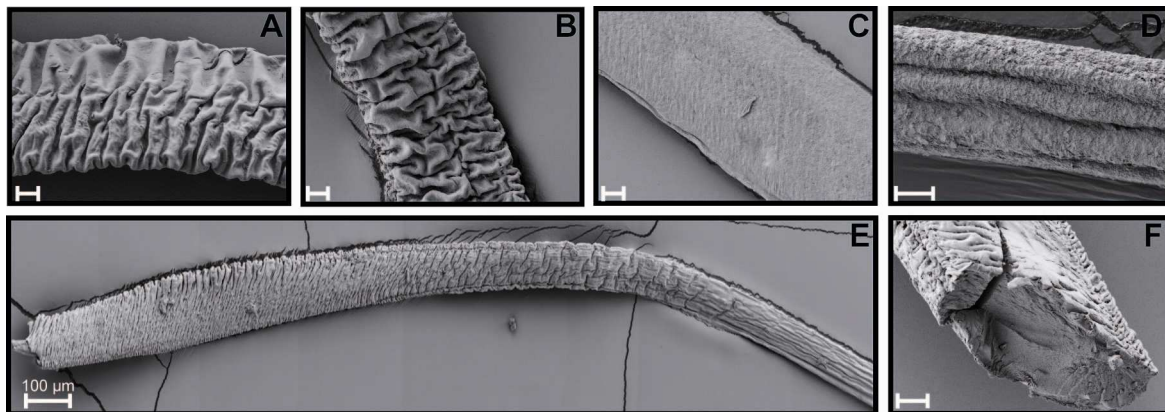
Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Der elliptische Querschnitt im distalen Fadenteil besitzt an der längsten Seite (Hauptachse) einen Durchmesser von 80-130  $\mu\text{m}$  und an der schmalsten Stelle (Nebenachse) 33-80  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz dazu ist der proximale Faden mit 120-230  $\mu\text{m}$  Durchmesser wesentlich breiter.

### 3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden sowohl die Oberflächenmorphologie der Byssusfäden als auch die innen liegenden Strukturen bis hin zur Fibrille im Fadenkern untersucht (Kapitel 2.4.2).

Wie in den lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die jeweiligen Fadenteile auch im REM unterschiedliche Oberflächenmorphologien. Während der proximale Faden (Abb. 3-2A+B) gewellt ist und tiefe, quer zur Fadenachse verlaufende Furchen besitzt, welche in ihrer Ausprägung zwischen einzelnen Fäden variieren können, ist der distale Faden (Abb. 3-1C+D) gerade und gleichmäßig eben. Längsrillen können dabei beim Trocknen des Fadens entstehen. Der Übergang zwischen den einzelnen Fadenteilen erfolgt fließend (Abb. 3-2E). Der gesamte Faden zeigt eine elliptische Querschnittsfläche (Abb. 3-2F).



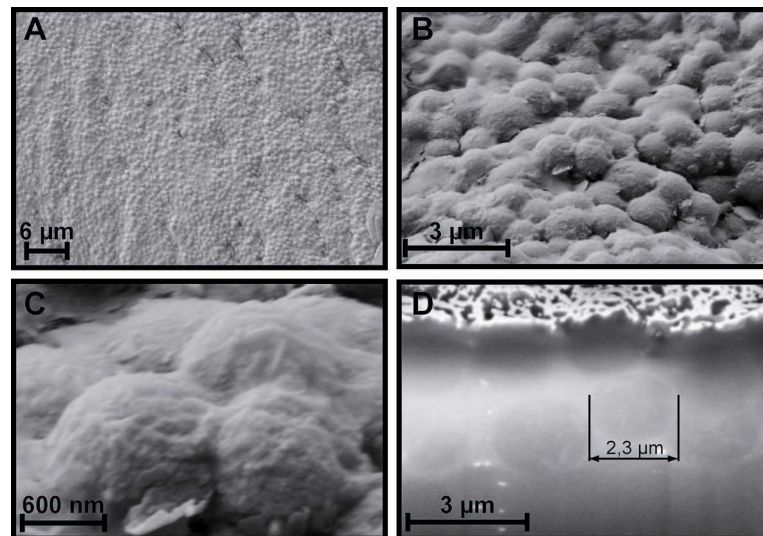
**Abb. 3-2 REM-Aufnahmen des Muschelbyssusfadens**

A) proximaler Fadenteil (1.000-fach) B) proximaler Fadenteil (1.000-fach) C) distaler Fadenteil (1.000-fach) D) distaler Fadenteil (2.000-fach) E) Zusammenschnitt mehrerer Aufnahmen entlang des Fadens (500-fach) F) Querschnitt eines proximalen Fadens (1.500-fach)

Falls nicht anders gekennzeichnet entspricht der Messbalken 20  $\mu\text{m}$ .

Bei höherer Vergrößerung ist die Oberfläche distaler Fäden stark strukturiert (Abb. 3-3) und zeigt kugelförmige Gebilde. Dies ist bei proximalen Fäden weniger ausgeprägt. Ein Querschnitt durch die Kutikula mittels FIB (fokussierter Ionenstrahl) zeigt räumlich abgegrenzte kugelförmige Strukturen mit einem Durchmesser von durchschnittlich 2,3  $\mu\text{m}$ , die in mehreren Lagen die Kutikula des Byssusfadens mit einer Dicke von ca. 3,4  $\mu\text{m}$  (Abb. 3-3D) bilden. Diese besteht aus Mfgp1, welches sich zu Granula, die in eine Proteinmatrix eingebettet sind, um den Fadenkern arrangiert (Sun & Waite, 2005). Leider konnten mittels FIB nur für die Kutikula eindeutig abgegrenzte Formen erhalten werden. Die darunterliegenden Schichten des Fadenkerns zeigen keine Feinstruktur.

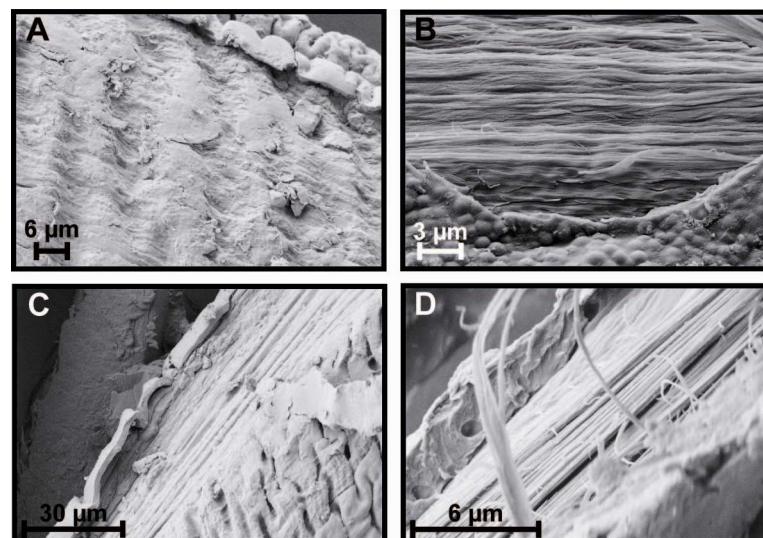




**Abb. 3-3 Kutikula des Muschelbyssusfadens**

A) Oberfläche eines distalen Byssusfadens (5.000-fach) B) Oberflächenstruktur (25.000-fach) C) Granula (100.000-fach) D) Querschnitt durch die Kutikula geschnitten mittels FIB bei 200 pA für 30 min (30.000-fach) Der Durchmesser der kugelförmigen Strukturen beträgt ca. 2,3 µm.

Nach Ablösen der Kutikula liegt der Fadenkern frei, welcher aus Fasern oder Fibrillenbündeln besteht, die entlang der Fadenachse ausgerichtet sind (Abb. 3-4). Die Fasern der unmittelbar unter der Kutikula liegenden Schicht verlaufen analog zu den Strukturen der Kutikula, während tiefer liegende Fasern geradlinig ausgerichtet sind (Abb. 3-4C).

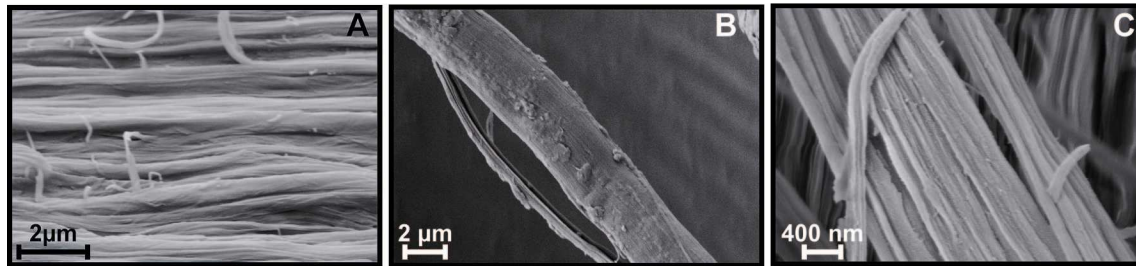


**Abb. 3-4 Der Kern des Byssusfadens**

A) proximalen Faden (4.000-fach) und B) distaler Faden (2.500-fach): unmittelbare Schicht unter der Kutikula, C) proximaler Faden (10.000-fach) D) und distaler Faden (16.000-fach): tiefere Schichten des Fadenkerns

Für diese Aufnahmen wurden entsprechende Bildausschnitte gewählt, bei denen die Kutikula aufgrund mechanischer Belastung bei der Probenpräparation fehlte.

Die Fasern des Fadenkerns bestehen wiederum aus Fibrillen (Abb. 3-5), welche eine Verdrehung um die Faserachse aufweisen. Die kleinste aufgelöste Fibrille hat einen Durchmesser von durchschnittlich 70 nm.



**Abb. 3-5 Fasern des Byssusfadenkerns**

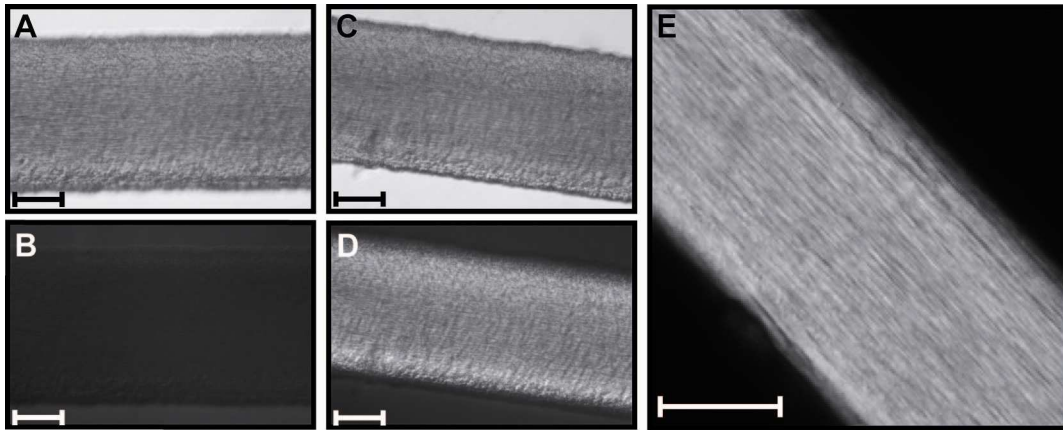
A) distaler Fadenkern und Vergrößerung von Abb. 3-4B (25.000-fach) B) Einzelfaser mit Verdrehung der Fibrillen um Faserachse (15.000-fach) C) höchste Auflösung von Einzelfibrillen (70.000-fach). Die kleinste gefundene Fibrille hatte einen Durchmesser von ca. 70 nm)  
Die jeweiligen Vergrößerungen sind in Klammern angegeben.

Die REM-Aufnahmen zeigen einen hierarchischen Aufbau des Byssusfadens sowohl im distalen als auch proximalen Teil, wobei Fibrillen sich zu Fibrillenbündeln oder Fasern zusammenlagern und den Fadenkern aufbauen, der von einer granulären Kutikula umgeben ist.

### 3.1.3 Polarisierte optische Mikroskopie

Die Fibrillen im Byssusfaden sind entlang der Fadenachse gerichtet angeordnet. Aufgrund dieser Ordnung sind diese doppelbrechend und dadurch optisch aktiv, d.h. sie können die Polarisations Ebene von linear polarisiertem Licht drehen. Die doppelbrechenden Eigenschaften des Byssusfadens wurden mittels Polarisationsmikroskopie analysiert (Kapitel 2.4.1).

Der distale Byssusfaden wurde zunächst parallel zur Polarisationsrichtung des Lichtes unter dem Mikroskop ausgerichtet (Abb. 3-6A/B). Hierbei zeigt die Probe bei gekreuzten Polarisatoren (Abb. 3-6B) keine optische Aktivität. Es kommt zur Auslöschung, da die Durchlassrichtung der Probe der Polarisationsrichtung des Lichtes entspricht und es im Material somit zu keiner Doppelbrechung kommt.

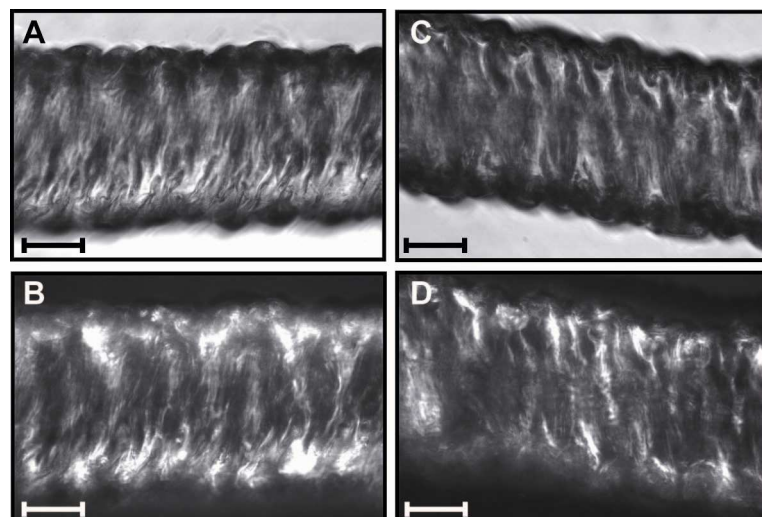


**Abb. 3-6 Polarisationsmikroskopie von distalen Muschelbyssusfäden**

Linke Spalte: distaler Faden parallel zur Polarisationsrichtung des Lichtes: A) ohne und B) mit gekreuzten Polarisatoren. Mittlere Spalte: distale Probe schräg zur Polarisationsrichtung C) ohne und D) mit gekreuzten Polarisatoren. E) Doppelbrechung der Fibrillen im distalen Fadenkern  
Der Messbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Bei Ausrichtung der distalen Probe schräg zur Polarisationsrichtung erhält man ein helles Bild der ausgerichteten Fibrillen im Faden (Abb. 3-6C/D/E). Nun wird das linear polarisierte Licht an den Strukturelementen des Fadens gebrochen, so dass gewisse Anteile davon den Analysator passieren können. Deutlich zu erkennen ist, dass ausschließlich der Fadenkern mit den Fibrillen optisch aktiv ist, während die Kutikula isotrope Eigenschaften zeigt.

Der proximale Fadenteil zeigt bei gekreuzten Polarisatoren Aufhellung im Bereich der Fadenkanten (Abb. 3-7).



**Abb. 3-7 Polarisationsmikroskopie von proximalen Muschelbyssusfäden**

Linke Spalte: proximaler Faden parallel zur Polarisationsrichtung des Lichtes: A) ohne und B) mit gekreuzten Polarisatoren. Rechte Spalte: proximale Probe schräg zur Polarisationsrichtung C) ohne und D) mit gekreuzten Polarisatoren  
Der Messbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

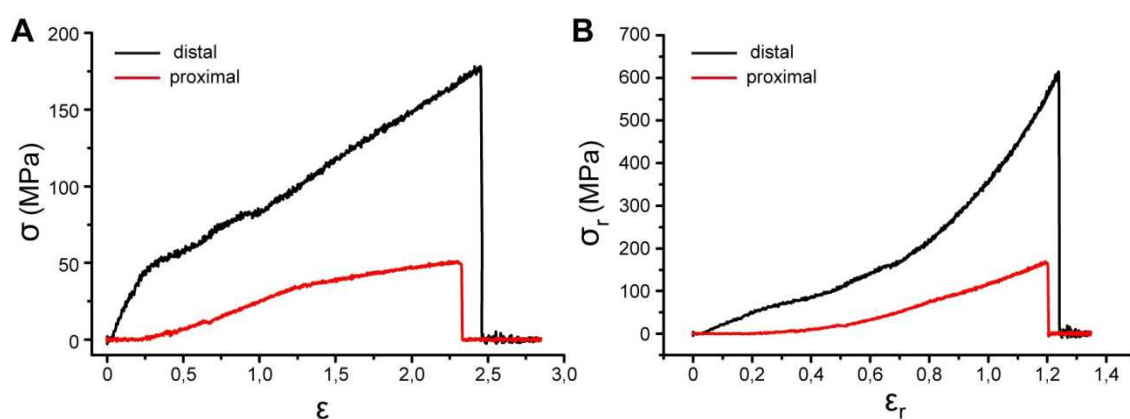
Es können zwar keine ausgerichteten Strukturen zugeordnet werden, aber die Aufhellung bei Kreuzpolarisation deutet auf das Vorhandensein anisotroper Elemente hin.

Wie in früheren Publikationen beschrieben (Bairati & Zuccarello, 1974; Mercer, 1952) zeigen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen, dass die entlang der Fadenachse ausgerichteten Fibrillen im Fadenkern insbesondere im distalen Fadenteil starke doppelbrechende Eigenschaften besitzen.

### 3.2 Mechanische Eigenschaften des Muschelbyssusfadens

Zur Analyse der mechanischen Eigenschaften des Muschelbyssusfadens wurden Zugmessungen mit distalen und proximalen Byssusfäden sowohl im hydrierten als auch dehydrierten Zustand durchgeführt, die entweder in RW oder KMW gelagert wurden. Die Proben wurden, wie in den Abschnitten Kapitel 2.2 und 2.5 beschrieben, präpariert und mit einer Zuggeschwindigkeit von  $0,1 \text{ mm sek}^{-1}$  an einer Bose ElectroForce 3220 Zugmaschine, ausgestattet mit einer 250 g Messdose, vermessen. Während die dehydrierten Proben an Luft mit einer RF von 25-30 % gemessen wurden, erfolgte die Analyse der hydrierten Proben in Lösung. Für Abbildungen wurden Messungen ausgewählt, welche die Mittelwerte des jeweiligen Probensatzes repräsentieren.

Generell ist die Kurve des distalen Byssusfadens (Abb. 3-8) gekennzeichnet durch einen steilen linear elastischen Bereich gefolgt von einem oder zwei *Yield*-Bereichen, die mehr oder weniger stark ausgeprägt sein können.



**Abb. 3-8 Vergleich technischer und realer Spannungs-Dehnungskurven des distalen und proximalen Muschelbyssusfadens.**

Die Fadenteile wurden in KMW inkubiert und mechanische Zugmessung im hydrierten Zustand durchgeführt. A) Technische Spannungs-Dehnungskurven; B) Reale Spannungs-Dehnungskurven

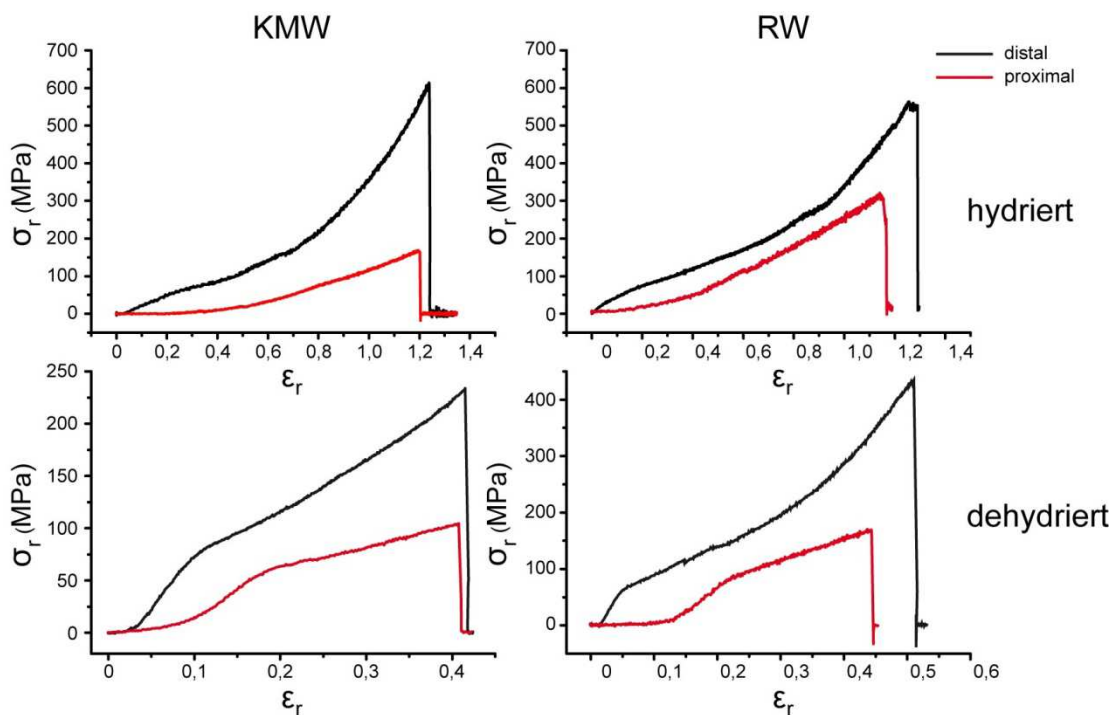
Anschließend versteift der Faden bis hin zum Materialbruch, was durch einen weiteren Anstieg der Kurve gekennzeichnet ist. Im Gegensatz dazu verläuft die Kurve des proximalen Fadens flacher mit einem langen, linear elastischen Bereich ohne *Yield*-Verhalten. Bei der technischen Spannung und Dehnung geht man davon aus, dass der Probenquerschnitt sich unter der Messung nicht verändert. Allerdings wird der Faden unter Zug bei gleichbleibenden Volumen dünner. Folglich wirkt die Kraft auf eine immer kleiner werdende Querschnittsfläche. Die Werte der technischen Spannung sind somit im Bereich der plastischen Deformation des Materials bei großer Dehnung viel geringer als die der real wirkenden. Aus diesem Grund wurden für alle Messungen die reale Spannung und Dehnung mit den Gleichungen 2-4 und 2-5 bestimmt.

Im Vergleich zur technischen Spannungs-Dehnungskurve (Abb. 3-8A) erhält man steilere Kurvenverläufe und damit höhere Werte für die reale Zugfestigkeit, während die reale Dehnbarkeit geringer ist (Abb. 3-8B).

Alle im Folgenden beschriebenen mechanischen Parameter beziehen sich auf die realen Spannungs-Dehnungskurven. Reale Spannungs-Dehnungskurven, die den Mittelwert der jeweiligen Probensätze repräsentieren, sind in Abb. 3-9 zusammengefasst und die entsprechenden mechanischen Parameter in Tab. 3-I gelistet. Die Ergebnisse weisen eine hohe Fehlerstreuung auf, was zum einen auf eine geringe Probenzahl zurückzuführen ist. Zum Anderen ist nicht auszuschließen, dass durch die Probenpräparation potentielle Schwachstellen im Material entstanden sind.

Der distale Fadenteil zeigt eine drei- bis vierfach höhere Steifigkeit als der proximale und weist bei gleicher Dehnbarkeit (dehydriert: 0,5 und hydriert: 1,2) eine dreifach höhere Zugfestigkeit (300-500 MPa) und somit auch eine dreifach höhere Zähigkeit (80-170 MPa) auf. Der proximale Fadenteil besitzt hingegen eine bis zu siebenfach höhere Elastizität, was sich in einem größeren linear-elastischen Bereich und einer höheren Resilienz  $R$  - der Fähigkeit, Energie ohne Verformung aufzunehmen (im hydrierten Zustand: 13-24 MJ m<sup>-3</sup>), äußert. Somit wirkt der proximale Fadenteil elastisch, während der distale Teil Zugstärke vermittelt.





**Abb. 3-9 Reale Spannungs-Dehnungskurven des Muschelbyssusfadens**

Die mechanische Zugmessung des distalen (schwarz) und proximalen Fadenteils (rot), die jeweils in RW und KMW inkubiert und in hydrierten sowie dehydrierten Zustand gemessen wurden, erfolgte mit einer Zuggeschwindigkeit von  $0,1 \text{ mm sek}^{-1}$ .

Der Hydratationsgrad der Proben hat einen wesentlichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften beider Fadenbereiche. Dehydrierte Proben sind generell nur halb so dehnbar ( $\epsilon_{max}$ : 0,4-0,5) wie hydrierte ( $\epsilon_{max}$ : 1,1-1,2), und besitzen somit auch eine geringere Zähigkeit (distal:  $80\text{-}130 \text{ MJ m}^{-3}$ ; proximal:  $24\text{-}40 \text{ MJ m}^{-3}$ ). Die Steifigkeit des Fadens ist bei dehydrierten Proben stark erhöht, was sich in einem vier- bis fünffach höheren E-Modul widerspiegelt. Des Weiteren verschiebt sich der linear-elastische Bereich hydrierter Proben zu höheren Dehnungswerten, wobei sich bei proximalen Fäden das Elastizitätsvermögen vervierfacht, während es sich im distalen nur verdoppelt. Somit erhält der proximale Faden durch Wasser zusätzliche Elastizität bzw. verliert diese beim Austrocknen. Auch das *Yield*-Verhalten der Fäden ist durch Wasser beeinflusst. Im Gegensatz zu hydrierten distalen Proben zeigen dehydrierte lediglich einen *Yield*-Punkt. Proximale Fäden besitzen nur im dehydrierten Zustand einen *Yield*. Erstaunlicherweise beträgt die Zugfestigkeit distaler Proben ca. 500 MPa mit Ausnahme des Probensatzes dehydrierter, in KMW inkubierter distaler Fäden. D.h. dehydrierte Proben brechen bei nahezu gleicher mechanischer Spannung wie hydrierte.

**Tab. 3-I Mechanische Eigenschaften des proximalen und distalen Muschelbyssusfadens**

Die hier aufgeführten Werte entsprechend dem Mittelwert eines Probensatzes und der daraus errechneten Standardabweichung.

|   | distal         |                |                 |                | proximal       |               |                |                |
|---|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
|   | KMW            |                | RW              |                | KMW            |               | RW             |                |
|   | dehydriert     | hydriert       | dehydriert      | hydriert       | dehydriert     | hydriert      | dehydriert     | hydriert       |
| n   | 6              | 8              | 7               | 8              | 9              | 8             | 6              | 8              |
| E-Modul/ MPa<br><i>Steifigkeit</i>            | 1900<br>± 600  | 510<br>± 140   | 2800<br>± 880   | 510<br>± 220   | 620<br>± 300   | 140<br>± 60   | 680<br>± 140   | 190<br>± 90    |
| $\varepsilon_E$<br><i>Elastizitätsgrenze</i>  | 0,05<br>± 0,02 | 0,09<br>± 0,04 | 0,03<br>± 0,005 | 0,11<br>± 0,05 | 0,14<br>± 0,08 | 0,65<br>± 0,2 | 0,18<br>± 0,08 | 0,78<br>± 0,24 |
| $\sigma_E$ / MPa<br><i>Elastizitätsgrenze</i> | 65<br>± 18     | 34<br>± 8      | 70<br>± 17      | 41<br>± 14     | 39<br>± 11     | 51<br>± 34    | 59<br>± 15     | 81<br>± 42     |
| R/ MJ m <sup>-3</sup><br><i>Resilienz</i>     | 1,3<br>± 0,5   | 1,1<br>± 0,6   | 1,1<br>± 0,3    | 1,8<br>± 0,7   | 1,6<br>± 0,6   | 13<br>± 10    | 3,3<br>± 2,5   | 24<br>± 10     |
| $\varepsilon_{Y1}$                            | 0,07<br>± 0,03 | 0,14<br>± 0,03 | 0,06<br>± 0,005 | 0,15<br>± 0,07 | 0,16<br>± 0,08 |               | 0,18<br>± 0,08 |                |
| $\sigma_{Y1}$ / MPa                           | 91<br>± 30     | 51<br>± 12     | 90<br>± 24      | 58<br>± 21     | 48<br>± 16     |               | 48<br>± 15     |                |
| $\varepsilon_{Y2}$                            |                | 0,6<br>± 0,1   |                 | 0,5<br>± 0,2   |                |               |                |                |
| $\sigma_{Y2}$ / MPa                           |                | 150<br>± 40    |                 | 150<br>± 70    |                |               |                |                |
| $\varepsilon_{max}$<br><i>Dehnbarkeit</i>     | 0,5<br>± 0,2   | 1,3<br>± 0,4   | 0,5<br>± 0,1    | 1,2<br>± 0,2   | 0,4<br>± 0,1   | 1,1<br>± 0,2  | 0,5<br>± 0,1   | 1,3<br>± 0,4   |
| $\sigma_{max}$ / MPa<br><i>Zugfestigkeit</i>  | 330<br>± 190   | 500<br>± 160   | 540<br>± 150    | 560<br>± 290   | 110<br>± 40    | 140<br>± 60   | 170<br>± 20    | 220<br>± 100   |
| Zähigkeit/ MJ m <sup>-3</sup>                 | 80<br>± 70     | 210<br>± 70    | 130<br>± 50     | 270<br>± 130   | 24<br>± 15     | 60<br>± 23    | 40<br>± 12     | 90<br>± 44     |

n - Probenanzahl,  $\sigma$  - Spannung,  $\varepsilon$  - Dehnung,  $\sigma_E$  - Spannung an der Elastizitätsgrenze,  $\varepsilon_E$  - Dehnung an der Elastizitätsgrenze,  $\sigma_Y$  - Spannung am *Yield*-Punkt,  $\varepsilon_Y$  - Dehnung am *Yield*-Punkt

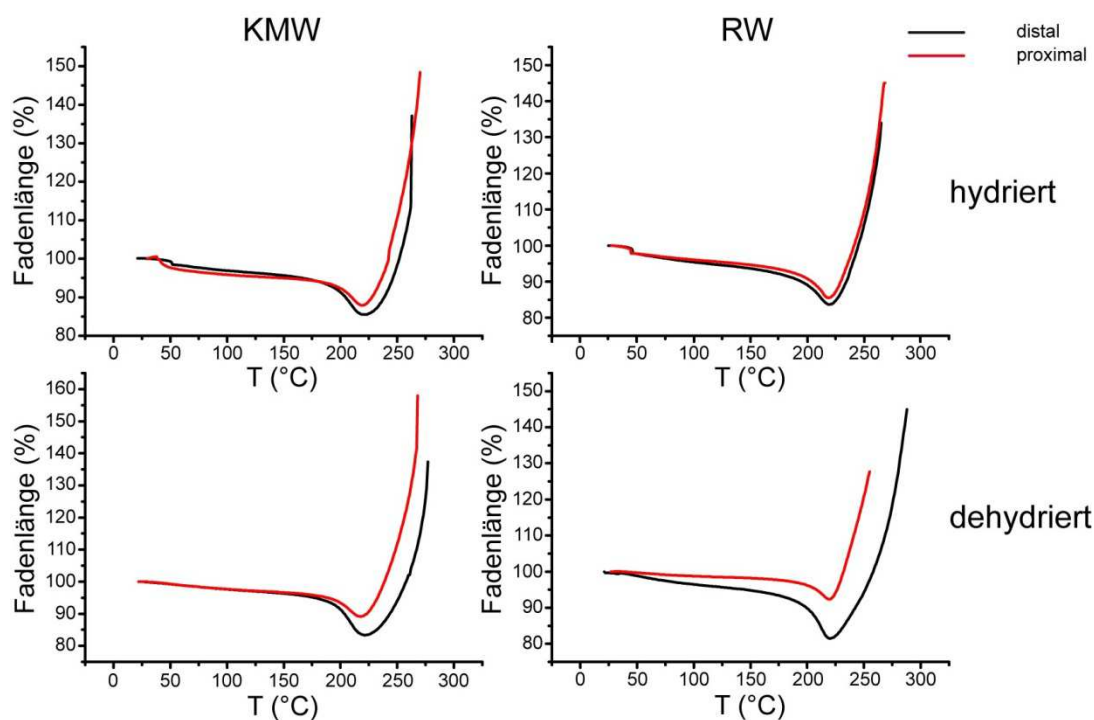
Um den Einfluss von Salzen auf die mechanischen Eigenschaften des Byssusfadens zu untersuchen, wurden diese jeweils in KMW und RW inkubiert. In den jeweiligen Lösungen hydrierte distale Proben zeigen dabei keine Unterschiede in den mechanischen Parametern. Wiederum weisen dehydrierte distale Fäden inkubiert in KMW eine 1,5-fach geringere Zugfestigkeit ( $\sigma_{max}$ : 330 MPa) und somit auch Zähigkeit (80 MJ m<sup>-3</sup>) auf. Im Falle der proximalen Proben zeigen dehydrierte Fäden inkubiert in KMW auch eine geringere Zugfestigkeit ( $\sigma_{max}$ : 100 MPa) und Zähigkeit (24 MJ m<sup>-3</sup>) im Vergleich zu den übrigen proximalen Probensätzen.

### 3.3 Thermisches Verhalten des Muschelbyssusfadens

#### 3.3.1 Thermomechanische Analyse des Byssusfadens

Die temperaturbedingten Änderungen der Länge des Byssusfadens und damit dessen thermomechanisches Verhalten in einem Temperaturbereich von 30-300°C wurden mittels thermomechanischer Analyse (TMA) untersucht. Sowohl in KMW als auch RW inkubierte proximale und distale Bereiche des Byssusfadens wurden separat im trockenen und nassen Zustand analysiert. Entsprechend Kapitel 2.6.1 wurden die Proben mit einer Kraft von 0,005-0,01 N gespannt und bei einer Heizrate von 2°C min<sup>-1</sup> auf 300°C erhitzt. Für Abbildungen wurden Einzelmessungen ausgewählt, welche die Mittelwerte des jeweiligen Probensatzes repräsentieren.

Die TMA-Kurven (Abb. 3-10) weisen für alle Proben den gleichen Verlauf auf, welcher in vier Bereiche unterteilt werden kann: langsames Schrumpfen bis ca. 195°C, rapide Verkürzung zwischen 195-219°C, minimale Länge bei ca. 220°C und anschließende Elongation des Byssusfadens.



**Abb. 3-10 Untersuchung des thermomechanischen Verhaltens des Muschelbyssusfadens von *M. galloprovincialis* mittels TMA**

Distale (schwarz) und proximale (rot) Fadenteile der jeweiligen Probensätze wurden mit einer statischen Kraft von 5-10 mN gestrafft und die Längenänderung im Temperaturbereich 20-300°C bei einer Heizrate von 2°C min<sup>-1</sup> untersucht.



Zur Bestimmung der Verkürzungsrate wurde eine lineare Regression im Temperaturbereich zwischen 40-170°C (langsames Schrumpfen) und 205-215°C (rapide Verkürzung) durchgeführt, wobei der Schnittpunkt beider Geraden den Startpunkt der rapiden Verkürzung bildet. Die Parameter der Kurven sind in Tab. 3-II für alle Probensätze zusammengefasst.

Im Temperaturbereich bis 195°C verkürzen sich der distale und der proximale Faden gleichermaßen, und der *Onset* der rapiden Verkürzung liegt bei beiden Fadenteilen bei 194°C. Die rapide Verkürzung des Byssusfadens ist beim distalen Fadenteil stärker ausgeprägt als beim proximalen, was sich in einem steileren Abfall der TMA-Kurve im entsprechenden Temperaturbereich zeigt. Desweiteren ist der distale Faden bei seiner maximalen Verkürzung bei 221°C um 5 % kürzer als der proximale. Anschließend verlängern sich beide Fadenteile, wobei der proximale Teil sich um 8 % mehr verlängert als der distale, allerdings auch bei niedrigeren Temperaturen reißt.

Die Kurven der hydrierten und dehydrierten Proben unterscheiden sich im Bereich von 35-55°C. Hier verkürzen sich die hydrierten Proben abrupt, was einem Versatz der TMA-Kurve verursacht.

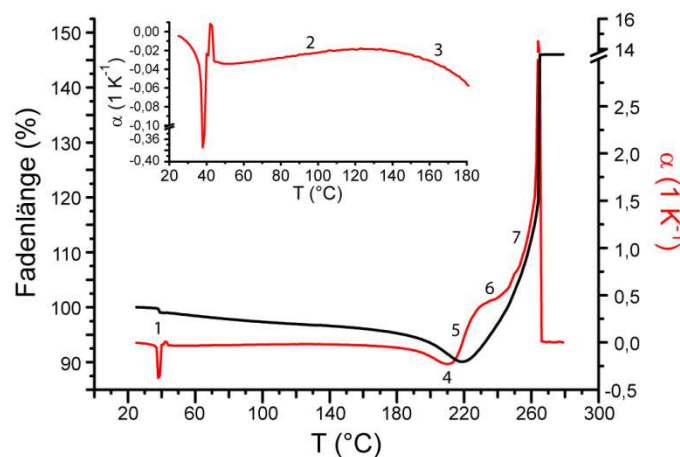
**Tab. 3-II Zusammenfassung der Kurvenparameter der thermomechanische Analyse am Byssusfaden**  
n - Anzahl der Proben; Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Fadenanfangslänge. Die hier aufgeführten Werte entsprechend dem Mittelwert und der entsprechenden Standardabweichung.

|          |     | n          | langsames Schrumpfen         | Rapide Verkürzung |                              | Minimum      | Bruch des Fadens      |                          |
|----------|-----|------------|------------------------------|-------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|--------------------------|
|          |     |            | Anstieg [% K <sup>-1</sup> ] | Startpunkt        | Anstieg [% K <sup>-1</sup> ] |              |                       |                          |
| distal   | RW  | dehydriert | 2                            | -0,03 ± 0,01      | 197°C ± 1<br>93 % ± 4        | -0,49 ± 0,07 | 221°C ± 1<br>85 % ± 4 | 287°C ± 2<br>137 % ± 10  |
|          |     | hydriert   | 4                            | -0,03 ± 0,01      | 196°C ± 4<br>93 % ± 2        | -0,34 ± 0,03 | 220°C ± 1<br>87 % ± 2 | 269°C ± 13<br>122 % ± 17 |
|          | KMW | dehydriert | 2                            | -0,03 ± 0,00      | 193°C ± 1<br>94 % ± 1        | -0,49 ± 0,02 | 219°C ± 4<br>85 % ± 3 | 283°C ± 8<br>133 % ± 1   |
|          |     | hydriert   | 2                            | -0,03 ± 0,00      | 193°C ± 0<br>92 % ± 1        | -0,46 ± 0,12 | 224°C ± 4<br>82 % ± 4 | 281°C ± 26<br>110 % ± 6  |
| proximal | RW  | dehydriert | 2                            | -0,02 ± 0,00      | 195°C ± 1<br>96 % ± 0        | -0,22 ± 0,01 | 220°C ± 1<br>92 % ± 0 | 248°C ± 9<br>122 % ± 9   |
|          |     | hydriert   | 4                            | -0,03 ± 0,01      | 194°C ± 2<br>93 % ± 1        | -0,26 ± 0,05 | 219°C ± 1<br>89 % ± 2 | 260°C ± 12<br>136 % ± 12 |
|          | KMW | dehydriert | 2                            | -0,03 ± 0,00      | 194°C ± 1<br>94 % ± 1        | -0,32 ± 0,06 | 218°C ± 0<br>88 % ± 1 | 266°C ± 1<br>132 % ± 13  |
|          |     | hydriert   | 1                            | -0,02             | 194°C<br>93 %                | -0,28        | 219°C<br>88 %         | 270°C<br>148 %           |

Beim Vergleich der Proben, die in KMW inkubiert wurden mit denen aus RW ergeben sich anhand der Kurvenparameter keine wesentlichen Unterschiede. Allerdings weisen die in KMW inkubierten Proben einen breiteren Peak am Minimum der TMA-Kurve auf.

Mittels des thermischen Längenausdehnungskoeffizienten können thermische Prozesse wie Erweichung und Versteifung eines Materials bestimmt werden. Dieser wird durch Gleichung 2-7 bestimmt und entspricht der ersten Ableitung der TMA-Kurve. Eine exemplarische TMA-Kurve und deren entsprechenden Längenausdehnungskoeffizienten  $\alpha$  ist in Abb. 3-11 dargestellt.

Der Längenausdehnungskoeffizient  $\alpha$  zeigt bei hydrierten Proben ein Minimum innerhalb des Bereiches von 35-55°C und kennzeichnet damit den Wendepunkt des Versatzes der TMA-Kurve. Bis ca. 125°C steigt  $\alpha$  leicht an, das Material im Byssusfaden wird weicher. Anschließend versteift es sich, wobei  $\alpha$  bis zu einem Minimum bei 211°C sinkt. Dies entspricht dem Wendepunkt des rapiden Schrumpfens der TMA-Kurve. Nach maximaler Fadenverkürzung steigt der Ausdehnungskoeffizient wieder an, der Faden erweicht. Zwischen 225°C und 256°C erhöht sich  $\alpha$  weniger stark, steigt aber ab ca. 256°C weiter bis zum Reißen des Fadens.

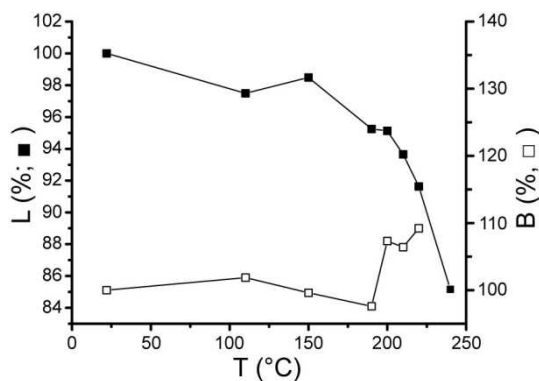


**Abb. 3-11 TMA-Kurve und thermischer Längenausdehnungskoeffizient  $\alpha$**

Gezeigt ist exemplarisch für alle Probensätze eine TMA- (schwarz) und  $\alpha$ -Kurve (rot) eines in RW inkubierten, hydrierten proximalen Byssusfadens. Verhalten des Längenausdehnungskoeffizienten  $\alpha$ : 1 – Minimum  $\alpha$  durch abrupten Wasserverlust, 2 (Ausschnitt) –  $\alpha$  steigt leicht bis 125°C (Faden wird weicher), 3 (Ausschnitt) –  $\alpha$  sinkt bis 211°C, 4 – höchste Materialsteifigkeit erreicht mit einem Minimum von  $\alpha$  bei 211°C, 5 – der Faden erweicht ( $\alpha$  steigt) bis 225°C, 6 – zwischen 225-256°C bleibt  $\alpha$  nahezu konstant, 7 –  $\alpha$  steigt und der Faden verliert seine Integrität durch thermische Zersetzung

### 3.3.2 Temperaturabhängige Änderung der Fadenmorphologie

Zur Analyse der makroskopischen, temperaturabhängigen Längen- und Breitenänderung des Byssusfadens wurden distale Fäden für 30 min im Ofen erhitzt und nach jeder Inkubationsstufe die Länge und Breite des Fadens bestimmt (Kapitel 2.6.2). Der Faden verkürzt sich vergleichbar den TMA-Studien (Kapitel 3.3.1) bis ca. 190°C langsam und anschließend rapide (Abb. 3-12). Die Fadenbreite bleibt bis 190°C nahezu konstant und verbreitert sich bei höheren Temperaturen.



**Abb. 3-12 Dimensionsänderungen des distalen Byssusfadens in Abhängigkeit von der Temperatur.**

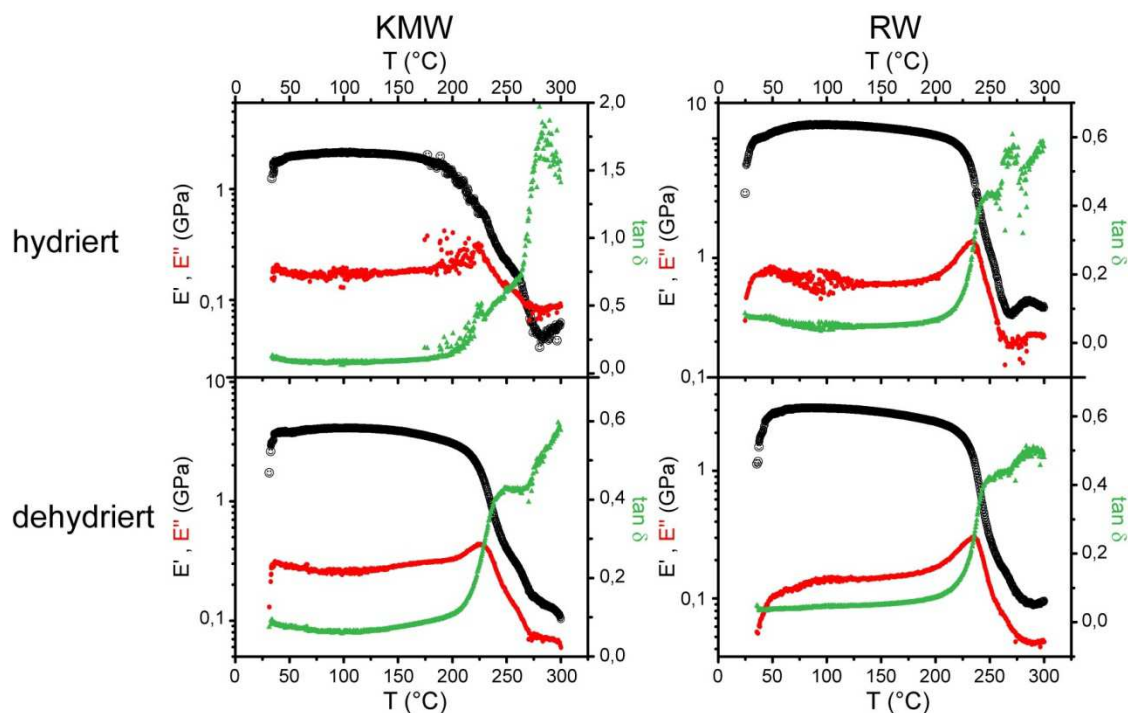
Die Proben wurden im Ofen bei der entsprechenden Temperatur jeweils 30 min inkubiert und die Fadenbreite und -länge nach Abkühlen am Lichtmikroskop bestimmt. Die Graphik zeigt den Mittelwert von Doppelbestimmungen für die Fadenlänge L und die Fadenbreite B.

### 3.3.3 Dynamisch-Mechanische Thermoanalyse (DMTA)

Bei der Dynamisch-Mechanischen Thermoanalyse (DMTA) werden die mechanischen Materialeigenschaften, insbesondere des E-Moduls E, in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Durch Bestimmung des Speicher- (E') und Verlustmoduls (E'') sowie des Verlustfaktors  $\tan \delta$  können somit Aussagen über die mechanische Integrität des Materials getroffen werden.

Proximale und distale Fadenteile wurden bei einer Frequenz von 1 Hz bis max. 2 % gedehnt und mit einer Temperiergeschwindigkeit von  $2^\circ\text{C min}^{-1}$  auf  $300^\circ\text{C}$  erhitzt (Kapitel 2.6.3). Während der Messung wurden die Parameter E', E'' und  $\tan \delta$  erfasst. Für jeden Probensatz erfolgten mindestens Doppelbestimmungen und die Abbildungen zeigen Daten einer Probe eines Probensatzes. In Tab. 3-III sind alle Ergebnisse der DMTA-Messungen zusammengefasst.

Bei den distalen Proben (Abb. 3-13) zeigen die Kurven des Speichermoduls E' einen Anstieg bis ca.  $40\text{-}50^\circ\text{C}$ . Dies kennzeichnet ein Versteifen des Materials, was zum einen auf die Abgabe von Wasser zurückzuführen ist, zum anderen durch das Schrumpfen des Fadens verursacht wird, wodurch mehr Kraft zur Aufrechterhaltung der Dehnung aufgewendet werden muss.



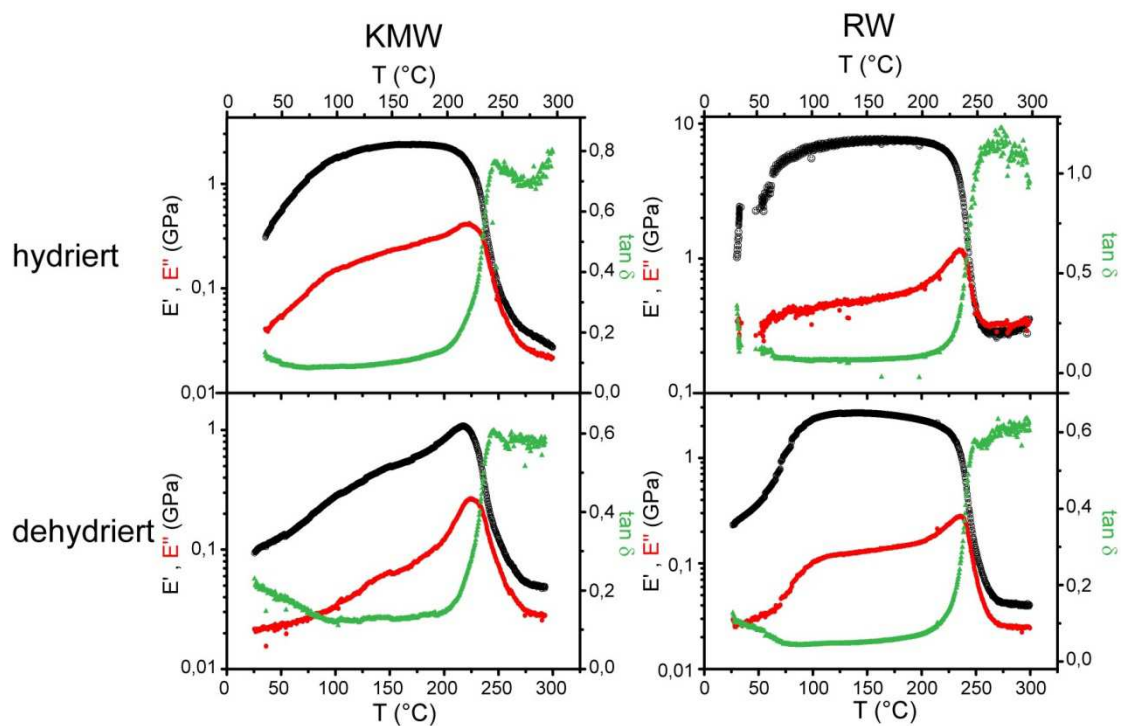
**Abb. 3-13 DMTA-Messungen der distalen Byssusfäden**

Die Proben wurden mit einer Frequenz von 1 Hz und anfänglichen Kräften von 1-10 mN bis 0,05-0,2 % gedehnt, und mit einer Heizrate von  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  auf  $300^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Pro Probensatz wurde eine repräsentative Messung ausgewählt und die Abhängigkeit des Speichermoduls  $E'$  (schwarz), Verlustmoduls  $E''$  (rot) und Verlustfaktors  $\tan \delta$  (grün) von der Temperatur dargestellt.

Nachdem  $E'$  über einen weiten Temperaturbereich konstant bleibt, kommt es zu einem rapiden Abfall. Hierbei liegt der Startpunkt des Kurvenabfalls von dehydrierten KMW-Proben bei durchschnittlich  $212^{\circ}\text{C}$ , während bei Proben, welche in RW inkubiert wurden, der Verlust des Speichermoduls bei ca.  $228^{\circ}\text{C}$  startet. Bei hydrierten Proben liegt der Startpunkt bei um  $8^{\circ}\text{C}$  niedrigeren Temperaturen. Das Verlustmodul  $E''$ , der Anteil der Steifigkeit, der durch plastische Verformung mechanische Energie dissipiert, steigt bis  $40-50^{\circ}\text{C}$  an und bleibt dann konstant. Bei hydrierten Proben zeigt die Kurve zwischen  $50-150^{\circ}\text{C}$  eine starke Streuung der Werte, was durch Wasserverdunstung aus dem Faden verursacht wird. Ab ca.  $200^{\circ}\text{C}$  erfolgt ein Anstieg in  $E''$  mit einem Maximum bei  $225^{\circ}\text{C}$  bei Fäden, die in KMW inkubiert wurden. Auch hier liegt das Maximum von  $E''$  bei RW-Proben  $10^{\circ}\text{C}$  höher. In diesem Bereich wird mechanische Energie verstärkt durch plastische Verformung übertragen. Das Material erweicht. Aufgrund des Verlustes der Steifigkeit des Fadens bei höheren Temperaturen sinkt  $E''$  bei weiterer Materialerweichung. Dieses "Fließen" des Fadenmaterials spiegelt sich auch im Verlauf der  $\tan \delta$ -Kurve wieder. Bis ca.  $200^{\circ}\text{C}$  besitzt  $\tan \delta$  niedrige Werte, das Material ist fest. Anschließend steigt  $\tan \delta$  an und erreicht ein Maximum bei  $240-245^{\circ}\text{C}$  bzw.  $250^{\circ}\text{C}$  für

dehydriert und hydrierte Proben inkubiert in KMW bzw. RW. Bis ca. 260°C bleibt dann  $\tan \delta$  konstant bzw. erhöht sich nur mäßig, und zeigt dann einen erneuten Anstieg.

Der Speichermodul  $E'$  der proximalen Proben (Abb. 3-14) steigt kontinuierlich bei niedrigen Temperaturen und erreicht ab 90-120°C konstante Werte. Einige Proben, wie der in KMW inkubierte, dehydrierte proximale Faden (Abb. 3-14), zeigen keine konstanten Werte von  $E'$  sondern einen kontinuierlichen Anstieg bis zu einem Maximum, welches dem Wert des Startpunktes des Kurvenabfalls entspricht. Die Materialversteifung erfolgt somit über einen größeren Temperaturbereich im Vergleich zu distalen Fäden.  $E'$  zeigt dann einen starken Abfall bei KMW-Proben bei ca. 220°C und 231°C bei RW-Proben. Der Verlustmodul  $E''$  steigt ebenfalls bis 120°C stark an. Dies weist darauf hin, dass hier das Material im Faden oder ein Teil davon plastisch deformiert wird. Anschließend erhöht sich  $E''$  weiter bis zu einem Maximum bei 230 bzw. 223°C für hydrierte bzw. dehydrierte KMW-Proben und bis 235°C bei Proben inkubiert in RW.



**Abb. 3-14 DMTA-Messungen der proximalen Byssusfäden**

Die Proben wurden mit einer Frequenz von 1 Hz und anfänglichen Kräften von 5-20 mN bis 0,05-2 % gedehnt, und mit einer Heizrate von 2°C min<sup>-1</sup> auf 300°C erhitzt. Pro Probensatz wurde eine repräsentative Messung ausgewählt und die Abhängigkeit des Speichermoduls  $E'$  (schwarz), Verlustmoduls  $E''$  (rot) und Verlustfaktors  $\tan \delta$  (grün) von der Temperatur dargestellt.

Die  $\tan \delta$ -Kurve zeigt, dass das Material bis 120°C fester wird, da sie in diesem Bereich kleinere Werte erreicht. Möglicherweise verhärten die Matrixproteine des proximalen Fadenteils in diesem Temperaturbereich, weil sie plastisch verformt werden. Ab 200°C steigt  $\tan \delta$  rapide an bis zu einem Maximum bei 245°C (KMW) bzw. 250/260°C (RW), das Material erweicht. Darüber hinaus zeigt  $\tan \delta$  ähnlich wie im Fall der distalen Proben einen weiteren Anstieg ab 280°C.

**Tab. 3-III Zusammenfassung der Ergebnisse der DMTA-Messungen des Muschelbyssusfadens.**

Die hier aufgeführten Werte entsprechend dem Mittelwert eines Probensatzes und der entsprechenden Standardabweichung.

|                    | distal     |           |            |           | proximal   |           |            |           |
|--------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
|                    | KMW        |           | RW         |           | KMW        |           | RW         |           |
|                    | dehydriert | hydriert  | dehydriert | hydriert  | dehydriert | hydriert  | dehydriert | hydriert  |
| n                  | 3          | 2         | 2          | 5         | 3          | 3         | 2          | 5         |
| Abfall E'          | 212°C ± 1  | 205°C ± 4 | 228°C ± 1  | 220°C ± 2 | 220°C ± 10 | 223°C ± 1 | 233°C ± 2  | 231°C ± 1 |
| Max. E''           | 223°C ± 2  | 225°C ± 1 | 234°C ± 0  | 234°C ± 2 | 230°C ± 6  | 223°C ± 1 | 235°C ± 1  | 234°C ± 1 |
| Max. $\tan \delta$ | 240°C ± 4  | 245°C ± 1 | 252°C ± 3  | 249°C ± 1 | 245°C ± 0  | 245°C ± 2 | 250°C ± 0  | 259°C ± 1 |

n...Anzahl der Proben

Die Kurvenverläufe der proximalen Proben variieren stark, wobei manche denen der distalen Proben ähneln. Aufgrund der geringen Länge des proximalen Fadenteils ist es bei der Probenpräparation schwierig eine ausreichende Probenlänge zu erhalten und es ist nicht ausgeschlossen, dass auch Anteile des distalen Teils die Messungen beeinträchtigen.

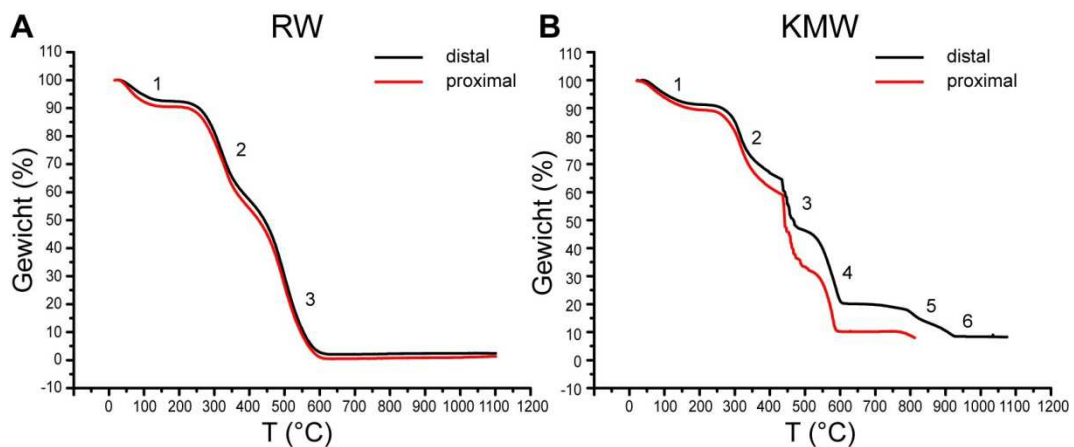
Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Werte für E', E'' und  $\tan \delta$  keine realen Werte sind und der Kurvenverlauf lediglich qualitativ bewertet wurde. Die Vergleichbarkeit der Werte unterschiedlicher Proben ist allein durch die stark variierende Vorspannung des Fadens schwierig. Darüber hinaus sind die Werte für E' nicht korrelierbar mit dem E-Modul, welcher durch mechanische Zugmessungen bestimmt wurde, da die angenommene Probengeometrie bei den DMTA-Messungen nicht dem elliptischen Fadendurchmesser entspricht und dadurch apparent zu hohe E'-Werte erhalten wurden.

Dennoch kann den Kurvenverläufen generell entnommen werden, dass die Byssusfäden ihre mechanische Integrität ab ca. 205°C verlieren. Hier sinkt ihre Steifigkeit, das Material erweicht und die mechanische Energie wird hauptsächlich durch plastische Deformation dissipiert.

### 3.3.4 Thermogravimetrische Analyse des Byssusfadens (TGA)

Zur Untersuchung der temperaturabhängigen Masseänderung des Byssusfadens mittels TGA wurden die Proben mit einer Heizrate von  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  auf  $800$  bzw.  $1100^{\circ}\text{C}$  erhitzt (Kapitel 2.6.4).

Die TGA-Kurven der proximalen und distalen Proben unterscheiden sich nicht signifikant in ihrem Verlauf, was darauf hindeutet, dass ähnliche Zersetzungsprozesse ablaufen (Abb. 3-15). Während die TGA-Kurven der RW-Byssusproben lediglich drei thermogravimetrische Effekte zeigen (Abb. 3-15A), erhält man für die KMW-Proben bis zu sechs Umsetzungsprozesse (Abb. 3-15B).



**Abb. 3-15 TGA-Kurven des Muschelbyssusfadens**

Mit einer Heizrate von  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  wurden distale und proximale Proben, welche in RW (A) bzw. KMW (B) inkubiert wurden, auf  $1100^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Abbildung zeigt exemplarisch jeweils eine Kurve aus jedem Probensatz. Die Ziffern kennzeichnen die in Tab. 3-IV gelisteten Umsetzungsprozesse.

Die Kennwerte der TGA-Kurven sind für jeden Masseverlust in Tab. 3-IV zusammengefasst. Der erste Masseverlust, welcher hauptsächlich auf das Verdampfen von Wasser zurückzuführen ist (Bigi et al., 1987; Lim & Shamos, 1974), erfolgt bei den RW-Proben in einem Temperaturbereich von  $36$ - $172^{\circ}\text{C}$ , während er bei den KMW-Proben bis  $210^{\circ}\text{C}$  anhält. Bei allen Probensätzen liegen die Wendepunkte zwischen  $61^{\circ}\text{C}$  und  $68^{\circ}\text{C}$  und die durchschnittliche Gewichtsabnahme beträgt  $10\%$ . An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass der verschobene Kurvenverlauf der proximalen KMW-Probe (Abb. 3-15B) kein materialspezifisches Verhalten für den proximalen Faden darstellt, sondern auf einen höheren Anfangswassergehalt der hier gemessenen Probe zurückzuführen ist. Der zweite Umsetzungsprozess beginnt bei  $270^{\circ}\text{C}$  für die RW-Proben und  $280^{\circ}\text{C}$  bei den KMW-Proben und endet bei allen Probensätzen bei  $400^{\circ}\text{C}$ . In diesem Temperaturbereich kommt es zur Oxidation organische Verbindungen. Die KMW-Proben verlieren bei

diesem Umsatzprozess 6-7 % weniger Masse als die RW-Proben. Die in RW inkubierten Proben werden ab einer Temperatur von ca. 460°C in einem dritten Umsetzungsprozess bis auf anorganische Reste von 1,4-2,1 % vollständig verbrannt. Alle organischen Anteile wurden umgesetzt.

**Tab. 3-IV Kennwerte der TGA-Kurven zu den Masseumsatzprozessen des Muschelbyssusfadens**

Die hier aufgeführten Werte entsprechend dem Mittelwert von Doppelbestimmungen.

|   |                 | RW           |              | KMW          |              |
|---|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   |                 | distal       | proximal     | distal       | proximal     |
| Prozess 1<br><i>H<sub>2</sub>O</i> Verlust<br>( <i>Bigi et al., 1987; Lim &amp; Shamos, 1974</i> )                    | T-Bereich       | 36 - 179°C   | 40 - 172°C   | 44 - 209°C   | 41 - 206°C   |
|   | Wp              | 61°C         | 68°C         | 64°C         | 63°C         |
|   | Gewichtsverlust | 12 %         | 8 %          | 10 %         | 12 %         |
| Prozess 2<br><i>Oxidation organischer Verbindungen/Verkohlen</i><br>( <i>Kristensen, 1990</i> )                       | T-Bereich       | 180 - 399 °C | 173 - 398 °C | 210 - 403 °C | 207 - 404 °C |
|   | Start           | 270°C        | 266°C        | 284°C        | 281°C        |
|   | Wp              | 321°C        | 331°C        | 314°C        | 314°C        |
|   | Gewichtsverlust | 33 %         | 36 %         | 27 %         | 29 %         |
| Prozess 3<br><i>CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></i><br>( <i>Hisatsun &amp; Adl, 1970</i> ) | T-Bereich       | 400 - 631°C  | 399 - 629°C  | 404 - 503 °C | 405 - 518 °C |
|   | Start           | 457°C        | 457°C        | 438°C        | 438°C        |
|   | Wp              | 498°C        | 497°C        | mehrere      | mehrere      |
|   | Gewichtsverlust | 54 %         | 54 %         | 24 %         | 26 %         |
| Prozess 4<br><i>thermischer Abbau organischer Verbindungen</i><br>( <i>Kristensen, 1990</i> )                         | T-Bereich       |              |              | 504 - 640°C  | 519 - 679°C  |
|   | Start           |              |              | 539°C        | 549°C        |
|   | Wp              |              |              | 573°C        | 580°C        |
|   | Gewichtsverlust |              |              | 25 %         | 25 %         |
| Prozess 5   | T-Bereich       |              |              | 641 - 848°C  | 680 - 866°C  |
|   | Start           |              |              | 761°C        | 775°C        |
|   | Wp              |              |              | 805°C        | 813°C        |
|   | Gewichtsverlust |              |              | 1 %          | 7,6 %        |
| Prozess 6   | T-Bereich       |              |              | 849 - 925°C  | 867 - 950°C  |
|   | Start           |              |              | 890°C        | 900°C        |
|   | Wp              |              |              | 915°C        | 935°C        |
|   | Gewichtsverlust |              |              | 6 %          | 3,7 %        |
| Rückstand<br>anorganischer Rest   |                 | 1,4 %        | 2,1 %        | 8 %          | 0 %          |

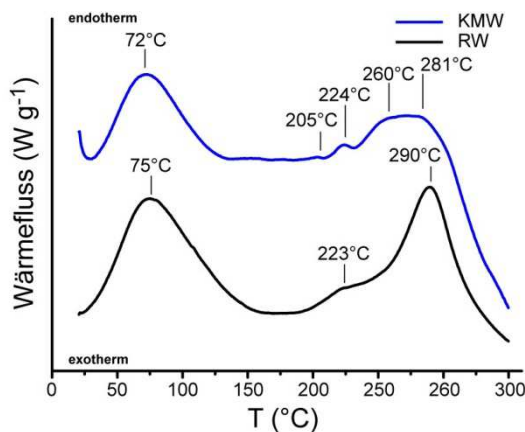
Im Gegensatz dazu erfolgen bei den KMW-Proben im Bereich von 404-518°C mehrere kleinere, aufeinanderfolgende Prozesse mit einem Masseverlust von 24-26 %. In diesem Bereich erfolgt eine stufenweise CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus dem im KMW enthaltenen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Prozess 3). Anschließend durchlaufen die KMW-Proben noch drei weitere Masseverluste bis zur vollständigen Verbrennung. Dabei liegen bei den distalen Proben die Wendepunkte bei 572°C, 80°C und 915°C, während sie bei den proximalen Fäden um 10-20°C zu höheren Temperaturen verschoben sind. Der thermische Abbau der organischen Verbindungen ist bei 640-680°C abgeschlossen. Die weiteren Masseverluste des Prozesses 5 und 6 können auf die im KMW enthaltenen Salze zurückgeführt werden.



### 3.3.5 Dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry, DSC*)

Zur Untersuchung thermodynamischer Prozesse im Byssusfaden wurden DSC-Messungen durchgeführt. Hierbei wurden zunächst gesamte Byssusfäden, die entweder in KMW oder RW inkubiert wurden, von 20°C auf 350°C erhitzt und die dabei ablaufenden Wärmeumsätze ermittelt (Kapitel 2.6.5).

Die DSC-Kurve der in RW inkubierten Proben zeigt vier Umsatzprozesse (Abb. 3-16). Im Temperaturbereich von 35-122°C wurde ein breiter endothermer Peak mit einem Maximum bei 72°C erhalten, und bei 205°C zeigt die DSC-Kurve einen Versatz. Ein weiterer endothermer Prozess liegt bei 224°C, der bei ca. 230°C in einen großen endothermen Peak übergeht. Dieser verläuft sehr breit mit zwei lokalen Maxima bei 260 und 281°C und wird ab ca. 300°C stark exotherm.



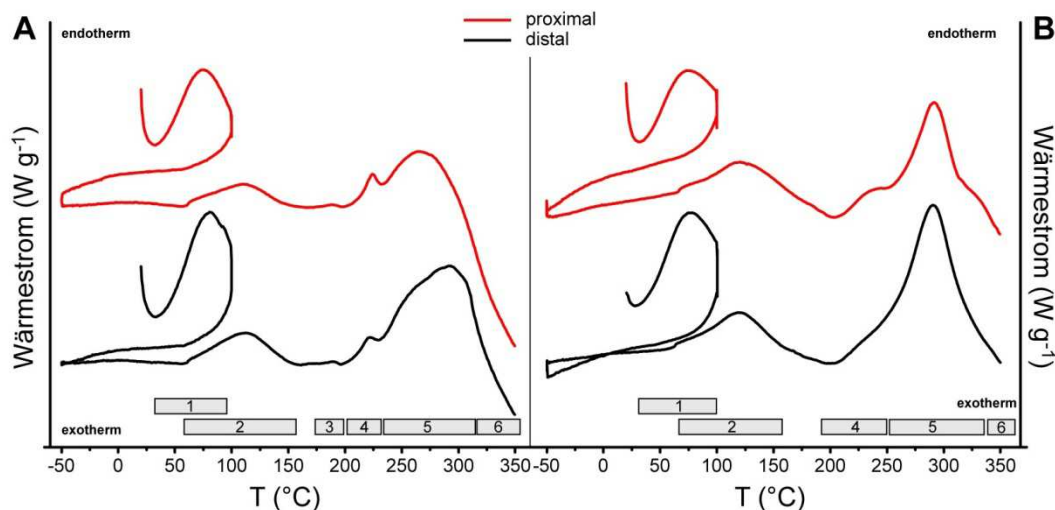
**Abb. 3-16 DSC-Kurven gesamter Muschelbyssusfäden inkubiert in KMW und RW**

Die Proben wurden bei 2°C min<sup>-1</sup> auf 350°C erhitzt und die Wärmedifferenz zu einer Referenzprobe ermittelt. Die Kurven wurden basislinienkorrigiert und sind mit Kurvenversatz dargestellt.

Im Vergleich dazu zeigt die DSC-Kurve der KMW-Proben ebenfalls einen endothermen Peak bei 75°C, dieser verläuft allerdings wesentlich breiter bis ca. 145°C. Bei höheren Temperaturen überlagern sich die Wärmeumsatzprozesse stärker, denn statt eines definierten Peaks bei 223°C wurde lediglich eine Schulter detektiert und das Maximum des Hauptpeaks liegt bei 290°C. Im Vergleich zu den RW-Proben ist dieser stärker ausgeprägt und schmaler.

Inwieweit sich die Wärmeumsatzprozesse des distalen und proximalen Byssusfadens unterscheiden, sollte durch Messungen der jeweiligen Fadenteile geklärt werden. Das Temperaturprogramm wurde so modifiziert, dass die ablaufenden Prozesse des großen endothermen Peaks bei ca. 75°C durch Aufheizen auf 100°C gefolgt von einem Abkühlen auf -50°C vor einem anschließenden erneuten Erhitzen auf 350°C voneinander separiert werden konnten.

Grundsätzlich unterscheiden sich die Kurven des distalen und proximalen Fadens nicht signifikant in ihrem Verlauf (Abb. 3-17), es erfolgen die gleichen Umsatzprozesse. Diese sind für proximale und distale Fadenteile in Tab. 3-V zusammengefasst.



**Abb. 3-17 DSC-Kurven distaler und proximaler Proben**

Die Proben wurden mit  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  zunächst auf  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzt und isotherm für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Abkühlen auf  $-50^{\circ}\text{C}$  und ein anschließendes Aufheizen auf  $350^{\circ}\text{C}$ .

A) Proben inkubiert in RW B) Proben inkubiert in KMW. Die ablaufenden Wärmeumsätze sind: 1 – endothermer Peak, 2 – endothermer Peak, 3 – exothermer Kurvenversatz, 4 – endothermer Peak, 5 – endothermer Peak, 6 – exothermer Verlauf.

Bei allen Proben konnte der erste endotherme Peak in zwei Prozesse aufgelöst werden. Der erste Umsatz hat ein Maximum bei  $77^{\circ}\text{C}$  sowohl bei den RW als auch den KMW-Proben, während der zweite Prozess zwischen  $60\text{--}160^{\circ}\text{C}$  erfolgt und ein Maximum bei  $118^{\circ}\text{C}$  (KMW) bzw.  $111^{\circ}\text{C}$  (RW) besitzt. Die in KMW inkubierten Proben zeigen auch in diesen Messungen bei Temperaturen ab ca.  $190^{\circ}\text{C}$  eine Überlagerung unterschiedlicher Prozesse, was sich in einem großen Peak mit Maximum bei  $290^{\circ}\text{C}$  widerspiegelt. Eine Schulter bei  $224^{\circ}\text{C}$  entspricht dabei möglicherweise dem kleinen Schmelzpeak der RW-Proben.

**Tab. 3-V DSC-Analysen von Muschelbyssusfäden**

| Wärmeumsatz                  | RW                                |  | KMW  |                       |
|------------------------------|-----------------------------------|--|--|-----------------------|
|                              | T-Bereich                         | Maximum/Wp   | T-Bereich                                    | Maximum/Wp            |
| 1 – endothermer Peak         | ab $40^{\circ}\text{C}$           | $77^{\circ}\text{C}$   | ab $39^{\circ}\text{C}$                      | $77^{\circ}\text{C}$  |
| 2 – endothermer Peak         | $60\text{--}152^{\circ}\text{C}$  | $111^{\circ}\text{C}$  | $60\text{--}158^{\circ}\text{C}$             | $118^{\circ}\text{C}$ |
| 3 – exothermer Kurvenversatz | $172\text{--}200^{\circ}\text{C}$ | $194^{\circ}\text{C}$  | /  | /                     |
| 4 – endothermer Peak         | $205\text{--}230^{\circ}\text{C}$ | $222^{\circ}\text{C}$  | $205\text{--}258^{\circ}\text{C}$ (Schulter) |                       |
| 5 – endothermer Peak         | $230\text{--}350^{\circ}\text{C}$ | $263^{\circ}\text{C}$<br>(Schulter)<br>$290^{\circ}\text{C}$ | $258\text{--}350^{\circ}\text{C}$            | $290^{\circ}\text{C}$ |
| 6 – exothermer Verlauf       | $305\text{--}320^{\circ}\text{C}$ |  | $330\text{--}350^{\circ}\text{C}$            |                       |

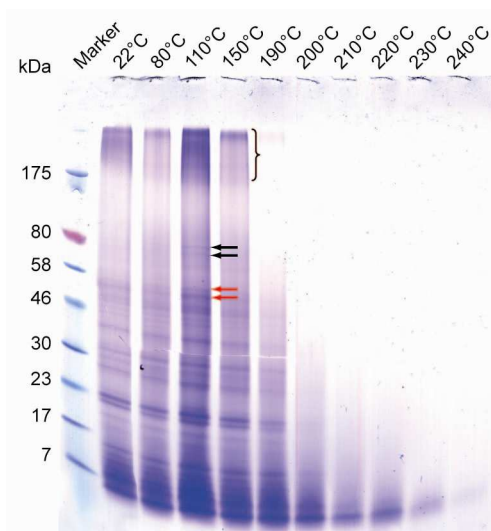
Die DSC-Kurven der Proben, welche in RW inkubiert wurden, zeigen in einem Temperaturbereich von 190-350°C eine definierte Auflösung. Ein exothermer Kurvenversatz mit  $W_p$  bei 194°C weist auf eine Verringerung der Wärmekapazität des Materials hin, es kann ab hier weniger Wärme aufnehmen. Es ist sehr schwierig, genau festzulegen, ob es sich um einen Kurvenversatz oder einen exothermen Peak handelt, da die Lage der Basislinie dabei eine große Rolle spielt. Normalerweise erhält man bei Einkomponenten-Materialien eine gerade Grundlinie, aber bei Mehrkomponenten-Systemen können sich die einzelnen Prozesse so stark überlagern, dass die Grundlinie stark verschoben ist. Die berechnete Basislinie ist in solchen Fällen oft subjektiv. Auch wenn es sich hier um einen exothermen Kristallisationspeak handelt, so bestärkt dies die Annahme, dass es in diesem Temperaturbereich zu einer Versteifung des Byssusfadens kommt.

Bei höheren Temperaturen erhält man zwischen 205-230°C einen endothermen Peak mit einem Maximum bei 222°C, der in einen großen, breiten endothermen Peak übergeht. Dieser setzt sich auch aus zwei Prozessen zusammen, die sich vergleichbar zu den Messungen des gesamten Byssusfadens in einer Schulter bei 263°C und einem Maximum bei 290°C zeigen. Bei den RW-Proben verläuft die DSC-Kurve ab 305°C exotherm. Bei den KMW-Proben ist dies ab 330°C der Fall. Hier beginnt die thermische Zersetzung.

### **3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Analyse des thermischen Abbaus der Proteine im Byssusfaden**

Um die thermische Zersetzung der Proteine im Byssusfaden zu untersuchen, wurden die Proteine distaler Byssusfäden, welche im Ofen bei 80, 110, 150, 190, 200, 210, 220, 230 und 240°C für 30 min inkubiert wurden, mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Kapitel 2.6.6).

Das Gel (Abb. 3-18) zeigt für die Temperaturen 22°C bis 150°C ein definiertes Bandenmuster mit einer Doppelbande bei 80 kDa, welche entweder den preCols (Qin & Waite, 1995) oder auch dem Kutikulaprotein Mgfp-1 (Inoue & Odo, 1994) zugeordnet werden kann (Abb. 3-18 schwarze Pfeile). Proteinbanden bei 50-60 kDa entsprechen möglicherweise den Matrixproteinen (Abb. 3-18 rote Pfeile) (Sagert & Waite, 2009; Sun et al., 2002). Diffuse Banden bei einer Größe von mehr als 175 kDa deuten auf größere Oligomere wie z.B. Di- und Trimere der preCols hin (Abb. 3-18 geschweifte Klammer).



**Abb. 3-18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Temperatur-behandelter Muschelbyssusfäden**

Die SDS-PAGE Temperatur-behandelter Muschelbyssus-Proben erfolgte bei 25 mA für 60 min. geschweifte Klammer - größere Oligomere, schwarze Pfeile - Proteinbanden möglicherweise von preCols oder Mgfp-1, rote Pfeile - Banden entsprechen wahrscheinlich den Matrixproteinen

Ab 190°C zeigt das SDS-Gel keine definierten Banden mehr, die größer als 60 kDa sind. Somit lösen sich die Oligomere auf und die Proteine werden möglicherweise thermisch entfaltet. Ab 230°C zeigt das Gel keine Proteinbanden mehr.

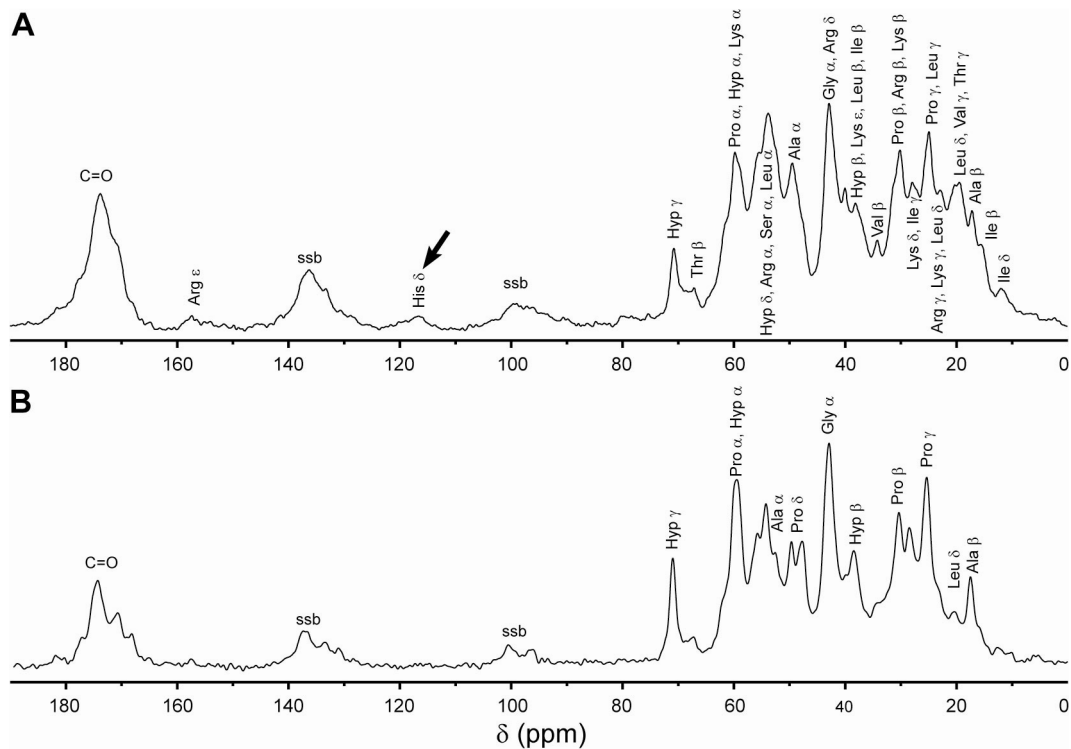
### 3.4 Protein-Strukturanalyse des Muschelbyssusfadens

#### 3.4.1 Festphasen-Kernspinresonanzspektroskopie (ssNMR, *solid state nuclear magnetic resonance*)

Zur Untersuchung der Molekülstruktur und Dynamik der Proteine im Muschelbyssusfaden wurden Experimente mit ssNMR-Spektroskopie durchgeführt (Kapitel 2.7.1), da diese Methode sich sehr gut zur Analyse von Mehrkomponentenmaterialien und intakten Geweben eignet. Bei den Messungen wurde das natürliche Vorkommen von  $^{13}\text{C}$  im Muschelbyssusfaden genutzt. Die Experimente wurden von Holger Scheidt vom Institut Biochemie/Biotechnologie (MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Zunächst wurden von hydrierten Gesamt-Byssusfäden kreuzpolarisierte (*cross polarization, CP*)  $^{13}\text{C}$  MAS NMR Spektren gemessen. Mit dieser Methode können rigide Moleküle und Molekülgruppen detektiert werden. Das  $^{13}\text{C}$  CP MAS Spektrum (Abb. 3-19A) zeigt bei den Aminosäuren Ala, Gly, Pro und Hyp (Zuordnung nach (Bielecki, 1989; Schulz, 2007; Zernia & Huster, 2006) chemische Verschiebungen, die auch in Kollagen der Achillessehne detektiert werden können (Abb. 3-19B). Besonders der Peak

von Hyp  $\delta$  bei 71.1 ppm ist typisch für Kollagen, da keine andere Aminosäure einen solche charakteristische Verschiebung zeigt.



**Abb. 3-19 Festphasen NMR-Spektroskopie des gesamten Byssusfadens und Achillessehnen-Kollagen**

Die MAS-Frequenz betrug 7 kHz bei 20°C. Peaks gekennzeichnet mit ssb (*spinning side band*) sind messtechnische Nebeneffekte.

A) Protonen-entkoppeltes 188 MHz  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektrum von hydriertem Gesamt-Byssusfaden. Für Ala, Gly, Pro und Hyp in Byssusfäden wurden ähnliche Verschiebungen erhalten wie bei Kollagen, und ein prominentes zusätzliches Signal bei 118 ppm (Pfeil) kann dem in der preCol His&DOPA-Domäne vorkommenden His zugeordnet werden. B)  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektrum von Achillessehnen-Kollagen (Wassergehalt: 20 % D<sub>2</sub>O).

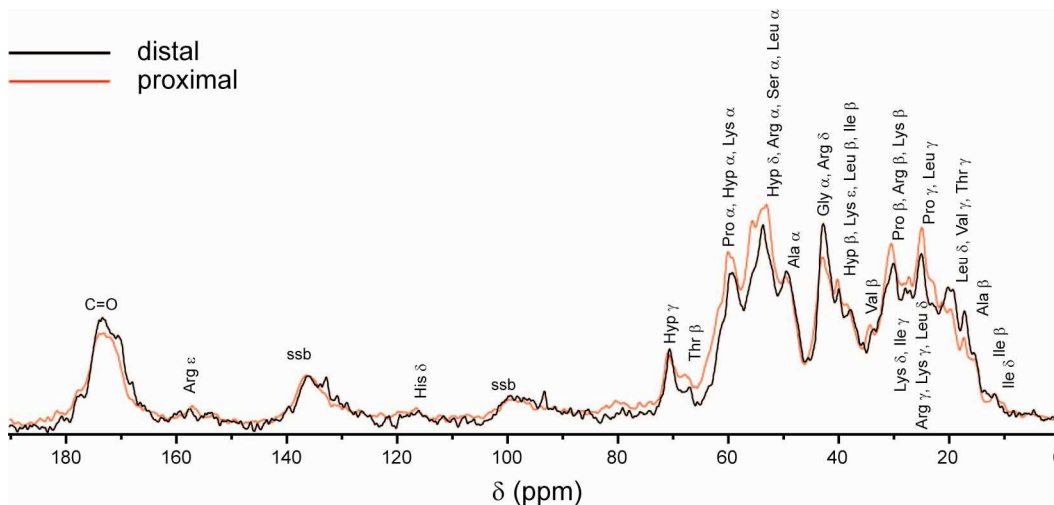
(nach Hagenau & Scheibel, 2010 und Hagenau et al., 2009 mit Erlaubnis der Verlage John Wiley and Sons und Taylor&Francis Group)

Weitere Signale könnten von den flankierenden Domänen der preCols sowie den Matrix- und Kutikulaproteine stammen, doch eine eindeutige Zuordnung zu den jeweiligen Proteinen ist nicht möglich. Lediglich ein markanter Peak bei 118 ppm entspricht dem Signal von His  $\delta$  und repräsentiert somit die His&DOPA-Domänen der preCols.

Direkt angeregte  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren (Bloch-Spektrum) mit hohen und niedrigen Protonen-Entkopplungsstärken wurden am Gesamt-Byssusfaden durchgeführt, um flexible Moleküle zu detektieren. Dabei zeigen Moleküle hoher Beweglichkeit starke Signale bei niedriger Entkopplungsstärke, während hohe Protonen-Entkopplung moderat flexible Gruppen betrachtet. Für den Gesamt-Byssusfaden zeigt das direkt angeregte  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (siehe Anhang Abb. 9-1) bei hoher und niedriger  $^1\text{H}$ -Entkopplung weitestgehend

identische chemische Verschiebungen verglichen mit dem  $^{13}\text{C}$  CP MAS-Spektrum. Die Signalintensitäten bei niedriger  $^1\text{H}$ -Entkopplung liegen im Hintergrundrauschen, was auf ein Fehlen hoch flexibler Aminosäuren im Byssusfaden schließen lässt. Auch das Bloch-Spektrum bei hoher Entkopplungsstärke weist ein niedriges Signal-Rausch-Verhältnis auf. Dennoch sind die Signalintensitäten höher als bei niedriger Protonen-Entkopplung, was darauf hindeutet, dass die Proteine im Byssusfaden somit größtenteils wenig flexibel bis unbeweglich sind.

Da sich die Spektren der Gesamt-Byssusfäden aus den Signalen aller Proteinkomponenten zusammensetzen, können mögliche Unterschiede der Flexibilität der Proteine der distalen und proximalen Fadenteile nicht aufgelöst werden. Deshalb wurden NMR-Spektren der jeweiligen Fadenbereiche einzeln aufgenommen. Das  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektrum proximaler und distaler Proben unterscheidet sich nicht in den chemischen Verschiebungen (Abb. 3-19), und sie entsprechen denen der Spektren des Gesamt-Byssusfadens und somit auch denen des Achillessehnen-Kollagens. Die Spektren zeigen lediglich Signale der preCol-Kollagendomäne, welche die Signale der Matrixproteine und flankierenden Domänen der preCols überlagern.



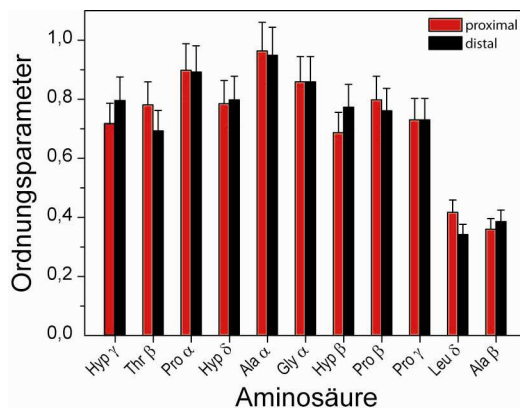
**Abb. 3-20 Protonen-entkoppeltes 188 MHz  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektren distaler und proximaler Byssusfäden**

Die Spektren zeigen keinen Unterschied in den chemischen Verschiebungen, lediglich einige Signalintensitäten (besonders für Pro) sind in der proximalen Probe stärker. ssb - *spinning side band*, messtechnischer Nebeneffekt

(nach Hagenau et al., 2009 mit Erlaubnis des Verlags John Wiley and Sons)

Direkt angeregte  $^{13}\text{C}$ -Spektren (siehe Anhang Abb. 9-2 und Abb. 9-3) zeigen sowohl bei den distalen als auch den proximalen Proben nur ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis und geben keinen Hinweis auf das Vorhandensein hochflexibler Strukturen.

Der Grad der Flexibilität von einzelnen Aminosäuren wurde anhand des  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Ordnungsparameters in DIPSHIFT-Experimenten bestimmt (Kapitel 2.7.1). Dabei bedeutet ein Ordnungsparameter von 1 komplette Unbeweglichkeit der entsprechenden Aminosäure, während ein Wert von 0 für isotrope Mobilität steht. Die  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Ordnungsparameter einzelner Aminosäuren unterscheiden sich für proximale und distale Proben nicht signifikant (Abb. 3-21).



**Abb. 3-21**  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ - Ordnungsparameter einzelner Aminosäuren für distale und proximale Byssusfäden bestimmt mit DIPSHIFT-Experimenten

Die  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ - Ordnungsparameter der Aminosäuren, die direkt in die Bildung und Stabilisierung der kollagenen Tripelhelix über Wasserstoffbrückenbindungen involviert sind, besitzen einen Wert über 0,7, was darauf hindeutet, dass die betrachtete Bindungen eher unflexibel sind. Im Gegensatz dazu ist der  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ - Ordnungsparameter für die C-Atome der aliphatischen Kette von Ala und Leu niedriger. Diese Molekülgruppen sind somit frei beweglich.

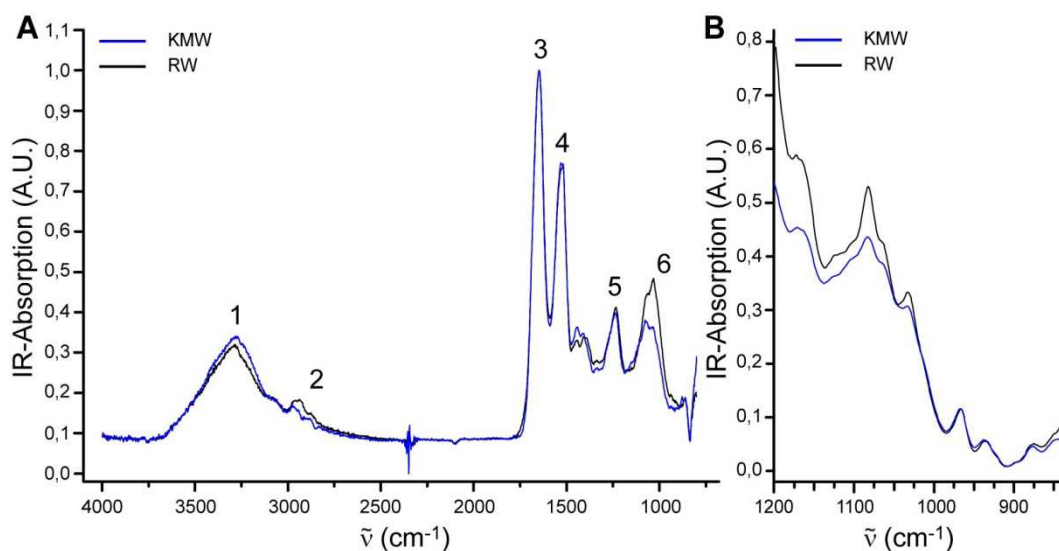
Die Ergebnissen der ssNMR-Untersuchungen zeigen, dass der Hauptteil der betrachteten Aminosäuren den Kollagendomänen der preCols im proximalen und im distalen Byssusfaden zugeordnet werden kann und diese eine hohe Packungsdichte im Byssusfaden aufweisen.

### 3.4.2 Strukturuntersuchungen am Muschelbyssusfadens mittels FTIR-Spektroskopie

Im folgenden Kapitel wurden neben den strukturellen Unterschieden des proximalen und distalen Fadenteils auch die Orientierung der Proteine und der Einfluss von mechanischer Belastung sowie Temperatur auf die Strukturelemente im distalen Faden untersucht.

#### 3.4.2.1 FTIR-Spektroskopie des distalen und proximalen Byssusfadens

Zunächst sollte geklärt werden, ob Ionen in der Inkubationslösung die Struktur der Proteine im Byssusfaden beeinflussen. Hierfür wurden sowohl Messungen am ATR-Kristall als auch Transmissionsmessungen (Kapitel 2.7.3.2) mit distalen und proximalen Fadenteilen, welche jeweils in KMW und RW inkubiert wurden, durchgeführt. Exemplarisch sind in Abb. 3-22 die Spektren distaler Proben gezeigt.



**Abb. 3-22 FTIR-Spektroskopie distaler Fadenteile inkubiert in KMW und RW**

A) Gesamtspektrum aufgenommen am Tensor MIRacle Ge (ATR-Kristall) mit Zuordnung der wichtigsten Absorptionsbanden: 1- Amid A, 2- Amid B, 3- Amid I, 4- Amid II, 5- Amid III und 6- *fingerprint*-Region. B) *Fingerprint*-Region des FTIR-Spektrums für eine bessere Bandenauflösung aufgenommen am Hyperion FTIR-Mikroskop im Transmissionsmodus.

Nach Grundlinienkorrektur wurden die Gesamtspektren normiert.

Die ATR-Spektren (Abb. 3-22A) zeigen nur im Bereich der *fingerprint*-Region signifikante Unterschiede zwischen KMW und RW. Eine geringe Bandenauflösung und unterschiedliche Absorptionsintensitäten können darauf zurückgeführt werden, dass die ATR-Methode in diesem Wellenzahlbereich limitiert ist, denn Spektren aufgenommen im Transmissionsmodus (Abb. 3-22B) zeigen eine gute Bandentrennung und geringe Unterschiede in der Bandenintensität. Da bei einem natürlichen Material wie dem



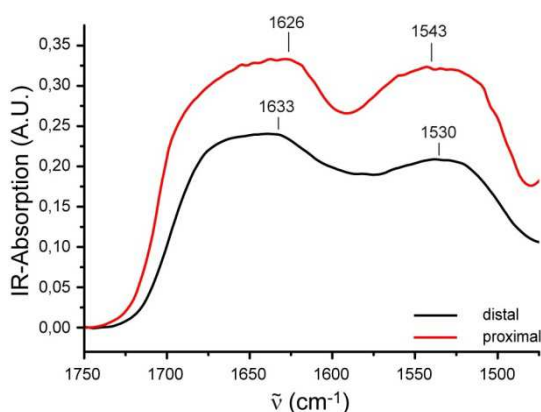
Byssusfaden keine exakte Proteinkonzentration eingestellt werden kann und die Oberfläche des Fadens Streuung verursacht, können die Absorptionsintensitäten zwischen einzelnen Proben variieren. Auch die FTIR-Spektren der proximalen Proben, welche in KMW bzw. RW inkubiert wurden, zeigen keine Unterschiede. Die Inkubationslösung beeinflusst somit nicht die Proteinstruktur des Fadens.

Zur Untersuchung der strukturellen Unterschiede der Proteine wurden FTIR-Spektren des distalen und proximalen Fadenteils anhand der Amid I-, II- und III-Banden sowie der *fingerprint*-Region analysiert.

#### *Sekundärstrukturbestimmung anhand der Amid I und II-Bande*

Die Absorptionsbanden der Amid-I und -II-Schwingungen setzen sich aus der Überlagerung der Banden des Peptid-Rückgrates und den Aminosäureseitenketten zusammen und sind stark beeinflusst von der Ausbildung von Sekundärstrukturen.

Die FTIR-Messungen zur Auswertung der Amid I und II-Banden wurden in Kooperation mit Dr. Sebastian Rammensee vom Department Physik der TU München durchgeführt (Kapitel 2.7.3.1). Bei der Auswertung der FTIR-Spektren wurden zunächst die Maxima der Amid I- und Amid II-Banden der distalen und proximalen Fadenteile bestimmt und Sekundärstrukturen (Tab. 2-I) zugeordnet. Im Falle der distalen Fäden wies die Amid I-Bande ein Maximum bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  und die Amid II-Bande bei  $1530\text{ cm}^{-1}$  auf, was auf tripelhelikale und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen hindeutet (Abb. 3-23).



**Abb. 3-23 Amid I und II-Bereich der FTIR-Spektren des distalen und proximalen Fadenteils**

Die Proben wurden in RW inkubiert und im Transmissionsmodus an einem Bruker IFS 66/s Spektrometer mit IRscope II-Mikroskop bei einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$  gemessen. Die Spektren wurden grundlinienkorrigiert und die Maxima der entsprechenden Amid-Banden sind gekennzeichnet.

(nach Hagenau et al., 2009 mit Erlaubnis des Verlags John Wiley and Sons)

Bei den proximalen Proben kennzeichnet ein Maximum der Amid I-Bande bei  $1626\text{ cm}^{-1}$   $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, während die Amid II-Bande bei  $1543\text{ cm}^{-1}$   $\alpha$ -Helices zugeordnet werden konnte.

Durch Dekonvolution der Amid I-Bande mit Lorentz-Fits wurden die Sekundärstrukturanteile der jeweiligen Fadenteile bestimmt (Tab. 3-VI).

**Tab. 3-VI Sekundärstrukturanteile des Muschelbyssusfadens bestimmt durch Dekonvolution der Amid I-Bande mittels Lorentz-Fits**

(nach Hagenau et al., 2009 mit Erlaubnis des Verlags John Wiley and Sons)

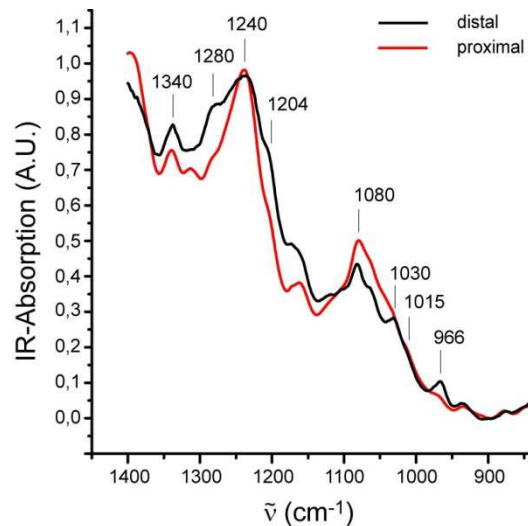
|   | proximal | distal |
|---|----------|--------|
| Seitengruppen (1610-1628 cm <sup>-1</sup> ) | 26 %     | 8 %    |
| β-Faltblatt (1625-1640 cm <sup>-1</sup> )   | 15 %     | 70 %   |
| β-Schleifen (1660-1685 cm <sup>-1</sup> )   |          |        |
| α-Helix (1648-1660 cm <sup>-1</sup> )       | 46 %     | 0 %    |
| Tripelhelix (1633-1640 cm <sup>-1</sup> )   | 13 %     | 22 %   |

Hierbei zeigen die proximalen Fäden mit 46 % hauptsächlich α-helikale Strukturen sowie einen geringen Anteil an β-Konformationen (15%) und Tripelhelices (13 %). Im Gegensatz dazu enthalten die distalen Fadenteile 22 % tripelhelikale Strukturen und zu einem Großteil β-Faltblätter und β -Schleifen.

Somit kennzeichnet die Proteine des proximalen Fadens ein hoher helikaler Sekundärstrukturanteil, während im distalen Faden vorwiegend β-strukturierte Proteine vorliegen.

#### *Amid III- und Fingerprint-Region*

Im Wellenzahlbereich unter 1500 cm<sup>-1</sup> setzen sich die Absorptionsbanden aus Beiträgen mehrerer Molekülschwingungen zusammen. Dadurch ist eine exakte Zuordnung der Banden schwierig. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zuordnungen ausschließlich auf die in den preCols vorkommenden Molekülschwingungen bezogen und anhand von Literaturdaten und den Ergebnissen zur Orientierung der Schwingung und deren Verhalten bei mechanischer Belastung getroffen. Die wichtigsten Absorptionsbanden, die in der Amid III-Bande und dem *fingerprint*-Bereich des FTIR-Spektrums des Byssusfadens auftreten, sind in Abb. 3-24 gekennzeichnet und in Tab. 3-VII zusammengefasst.



**Abb. 3-24** *Fingerprint-* und *Amid III*-Bereich der FTIR-Spektren des distalen und proximalen Fadenteils.

Das Spektrum wurde im Transmissionsmodus am Bruker Hyperion Mikroskop aufgenommen und eine Grundlinienkorrektur und Normierung im entsprechenden Wellenzahlbereich durchgeführt. Die wichtigsten Peaks sind gekennzeichnet und in Tab. 3-VII zusammengefasst.

**Tab. 3-VII** Übersicht der IR-Absorptionsbanden der *Amid III*-Bande und des *fingerprint*-Bereiches sowie deren molekulare Zuordnung

Die Zuordnung beruht auf dem Vergleich mit Spektren von Kollagenmaterialien und polyAminosäuren.

| Bande (cm <sup>-1</sup> ) | Molekulare Zuordnung   | Referenz   |
|---------------------------|--|--|
| 966                       | N-C <sup>α</sup> Streckschwingung in polyAla- Faltblättern                                 | (Dwivedi & Krimm, 1982b; Papadopoulos et al., 2007)                  |
| 1015                      | Streckschwingung des Peptidrückgrats in polyGly I Faltblättern                             | (Dwivedi & Krimm, 1982a; Suzuki et al., 1966; Taga et al., 1997)     |
| 1030                      | Kombination aus C-O Streck- und Biegeschwingung in Hyp in Kollagenen                       | (Gough et al., 2003; Movasaghi et al., 2008)                         |
| 1080                      | C <sup>α</sup> -C <sup>β</sup> und N-C <sup>α</sup> Streckschwingung in polyPro II Helices | (Dwivedi & Gupta, 1972; Isemura et al., 1968)                        |
| 1204                      | C-N Streckschwingung der Peptidbindung in Kollagen   | (Belbachir et al., 2009; Gough et al., 2003; Movasaghi et al., 2008) |
| 1240                      | N-H Deformationsschwingung der Peptidbindung in Kollagen <sup>h</sup>                      |  |
| 1340                      | CH <sub>3</sub> und CH <sub>2</sub> Schwingungen vieler Aminosäuren u. a. Pro              | (Barth, 2000; Movasaghi et al., 2008)                                |

In FTIR-Spektren des distalen und proximalen Fadens, welche am Bruker Hyperion 1000 IR-Mikroskop (Kapitel 2.7.3.2) aufgenommenen wurden, zeigen einige Unterschiede in der *fingerprint*-Region (Abb. 3-24). So sind die *Amid III*-Banden bei 1280 cm<sup>-1</sup> und 1204 cm<sup>-1</sup>, welche Schwingungen des Kollagens zugeordnet werden können, in Spektren des proximalen Fadens weniger ausgeprägt als bei denen des distalen Fadens. Dies kann

auf einen geringeren preCol-Anteil im proximalen Faden zurückgeführt werden (Kapitel 1.2.3.2).

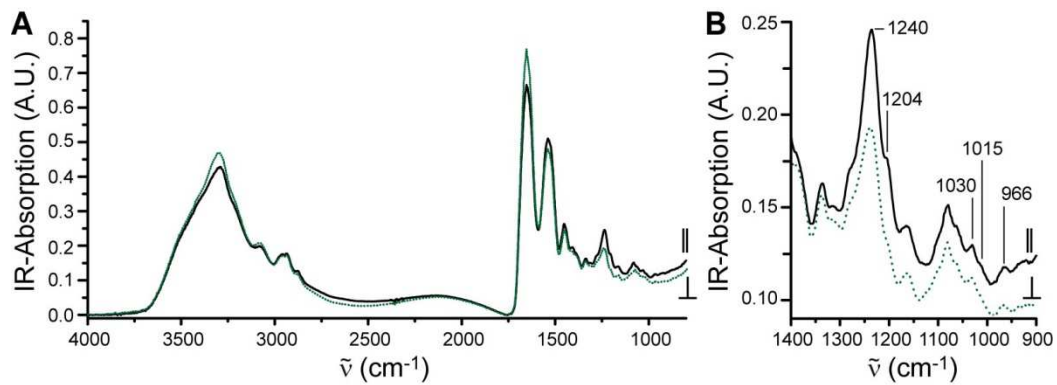
Des Weiteren zeigt der Peak bei  $1080\text{ cm}^{-1}$  im proximalen Teil eine höhere Absorption. Da zu dieser Bande auch Schwingungen von Phosphat beitragen können (Movasaghi et al., 2008) und das proximale Matrixprotein PTMP-1 eine hohe Zahl an potentiellen Phosphorylierungsstellen besitzt (Sun et al., 2002), könnte diese erhöhte Absorption möglicherweise von Phosphat im proximalen Fadenteil resultieren. Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigt die Bande bei  $966\text{ cm}^{-1}$ , welche polyAla  $\beta$ -Faltblättern zugeordnet werden kann (Dwivedi & Krimm, 1982b). Diese Vibration weist im distalen Faden eine wesentlich höhere Absorption auf. PreCol P besitzt im Vergleich zu preCol D keine ausreichend langen polyAla-Sequenzen in den flankierenden Regionen, die in ein solches Strukturmotiv falten können.

#### 3.4.2.2 *Polarisierte FTIR-Spektroskopie des distalen Byssusfadens*

Hochgeordnete Strukturen in einem anisotropen Material absorbieren polarisiertes IR-Licht je nach Polarisierungswinkel unterschiedlich und zeigen damit Dichroismus. So erhält man bspw. bei senkrechter Polarisation keine Absorption, wenn die Dipol-Übergangsmomente alle parallel entlang der Symmetrieachse orientiert sind. Somit kann die Ausrichtung von Bindungen in einem Material bestimmt werden.

Zur Analyse der Orientierung verschiedener Aminosäure-Bindungen und damit der entsprechenden Struktur motive der preCols wurden polarisierte FTIR-Messungen am distalen Fadenteil durchgeführt (Kapitel 2.7.3.2). Dabei bedeutet ein Polarisationswinkel von  $0^\circ$  eine Polarisation parallel zur Fadenachse, während  $90^\circ$  eine senkrechte Ausrichtung angibt.

Die Amid A und I-Banden zeigen bei einer Polarisation von  $90^\circ$  eine höhere Absorption im Vergleich zu  $0^\circ$ . Die entsprechenden Schwingungen besitzen somit eine senkrechte Ausrichtung im Bezug auf die Fadenachse. Im Gegensatz dazu zeigt die Amid II-Bande bei einer Polarisation von  $0^\circ$  eine höhere Absorption und folglich parallele Orientierung (Abb. 3-25 A).



**Abb. 3-25 Polarisierte FTIR-Spektroskopie des distalen Byssusfadens**

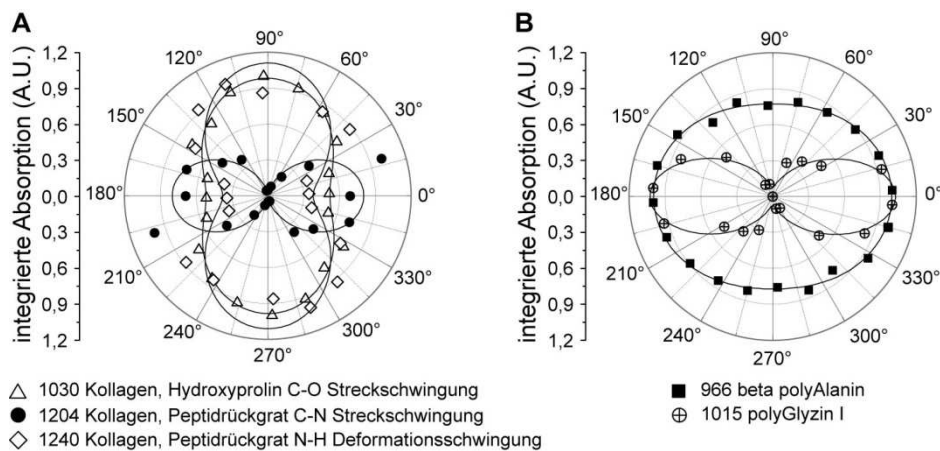
A) Gesamtspektrum mit parallel (schwarze Linie, ||) und senkrecht (grüne, gepunktete Linie, ⊥) polarisierten IR-Licht. B) Ausschnitt der *fingerprint*-Region. Die zur weiteren Analyse verwendeten Absorptionsbanden sind gekennzeichnet und die entsprechenden Molekülschwingungen sind in Tab. 3-VII gelistet. (nach Hagenau et al., 2011 mit Erlaubnis des Verlags Elsevier)

Da in den Amid A und I-Banden zum Großteil die Carbonyl-Schwingungen der Peptidbindung absorbieren und die Amid II-Bande sich aus unterschiedlichen Peptidrückgrat-Schwingungen zusammensetzt (Movasaghi et al., 2008), kann aus dem Dichroismus der Banden geschlossen werden, dass die Proteine im distalen Byssusfaden im Durchschnitt eher parallel zur Fadenachse ausgerichtet sind.

Im Bereich der Amid III-Bande und des *fingerprint*-Bereiches wurden Banden spezifischer Aminosäure-Bindungen ausgewählt und deren Orientierung analysiert. Diese entsprechen zum einen Schwingungen der Kollagendomäne der preCols (1240  $\text{cm}^{-1}$ , 1204  $\text{cm}^{-1}$ ) (Belbachir et al., 2009; Gough et al., 2003), und zum anderen können sie Gly- (1015  $\text{cm}^{-1}$ ) (Dwivedi & Krimm, 1982a; Suzuki et al., 1966; Taga et al., 1997) und Ala-reichen (966  $\text{cm}^{-1}$ ) (Dwivedi & Krimm, 1982b)  $\beta$ -Faltblättern der flankierenden preCol-Sequenzen zugeordnet werden. Die Bande bei 1030  $\text{cm}^{-1}$  kann je nach Orientierung der Schwingungsmoden entweder der Streckschwingung im Peptidrückgrat von polyGly II-Helices (Dwivedi & Krimm, 1982a; Papadopoulos et al., 2007) oder der Streck- und Biegeschwingung der C-O-Bindung des Hydroxyprolins in Tripelhelices zugeordnet werden (Abb. 3-25 B, Tab. 3-VII) (Gough et al., 2003; Movasaghi et al., 2008).

FTIR-Spektren hydrierter und dehydrierter distaler Byssusfäden wurden bei Polarisationswinkeln zwischen 0 und 180°, wie in Kapitel 2.7.3.2 beschrieben, aufgenommen. Die Flächen der jeweiligen Banden wurden nach Basislinienkorrektur bestimmt, normiert und in Abhängigkeit vom Polarisationswinkel in sogenannten Polardiagrammen graphisch dargestellt (Abb. 3-26). Nach Fitten der Daten wurde der

Ordnungsparameter  $S^{mol}$ , welcher den Grad der Orientierung einer Schwingung angibt, bestimmt. Alle  $S^{mol}$ -Werte sind in Tab. 3-VIII zusammengefasst.



**Abb. 3-26 Abhängigkeit der Fläche ausgewählter Absorptionsbanden von der Polarisierung des IR-Lichts dargestellt in Polardiagrammen.**

Die ausgewählten Banden repräsentieren die Kollagendomäne und die flankierenden Regionen der preCols im distalen dehydrierten Muschelbyssusfäden. Die Fadenachse entspricht 0°.

A) Polardiagramm ausgewählter Schwingungsmoden in tripelhelikalen Strukturen. Hier zeigt die Peptidrückgratschwingung bei 1204  $\text{cm}^{-1}$  eine hohe Orientierung entlang der Fadenachse, während die Vibrationen bei 1240 und 1030  $\text{cm}^{-1}$  senkrecht orientiert sind. B) Polarisation-Abhängigkeit der Absorptionssignale von  $\beta$ -Faltblattstrukturen in polyAla und polyGly, welche in den flankierenden Regionen von preCol D und NG vorkommen. Beide Schwingungen zeigen eine eher parallele Orientierung im Byssusfäden, wobei die polyGly I-Schwingung eine höhere Ordnung besitzt.

(nach Hagenau et al., 2011 mit Erlaubnis des Verlags Elsevier)

Die Amid-Schwingung bei 1204  $\text{cm}^{-1}$  in dehydrierten Proben zeigt eine parallele Ausrichtung entlang der Fadenachse mit einem sehr hohen Ordnungsparameter ( $S^{mol}$  0,94). Der Grad der Orientierung in hydrierten Fäden ist hingegen geringer ( $S^{mol}$  0,69). Die Schwingung bei 1240  $\text{cm}^{-1}$  ist dagegen senkrecht orientiert mit einem  $S^{mol}$  von -0,28 und -0,21 für dehydrierte und hydrierte Proben. Mit Ordnungsparametern von -0,19 und -0,28 zeigen die Übergangsmomente mit Absorption bei 1030  $\text{cm}^{-1}$  eine senkrechte Ausrichtung und könnten somit eher der Schwingung der C-O-Bindung in Hydroxyprolin zugeordnet werden.

Die Aminosäure-Schwingungen der  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind im Falle von polyAla (966  $\text{cm}^{-1}$ ) nur gering parallel orientiert, während die von polyGly (1015  $\text{cm}^{-1}$ ) eine hohe parallele Ausrichtung mit einem  $S^{mol}$  von 0,5 (hydriert) und 0,8 (dehydriert) aufweisen.

**Tab. 3-VIII Orientierung und Ordnungsparameter  $S^{mol}$  ausgewählter Schwingungsmoden der Amid III-Bande und *fingerprint*-Region des distalen Byssusfadens**

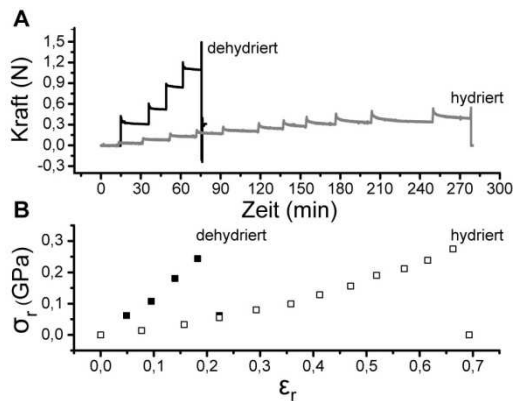
Die Werte für  $S^{mol}$  wurden anhand von Polardiagrammen bestimmt.  
(nach Hagenau et al., 2011 mit Erlaubnis des Verlags Elsevier)

| Bande                 | Orientierung<br>der Bindung | $S^{mol}$        |                  |
|-----------------------|-----------------------------|------------------|------------------|
|                       |                             | dehydriert       | hydriert         |
| 966 $\text{cm}^{-1}$  |                             | $0,09 \pm 0,01$  | n.d.             |
| 1015 $\text{cm}^{-1}$ |                             | $0,81 \pm 0,08$  | $0,5 \pm 0,17$   |
| 1030 $\text{cm}^{-1}$ | ⊥                           | $-0,19 \pm 0,01$ | $-0,28 \pm 0,08$ |
| 1204 $\text{cm}^{-1}$ |                             | $0,94 \pm 0,2$   | $0,69 \pm 0,14$  |
| 1240 $\text{cm}^{-1}$ | ⊥                           | $-0,28 \pm 0,04$ | $-0,21 \pm 0,03$ |

### 3.4.3 Analyse der Strukturänderung im distalen Faden bei mechanischer Belastung

Bei äußerer mechanischer Belastung eines Materials wird die wirkende Kraft bis auf die Molekülbindungen weitergeleitet. Dabei können sich je nach Bindungscharakteristika und deren Beteiligung an der Kraftübertragung Schwingungsausrichtung und Dipol-Übergangsmoment verändern, was eine Verschiebung der IR-Absorptionsbanden und eine Änderung des Ordnungsparameters  $S^{mol}$  verursacht. Bei Kraft-tragenden, hochorientierten Bindungen erfolgt dabei neben einer Bandenverschiebung zu niedrigeren Wellenzahlen gleichzeitig ein Anstieg in  $S^{mol}$ . In Anlehnung an das Quanten-mechanische Modell für Bindungen, die durch das Morse-Potential beschrieben werden, ist die Bandenverschiebung direkt proportional zur einwirkenden mechanischen Spannung (Papadopoulos et al., 2007; Young & Eichhorn, 2007).

Inwieweit die Bindungen im distalen Byssusfaden durch externe mechanische Belastung beeinflusst werden, wurde mit polarisierter FTIR-Spektroskopie in Kombination mit mechanischen Zugmessungen untersucht (Kapitel 2.7.3.3). Dabei wurden distale Fäden in hydrierten und dehydrierten Zustand stufenweise bis zum Reißen gedehnt (Abb. 3-27A) und bei jeder Dehnung nach Einstellen einer konstanten Kraft FTIR-Spektren bei  $0^\circ$  und  $90^\circ$  Polarisation aufgenommen.



**Abb. 3-27 Ablauf der Strukturuntersuchungen am gestreckten distalen Byssusfaden mittels FTIR-Spektroskopie**

A) Zeitaufgelöste Kraftmessung eines hydrierten (grau) und dehydrierten (schwarz) distalen Fadens. Der Faden wurde stufenweise gedehnt und die FTIR-Messungen bei Polarisationswinkeln von  $0^\circ$  und  $90^\circ$  gestartet nachdem sich ein Gleichgewicht der Kraft eingestellt hat. B) Reale Spannungs-Dehnungskurve für den hydrierten (□) und dehydrierten (■) distalen Faden.

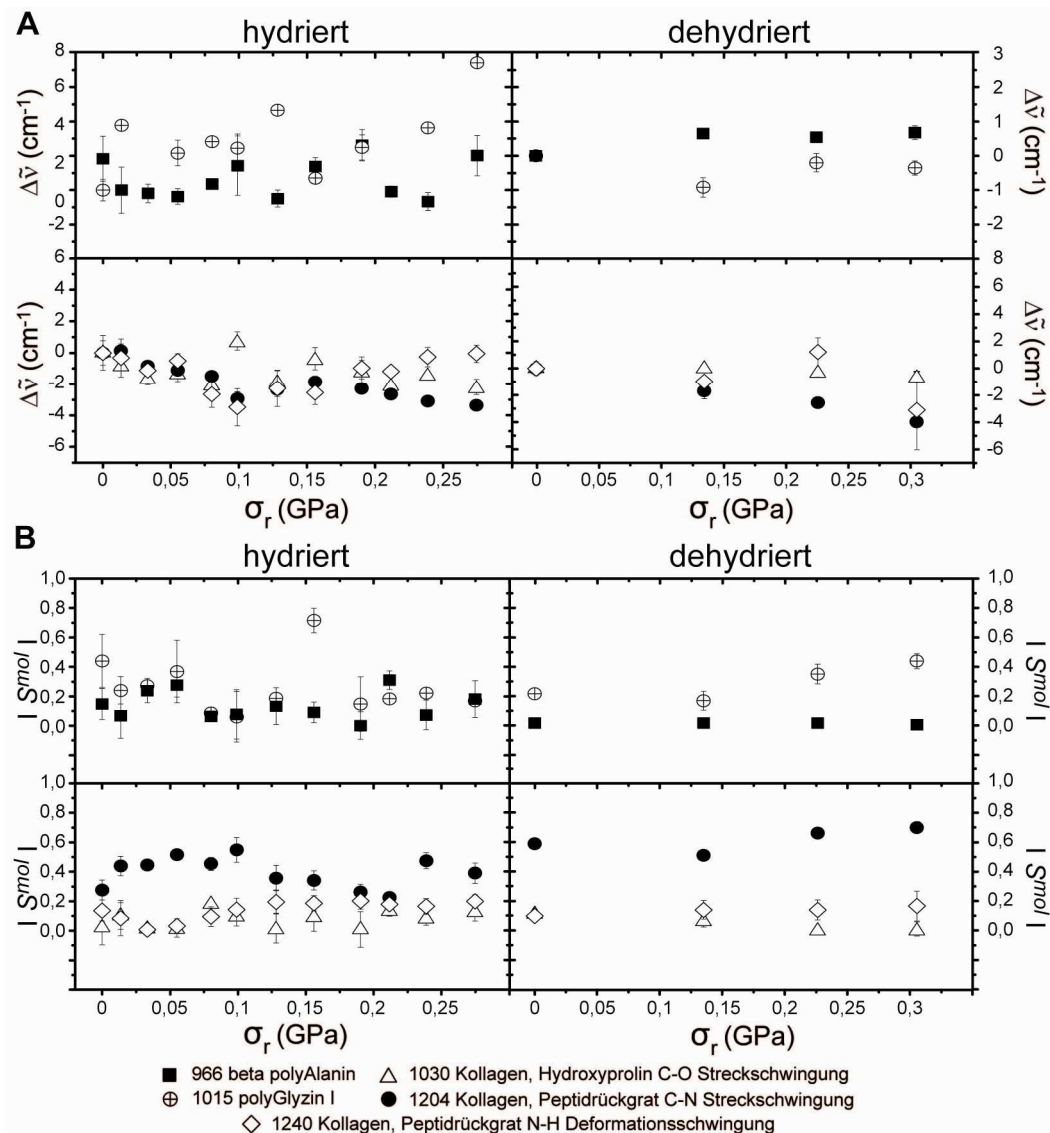
(nach Hagenau et al., 2011 mit Erlaubnis des Verlags Elsevier)

Die Werte für die mechanische Spannung wurden anhand der zeitabhängigen Kraftkurve nach Einstellen des Gleichgewichts mit Gleichung 2-3 berechnet. Reale Spannung und Dehnung wurden mit den Gleichungen 2-4 und 2-5 bestimmt und zeigen ähnlich den kontinuierlichen Kraftmessungen (Kapitel 3.2), dass der hydrierte Faden eine höhere Dehnbarkeit aufweist als der dehydrierte, beide aber eine max. Spannung von 300 MPa besitzen (Abb. 3-27B).

Die Bandenverschiebungen und Änderungen im Betrag von  $S^{mol}$  bei steigender mechanischer Spannung sind in Abb. 3-28 dargestellt. Die Wellenzahlenverlagerungen wurden im entsprechenden Bereich linear gefittet und die Anstiege der Geraden sind in Tab. 3-IX aufgeführt.

Das Maximum der Bande bei  $966\text{ cm}^{-1}$  (polyAla  $\beta$ -Faltblatt) verschiebt sich bei hydrierten Proben bis zu einer mechanischen Spannung von ca. 55 MPa zu niedrigeren Wellenzahlen und  $S^{mol}$  steigt leicht. Bei größerer Belastung verliert diese Bindung ihre krafttragende Fähigkeit, da die Bande wieder bei höheren Frequenzen zu finden ist und  $S^{mol}$  konstant bleibt. Bei dehydrierten Proben kann leider keine Aussage über das Peakmaximum bei kleinen Spannungswerten getroffen werden, da zu wenige Messpunkte in diesem Bereich vorliegen.





**Abb. 3-28** Effekte der externen, linearen mechanischen Belastung auf Aminosäure-Bindungen in der Kollagendomäne und den flankierenden Regionen der preCols im distalen Byssusfaden.

Die Fehlerbalken sind im Falle kleiner Fehlerwerte vom Symbol überdeckt.

A) Abhängigkeit der Peakmaxima von der angelegten mechanischen Spannung. Die Maxima der Banden bei 1030 cm<sup>-1</sup>, 1204 cm<sup>-1</sup> und 1240 cm<sup>-1</sup> verschieben sich mit steigender mechanischer Spannung zu niedrigeren Wellenzahlen, während es bei den polyGly I Schwingungen zu keiner Peakverschiebung kommt. Die Vibrationen des polyAla-Motivs zeigen bis zu einer mechanischen Spannung von 55 MPa eine Verschiebung zu niedrigeren Frequenzen. B) Abhängigkeit des Betrages des Ordnungsparameters  $|S^{mol}|$  von der mechanischen Spannung.

(nach Hagenau et al., 2011 mit Erlaubnis des Verlags Elsevier)

Bei der polyGly I-Schwingung (1015 cm<sup>-1</sup>) in hydrierten Fäden konnte kein eindeutiger Trend in der Bandenverschiebung und  $S^{mol}$  beobachtet werden, aber bei dehydrierten Proben steigt der Ordnungsparameter leicht an. Die Auswertung dieser Bande war aufgrund schlechter Spektrenqualität schwierig, was sich in den großen Fehlerbalken widerspiegelt. Dadurch kann zu dieser Schwingung keine klare Aussage getroffen werden.

**Tab. 3-IX Einfluss äußerer mechanischer Belastung auf die Absorptionsbanden-Maxima und Ordnungsparameter  $S^{mol}$  von Aminosäure-Schwingungen der preCol-Kollagendomäne und flankierender Regionen des distalen Byssusfadens.**

(nach Hagenau et al., 2011 mit Erlaubnis des Verlags Elsevier)

| Bande                 | □ Verschiebung (cm <sup>-1</sup> /GPa) |                       | $S^{mol}$   mit steigender $\sigma$ |                 |
|-----------------------|--|-----------------------|-------------------------------------|-----------------|
|                       | dehydriert                             | hydriert              | dehydriert                          | hydriert        |
| 966 cm <sup>-1</sup>  | +2,1 ± 1,3                             | -9 ± 0,3 <sup>a</sup> | konst.                              | konst.          |
| 1015 cm <sup>-1</sup> | +1,2 ± 1,3                             | +1,7 ± 6              | ↑                                   | ↓↑ <sup>d</sup> |
| 1030 cm <sup>-1</sup> | -2,0 ± 0,7                             | -15 ± 6 <sup>b</sup>  | ↓                                   | ↓↑ <sup>d</sup> |
| 1204 cm <sup>-1</sup> | -12,0 ± 0,8                            | -11 ± 0,8             | ↑ <sup>c</sup>                      | ↑               |
| 1240 cm <sup>-1</sup> | n.d.                                   | -25 ± 12 <sup>b</sup> | ↑                                   | ↓↑ <sup>d</sup> |

<sup>a</sup> Verschiebung zu niedrigeren Wellenzahlen nur bis zu einer Spannung von 55 MPa <sup>b</sup> Abnahme bis zu 100 MPa, danach kein eindeutiger Trend <sup>c</sup> ein kontinuierlicher Anstieg wurde bei der Auswertung von Polardiagrammen bei steigender mechanischer Spannung erhalten (Daten nicht gezeigt) <sup>d</sup> kein eindeutiger Trend

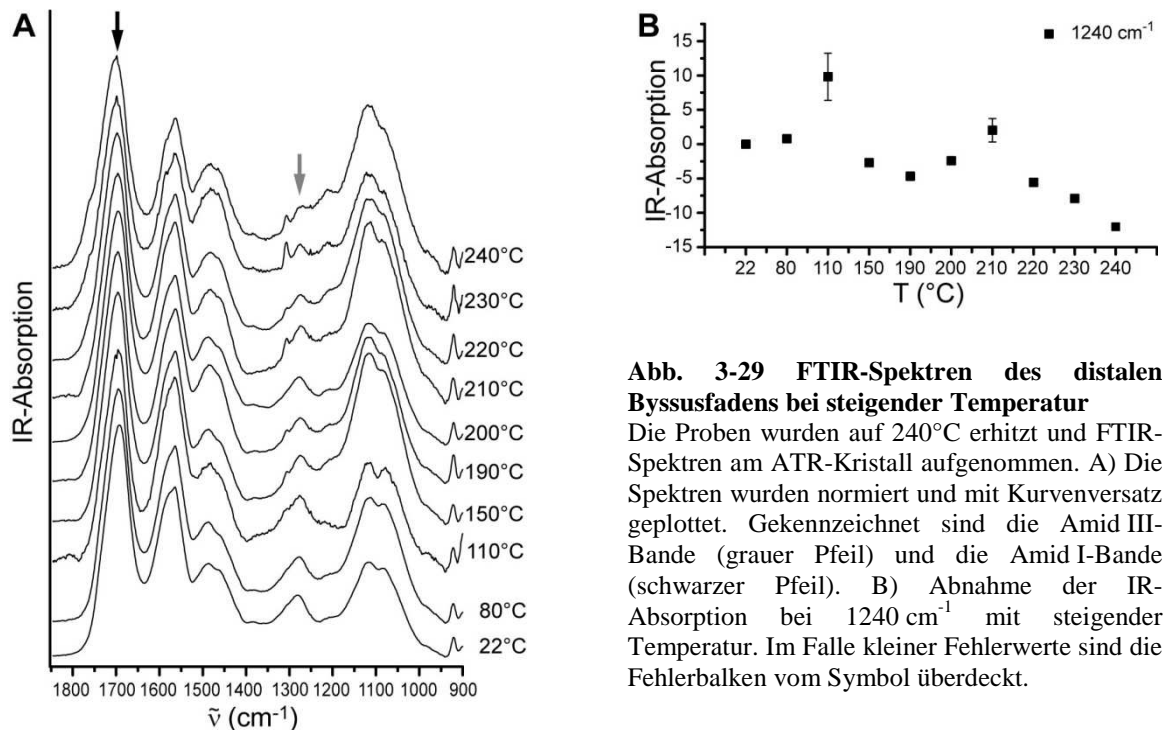
Alle Schwingungen, die der Kollagendomäne von preCols zugeordnet werden können, besitzen krafttragende Eigenschaften sowohl im hydrierten als auch dehydrierten Probenzustand. Die Peaks der senkrecht ausgerichteten Vibrationen bei 1030 cm<sup>-1</sup> und 1240 cm<sup>-1</sup> verschieben sich bis zu einer mechanischen Spannung von 100 MPa zu niedrigeren Wellenzahlen, danach scheinen sie nicht mehr unter Zug zu sein, da kein eindeutiger Trend beobachtbar ist und der Ordnungsparameter keinen Anstieg zeigt. Die Bande bei 1204 cm<sup>-1</sup> zeigt hingegen eine kontinuierliche Bandenverlagerung zu niedrigen Frequenzen bis der Faden reißt. Gleichzeitig steigt die Orientierung der Übergangsmomente. Somit ist das Peptidrückgrat der preCol-Kollagendomäne die grundlegende Kraft-tragende Struktur im Byssusfadens.

#### 3.4.4 FTIR-Untersuchung der Struktur des distalen Fadenteils in Abhängigkeit von der Temperatur

Der Einfluss von Temperatur auf die Proteinstruktur im distalen Byssusfadens wurde mittels FTIR-Spektroskopie analysiert, um so thermische Strukturänderungen, Denaturierungseffekte und Proteinabbauprozesse zu untersuchen.

Hierfür wurden zunächst distale Proben im Ofen stufenweise für je 30 min erhitzt (Kapitel 2.7.3.4) und am IR-Spektrometer Tensor 27 in abgeschwächter Totalreflexion (ATR) gemessen. Die Spektren (Abb. 3-29) zeigen im Bereich der Amid III-Bande mit

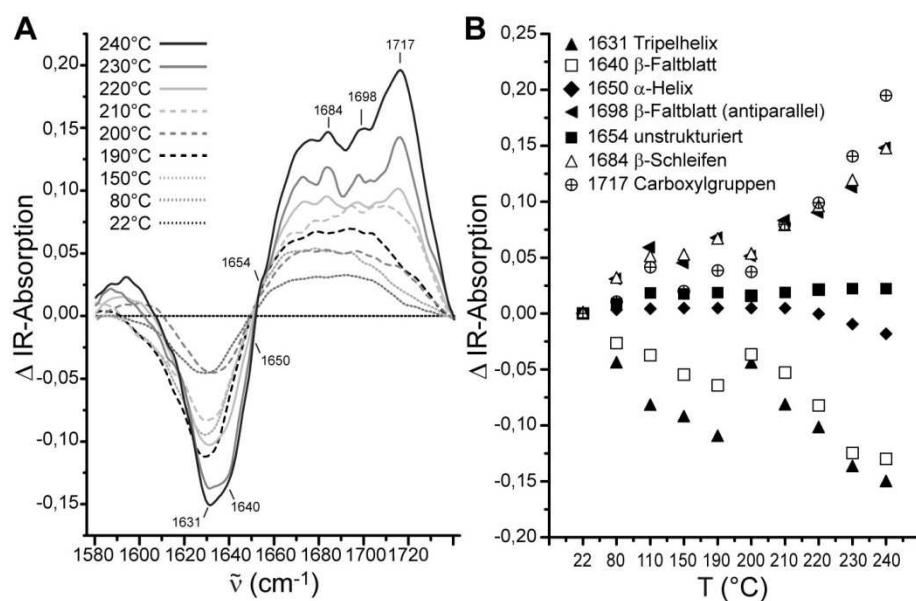
zunehmender Temperatur eine signifikante Abnahme der Schwingungsabsorption bei  $1240\text{ cm}^{-1}$  (grauer Pfeil), was auf einen thermischen Einfluss auf die Molekülschwingungen der Tripelhelix hindeutet.



**Abb. 3-29 FTIR-Spektren des distalen Byssusfadens bei steigender Temperatur**

Die Proben wurden auf  $240^{\circ}\text{C}$  erhitzt und FTIR-Spektren am ATR-Kristall aufgenommen. A) Die Spektren wurden normiert und mit Kurvenversatz geplottet. Gekennzeichnet sind die Amid III-Bande (grauer Pfeil) und die Amid I-Bande (schwarzer Pfeil). B) Abnahme der IR-Absorption bei  $1240\text{ cm}^{-1}$  mit steigender Temperatur. Im Falle kleiner Fehlerwerte sind die Fehlerbalken vom Symbol überdeckt.

Zur Bestimmung der thermischen Effekte auf die Sekundärstruktur der Byssusfadenproteine wurden Differenzspektren der Amid I-Bande erstellt (Abb. 3-30A).



**Abb. 3-30 Änderung der Proteinsekundärstruktur in Abhängigkeit von der Temperatur**

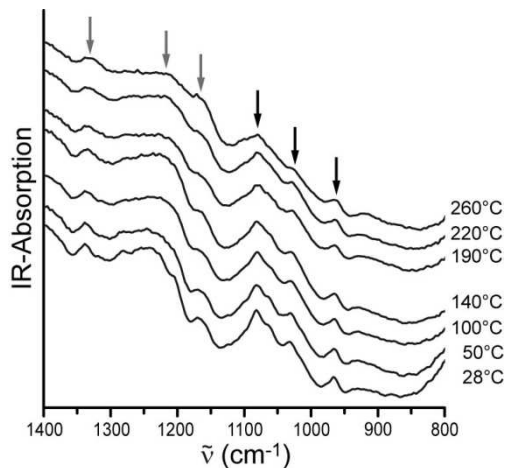
A) Differenzspektren der Amid I-Region bei steigender Temperatur bezogen auf das Spektrum bei  $22^{\circ}\text{C}$ . Die wichtigsten Wellenzahlen sind gekennzeichnet. B) IR-Absorption einzelner Wellenzahlen entsprechender Sekundärstrukturen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Diese weisen auf eine Abnahme tripelhelikaler und paralleler  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen hin, während  $\beta$ -Konformationen wie Schleifen und antiparallele Faltblätter (Fabian & Schultz, 2000) mit steigender Temperatur zunehmen.

Die IR-Absorptionen der Amid I-Bande bei einzelnen Wellenzahlen, die den entsprechenden Sekundärstrukturen laut Tab. 2-I zugeordnet werden können, wurden in Abhängigkeit von der Temperatur graphisch dargestellt (Abb. 3-30B). Dies kann allerdings nur als qualitative Näherung betrachtet werden, da sich Schwingungsabsorptionen unterschiedlicher Sekundärstrukturen in der Amid I-Bande überlagern und somit eine exakte Zuordnung der Wellenzahlen nicht eindeutig möglich ist. Dennoch zeigt Abb. 3-30B deutlich, dass Tripelhelices und parallele  $\beta$ -Faltblätter sich auflösen und  $\beta$ -Schleifen sowie antiparallele  $\beta$ -Faltblätter zunehmen, während die Anteile an *random coil*-Konformationen konstant bleiben.

Darüber hinaus bildet sich eine breite Schulter bei  $1717\text{ cm}^{-1}$ , insbesondere ab einer Temperatur von  $200^\circ\text{C}$ , aus. Bei dieser Frequenz werden C=O-Streckschwingungen der Peptid-Carbonylgruppe angeregt, wenn das entsprechende Carboxyl protoniert wird (Barth, 2000). Dies ist der Fall, wenn die Peptidbindung hydrolytisch gespalten wird. Da die Messungen nicht unter Luftausschluss durchgeführt wurden, könnte diese Reaktion durch Restwasser in der Probe oder Wasser der Luft stattfinden.

Zur besseren Auflösung der *fingerprint*-Region wurden FTIR-spektroskopische Messungen von Dr. Periklis Papadopoulos an Einzelfäden des distalen Teils in einer temperierbaren Klimakammer durchgeführt (Kapitel 2.7.3.4). Dabei wurden die Proben in  $10^\circ\text{C}$ -Schritten auf  $260^\circ\text{C}$  erhitzt und anschließend wieder abgekühlt, wobei bei jeder Temperaturstufe FTIR-Spektren im Transmissionsmodus aufgenommen wurden. Vergleichbar zu den Messungen in abgeschwächter Totalreflexion (ATR) (Abb. 3-29A) konnte auch hier eine Abnahme der Bandenabsorption im Bereich der Amid III-Bande mit steigender Temperatur detektiert werden (Abb. 3-31). Darüber hinaus zeigen auch die Banden bei  $1340$  und  $1160\text{ cm}^{-1}$  (grauer Pfeil) sowie bei  $1080$ ,  $1030$  und  $966\text{ cm}^{-1}$  (schwarzer Pfeil) eine Intensitätsabnahme.



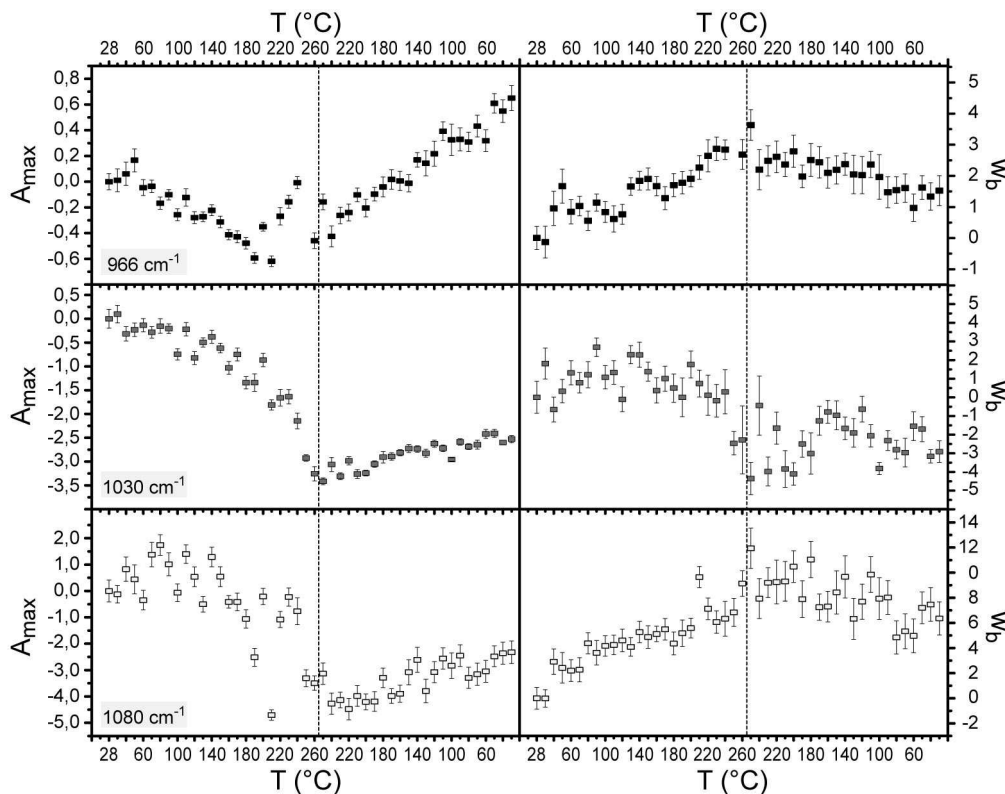
**Abb. 3-31 Fingerprint-Bereich der FTIR-Spektren bei steigender Temperatur**

Distale Byssusfäden wurden in 10°C-Schritten auf 260°C erhitzt und FTIR-Spektren im Transmissionsmodus gemessen. Die Abbildung zeigt Spektren ausgewählter Temperaturen nach Basislinienkorrektur in dem Wellenzahlbereich zwischen 3500-700  $\text{cm}^{-1}$ , Normierung und Kurvenversatz. Die gekennzeichneten Banden zeigen eine starke Intensitätsabnahme mit steigender Temperatur. Die Banden bei 1080, 1030, und 966  $\text{cm}^{-1}$  (schwarzer Pfeil) wurden eingehender analysiert.

Da sich im Wellenzahlbereich über 1200  $\text{cm}^{-1}$  die Spektrenqualität verschlechtert, wurden zur detaillierteren Auswertung nur die Banden bei 1080, 1030 und 966  $\text{cm}^{-1}$  herangezogen. Dabei wurde mittels dem Algorithmus "fit collagen" (Kapitel 2.7.3.3) die jeweilige Bandenbreite und das Absorptionsmaximum berechnet.

Die Bande bei 966  $\text{cm}^{-1}$ , welche der Peptidrückgrat-Schwingung von polyAla in  $\beta$ -Faltblattstrukturen zugeordnet werden kann (Tab. 3-VII), zeigt eine Abnahme der maximalen Absorption bei Bandenverbreiterung (Abb. 3-32). Beim Abkühlen des Fadens steigt die Absorption wieder an und übertrifft sogar den Ausgangswert, während die Peakbreite wieder abnimmt. Diese Schwingungen bleiben somit möglicherweise bei einer Erhitzung auf 260°C stabil und intakt. Die Bandenabsorption der C-O-Schwingung von Hyp bei 1030  $\text{cm}^{-1}$  sinkt bis 210°C langsam, danach abrupt, wobei sich die Peakbreite leicht verbreitert. Während des Abkühlens wird die Bande schmaler und die Absorption steigt wieder langsam an, erreicht allerdings nur 30 % der Ausgangsabsorption. Diese Schwingung wurde somit thermisch sehr stark beeinflusst.

IR-Absorptionen bei 1080  $\text{cm}^{-1}$  können polyProlin II-helikalen Konformationen zugeordnet werden und repräsentieren dabei die  $\text{C}^{\alpha}\text{-C}^{\beta}$  und  $\text{N-C}^{\alpha}$  Streckschwingung der preCol-Kollagendomäne. Die entsprechende Bande dieser Schwingungen verbreitert sich bis 260°C und die Absorption nimmt, ähnlich zur Bande bei 1030  $\text{cm}^{-1}$ , bei 240°C stark ab. Anschließendes Abkühlen der Probe führt zu keiner vollständigen Regeneration der Schwingung mit Absorption bei 1080  $\text{cm}^{-1}$ .



**Abb. 3-32** Temperaturabhängigkeit der maximalen Absorption ( $A_{max}$ ) und der Basispeakbreite ( $w_b$ ) der IR-Banden bei 966, 1030 und 1080  $\text{cm}^{-1}$

Der Übergang zum Abkühlen ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die Werte wurden mit dem Rechenalgorithmus „fit collagen“ bestimmt und im Falle kleiner Fehlerwerte sind die Fehlerbalken vom Symbol überdeckt.

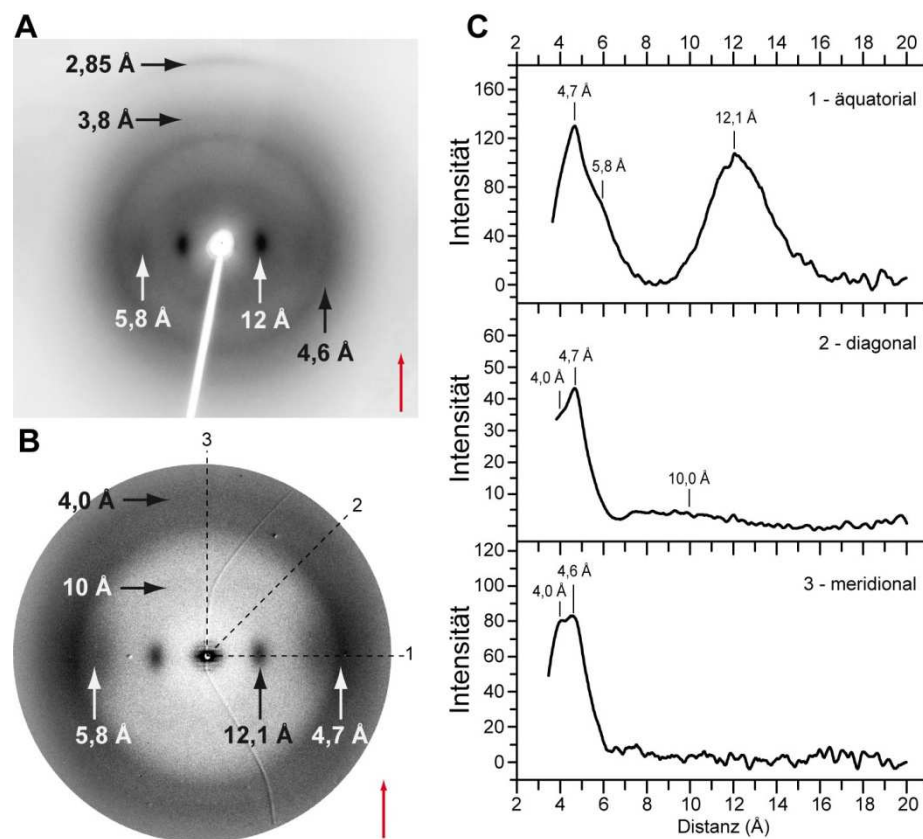
Die Ergebnisse der FTIR-Untersuchungen zeigen, dass tripelhelikale Strukturen der preCol-Kollagendomäne thermisch stark beeinflusst wurden und sich auflösten, während  $\beta$ -Konformationen eine höhere thermische Stabilität zeigten.

Schon die Ergebnisse der TMA- (Kapitel 3.3.1), DMTA- (Kapitel 3.3.3) und DSC-Messungen (Kapitel 3.3.5) deuten darauf hin, dass im Temperaturbereich ab 40-70°C die Proteine thermisch entfalten. Insbesondere die Denaturierung der Tripelhelix der preCol-Kollagendomäne kann dabei zur Freisetzung gebundenen Wassers führen, wodurch der Byssusfaden versteift und schrumpft. Dieses Verhalten konnte auch bei kollagenhaltigen Geweben beobachtet werden (Stylianopoulos et al., 2008; Wright & Humphrey, 2002). Das Auftreten einer IR-Absorptionsbande bei 1717  $\text{cm}^{-1}$  und ein endothermer Schmelzpeak in den DSC-Messungen (Kapitel 3.3.5) bei 200-220°C deutet auf die Spaltung der Peptidbindungen der Proteine des Byssusfadens hin. Das Elongieren des Fadens nach maximaler Verkürzung, welches in den TMA-Studien in diesem Temperaturbereich beobachtet wurde, und der Verlust der mechanischen Integrität des Fadens (Kapitel 3.3.3) unterstützen diese Annahme.

### 3.4.5 Röntgenbeugungsanalysen am Muschelbyssusfaden

Zur Aufklärung der Proteinstrukturen im Muschelbyssusfaden wurden Röntgenbeugungsanalysen durchgeführt. Messungen mit Röntgenstrahlung, die mittels Drehanoden-Generatoren erzeugt wurde, wurden von Dr. Louise Serpell (University of Sussex, Großbritannien) durchgeführt und ausgewertet. Beugungsanalysen hoher Auflösung wurden mit Synchrotronstrahlung am *Argonne National Laboratory* in Argonne (Illinois, USA) gemessen.

Röntgenbeugungsanalysen an distalen Fadenteilen zeigen ein definiertes Beugungsmuster mit ausgeprägten Signalen. Das Röntgenbeugungsmuster der Messungen am System mit Drehanode (Abb. 3-33A) zeigt äquatorial ein starkes, definiertes Signal bei 12 Å und einen Fleck bei 5,8 Å sowie einem sehr diffusen Signal bei ca. 4,5 Å, das von einem diffusen, unorientierten Ring bei 4,7 Å teilweise überlagert wird.



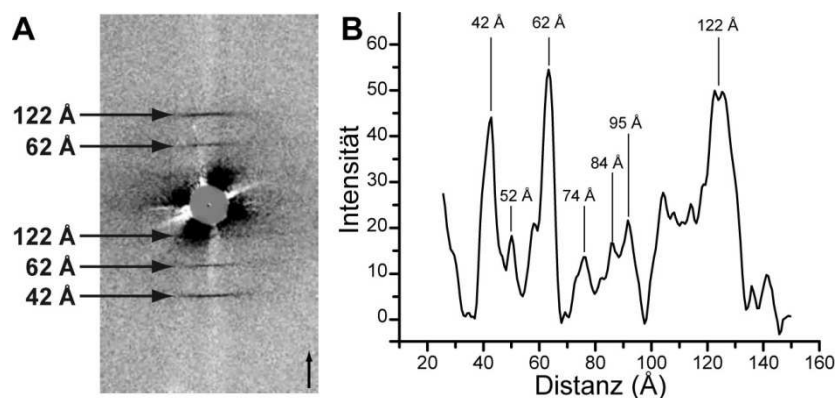
**Abb. 3-33 Röntgenbeugungsanalysen am distalen Byssusfaden**

A) Röntgenbeugungsmuster erhalten durch Messungen an einem System mit Drehanoden-Generator durch Dr. Louise Serpell B) Beugungsmuster detektiert bei Messung mit Synchrotronstrahlung. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die in C) ausgewerteten Bereiche des Beugungsmusters. C) Auswertung der äquatorialen (1), diagonalen (*off-meridional*) (2) und meridionalen (3) Beugungssignale. Die Byssusfadenachse ist gekennzeichnet durch einen roten Pfeil.

Des Weiteren zeigt das Beugungsmuster ein meridionales Signal bei 2,85 Å. Abgesehen von dem ringförmigen Signal bei 4,7 Å wurden die benannten Beugungssignale auch in kollagenen Materialien detektiert (Fraser & MacRae, 1973c; Rudall, 1955) und können somit der Geometrie der Kollagentripelhelix zugeordnet werden. Darüber hinaus repräsentiert ein zusätzliches, schwaches und leicht versetztes Signal (*off*-meridional) bei 3,8 Å möglicherweise die Distanz zwischen gestapelten  $\beta$ -Faltblättern.

Auch bei den Untersuchungen mit Synchrotron-Strahlung zeigt das Beugungsmuster für den distalen Faden (Abb. 3-33B) einen diffusen Ring bei 4,7 Å, ein Signal bei 5,8 Å und ein definiertes, starkes Signal bei 12 Å. Zusätzlich jedoch wurde meridional ein Signal bei 4,0 Å und *off*-meridional bei 10 Å detektiert, was insbesondere im Röntgenbeugungsdiagramm (Abb. 3-33C), welches die Auswertung der Intensitäten der in Abb. 3-33B gekennzeichneten Bereiche des Beugungsmusters zeigt, deutlich wird.

Darüber hinaus zeigen die Synchrotron-Messungen für kleine Beugungswinkel starke meridionale Signale (Abb. 3-34). Die Signale mit der höchsten Intensität entsprechen den Distanzen 42 Å, 62 Å und 122 Å.



#### Abb. 3-34 Röntgenbeugungsanalysen am distalen Byssusfaden

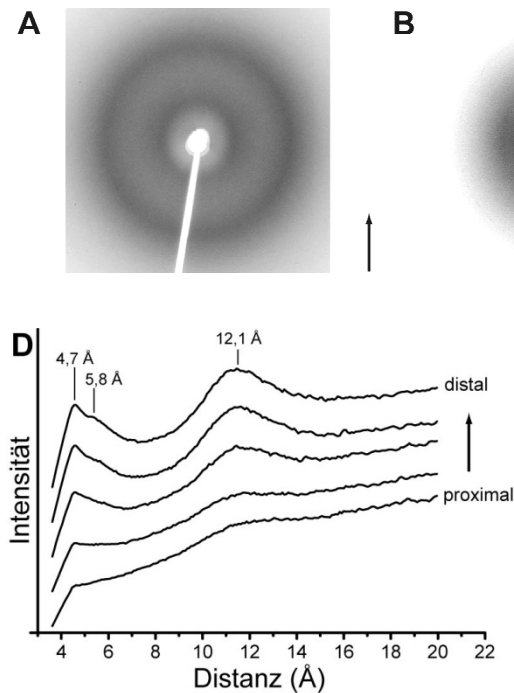
A) Ausschnitt des Röntgenbeugungsmusters von Abb. 3-33B für kleine Beugungswinkel. Die entsprechenden Distanzen der stärksten Signale sind gekennzeichnet. B) Fit2D-Auswertung der meridionalen Signale von A.

Der senkrechte Pfeil kennzeichnet die Ausrichtung der Byssusfadenachse.

Diese meridionalen Signale deuten auf ein periodisches Arrangement der Proteine oder von Proteinstrukturen entlang der Fadenachse hin. Solche Beugungsmuster können auch bei Analysen von Kollagen erhalten werden und entsprechen dabei den Dimensionen der D-Periode von Kollagenfibrillen (Bear, 1944; Brodsky et al., 1982; Eikenberry & Brodsky, 1980).



In weiteren Messungen wurde entlang des Byssusfadens vom proximalen zum distalen Teil Beugungsmuster aufgenommen. Dabei wurden für den proximalen Faden lediglich zwei diffuse Ringe bei 4,5-4,7 Å sowie 11-12 Å detektiert (Abb. 3-35A), was darauf hindeutet, dass die Proteine des proximalen Fadens im Vergleich zum distalen Teil eher unorientiert im Faden vorliegen.



**Abb. 3-35 Röntgenbeugungsanalysen entlang des Muschelbyssusfadens.**

Der Pfeil kennzeichnet die Ausrichtung der Byssusfadenachse. Beugungsmuster erhalten bei Messungen mit Drehanoden-System: A) proximaler Fadenteil, B) Übergangsbereich zwischen proximal und distal und C) distaler Fadenbereich. D) Röntgenbeugungsdiagramme der meridionalen Signale der Synchrotron-Messungen zeigen eine Zunahme der Signalintensitäten von proximal zu distal. Die Kurven sind mit Kurvenversatz dargestellt.

(nach Hagenau et al., 2009 mit Erlaubnis des Verlags John Wiley and Sons)

Der Übergangsbereich zum distalen Fadenteil (Abb. 3-35B) zeigt Merkmale des Beugungsmusters des distalen Teils wie ein starkes äquatoriales Signal bei 11-12 Å und ein meridionales bei 2,8 Å, sowie den diffusen Ring bei 4,7 Å. Die Röntgenbeugungsdiagramme der meridionalen Signale, welche durch Synchrotron-Messungen erhalten wurden (Abb. 3-35D), zeigen eine deutliche Zunahme der Intensitäten für die Signale bei 4,7 Å, 5,8 Å und 12,1Å von proximal nach distal.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Proteine im distalen Faden eine hohe Ordnung und hauptsächlich eine tripelhelikale Struktur ähnlich der fibrillärer Kollagene besitzen. Darüber hinaus lassen die erhaltenen Signale darauf schließen, dass die Proteine linear entlang des Fadens in einer periodischen Anordnung vorliegen. Im proximalen Faden zeigen die Proteine keine hohe Orientierung, der Übergang erfolgt dabei fließend.

### 3.5 Erstellung einer cDNA-Bank aus dem Gewebe des Muschelfußes

Zum Erhalt der Erbinformationen aller beim Bildungsprozess des Byssusfadens beteiligter Proteine wie preCols, Matrix- und Kutikulaproteine sowie essentieller Enzyme wurde eine cDNA-Bank vom Gewebe des Muschelfußes erstellt.

Bei der Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Muschelfußgewebe (Kapitel 2.8.2) konnten pro Muschelfuß 230-330 µg Gesamt-RNA isoliert werden. Die RNA von jeweils zwei Muschelfüßen wurde vereint und die mRNA mittels oligo(dT)-konjugierter magnetischer Partikel (Kapitel 2.8.3) angereichert. Dabei konnten Ausbeuten für die Präparation I von 7 µg und für Präparation II von 4,6 µg mRNA erhalten werden. Für die Erstellung der cDNA-Bank wurde die Präparation I eingesetzt, wobei 5,5 µg der mRNA für die eigentliche cDNA-Bank und 1,5 µg für die Analyse der cDNA-Qualität (Kapitel 2.8.4.2) verwendet wurden. Nach der Erststrangsynthese wurde bei der Probe für die Qualitätsbestimmung der cDNA der Einbau radioaktiv markierten [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP analysiert. In Scintillationsmessungen wurden der Gesamtgehalt an Radioaktivität der Probe und der Gehalt nach Entfernen von freiem [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP ermittelt. Anhand dieser cpm-Werte konnte sowohl die spezifische Aktivität *sA* von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Gleichung 2-13) als auch die cDNA-Ausbeute (Gleichung 2-14) und der prozentuale Einbau von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Gleichung 2-15) in den Erststrang ermittelt werden (Tab. 3-X).

Die Analyse zeigte, dass in der Erststrangsynthese 0,373 µg cDNA erhalten wurde, was einem Einbau an [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP von 25 % entspricht. Ein Einbau über 20 % wiederum bedeutet, dass hauptsächlich lange cDNA-Fragmente enthalten und die cDNA-Qualität und somit auch die Ausgangs-mRNA sehr gut sind.

**Tab. 3-X Auswertung der Scintillationsmessungen zur Einschätzung der cDNA-Qualität**

|                                   | Kontrolle    | cDNA aus Muschelfuß |
|-----------------------------------|--------------|---------------------|
| Gesamtradioaktivität              | 47875,6 cpm  | 50930,6 cpm         |
| in cDNA eingebaute Radioaktivität | 4831,9 cpm   | 1438,5 cpm          |
| <i>sA</i>                         | 239 cpm/pmol | 254 cpm/pmol        |
| cDNA Ausbeute                     | 1,33 µg      | 0,373 µg            |
| eingesetzte mRNA-Menge            | 2 µg         | 1,5 µg              |
| Einbau                            | 66,5 %       | 25 %                |

Die Analyse zeigte, dass in der Erststrangsynthese 0,373 µg cDNA erhalten wurde, was einem Einbau an [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP von 25 % entspricht. Ein Einbau über 20 % wiederum

bedeutet, dass hauptsächlich lange cDNA-Fragmente enthalten und die cDNA-Qualität und somit auch die Ausgangs-mRNA sehr gut sind.

Nach der Synthese des zweiten Stranges und der Ligation des Adapters *attB1* wurden die cDNA-Fragmente in einer Größenausschlusschromatographie fraktioniert und einzelne Fraktionen zu zwei cDNA-Banken vereint (Kapitel 2.8.4.3). Dabei besteht die Bank MfL-1 mit 238 ng cDNA aus größeren Fragmenten, während MfL-2 mit einer cDNA-Menge von 1090 ng eher kleinere Konstrukte enthält. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in den Vektor pDONR<sup>TM</sup>222 rekombiniert und *Electromax*<sup>TM</sup> DH10B<sup>TM</sup> T1 Phage resistente Zellen damit transformiert (Kapitel 2.8.4.4). Während der Titer der jeweiligen cDNA-Banken anhand von Verdünnungsreihen bestimmt wurde (Kapitel 2.8.5), zeigen Restriktionsanalysen einzelner Klone (Kapitel 2.8.6) neben den Konstruktgrößen auch die Rekombinationseffizienz (Tab. 3-XI). Die Bank MfL-1 besitzt dabei einen Titer von  $1,6 \times 10^6$  KBE/mL, was einer Gesamtzahl von 21 Millionen Konstrukten entspricht. Mit einer Rekombinationseffizienz von 100 % enthält MfL-1 vorwiegend große Konstrukte mit einer Größe von ca. 0,2-3 kb.

**Tab. 3-XI Zusammenfassung der Kennwerte der cDNA-Banken MfL-1 und -2 aus dem Muschelfußgewebe von 2 Individuen**

|                             | MfL-1                    | MfL-2                    |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Titer                       | $1,6 \times 10^6$ KBE/mL | $5,3 \times 10^6$ KBE/mL |
| Gesamtanzahl                | $2,1 \times 10^7$ KBE    | $6,35 \times 10^7$ KBE   |
| Effizienz der Rekombination | 100 %                    | 91 %                     |
| Größe der Konstrukte        | 0,2-3 kb                 | 0,15-2 kb                |
| Ø Konstruktgröße            | 1,2 kb                   | 630 bp                   |

Im Gegensatz dazu befinden sich in der cDNA-Bank MfL-2 insgesamt 63,5 Millionen Konstrukte mit einer durchschnittlichen Größe von 630 bp bei einer Rekombinationseffizienz von 91 %.

### 3.5.1 Sequenzvergleich der aus den cDNA-Banken isolierten preCol-Varianten mit publizierten Sequenzen

Im Rahmen der Doktorarbeiten von Michael Suhre und Adrian Golser wurden aus den cDNA-Banken die Sequenzen der Proteine preCol NG, P und D isoliert und sequenziert. Mit dem Online-Programm LALIGN<sup>3</sup> (Huang & Miller, 1991) (Kapitel 2.8.7) wurde ein Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen der cDNA-Bank-Proteine mit den publizierten Sequenzen für preCol P, D und NG aus *Mytilus galloprovincialis* (Lucas et al., 2002) durchgeführt. Durch zusätzliche Vergleiche der entsprechenden DNA-Sequenzen konnten die Positionen einzelner Insertionen nachträglich korrigiert werden (mit freundlicher Unterstützung von Michael Suhre, Vergleich der DNA-Sequenzen siehe Anhang 9.3.1, 9.3.2 und 9.3.3). Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden bei den Sequenzvergleichen (Tab. 3-XII, Tab. 3-XIII und Tab. 3-XIV) die einzelnen Domänen der preCols den entsprechenden Sequenzen nach Lucas et al., 2002 zugeordnet.

---

<sup>3</sup> [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)

**Tab. 3-XII Vergleich der Aminosäuresequenz des aus der cDNA-Bank isolierten preCol Ps mit der entsprechenden publizierten Sequenz (UniProtKB: Q8MW54) (Lucas et al., 2002)**  
 Zeichenerklärung: **graue Markierung** – Übereinstimmung, **gelbe Markierung** - Unterschiede in der Sequenz, **rote Markierung** - konservierte Bereiche mit Unterbrechungen im Triplettmuster

|                 |            |  |                        |                              |
|-----------------|------------|--|------------------------|------------------------------|
| Q8MW54 preCol P | 1          | MVRFSLASVLLLLAVTSTAF   | Signal-sequenz         |                              |
| Q8MW54 preCol P | 21<br>1    | GTISDYGGGKVVVYGGGGGGGGGGHGSWHHGGGPYHGHGHGGIGGIGGSSAHAHSS<br>GTISDYGGGKVVVYHGGGGGGGGGGHGSWHHGGGPYHGHGHGGIGGIGGSSAHAHSS              | His&DOPA-reiche Domäne |                              |
| Q8MW54 preCol P | 81<br>61   | ASAHAHHFPGGSSHASAGSSSHASASHNGLGGSAHAHSSSSAHHS<br>ASAHAHHFPGGSSHASAGSSSHASASHNGLGGSAHAHSSSSAHHS                                     |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 129<br>109 | GGFGGIGGIGPGGSSVGGGIGGIGGVGGVGGIGGVGGPGGNGGIGIGPGFGGGFGPSSA<br>GGFGGIGGIGPGGSSVGGGIGGIGGVGGVGGIGGVGGPGGIGGIGIGPGFGGGFGPSSA         | flankierende Domäne    |                              |
| Q8MW54 preCol P | 190<br>170 | SGFGSGSAFGGPGGSSASANAARANANGGGGF<br>SGSGSGSAFGGPGGSSASANAARANANGGGGF   |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 222<br>202 | GGPGTPGNAGPPGQPLPGAPGAPGRPGNTPPGRPGNPG<br>GGPGTPGNAGPPGQPLPGAPGAPGRPGNTPPGRPGNPG   | Kollagendomäne         |                              |
| Q8MW54 preCol P | 261<br>241 | PPGQPGNPRPGSAGRPGGSGQPGGPRPGIPGKPGNRGQPGQPGGPGQPHHPGAGGQPG<br>PPGQPGNPRPGSAGRPGGSGQPGSPGRPGIPGKPGNRGQPGQPGGPGQPHHPGAGGQPG          |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 321<br>301 | RNGNPGNPGKPGTGHHPGTVGSRSPTGTPGQPGIPGTTGGRGPRGPAGIIGLIGPKG<br>RNGNPGNPGKPGTGHHPGTAGSRSPTGTPGQPGIPGTTGGRGPRGPAGIIGLIGPKG             |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 381<br>361 | NPGEFPGNPGAPGGPGSTGPGQPGAGGPGASGGPGDKGAPGTPGGTGPRGPIGPSGPGS<br>NPGEFPGNPGAPGGPGSTGPGQPGAGGPGASGGPGDKGAPGTPGGTGPRGPIGPSGPGS         |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 441<br>421 | GPGDQGPQGGRLPGIPGKPGPKGLQGSNGEVGPQGPSGAPGQPGQKNGVKGPAGDQG<br>GPGDQGPQGGRLPGIPGKPGPKGLQGSNGEVGPQGPSGAPGQPGQKNGVKGPAGDQG             |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 501<br>481 | ARGPEGKAGPAGPQGEQGPQKPTGAQGPAGPAGPSGEQGPGERGAQGPQGAEGSPGPAG<br>ARGPEGKAGPAGPQGEQGPQKPTGAQGPAGPAGPSGEQGPGERGAQGPQGAEGSPGPAG         |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 561<br>541 | PRGPAGHQGPSGERGAPGSPGKKGPNDRGNQGSPPGAPGKNGARGDRGSRGNSGSPGRSG<br>PRGPAGQGPSGERGAPGSPGKKGPNDRGNQGSPPGAPGKNGARGDRGSRGNSGSPGRSG        |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 621<br>601 | SPGSRGKPGPQPHGPRGARGSPGQKGRGDQGAPGVI<br>SPGSRGKPGPQPHGPRGARGSPGQKGRGDQGAPGVI   |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 659<br>639 | RIVVDDQRTGPEVAE<br>RIVIDDQRTGPEVEE   |                        | Abschnitt saurer Aminosäuren |
| Q8MW54 preCol P | 674<br>654 | FPGFGGFGGFGGASANAGSSANANAGGPGGSAGAGSSSGANANAGGFPPFGGPFGGVGGGP<br>FPGFGGFGGFGGASANAGSSANANAGGPGGSAGAGSSSGANANAGGFPPFGGPFGGVGGGP     |                        | flankierende Domäne          |
| Q8MW54 preCol P | 734<br>714 | GGAGGPGGVGGGPGVGGVGGVGGGPG---GVGGGPGGAGGLGGFGGFGGSSAGASSSGS<br>GGAGGPGGVGGGPGVGGVGGVGGVGGVGGGPGVGGGPGVGGGPGGAGGLGGFGGFGGSSAGASSSGS |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 790<br>774 | ASASSGGPFVNLVPGGGIGGGSASASAASRA<br>ASASSGGPFVNLVPGGGIGGGSASASAASRA   |                        |                              |
| Q8MW54 preCol P | 823<br>807 | HAHAFGGLGGGSASAGCHSSSAHSFGGHNVFHS<br>HAHAFGGLGGGSASAGSHSTSSAHSFGGHNVFHS  | His&DOPA-reiche Domäne |                              |
| Q8MW54 preCol P | 857<br>841 | VIHHGGPSHASAHASAHASASSGGHGGHGGGPYKPGY<br>VIHHGGPSHASAHASAHASASSGGHGGHGGGPYKPGY   |                        |                              |

**Tab. 3-XIII Vergleich der Aminosäuresequenz des aus der cDNA-Bank isolierten preCol Ds mit der entsprechenden publizierten Sequenz (UniProtKB: Q8MW53) (Lucas et al., 2002)**

Zeichenerklärung: **graue Markierung** – Übereinstimmung, **gelbe Markierung** - Unterschiede in der Sequenz, **rote Markierung** - konservierte Bereiche mit Unterbrechungen im Triplettmuster, **gerader Unterstrich** – Gly-Substitution, die in der cDNA-basierten Sequenz nicht auftritt

|                 |            |  |                        |
|-----------------|------------|--|------------------------|
| Q8MW53 preCol D | 1          | MVYKLLTVCLVASLLEICLA   | Signal-sequenz         |
| Q8MW53 preCol D | 21<br>1    | DYHGKQYGGRYGNRFGGGIGGAGAVAHAAHAAHASAGANGRARAHARALAHGHAGGSAA<br>DYHGKQYGGRYGNRFGGGIGGAGAVAHAAHAAHASAGANGRARAHARALAHAGGSAA     | His&DOPA-reiche Domäne |
| Q8MW53 preCol D | 81<br>61   | HGHPGFP<br>HGHPGFP   |                        |
|                 | 88<br>68   | IGGSASAAAARASAGGLGGLGGFVSAANAAAAANAGAGFGGFGGFGLGGV<br>VGGASAAAARASAGGLGGLGGFGSAANAAAAANAGAGFGGFGGFGGV                        | flankierende Domäne    |
| Q8MW53 preCol D | 143<br>123 | GGPGQPGGPGGPGGPGGPGMPGGPGGP SGPGTGGPGQPDPGPGPGGPGGPGGPM<br>GGPGQPGGPGGPGGPGGPGGPGMPGGPGGP SGPGTGGPGQPDPGPGPGGPGGPGGPM        | Kollagendomäne         |
| Q8MW53 preCol D | 201<br>181 | PGGPGGP-----GGPGGPRPGVGGDDGGI PGMPGPAGPPGAPGQPEGEQGPRGRT P<br>PGGPGGPMPGGPGGPGGPGGPGVGGDDGGI PGMPGPAGPPGAPGQPEGEQGPRGRT P    |                        |
| Q8MW53 preCol D | 255<br>241 | AGTPGPPGNPGEFQAGAPGAPGAPGHAGKHGTAGPAGKAGRPGRGQSGASGSSGQHGA<br>AGTPGPPGNPGEFQAGAPGAPGAPGHAGKHGTAGPAGKAGRPGRGQSGASGSSGQHGA     |                        |
| Q8MW53 preCol D | 315<br>301 | SGAPGRPGNPGSTGRPGATGDPGRPGATGTTGRPGPSGAPGNPGAPGALGAPPRGAPGF<br>SGAPGRPGNPGSTGRPGATGDPGRPGATGTTGRPGPSGAPGNPGAPGALGAPPRGAPGF   |                        |
| Q8MW53 preCol D | 375<br>361 | VGLPGRGSPGEPGNQGP IGGPGYPGRPGQPDGAMGPQPCGDRGAPGVPGKQGPVGG<br>VGLPGRGSPGEPGNQGP IGGPGYPGRPGQPDGAMGPQPCGDRGAPGVPGKQGPVGG       |                        |
| Q8MW53 preCol D | 435<br>421 | QGPAGPRGPRGDGGPVGPKGEPGAKGADGKPGDRGPDGETGPQGPAGPKQVGDQGKPGA<br>QGPAGPRGPRGDGGPVGPKGEPGAKGADGKPGDRGPDGETGPQGPAGPKQVGDQGKPGA   |                        |
| Q8MW53 preCol D | 495<br>481 | KGETGDQARGEAGKAGEQPGGIQGPKGPVGGQGPAGPRGPRGDEGPVGPKEPGAKGA<br>KGETGDQARGEAGKAGEQPGGIQGPKGPVGGQGPAGPRGPRGDEGPVGPKEPGAKGA       |                        |
| Q8MW53 preCol D | 555<br>541 | DGKPGDRGPDGETGPQGPAGPKQVGDQGAQGDQASGADGKKGEP RERGGQGAAGPVGR<br>DGKPGDRGPDGETGPQGPAGPKQVGDQGAQGDQASGADGKKGEP RERGGQGAAGPVGR   |                        |
| Q8MW53 preCol D | 615<br>601 | PGPRGDRGAKGIQGSRRPGGMRRGNRGSQGAVGPRGETGPDGNQGRGEQGAPGVI<br>PGPRGDRGAKGIQGSRRPGGMRRGNRGSQGAVGPRGETGPDGNQGRGEQGAPGVI           |                        |
| Q8MW53 preCol D | 673<br>659 | TLVIEDLRTAGVESPVETFDA<br>TLVIEDLRTAGVESPVETFDA   |                        |
| Q8MW53 preCol D | 694<br>680 | GAGTGGPAPGAGATAGAFAGAGPGGANAGNAAAGAGPG<br>GAGTGGPAPGAGATAGAFAGAGPGGANAGNAAAGAGPG   | flankierende Domäne    |
| Q8MW53 preCol D | 733<br>719 | GLGGAGPGGLGGLGGGLGGGLGGAGGLGGGLGGLGAGGLGGGLGGLGGAGGGA<br>GLGGAGPGGLGGLGGGLGGGLGGAGGLGGGLGGLGAGGLGGGLGGLGGAGGGA               |                        |
| Q8MW53 preCol D | 793<br>779 | GGAGGAGA---IAAAAAQAAAAAGAGNGGAAQAAAQAAAASAAANSGLGAGAARAAASAA<br>GGAGGAGAGAGIAAAAAQAAAAAGAGNGGAAQAAAQAAAASAAANSGLGAGAARAAASAA |                        |
| Q8MW53 preCol D | 850<br>839 | ARATVAGHSGTAAAAANAAAQAHAAATRGQGGSHAHAAAAHAAA<br>ARATVAGHSGTAAAAANAAAQAHAAATRGQGGSHAHAAAAHAAA                                 |                        |
| Q8MW53 preCol D | 895<br>884 | SSVIHGGGHGGHGGDYHGGDAGYHKPGY<br>SSVIHGGGHGGHGGDYHGGDAGYHKPGY   | His&DOPA-reiche Domäne |

**Tab. 3-XIV Vergleich der Aminosäuresequenz des aus der cDNA-Bank isolierten preCol NGs mit der entsprechenden publizierten Sequenz (UniProtKB: Q8MW55) (Lucas et al., 2002)**

Zeichenerklärung: **graue Markierung** – Übereinstimmung, **gelbe Markierung** - Unterschiede in der Sequenz, **rote Markierung** - konservierte Bereiche mit Unterbrechungen im Triplettmuster, **gerader Unterstrich** – Gly-Substitution, die in der cDNA-basierten Sequenz nicht auftritt, **gewellter Unterstrich** – abweichende Sequenz

|                     |            |  |                                 |
|---------------------|------------|--|---------------------------------|
| Q8MW55<br>preCol NG | 1<br>1     | MVHNFLTVFLIAAIARTGLA<br>MVHNFLTVFLIAAIARTGLA   | Signal-<br>sequenz              |
| Q8MW55<br>preCol NG | 21<br>21   | GSIGYGKPGYGGGRDFFNHGGGGHGGGGHGGGSAS<br>GSIGYGKPGYGGGRDFFNHGGGGHGGGGHGGGSAS   | His&DOPA-reiche<br>Domäne       |
| Q8MW55<br>preCol NG | 58<br>58   | AAAHAAAVANALGGGGGSASAAARAAAAARALGGGGGSASAAARAAAAARALGGGGGSAS<br>AAAHAAAVANALGGGGGSASAAARAAAAARALGGGGGSASAAARAAAAARALGGGGGSAS   | flankierende<br>Domäne          |
| Q8MW55<br>preCol NG | 118<br>118 | AAARAAAAASALGGGGGFGLGGGLGGLGGGAGLGLGLGGGFGLGGGGPGGGGLGG--<br>AAARAAAAASAL--GGGGGFGL---GGLGGGAGLGLGLGGGLGGLGGGVGGGGVGGGG        |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 176<br>173 | --VPGGGLGGGGPGSAGAFNGNAAAGPGGAGASASAGAFATGGGGFPLP<br>VGGIGPGGGLGGGGPGSAGAFNGNAAAGPGGAGASASAGAFATGGGGFPLP                       |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 226<br>226 | GAPGPQGRPGPAGPPGDQGHGGPPGPPGHS P QPGQSRGAPGAPGEQGANPNPQPGNAG<br>GAPGPQGRPGPAGPPGDQGHGGPPGPPGHS P QPGQSRGAPGAPGEQGANPNPQPGNAG   |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 289<br>289 | APGQPGAPQAGAPGARGPSGAAGHQGAQGGVDQPGSPQQGSAGQPAPGNPAPGAPG<br>PQQPGAPQAGAAPGARGPSGAAGHQGAQGGVDQPGSPQQGSAGQPAPGNPAPGAPG           | Kollagendomäne                  |
| Q8MW55<br>preCol NG | 346<br>346 | PTGQAGSVGNIGGPERGAQGSAGPRGIQGRPGCKGLPGPKR PDGPQAGPKPGADGPAG<br>PTGQAGSVGNIGGPERGAQGSAGPRGIQGRPGCKGLPGPKG PDGPQAGPKPGADGPAG     |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 406<br>406 | VRGPIGPAGGKGTGPKGAPGDVPEGPEGPAGGPGPKGPTGPGQAKGSPGEDGEPGAEG<br>VRGPIGPAGGKGTGPKGAPGDVPEGPEGPAGGPGPKGPTGPGQAKGSPGEDGEPGAEG       |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 466<br>466 | EPGAKGGDGLPGQAGPRGNAGPQGEPEPVGDKGAPGESGGPGAPGPHGPQGPAGEQGDGLG<br>EPGAKGGDGLPGQAGPRGNAGPQGEPEPVGDKGAPGESGGPGAPGPHGPQGPAGEQGDGLG |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 526<br>526 | EVGPAGEAGAAGVPGPKGIQGPPELGPVKGEGPAGEAGPKGRLGQKGPAGEPGQPGEEG<br>EVGPAGEAGAAGVPGPKGIQGPPELGPVKGEGPAGEAGPKGRLGQKGPAGEPGQPGEEG     |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 586<br>586 | KQGDLAGPNRGATGVGGVKGPTGFRGNRKGPNAGRPRGRNGRNGRPTGPGQLRGNQG<br>KQGDLAGPNRGATGVGGVKGPTGFRGNRKGPNAGRPRGRNGRNGRPTGPGQLRGNQG         |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 646<br>646 | PDGEQGGSGVAVGGTI<br>PDGEQGGSGVAVGGTI   |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 663<br>663 | HIIVDDNGARFGDFADITGPNSEVNMQLVREFIGDLDTFLSLNPGGPAGV<br>HIIVDDNGARFGDFADITGPNSEVNMQLVREFIGDLDTFLSLNPGGPAGV                       | Abschnitt saurer<br>Aminosäuren |
| Q8MW55<br>preCol NG | 715<br>715 | GAGEAGTGGAGGGAGGPGGLGGEPR-AGGLGGFGGLGGGAGGLGGLGGGAGGAGGVGGL<br>GAGEGAGGAGGGAGGAGGLGGEPR-AGGLGGFGGLGGGAGGLGGLGGGAGGAGGVGGL      | flankierende<br>Domäne          |
| Q8MW55<br>preCol NG | 774<br>775 | GGGVGGLGGVGLGFGGAGASAGAGANAGAGGAGGSASA<br>GGGVGGLGGVGLGFGGAGASAGAGANAGAGGAGGSASA   |                                 |
| Q8MW55<br>preCol NG | 813<br>814 | HAHAHAHASSAGLGGGSAHAHAHAHAHSHVSHAGGSHAHAAATASTRTFSKSLPEDHTHTQ<br>HAHAHAHASSAGLGGGSAHAHAHAHAHSHVSHAGGSHAHAAAHAHSHVSHAGGSHAHAA   | His&DOPA-reiche<br>Domäne       |
| Q8MW55<br>preCol NG | 873<br>874 | LPQAHAAHAAASLGGSTGGHSLHYNDPFYKADY<br>AAAHAAHAAASLGGSTGGHSLHYNDPFYKADY  |                                 |

Trotz einer hohen Zahl von Polymorphismen auf DNA-Ebene, besitzen die Aminosäuresequenzen der aus der cDNA-Bank isolierten preCol-Varianten eine 95-98 %ige Homologie zu den veröffentlichten Sequenzen. Dabei unterscheiden sie sich überwiegend in einzelnen Aminosäure-Positionen. Alle Abweichungen zu den publizierten Aminosäuresequenzen sind in Tab. 3-XV aufgeführt.

In den flankierenden Domänen wurden hydrophobe Aminosäuren wie Leu, Ala und Gly durch Aminosäuren derselben Stoffklasse ersetzt. Auch Aminosäureaustausche in den Triplets der preCol-Kollagendomänen unterbrechen nicht das Sequenzmotiv GlyXaaYaa, was die Ausbildung einer tripelhelikalen Konformation nicht beeinträchtigt.

**Tab. 3-XV Übersicht der Abweichungen in der preCol-Aminosäuresequenz der aus der cDNA-Bank isolierten preCol-Proteine von den publizierten Sequenzen (Lucas et al., 2002)**

|  | <b>preCol P</b>                                  | <b>preCol D</b>   | <b>preCol NG</b>   |
|--|--|---|--|
| Sequenzidentität                         | 98,3 %   | 98,1 %  | 95,6 %   |
| His&DOPA- Domäne<br>(amino-terminal)     | Tyr36His   | Gly73Ala  |  |
| flankierende Domäne<br>(amino-terminal)  | Asn169Ile<br>Phe119Ser                           | Ile88Val<br>Val144Gly<br>Leu139Phe                                      | Deletion Position 130: Gly<br>Deletion Position 140:<br>GlyGlyGlyLeu<br>Phe160Leu<br>Pro168Val<br>Leu173Gly<br>Insertion Position 175:<br>GlyGlyValGlyGly<br>Val176Ile |
| Kollagendomäne                           | Gly285Ser<br>Val340Ala<br>Gly511Ala<br>His567Gln | Asp184Gly<br>Insertion Position 208:<br>GlyMetProGlyGlyPro<br>Arg215Gly | Asp380Gly<br>Arg389Gly   |
| Bereich saurer<br>Aminosäuren            | Val662Ile<br>Ala672Glu                           | Ala270Gly<br>His285Pro  |  |
| flankierende Domäne<br>(carboxyterminal) | Insertion Position 759:<br>ValGlyGlyGly          |   | Ala721Gly<br>Thr723Ala<br>Pro733Ala<br>Glu739Gly<br>Pro740Ala<br>Arg741Gly<br>Insertion Position 742: Gly  |
| His&DOPA- Domäne<br>(carboxy-terminal)   | Gly839Ser<br>Ser842Thr                           | Insertion Position 801:<br>GlyAlaGly                                    | Position 857-878<br>abweichende Sequenz  |

Der Vergleich der Sequenzen zeigt darüber hinaus, dass bei einigen Triplets, die in den publizierten Sequenzen eine Gly-Substitution im GlyXaaYaa-Motiv enthalten, die cDNA-Bank-basierten Sequenzen diese nicht aufweisen. Die Aminosäureabfolge der carboxy-



terminalen His&DOPA-Domäne des preCol NGs zeigt eine starke Abweichung über einen großen Sequenzbereich (Tab. 3-XIV, gewellt unterstrichen). Während bei der publizierten Sequenz für diesen Bereich untypische Aminosäuren wie Thr, Pro, Arg und Glu auftreten, zeigt die cDNA-Bank-basierte Sequenz eine Aminosäureabfolge, die den His-reichen Motiven der His&DOPA-Domäne entsprechen. Ein Vergleich der DNA-Sequenzen zeigt, dass in den publizierten Sequenzen eine Leserahmenverschiebung durch drei bei der Sequenzierung zusätzlich detektierte Basen (Basenpaar 2569, 2594 und 2628, Tab. 3-XVI) auftrat, die zu der abweichenden und vermutlich falschen Aminosäureabfolge führte. Dies lässt darauf schließen, dass die cDNA-basierte Sequenz vermutlich eher der des natürlichen preCol NGs entspricht.

**Tab. 3-XVI Vergleich der DNA- und Aminosäuresequenzen der carboxy-terminalen His&DOPA-Domäne von preCol NG**

Zeichenerklärung: **graue Markierung** – Übereinstimmung, **gelbe Markierung** - Unterschiede in der Sequenz

|         |           |      |   |
|---------|-----------|------|---|
| DNA     | Q8MW55    | 2548 | CACGCACACGCAGCTACCGCAAGCACACGCACATTTCAGTAAGTCACTGCCGGAGGATCAC |
| DNA     | preCol NG | 2548 | CACGCACACGCAGCTGCCGCA-GCACACGCACATTTCAGTAAGTCAC-GCCGGAGGATCAC |
| Protein | Q8MW55    | 849  | H A H A A T A S T R T F S K S L P E D H                       |
| Protein | preCol NG | 850  | H A H A A A A A A H A H S V S H A G G S                       |
| DNA     | Q8MW55    | 2608 | ACGCACACGCAGCTGCCGCAAGCACACsGCACATGCTGCATCTCTCGGAGGATCTACTGGA |
| DNA     | preCol NG | 2606 | ACGCACACGCAGCTGCCGCA-GCACACGCACATGCTGCATCTCTCGGAGGATCTACTGGA  |
| Protein | Q8MW55    | 869  | T H T Q L P Q A H A H A A S L G G S T G                       |
| Protein | preCol NG | 869  | H A H A A A A A A H A H A A S L G G S T G                     |
| DNA     | Q8MW55    | 2668 | GGCACTCACTGCACTACAACGATCCATTTTATGGCAAAAAAGCCGACTATTGA         |
| DNA     | preCol NG | 2665 | GGCACTCACTGCACTACAACGATCCATTTTATGGCAAAAAAGCCGACTATTGA         |
| Protein | Q8MW55    | 889  | G H S L H Y N D P F Y G K K A D Y Stop                        |
| Protein | preCol NG | 889  | G H S L H Y N D P F Y G K K A D Y Stop                        |

### 3.6 Sequenzanalyse der Kollagendomäne der preCols

Durch die Ergebnisse der Röntgenbeugungsanalysen konnte gezeigt werden, dass im Muschelbyssusfaden, insbesondere im distalen Teil, hochgeordnete tripelhelikale Strukturen vorliegen. Die Geometrie, Packungsdichte und somit auch die Stabilität der Tripelhelix ist abhängig von der Aminosäuresequenz der einzelnen Triplets. Untersuchungen dazu zeigten, dass mit steigendem Iminosäure-Gehalt eines Triplets die Packungsdichte und Stabilität der Tripelhelix (Brodsky et al., 2008) zunimmt.

Um Aussagen über eine mögliche Konformation der Tripelhelix in preCols zu treffen, wurden die Triplets der Kollagendomänen von preCol D, P und NG, welche aus der Muschelfuß-cDNA-Bank isoliert wurden, hinsichtlich ihrer Aminosäure-Sequenzen

analysiert (Kapitel 2.9). Die Domänengrenzen der Kollagendomänen wurden nach Lucas et al., 2002 festgelegt.

Die Triplets wurden zunächst gemäß des Vorkommens von Iminosäuren und deren Position in der Sequenz eingeteilt (Tab. 3-XVII). Die Kollagendomäne von preCol D ist mit 179 Triplets die längste unter den preCol-Proteinen. Neben zwei sehr stabilen Triplets der Sequenz GlyProPro enthält sie mit 38 % zum Großteil iminosäurefreie Triplets (GlyXaaYaa, wobei Xaa und Yaa beliebige Aminosäuren darstellen). Des Weiteren enthalten 24 % und 34 % der Triplets eine Iminosäure an 2. bzw. 3. Stelle.

**Tab. 3-XVII Aminosäure-Triplets der Kollagendomänen von den cDNA-Bank-basierten preCol D, P und NG eingeteilt nach ihrem Gehalt an Iminosäuren**  
Xaa und Yaa stehen für beliebige Aminosäuren

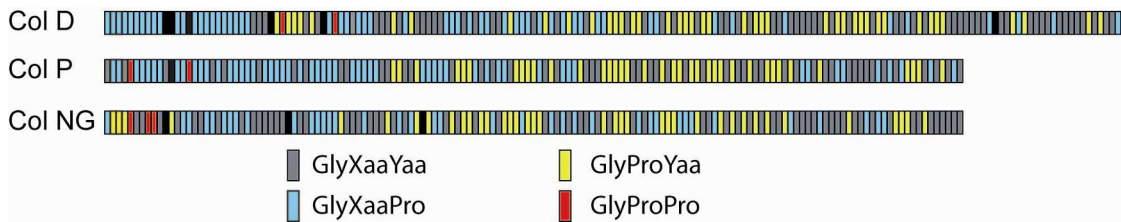
|   | preCol D  | preCol P    | preCol NG   |
|---|-----------|-------------|-------------|
| Anzahl Triplets                                       | 179       | 146         | 146         |
| GlyXaaYaa   | 69 (38 %) | 49 (34 %)   | 65 (45 %)   |
| GlyProYaa   | 42 (24 %) | 38 (26 %)   | 40 (27,4 %) |
| GlyXaaPro   | 61 (34 %) | 56 (38,5 %) | 37 (25,5 %) |
| GlyProPro   | 2 (1,2 %) | 2 (1,4 %)   | 3 (2 %)     |
| Triplet mit Abweichungen<br>(Deletionen, Insertionen) | 5 (2,8 %) | 1 (0,1 %)   | 1 (0,1 %)   |

Der Hauptteil der Kollagendomäne von preCol P wird von Triplets mit einer Iminosäure gebildet, wobei Sequenzen mit Pro/Hyp an zweiter Stelle häufiger vorkommen. PreCol P besitzt neben zwei GlyProPro-Motiven weniger iminosäurefreie Triplets als die Kollagendomänen von preCol D und NG. Bei letzterem liegt der Anteil an GlyXaaYaa-Sequenzen bei 45 %, und Triplets mit einer Iminosäure an 2. oder 3. Position kommen annähernd zu gleichen Anteilen vor.

Abb. 3-36 zeigt ein Schema zur Verteilung der nach Iminosäure-Gehalt eingeteilten Triplets in den jeweiligen preCol-Kollagendomänen.

Auffällig ist dabei, dass die einzelnen Triplet-Klassen nicht zufällig verteilt sind, sondern Bereiche mit einem hohen Anteil von GlyXaaYaa, GlyXaaPro oder GlyProYaa vorkommen. In der Kollagendomäne von preCol D und P befinden sich im aminoterminalen Bereich viele GlyXaaPro-Triplets (blau), während in der Mitte der Kollagendomäne eher GlyProYaa-Sequenzen (gelb) vorherrschen und carboxyterminal viele iminosäurefreie Motive (grau) auftreten. Bei preCol NG verteilen sich die Triplet-

Motive eher zufällig, abgesehen von den GlyProYaa-Triplets, welche vermehrt im mittleren Teil der Sequenz auftreten.

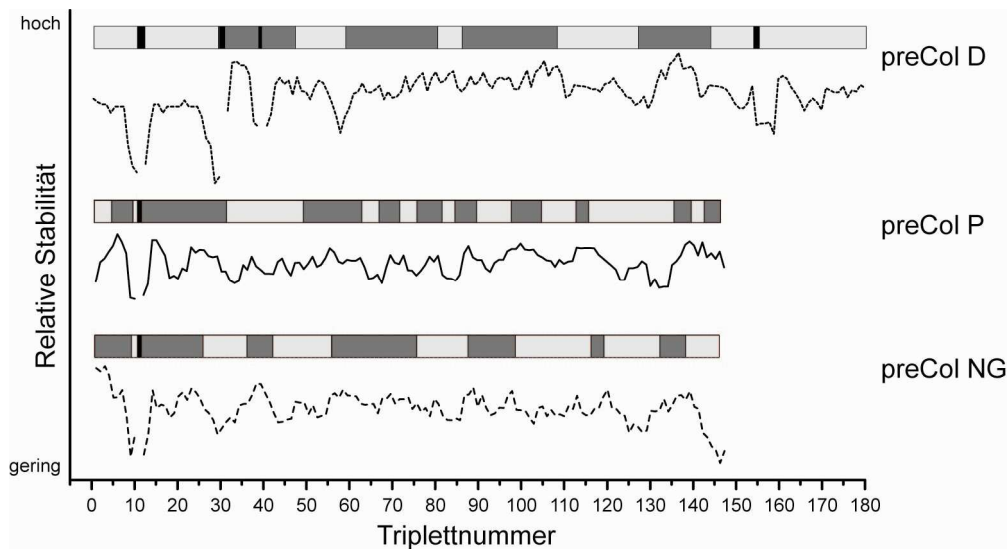


**Abb. 3-36 Schema zur Verteilung von Triplets in der Kollagendomäne von preCol D, NG und P nach ihrem Iminosäure-Gehalt**

Jeder Block entspricht einem Triplet. grau - GlyXaaYaa, blau - GlyXaaPro, gelb - GlyProYaa, rot - GlyProPro, schwarz - Triplets mit Abweichungen vom GlyXaaYaa-Motiv (Insertionen, Deletionen, Substitutionen)

Der insgesamt niedrige Iminosäure-Gehalt in den Triplets der Kollagendomänen lässt darauf schließen, dass die Tripelhelix eher eine voluminöse, locker gepackte Konformation einnimmt. Dennoch bestimmen auch die übrigen Aminosäuren der Triplets die Stabilität der Kollagentripelhelix, wobei einige Aminosäuren stabilisierend wirken, andere eher einen destabilisierenden Einfluss zeigen. Anhand von Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von Triplets in Kollagenen (Ramshaw et al., 1998) und zur thermischen Stabilität von Modelpeptiden (Brodsky & Ramshaw, 1997; Brodsky et al., 2008; Persikov et al., 2000) wurden alle Aminosäuren hinsichtlich ihrer stabilisierenden Eigenschaften eingeordnet (siehe Kapitel 2.9). Anhand dieser Auflistung wurden die Triplets der preCol-Kollagendomänen nach ihrer stabilisierenden Wirkung in einem preCol-Homotrimer eingeschätzt. Zusätzlich wurde mit dem Online-Tool *Collagen Stability Calculator*<sup>4</sup> zur Bestimmung der relativen Stabilität von Tripelhelices die Aminosäuresequenz der Kollagendomänen analysiert (Abb. 3-37).

<sup>4</sup> [http://jupiter.umdj.edu/collagen\\_calculator/index.php](http://jupiter.umdj.edu/collagen_calculator/index.php)



**Abb. 3-37 Stabilität der Triplets von preCol D, P und NG (cDNA-Bank basierte Sequenzen)**

Die Kurven zeigen die Stabilitäten bestimmt durch den Algorithmus *Collagen Stability Calculator* (mit Kurvenversatz), wobei für Insertionen und Deletionen im Triplettmuster kein Stabilitätswert erhalten wurde (Lücken in Kurve). Über den Kurven ist ein Schema der Triplets der jeweiligen Kollagendomänen dargestellt. Hier wurden die Triplets nach ihrer thermischen Stabilität in Modellpeptiden eingeteilt (Persikov et al., 2000). Die Sequenzbereiche stabiler Triplets sind dunkelgrau und die mit lockerer tripelhelikaler Konformation hellgrau gefärbt. Triplets mit Abweichungen vom GlyXaaYaa-Motiv (Insertionen, Deletionen, Substitutionen) erscheinen schwarz.

Anhand dieser Sequenzanalysen zeigt sich, dass in den Kollagendomänen aller preCols Sequenzbereiche auftreten, für die eine hohe Stabilität vorhergesagt wird (Abb. 3-37). Sie enthalten Aminosäuren, die in eine stabile, dicht gepackte Tripelhelix falten können. Diese befinden sich bei preCol D im mittleren Teil der Kollagendomäne, während preCol P und NG laut der manuellen Einteilung der Triplets gemäß ihrer thermischen Stabilität (Persikov et al., 2000) besonders aminoterminal einen breiten Bereich stabiler Triplets aufweisen. Die mittels Algorithmus vorhergesagten Stabilitäten sehen jedoch im Bereich der Gly-Deletion im 11. Triplett einen instabilen tripelhelikalen Abschnitt vor. Bei preCol D befinden sich an den Termini der Kollagendomäne Bereiche, denen eine lockere, voluminöse und damit auch eher instabile tripelhelikale Konformation vorhergesagt wird.

## 4 Diskussion

Kollagen-haltige Materialien wie Blutgefäße, Sehnen, Knochen und Knorpel befinden sich in der Regel innerhalb des Körpers. Der Muschelbyssus mariner Miesmuscheln hingegen stellt ein Beispiel extrakorporaler Kollagenmaterialien dar. Neben starker mechanischer Beanspruchung ist dieser auch wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. UV-Strahlung, Austrocknung, mikrobielle Angriffe und saisonale Schwankungen der Wasserqualität, wie beispielsweise die Wassertemperatur und der Salzgehalt, stellen besondere Ansprüche an den Byssusfaden. Darüber hinaus muss neben einer gleichbleibenden mechanischen Stabilität auch ein beständiger Übergang vom Faden zur Haftscheibe einerseits und andererseits über den Byssusstamm ins Muschelgewebe gewährleistet sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Muschelbyssusfaden der marinen Miesmuschel *M. galloprovincialis* hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften, des strukturellen Aufbaus und thermischen Verhaltens untersucht, um dessen strukturelle Einheiten und deren Zusammenspiel besser zu verstehen, und daraus grundlegende Mechanismen zur Funktionsweise des Byssusfadens abzuleiten.

### 4.1 Die Mechanik des Muschelbyssusfadens

Marine Miesmuscheln besiedeln Habitate der Gezeitenzonen und Schelfregionen, in denen starke Strömungen und Wellenbewegungen vorherrschen. Dabei wirken mechanische Kräfte aus unterschiedlichen Richtungen auf die Byssusfäden, welche dadurch gestreckt, gestaucht und gebogen werden können. Somit müssen Byssusfäden reißfeste und zugleich elastische und stoßdämpfende Eigenschaften besitzen. Darüber hinaus muss ihre Reißfestigkeit auch im Falle von Austrocknung beispielsweise während Ebben erhalten bleiben.

Mechanische Zugmessungen (Kapitel 3.2) zeigen, dass der distale Teil des Byssusfadens im Vergleich zum proximalen bei gleicher Dehnbarkeit eine höhere Steifigkeit, Zugfestigkeit und Zähigkeit besitzt. Der proximale Fadenteil hingegen ist stark elastisch verformbar, das heißt er kann mehr Energie aufnehmen, ohne sich plastisch zu verformen. Dabei spielt der Hydratationsgrad der Proben eine wesentliche Rolle. Dehydrierte Proben sind weniger dehnbar und besitzen eine höhere Steifigkeit, was sich in einem höheren E-Modul widerspiegelt.

Die vorliegenden Studien stellen eine umfassende Übersicht der mechanischen Eigenschaften des distalen und proximalen Fadenteils dar. Um den natürlichen Arbeitsbereich der Muschelbyssusfäden nachzuempfinden, wurden die Byssusfäden in salzhaltiger bzw. salzfreier Lösung inkubiert und Messungen bei unterschiedlichen Hydratationszuständen durchgeführt. Es gibt keine vergleichbaren Datensätze für Byssusfäden der Muscheln *M. edulis* und *galloprovincialis* in der Literatur. Hier wurden hauptsächlich die mechanischen Eigenschaften von hydrierten Gesamtbyssusfäden (Aldred et al., 2007; Smeathers, 1979) oder der einzelnen Fadenteile analysiert (Bell & Gosline, 1996; Lucas et al., 2002; Vaccaro & Waite, 2001; Waite et al., 2002), die in KMW inkubiert und hydriert vermessen wurden. Des Weiteren wurden in früheren Studien die technischen Spannung-Dehnungskurven hinsichtlich der mechanischen Parameter ausgewertet, wobei eine zylindrische statt der wahren elliptischen Probengeometrie angenommen wurde. Wie schon in Kapitel 2.5 und 3.2 besprochen, spiegeln die technischen Daten für große Dehnungswerte nicht die realen Daten wider, da sich der Fadenquerschnitt beim Ziehen verkleinert und dadurch die Kraft auf eine kleinere Fläche wirkt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Literaturwerten werden allerdings in Tab. 4-I sowohl die Werte der technischen als auch der realen Spannungs-Dehnungskurve angegeben.

Die erhaltenen Werte für den E-Modul und die Zugfestigkeit  $\sigma_{\max}$  sowohl des distalen als auch des proximalen Fadenteils entsprechen den Literaturdaten. Die in dieser Arbeit erhaltene maximale Dehnbarkeit der distalen Fäden liegt allerdings bei bis zu dreifach höheren Werten ( $\epsilon_{\max}$ : 240 %) als in der Literatur ( $\epsilon_{\max}$ : 68-80 %) (Lucas et al., 2002; Waite et al., 2002). Auch konnte kein Unterschied in der Dehnbarkeit beider Fadenteile erhalten werden, was laut früheren Veröffentlichungen neben der Steifigkeit den Hauptunterschied der beiden Fadenteile darstellt, da hier der proximale Fadenteil doppelt so dehnbar ist wie der distale (Waite et al., 2002). Aus den erhaltenen hohen Dehnbarkeitswerten resultieren somit auch größere Zähigkeiten im Vergleich zu den publizierten Daten.

Ursachen für diese Diskrepanzen der Werte liegen möglicherweise im unterschiedlichen Alter der verwendeten Byssusfäden. Während in früheren Studien frisch von der Muschel präparierte Fäden untersucht wurden, lagerten die in dieser Arbeit verwendeten Proben mehrere Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Des Weiteren spielt auch die Herkunft der Muscheln eine entscheidende Rolle, da die Fadeneigenschaften an Wasserqualität und Umweltbedingungen angepasst werden (Moeser & Carrington, 2006). Die in den publizierten

Studien verwendeten Muscheln stammen von der kalifornischen bzw. kanadischen Westküste (Bell & Gosline, 1996; Lucas et al., 2002; Vaccaro & Waite, 2001; Waite et al., 2002) bzw. von der Nordseeküste Ostenglands (Aldred et al., 2007) und die Byssusfäden wurden im Labor unter kontrollierte Bedingungen produziert, während die in dieser Arbeit verwendeten Fäden von Muscheln stammen, die in einer Muschelfarm im adriatischen Mittelmeer produziert wurden. Bei einer entsprechenden Massenproduktion kann aufgrund des erhöhten Stresslevels der Organismen die Qualität des Byssus variieren.

**Tab. 4-I Vergleich der erhaltenen mechanischen Daten für distale und proximale Byssusfäden mit denen aus der Literatur für die Species *M. galloprovincialis*.**

|                               | distal                | proximal              | Referenz             |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
|                               | KMW                   | KMW                   |                      |
|                               | hydriert              | hydriert              |                      |
| E-Modul/ MPa                  | 510± 140 <sup>a</sup> | 140± 60 <sup>a</sup>  |                      |
|                               | 430± 130 <sup>b</sup> | 40± 10 <sup>b</sup>   |                      |
| Steifigkeit                   | 562± 55               | 50± 3,8               | (Lucas et al., 2002) |
|                               | 500                   | 50                    | (Waite et al., 2002) |
| $\epsilon_{max}$              | 1,3± 0,4 <sup>a</sup> | 1,1± 0,2 <sup>a</sup> |                      |
|                               | 2,4± 0,3 <sup>b</sup> | 2,2± 0,5 <sup>b</sup> |                      |
| Dehnbarkeit                   | 0,68± 0,55            | 1,08± 0,39            | (Lucas et al., 2002) |
|                               | 0,8                   | 1,6                   | (Waite et al., 2002) |
| $\sigma_{max}$ / MPa          | 500± 160 <sup>a</sup> | 140± 60 <sup>a</sup>  |                      |
|                               | 160± 20 <sup>b</sup>  | 50± 10 <sup>b</sup>   |                      |
| Zugfestigkeit                 | 138± 16               | 35,6± 1,8             | (Lucas et al., 2002) |
|                               | 150                   | 20                    | (Waite et al., 2002) |
| Zähigkeit/ MJ m <sup>-3</sup> | 210± 70 <sup>a</sup>  | 60± 23 <sup>a</sup>   |                      |
|                               | 230± 30 <sup>b</sup>  | 60± 30 <sup>b</sup>   |                      |
|                               | 46,3± 6,6             | 20,4± 1,9             | (Lucas et al., 2002) |
|                               | 50                    | 15                    | (Waite et al., 2002) |

<sup>a</sup> technische Werte , <sup>b</sup> reale Werte

Aber auch unterschiedliche Zuggeschwindigkeiten und Probenlängen bei den mechanischen Zugmessungen können abweichende Werte verursachen. So kann beispielsweise bei geringeren Zuggeschwindigkeiten ein stärkeres *Yield*-Verhalten beobachtet werden (Aldred et al., 2007; Bertoldi & Boyce, 2007).

Im Vergleich zu anderen Materialien (Gosline et al., 1999) (Tab. 4-II) zeigt der distale Byssusfaden im hydrierten Zustand eine geringere Steifigkeit als Sehnenkollagen, ist aber steifer als Elastin. Der distale Byssusfaden ist so dehnbar wie Elastin oder Flagelliform-Spinnenseide bei einer Zugfestigkeit vergleichbar zum Kollagen von Sehnen. Somit

besitzt der distale Fadenteil eine wesentlich höhere Zähigkeit im Vergleich zu Sehnenkollagen und sogar *dragline*-Spinnenseide.

Im dehydrierten Zustand besitzt der distale Fadenteil eine höhere Steifigkeit als im hydrierten und diese ist vergleichbar zu der von Sehnenkollagen, aber geringer als bei Seiden-Materialien. Mit einer Dehnbarkeit von nur noch 50 % verhält sich der dehydrierte distale Byssusfaden elastischer als Kokoon- oder Spinnenseide, ist aber weniger dehnbar als Elastin. Mit einer Zugfestigkeit, die der von Sehnenkollagen entspricht, besitzt der dehydrierte distale Faden somit eine Zähigkeit wie Kokonseide des Maulbeerspinners (*Bombyx mori*) oder Nylon.

**Tab. 4-II Vergleich der mechanischen Daten des Muschelbyssusfadens mit weiteren biologischen Materialien (Gosline et al., 1999)**

| Material   | E-Modul/ GPa<br><i>Steifigkeit</i> | $\epsilon_{max}$<br><i>Dehnbarkeit</i> | $\sigma_{max}$ / MPa<br><i>Zugfestigkeit</i> | Zähigkeit/ MJ m <sup>-3</sup> |
|--|------------------------------------|--|--|-------------------------------|
| Byssusfaden<br>( <i>M. galloprovincialis</i> )         |                                    |  |  |                               |
| distaler Teil  |                                    |  |  |                               |
| hydriert   | 0,43                               | 2,4                                    | 160  | 230                           |
| dehydriert   | 1,8                                | 0,5                                    | 200  | 82                            |
| proximaler Teil  |                                    |  |  |                               |
| hydriert   | 0,04                               | 2,2                                    | 45   | 56                            |
| dehydriert   | 0,49                               | 0,55                                   | 70   | 22                            |
| <i>dragline</i> Seide<br>( <i>Araneus diatematus</i> ) | 10                                 | 0,27                                   | 1100   | 160                           |
| Flagelliform-Seide<br>( <i>Araneus diatematus</i> )    | 0,003                              | 2,7                                    | 500  | 150                           |
| Kokon-Seide<br>( <i>Bombyx mori</i> )                  | 7                                  | 0,18                                   | 600  | 70                            |
| Sehnenkollagen   | 1,5                                | 0,12                                   | 150  | 7,5                           |
| Elastin  | 0,001                              | 1,5                                    | 2  | 2                             |
| Synthetischer Gummi                                    | 0,001                              | 8,5                                    | 50   | 100                           |
| Nylonfaden   | 5                                  | 0,18                                   | 950  | 80                            |

Im Gegensatz dazu zeigt der hydrierte, proximale Byssusfaden mit einer geringen Steifigkeit und hohen Dehnbarkeit mechanische Eigenschaften wie die Flagelliform-Seide und Elastin, ist aber zugfester und zäher als Elastin. Im dehydrierten Zustand ist der proximale Faden zwar steifer und zugfester als im hydrierten Zustand, erreicht aber nicht die Eigenschaften von Seiden-Materialien.



Des Weiteren zeigen die mechanischen Zugmessungen (Kapitel 3.2) dass die distalen Byssusfäden nach Erreichen der Elastizitätsgrenze bei ca. 15 % (hydrierte Fäden) und ca. 7 % (dehydrierte Fäden) eine Änderung der mechanischen Eigenschaften erfahren. Proximale Fäden hingegen zeigen im hydrierten Zustand kein *Yield*-Verhalten, aber bei dehydrierten ändert sich die Steifigkeit ab einer Fadendehnung von 16-18 %. Es kommt hierbei zu einer Verminderung der Steifigkeit (*Yield*), wobei der Faden mit geringem Kraftaufwand gestreckt wird bis eine erneute Versteifung des Materials einsetzt. Dieses Verhalten des Fadens wurde in der Vergangenheit eingehend untersucht (Brazee & Carrington, 2006; Harrington et al., 2009; Smeathers, 1979). Insbesondere die Muscheln der Species *M. californianus* zeigen ein sehr ausgeprägtes *Yield*-Verhalten. Aber auch in Studien an Byssusfäden der Muschel *M. galloprovincialis* (Vaccaro & Waite, 2001) wurden, vergleichbar zu den Messungen der vorliegenden Arbeit, bei Fadendehnungen von ca. 20 % eine Verminderung bis hin zum Verlust der Steifigkeit beobachtet. Der Faden konnte dann bis ca. 60 % gedehnt werden bis eine Versteifung einsetzte. Durch dieses Materialverhalten wird zum einen die auf die Haftscheibe wirkende Kraft verringert und zum anderen wird durch die erhöhte Dehnbarkeit des einzelnen Fadens die Verteilung der Kraft auf umliegende Fäden ermöglicht (Aldred et al., 2007; Bertoldi & Boyce, 2007).

Bei den Zugmessungen hydrierter distaler Fäden (Kapitel 3.2) konnte ein weiterer *Yield*-Punkt bei einer Fadendehnung von 50-60 % beobachtet werden. Aufeinanderfolgende *Yield*-Ereignisse lassen sich in einem Multikomponenten-Material auf die unterschiedlichen Strukturen des Materials zurückführen. So kann beispielsweise der beobachtete zweite *Yield*-Punkt durch das Ablösen der Kutikula vom Fadenkern oder auch durch deren Reißen verursacht werden (Aldred et al., 2007). Untersuchungen zur mechanischen Stabilität der Kutikula zeigen, dass bei Byssusfäden der Muschel *M. galloprovincialis* die äußere Hülle um den Fadenkern bei einer Fadendehnung von 75 % bricht (Holten-Andersen et al., 2007).

Dieses Phänomen des *Yields* gilt unter Materialwissenschaftlern als ein irreversibles Werkstoffverhalten und der *Yield*-Punkt kennzeichnet den Beginn der plastischen Deformation eines Materials. Der Byssusfaden jedoch besitzt in diesem Dehnungsbereich jedoch die Fähigkeit, einen großen Teil der plastischen Verformung durch unterschiedliche molekulare Prozesse wiederherzustellen. Wird der Faden bis zum Beginn des erneuten Versteifens gedehnt und die Krafteinwirkung eingestellt, kommt es zum Relaxieren des Fadens. Dabei zeigt der Byssusfaden eine Hysterese von bis zu 70 %

(Harrington & Waite, 2008b). Wird direkt nach Relaxation des Fadens erneut gezogen, zeigt der distale Fadenteil eine verringerte Steifigkeit (Brazee & Carrington, 2006; Harrington et al., 2009; Vaccaro & Waite, 2001), während der proximale sich versteift (Sun et al., 2001). Bei längerer Erholungspause nach dem ersten Ziehen zeigt insbesondere der distale Byssusfaden eine Wiederherstellung der anfänglichen mechanischen Eigenschaften. Dieser "Selbsteilungs"-Prozess ist zum einen zeitabhängig, d. h. je länger die Erholungszeit, umso höher die Effizienz der Wiedererlangung, und zum andern dehnungsabhängig. Dabei gilt, je höher die Streckung des Fadens, umso höher der Verlust der Steifigkeit im nächsten Zyklus (Harrington & Waite, 2007). So können beispielsweise bei Dehnung des Byssusfadens bis 35 % eine Wiederherstellung der anfänglichen Steifigkeit von 70 % nach einer Stunde erreicht werden (Harrington & Waite, 2007; Harrington & Waite, 2008b).

Die mechanischen Fähigkeiten des Muschelbyssusfadens machen deutlich, dass der Lebensraum der Muschel mit seinen Wellenbewegungen und wechselnden Wasserständen nicht zwangsläufig eine hohe Zugfestigkeit vom Material fordert, sondern dass die einwirkenden Kräfte und Energien effizient absorbiert und abgeleitet werden müssen, damit ein dauerhafter Halt zum Substrat gewährleistet ist.

## **4.2 Die molekulare Struktur des Muschelbyssusfadens**

Seit den 1950er Jahren wurde der Muschelbyssusfaden hinsichtlich seines Aufbaus und der Struktur der Byssusproteine untersucht, um herauszufinden, welche Strukturelemente den mechanischen Eigenschaften des Fadens zu Grunde liegen. Der Hauptanteil der Byssusfäden wird von den kollagen-ähnlichen preCol-Proteinen gebildet. Es wird davon ausgegangen, dass diese maßgeblich an der Vermittlung der mechanischen Eigenschaften des Byssusfadens beteiligt sind (Harrington & Waite, 2008b; Waite et al., 1998; Waite et al., 2002).

Anhand der Ergebnisse von Strukturuntersuchungen mittels ssNMR, FTIR-Spektroskopie, sowie Röntgenbeugungsanalysen und Sequenzanalysen der preCol-Kollagendomäne der vorliegenden Arbeit soll im Folgenden sowohl die molekulare Struktur der preCol-Kollagendomäne und der flankierenden Bereiche, als auch das Arrangement der preCols im Byssusfaden diskutiert werden.

#### 4.2.1 Die preCol-Kollagendomäne

In FTIR-spektroskopischen Studien an Längsschnitten des distalen und proximalen Byssusfadens (Kapitel 3.4.2) wurden Absorptionsbanden im Bereich der Amid I und III-Bande sowie im *fingerprint*-Bereich des IR-Spektrums erhalten, die tripelhelikalen Strukturen zugeordnet werden können. Auch Untersuchungen mit ssNMR-Spektroskopie zeigen chemische Verschiebungen der Aminosäuresignale vergleichbar zu denen in fibrillären Kollagenen (Kapitel 3.4.1). Die Aminosäuresequenz der Kollagendomäne der preCol-Proteine ist gekennzeichnet durch das sich wiederholende Triplettmotiv  $(\text{GlyXaaYaa})_n$ , welches charakteristisch für Kollagen und damit auch für die Ausbildung einer tripelhelikalen Struktur ist.

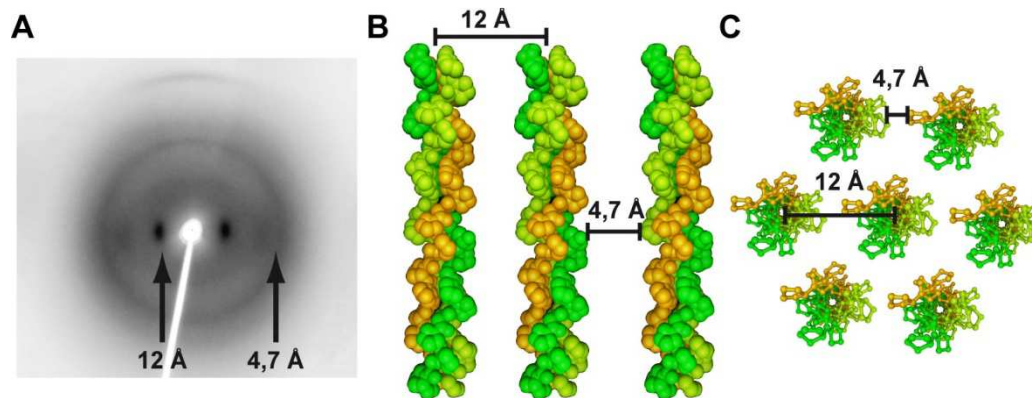
Einen detaillierten Einblick in die tripelhelikale Sekundärstruktur der Kollagendomäne gaben Röntgenbeugungsanalysen am Byssusfaden. In früheren Studien wurden für den Byssusfaden verschiedener *Mytilus*-Arten Röntgenbeugungsmuster erhalten, welche die Anwesenheit tripelhelikaler und  $\beta$ -strukturiertes Konformationen (Harrington et al., 2009; Mercer, 1952; Rudall, 1955) belegen. Jedoch wurde dabei die dreidimensionale Struktur der Kollagendomäne nicht näher diskutiert.

Die Ergebnisse der Röntgenbeugungsanalysen der vorliegenden Arbeit schaffen die Grundlage für ein Modell zur tripelhelikalen Struktur der preCol-Kollagendomäne. Durch eine Vielzahl von Strukturuntersuchungen an kollagen-haltigen Geweben und Modellpeptiden sind hochaufgelöste Strukturdaten zur tripelhelikalen Konformation verfügbar (Brodsky et al., 2008; Shoulders & Raines, 2009). Da die Röntgenbeugungsmuster des distalen Byssusfadens vergleichbar mit denen von Säugetier-Kollagenen (Okuyama, 2008) sind, wurden zur Auswertung und Diskussion der Struktur der preCol-Kollagendomäne die Strukturdaten von fibrillären Säugetier-Kollagenen und abgeleiteten Modellpeptiden herangezogen.

##### 4.2.1.1 Geometrie und Helixsymmetrie der tripelhelikalen preCol-Kollagendomäne

Die Röntgenbeugungsmuster des distalen Fadenteils (Kapitel 3.4.5) zeigen, dass hochorientierte Strukturen parallel zur Fadenachse ausgerichtet sind. Die erhaltenen Signale können denen tripelhelikaler Strukturen zugeordnet werden und entsprechen somit den Tripelhelices der preCol-Kollagendomänen. (Abb. 4-1). Äquatoriale Signale entsprechen dabei dem Querschnitt und meridionale der Längsachse von Tripelhelices.

Das starke äquatoriale Signal mit einer Distanz von 12 Å kennzeichnet dabei den Abstand vom Zentrum einer Tripelhelix zu dem einer benachbarten (Abb. 4-1B). Dieser Abstand kann je nach Hydratationsgrad des Kollagenmaterials variieren. Je weniger Wasser gebunden ist, desto geringer ist der Abstand zwischen den Tripelhelices (Bella et al., 1994).



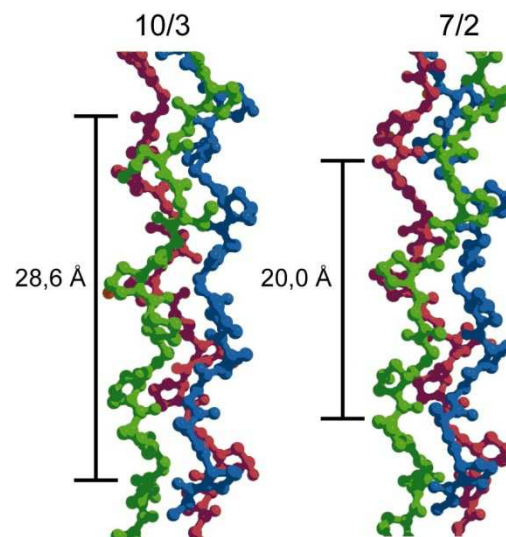
**Abb. 4-1 Zuordnung der äquatorialen Röntgenbeugungssignale**

A) Röntgenbeugungsmuster des distalen Byssusfadens. Die entsprechenden äquatorialen Distanzen sind gekennzeichnet. B) Längsansicht Tripelhelices C) Querschnitt hexagonal angeordneter Tripelhelices

Ein weiteres diffuses äquatoriales Signal bei 4,7 Å kann möglicherweise dem Abstand zwischen angrenzenden Einzelsträngen (Okuyama, 2008) zugeordnet werden. Dieses Signal geht in einen nicht-orientierten Ring mit einer Distanz von 4,6 Å über, der nicht definitiv einer Struktur des Fadens zugeordnet werden kann. Dieses Muster kann durch Beugungen am hochgeordneten Wassernetzwerk der Tripelhelices verursacht werden (Bella et al., 1995) oder es stammt von weiteren Bestandteilen des Byssusfadens wie Kutikula- oder Matrixproteinen.

Die meridionalen Signale mit den Distanzen 2,85 Å, 4,0 Å und 10 Å (Abb. 3-33) entsprechen dem Beugungsmuster entlang einer Tripelhelix und können den einzelnen Ordnungen der Helixsymmetrie zugeordnet werden (Okuyama, 2008; Okuyama et al., 2006; Shoulders & Raines, 2009). Generell wird eine rechtsgängige Tripelhelix von drei linksgängigen polyProlin II-Helices gebildet. Jedoch können sich Packungsdichte und Torsionswinkel je nach Aminosäuresequenz unterscheiden. In der Literatur existieren für eine tripelhelikale Helixsymmetrie zwei Modelle: die 10/3-Symmetrie von Rich & Crick (Rich & Crick, 1955) und die 7/2-Symmetrie von Okuyama (Okuyama et al., 1972) (Abb. 4-2).

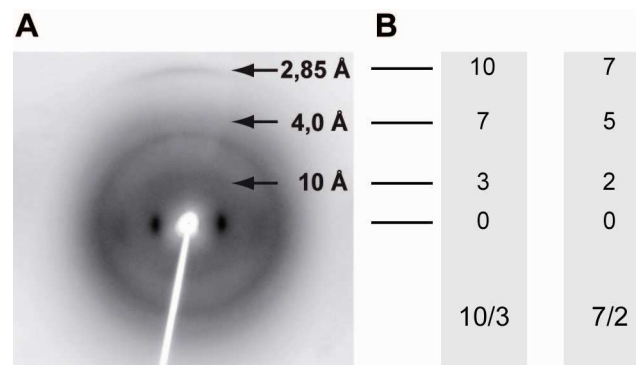
Basierend auf Röntgenbeugungsanalysen an Ratten- und Känguruschwanzsehne wurde zunächst eine  $10/3$ -Symmetrie postuliert (Cowan et al., 1955; Ramachandran & Kartha, 1954; Rich & Crick, 1955), bei der 3,33 Aminosäuren in einer Windung involviert sind und somit 10 Aminosäuren drei Helixwindungen bilden. Identische Aminosäuren benachbarter Polypeptidketten wiederholen sich dabei auf einer Achse mit einem Abstand von  $28,6 \text{ \AA}$  (Abb. 4-2). Dieses Modell galt lange Zeit als allgemeingültig für die Helixsymmetrie natürlicher Kollagene. Da jedoch anhand der Röntgenbeugungsanalysen am natürlichen Kollagen keine Aussagen über die strukturellen Parameter einzelner Aminosäuren in den verschiedenen Triplets einer Tripelhelix getroffen werden konnten, wurden Studien an Einkristallen durchgeführt.



**Abb. 4-2** Symmetriemodelle einer Tripelhelix nach Rich & Crick ( $10/3$ ) und Okuyama ( $7/2$ )

Strukturanalysen an Einkristallen von Kollagenpeptiden der Sequenz  $(\text{ProProGly})_n$  (Nagarajan et al., 1999; Okuyama et al., 1999; Okuyama et al., 1972) lieferten eine molekulare Struktur, bei der die linksgängige Tripelhelix eine  $7/2$ -Symmetrie mit einer axialen Wiederholung gleicher Aminosäuren im Abstand von  $20 \text{ \AA}$  besitzt (Abb. 4-1). Hierbei bilden 3,5 Aminosäuren eine Einzelstrangwindung und somit sieben Aminosäuren zwei Helixwindungen. Dieses Modell regte zur Neuinterpretation der Beugungsmuster natürlicher Kollagene an, da die prominentesten Beugungssignale bei  $2,86 \text{ \AA}$ ,  $4 \text{ \AA}$  und  $10 \text{ \AA}$  auf der einen Seite der 10., 7. und 3. Ordnung des Rich & Crick Modells und damit einer  $10/3$ -Symmetrie zugeordnet werden können und auf der anderen Seite gleichfalls der 7., 5. und 2. Ordnung des Okuyama-Modells ( $7/2$ -Symmetrie) entsprechen (Okuyama et al., 1999). Auch im Falle des Röntgenbeugungsmusters des distalen Muschelbyssusfadens ist eine Zuordnung der Symmetrieordnungen nicht eindeutig zu treffen (Abb. 4-3). Hier

wurden hinsichtlich der Helixsymmetrie lediglich die meridionalen Signale bei 2,86 Å, 4 Å und 10 Å aufgelöst.



**Abb. 4-3 Röntgenbeugungsmuster und Zuordnung der Signale zu den Ordnungen der tripelhelikalen Helixsymmetrie**

A) meridionale Signale des distalen Byssusfadens B) Zuordnung der Röntgenbeugungssignale zu den Ordnungen der 10/3- und 7/2-Helixsymmetrie

Bei der Kontroverse, welches Modell der Symmetrie natürlicher Kollagentripelhelices entspricht, lassen Studien an natürlichen Kollagenen mit hohem Prolinanteil sowie Ergebnisse mit iminosäure-armen Modellpeptiden (Jenkins & Raines, 2002; Ramshaw et al., 1998) und Peptiden mit Unterbrechungen im regelmäßigen GlyXaaYaa-Muster (Bella et al., 1994; Bella et al., 2006; Thiagarajan et al., 2008) den Schluss zu, dass die Helixsymmetrie in einer Tripelhelix variieren kann (Bella et al., 1994; Shoulders & Raines, 2009). Beispielsweise bilden iminosäurearme Sequenzen eher eine 10/3-Symmetrie aus, während eine Sequenz mit hohem Prolinanteil eine Ganghöhe gemäß dem 7/2-Modell zeigt (Boudko et al., 2008; Brodsky et al., 2008; Sweeney et al., 1998). Iminosäure-freie Regionen hingegen formen eine relaxierte Helix (Brodsky et al., 2008). Dadurch entstehen lockere und enggepackte Bereiche entlang einer Tripelhelix, welche unter anderem eine bestimmte Funktionalität wie die Interaktion mit anderen Molekülen vermitteln können (Bella et al., 2006).

Somit stellt der Iminosäuregehalt der einzelnen Triplets ein Indiz für die mögliche Symmetrie der Helix dar. Sequenzanalysen der Triplets der Kollagendomänen anhand der cDNA-Bank-basierten Sequenzen von preCol P, D und NG (Kapitel 3.5, Tab. 3-XII; Tab. 3-XIII, Tab. 3-XIV) zeigen, dass ein Großteil der GlyXaaYaa-Motive keine Iminosäuren enthalten, was somit für die Ausbildung einer 10/3-Symmetrie spricht. Diese Triplets sind nicht gleichmäßig über die gesamte Kollagendomäne verteilt, sondern treten vermehrt insbesondere im jeweiligen carboxy-terminalen Bereich auf. Iminosäure-haltige Triplets

kommen vorzugsweise aminoterminal und im Zentrum der Kollagendomäne vor. Diese Bereiche könnten somit eine 7/2-Helixsymmetrie ausbilden.

Bei der Verteilung iminosäurehaltiger Triplets ist auffällig, dass Motive der Sequenz GlyProYaa vorrangig im Zentrum der Kollagendomäne auftreten. Diese Triplets sind thermisch stabiler, da das Prolin in zweiter Position in einer Tripelhelix nah am benachbarten Strang lokalisiert und somit weniger stark exponiert ist (Ramshaw et al., 1998). Im Gegensatz dazu enthält der carboxy-terminale Bereich der Kollagendomäne einen hohen Anteil des Motivs GlyXaaPro. Triplets dieser Sequenz sind *per se* thermisch instabil, was unter anderem an der Exposition des Prolins liegt (Ramshaw et al., 1998). Allerdings neigt Prolin an dritter Stelle im Sequenzmotiv zur Hydroxylierung zu Hydroxyprolin durch Prolyl 4-hydroxylase, was auch für die preCols beschrieben wurde (Mascolo & Waite, 1986; Qin & Waite, 1995). Dieses Hyp ist in der wasservermittelten inter- und intramolekularen Quervernetzung der Einzelstränge involviert und trägt somit maßgeblich zur Stabilität der Tripelhelix bei (Brodsky & Shah, 1995; Shoulders & Raines, 2009). Das Vorkommen dieses Sequenzmotivs deutet darauf hin, dass möglicherweise besonders in den carboxy-terminalen Bereichen der preCol-Kollagendomäne eine stärkere Quervernetzung und Stabilität der Helix gegeben ist.

Neben dem Iminosäure-Gehalt tragen auch die restlichen Aminosäuren in einem Triplet zur Stabilität und Packungsdichte und somit auch zur Helixsymmetrie einer Tripelhelix bei. So zeigt das häufige Vorkommen beispielsweise der Tripeptid-Motive GlyProAla, GlyAlaHyp, GlyLeuHyp, GlyProLys und GlySerHyp aber auch der iminosäurefreien Tripeptide GlyGluLys und GlyGluArg in natürlichen Kollagenen, dass diese Aminosäuren sich stabilisierend auf die Struktur der Tripelhelix auswirken (Jenkins & Raines, 2002; Ramshaw et al., 1998). Auch Studien zur thermischen Stabilität von Modellpeptiden der Sequenz (GlyProHyp)<sub>3</sub>-GlyXaaHyp-(GlyProHyp)<sub>4</sub> und (GlyProHyp)<sub>3</sub>-GlyProYaa-(GlyProHyp)<sub>4</sub> (Persikov et al., 2000) zeigten, dass nur bestimmte Aminosäuren in Xaa- bzw. Yaa-Position eine Tripelhelix stabilisieren (Kapitel 2.9). Beispielsweise interagieren polare Aminosäurereste mit dem Wassernetzwerk der Tripelhelix vergleichbar zu Hyp, geben aber dem Einzelstrang eine höhere konformationelle Freiheit (Bella et al., 1994). Die Triplets der preCol-Kollagendomänen wurden gemäß ihrer Aminosäurezusammensetzung analysiert und in Tripeptide eingeteilt, welche stabilisierend bzw. destabilisierend auf eine tripelhelikale Konformation wirken (Kapitel 3.6). Auch hier wurden Bereiche identifiziert, die mehrere aufeinanderfolgende Triplets enthielten, denen

eine hohe Stabilität vorhergesagt wird, während anderen Bereichen eher eine geringe thermische Stabilität und damit eine lockere, voluminösere Helixpackung zugeordnet werden konnten. Alle preCols besitzen stabile, kompakte Bereiche im Zentralteil der Kollagendomäne, wodurch eine Stabilität des gesamten Trimers gewährleistet wird. Für die terminalen Bereiche der preCol D-Kollagendomäne wurden eine geringe Stabilität und damit eine lockere Helixpackung vorhergesagt. Diese Abschnitte der Tripelhelix sind möglicherweise flexibler und ermöglichen somit einen sterisch erleichterten Übergang zu den eher rigiden,  $\beta$ -Struktur-reichen flankierenden Domänen. Während der carboxyterminale Teil der Kollagendomänen von preCol P und NG eher destabilisierende Triplets enthält, finden sich im aminoterminalen Bereich stabilisierende Tripeptide.

Die Sequenzanalysen zeigen, dass in den Kollagendomänen der preCols neben stabilen, enggepackten Bereichen auch Sequenzabschnitte auftreten, die für eine lockere, flexible Tripelhelix sprechen. Somit könnte die gebildete Tripelhelix sowohl eine 10/3- als auch eine 7/2-Helixsymmetrie aufweisen. Folglich ist eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Röntgenbeugungsmuster hinsichtlich der Helixsymmetrie für den distalen Byssusfaden nicht möglich und repräsentiert eine Mischung beider Symmetrien.

#### *4.2.1.2 Auswirkungen von Abweichungen im Triplettmuster GlyXaaYaa auf die tripelhelikale Struktur*

Die Aminosäuresequenz der preCol-Kollagendomäne enthält Triplets mit einer vom charakteristischen Motiv GlyXaaYaa abweichenden Sequenz. Wie in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.2.3.3), können dabei sowohl Gly-Deletionen als auch Insertionen und Gly-Substitutionen (Tab. 4-III) auftreten.

Abweichungen im Triplettmuster können tiefgreifende Auswirkungen auf Struktur und Stabilität der preCol-Tripelhelix an den entsprechenden Stellen haben. Aufgrund der Beständigkeit dieser Bereiche gegenüber Degradation (Qin et al., 1997) und Strukturmodellierungen an Sequenzen der Einzelstränge (Qin & Waite, 1998), sowie AFM-Untersuchungen an Querschnitten des proximalen Fadens (Hassenkam et al., 2004) wird davon ausgegangen, dass diese Abweichungen in einem Homotrimer Knicke im Molekül verursachen (Coyne et al., 1997; Harrington & Waite, 2008b; Qin & Waite, 1998; Qin et al., 1997; Waite et al., 1998; Waite et al., 2002).



**Tab. 4-III Abweichungen vom charakteristischen Triplet-Seqenzmotiv in der preCol-Kollagendomäne der publizierten und cDNA-Bank-basierenden Sequenzen**

| preCol    | Triplettnummer     |              |                   |           |                |       |              |           |
|-----------|--------------------|--------------|-------------------|-----------|----------------|-------|--------------|-----------|
|           | 11                 | 12           | 15                | 29/31     | 32             | 38/40 | 55           | 150       |
| <b>D</b>  | Lucas et al., 2002 | Gly173Ser    | Xaa/ Yaa-Deletion | Gly184Asp | Insertion: Pro |       | Gly-Deletion | Gly601Arg |
|           | cDNA-Bank          | Gly173Ser    | Xaa/ Yaa-Deletion |           | Insertion: Pro |       | Gly-Deletion | Gly607Arg |
| <b>NG</b> | Lucas et al., 2002 | Gly-Deletion |                   |           | Gly318Asp      |       | Gly387Arg    |           |
|           | cDNA-Bank          | Gly-Deletion |                   |           |                |       |              |           |
| <b>P</b>  | Lucas et al., 2002 | Gly-Deletion |                   |           |                |       |              |           |
|           | cDNA-Bank          | Gly-Deletion |                   |           |                |       |              |           |

Unterbrechungen im GlyXaaYaa-Motiv wurden an Modellpeptiden eingehend untersucht. Peptide mit einer Deletion des Hyp in Yaa-Position bildeten in einem Homotrimer eine reguläre Tripelhelix mit 10/3-Symmetrie vor und nach der Deletionsstelle ohne Knicke oder Biegungen des Moleküls. Der Bereich der Deletion wies eine flexiblere Helixfaltung mit veränderten Torsionswinkeln und Wasserstoffbrücken auf (Bella et al., 2006). Auch Studien an Peptiden mit einer Gly→Ala-Substitution (Bella et al., 1994) ergaben, dass die stabförmige tripelhelikale Konformation nicht durch die Substitution beeinflusst wurde. An der Substitutionsstelle zeigt die Tripelhelix eine lokale Entwindung, wobei die direkten intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen durch interstitielle Wasserbrücken ersetzt werden. Wie stark der destabilisierende Effekt einer Gly-Substitution ist, hängt von der jeweiligen Aminosäure ab. Dabei gilt für die destabilisierende Wirkung: Ala, Ser < Cys < Arg < Val < Glu, Asp (Beck et al., 2000).

Generell zeigen diese Studien, dass die allgemeine tripelhelikale Struktur in einem Homotrimer durch Unterbrechungen des Tripletmusters nicht zwangsläufig zu einem Knick im Molekül führt. Dabei spielen auch die umliegenden Sequenzen eine entscheidende Rolle. Wirken diese stabilisierend auf die Struktur, kann der Bereich der Unterbrechung kompensiert werden. Die Analyse der Lokalisierung stabiler tripelhelikaler Sequenzabschnitte in der preCol-Kollagendomäne zeigt, dass sich die Gly-Deletionen im 11. Triplet von preCol P und NG sich in Bereichen einer stabilen Tripelhelix befinden. Die Faltung der umliegenden Bereiche könnte somit das Fehlen eines Gly ausgleichen,

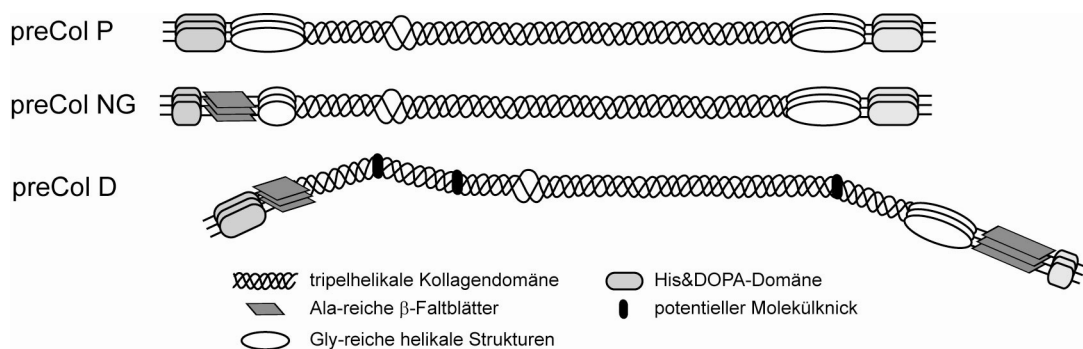
wobei die Tripelhelix an der Deletionsstelle vermutlich eine voluminösere Packung zeigen würde.

Grundsätzlich ist es möglich, dass, unter der Annahme, preCol-Moleküle bilden Homotrimere, die Unterbrechungen im GlyXaaYaa-Motiv bei der Faltung in eine tripelhelikale Struktur kompensiert werden können und keine Molekülknicke oder -biegungen verursachen. Falten jedoch die Einzelstränge stark versetzt zueinander, so dass die Regionen mit der abweichenden Aminosäuresequenz nicht auf einer Höhe liegen, kann die so entstehende Spannung im Molekül zur Ausbildung eines Knickes führen. Bisher liegen jedoch keine Informationen über den Proteinfaltungsmechanismus der preCols vor. Ferner existieren keinerlei Belege, dass es sich bei den preCol-Molekülen tatsächlich um Homotimere handelt.

Den alleinigen Hinweis auf eine „geknickte“ Fibrillenmorphologie stellen publizierte AFM-Untersuchungen am proximalen Byssusfaden (Hassenkam et al., 2004) dar. Hier wurde eine Fibrillen-Topographie mit zwei Erhebungen beobachtet, was drei Molekülknicken entsprechen würde. Die Autoren postulierten, dass die detektierten Fibrillenbündel preCol NG zugeordnet werden können, da diese laut Aminosäuresequenz drei Abweichungen im Triplettmuster der Kollagendomäne besitzt, was laut computergestützter Strukturmodellierung (Qin & Waite, 1998) zu drei Molekülknicken führen könnte. Weitere Topographien, die preCol P und D entsprechen, wurden nicht beobachtet. Die Hypothese, dass preCol NG drei Molekülknicke besitzt, ist jedoch äußerst fragwürdig, da Vergleiche der Aminosäuresequenzen der veröffentlichten Daten zu preCol D, P und NG (Lucas et al., 2002) mit denen der aus der cDNA-Bank isolierten Sequenzen zeigen, dass in preCol NG keine Aminosäureaustausche von Gly→Asp (32. Triplet) bzw. Gly→Arg (55. Triplet) vorliegen (Tab. 4-III). Auch die cDNA-Bank-basierte Aminosäuresequenz von preCol D enthält im 15. Triplet keine Gly-Substitution. Das GlyXaaYaa-Motiv ist in diesen Bereichen vollständig intakt. Höchstwahrscheinlich war die Auswertung der publizierten Sequenzdaten fehlerhaft, was dazu führte, dass durch Fehlinterpretation einer einzelnen Base, wie im Falle Gly und Arg, eine Gly-Substitution angenommen wurde. Treten in den entsprechenden Triplets keine Gly-Substitution auf, sind die Strukturmodellierungen zu den Molekülknicken der preCols ungenau und die angenommenen Dimensionen, die unter anderem den AFM-Messungen am proximalen Byssusfaden (Hassenkam et al., 2004) zugrunde gelegt wurden, sind nicht korrekt. Dennoch zeigen die Sequenzanalysen auch, dass andere Unterbrechungen im

Triplettmuster, insbesondere im Bereich des 11. Triplett, konserviert sind, da diese sowohl in den publizierten als auch den cDNA-basierten Sequenzen auftreten.

Basierend auf den aus der cDNA-Bank isolierten preCol-Aminosäuresequenzen und den hier besprochenen Annahmen zum Einfluss der Triplettssequenzen auf die Struktur der Tripelhelix ergibt sich, unter der Annahme der Ausbildung von Homotrimeren, eine Neuinterpretation der Struktur der preCol-Kollagendomäne (Abb. 4-4). Diese faltet somit in eine Tripelhelix, in der sowohl dichte, stabile Bereiche neben Abschnitten lockerer, relaxierter Helixpackung vorliegen. Es ist anzunehmen, dass bei preCol P und NG die Gly-Deletion im 11. Triplett durch eine stabile Helixfaltung der umliegenden Bereiche kompensiert wird und die Tripelhelix an dieser Stelle eine voluminöse Konformation zeigt, was eine höhere konformationelle Freiheit und somit eine höhere Flexibilität in dem Bereich ermöglicht.



**Abb. 4-4 Neuinterpretation der Morphologie der preCol-Kollagendomäne aufgrund der cDNA-Bank-basierten preCol-Sequenzen**

Die Kollagendomäne von preCol D enthält dagegen vier potentielle Bereiche, bei denen ein Molekülknick der Tripelhelix nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Gly→Ser-Substitution im 11. Triplett würde die Struktur zwar nicht destabilisieren, da jedoch diese direkt von einer Gly-Deletion gefolgt wird und in einem Bereich mit lockerer tripelhelikaler Struktur liegt, zeigt dieser Bereich möglicherweise eine stark relaxierte Konformation, was gegebenenfalls zu einem Molekülknick führen könnte. Die Pro-Insertion im 31. Triplett und die Gly-Deletion im 40. Triplett führen möglicherweise zu einem Entwinden der Tripelhelix aufgrund sterischer Spannung und verleihen diesen Bereichen somit mehr Flexibilität. Die Gly-Deletion könnte aber auch wie im Fall von preCol P bzw. NG kompensiert werden. Eine Gly→Arg-Substitution wie im 155. Triplett der preCol D-Kollagendomäne wirkt sich eher destabilisierend auf. Da sich diese

Abweichung vom Triplettmuster in einem Bereich mit lockerer tripelhelikaler Struktur befindet, ist an dieser Stelle ein Molekülknick nicht auszuschließen.

#### 4.2.1.3 *Hydratation tripelhelikaler Strukturen*

Die mechanischen Zugmessungen (Kapitel 3.2) zeigen, dass der Hydratationsgrad des Byssusfadens einen wesentlichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Materials hat, und diesem neben einer geringeren Steifigkeit eine höhere Dehnbarkeit und gleichbedeutend eine höhere Zähigkeit verleiht. Wasser agiert demzufolge als Weichmacher und ein Übergang vom dehydrierten (starr) zum hydrierten Zustand (weich) kann aus materialwissenschaftlicher Sicht als Glasübergang gewertet werden. Der Wassergehalt hydrierter Fäden beträgt 70 % (Waite et al., 2002), während TGA-Analysen dehydrierter Byssusproben zeigen, dass ein Masseanteil des Fadens von ca. 10 % assoziiertem Wasser entsprechen (Kapitel 3.3.4, Tab. 3-IV). Dies weist darauf hin, dass Wasser in unterschiedlichen Formen vorliegen kann.

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von Querschnitten des distalen Fadenteils zeigten neben einer regelmäßige Anordnung der Fibrillen im Fadenkern, dass diese durch Hohlräume unterbrochen wurden (Bairati & Vitellaro Zuccarello, 1976), welche als Speicherreservoirs für freies, unstrukturiertes Wasser dienen könnten. Darüber hinaus bildet Wasser definierte Hydrathüllen in Assoziation mit Tripelhelices (Brodsky & Ramshaw, 1997). Strukturanalysen zur Kristallstruktur tripelhelikaler Modellpeptide zeigten eine hochgeordnete Wasserstruktur, welche zur Stabilität der einzelnen Peptidstränge und der tripelhelikalen Trimere ebenso beiträgt wie zur Quervernetzung benachbarter Tripelhelices. Wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindungen werden von freien Carbonyl-, Amid- und Hydroxylgruppen ausgebildet, wobei die Anwesenheit von Hyp eine entscheidende Rolle spielt. Somit ergeben sich unterschiedliche Wasserhüllen um Tripelhelices (Bella et al., 1995): 1) Direkt an die Tripelhelix gebundenes Wasser vernetzt intra- und intermolekular Carbonylgruppen miteinander oder mit einer OH-Gruppe von Hyp. 2) Wassermoleküle der zweiten Schicht interagieren mit denen der direkt gebundenen und füllen Gruben und Furchen der Tripelhelix auf. 3) Die dritte Schicht umhüllt die Tripelhelix komplett und vermittelt Wechselwirkungen mit dem Wassernetzwerk benachbarter Tripelhelices. Somit reguliert der Wasserzylinder um die Tripelhelix den Abstand zur benachbarten und verleiht den

einzelnen Molekülen eine gewisse Flexibilität und Bewegungsfreiheit (Miles & Ghelashvili, 1999).

#### 4.2.2 Die flankierenden Domänen der preCols

Die Ergebnisse der FTIR-spektroskopischen Untersuchungen des Byssusfadens weisen darauf hin, dass die Proteine des proximalen Fadenteils einen hohen  $\alpha$ -helikalen Strukturanteil besitzen (Kapitel 3.4.2.1 Abschnitt Sekundärstrukturbestimmung anhand der Amid I- und II-Bande). Dies kann zum einen auf das Matrixprotein PTMP-1 zurückgeführt werden, welches einen Anteil von 33 % am Proteingehalt des proximalen Fadens besitzt (Waite et al., 2002) und eine vorwiegend  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur ausbildet (persönliche Kommunikation Michael Suhre). Zum anderen kann die detektierte helikale Struktur den preCol-Proteinen P und NG zugeschrieben werden.

Alle preCols enthalten Sequenzbereiche, welche die Kollagendomäne flankieren und deren Aminosäuresequenzen Homologien zu anderen Strukturproteinen aufweisen. Die flankierenden Domänen des preCol Ps beinhalten Aminosäuremotive der Sequenz XaaGlyXaaProGly, wobei Xaa den hydrophoben Aminosäuren Gly, Ala, Phe, Ile und Val entsprechen (Coyne et al., 1997). Diese Aminosäuren neigen zur Ausbildung von helikalen Strukturen (Fraser & MacRae, 1973c; Persikov et al., 2000). Neben der Ähnlichkeit dieses Motivs zur typischen repetitiven Aminosäureabfolge ValGlyValProGly des Elastins finden sich auch Übereinstimmungen zur Sequenz GlyProGlyGlyXaa der Flagelliform-Spinnenseide (Coyne et al., 1997; Waite et al., 2002), welche die Elastizität der Fangspirale eines Radnetzes vermittelt. Diese Sequenzmotive können in helikale Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Spiralen falten (Hayashi & Lewis, 2001; Vrhovski & Weiss, 1998). Darüber hinaus enthalten die flankierenden Bereiche des preCol Ps Ala-reiche Bereiche und GlyGlyXaa-Wiederholungen (Xaa entspricht vorwiegend hydrophoben Aminosäuren wie Leu oder Val), welche ebenfalls bevorzugt eine helikale Konformation ausbilden (Fraser & MacRae, 1973b; Persikov et al., 2000).

Die flankierenden Bereiche des preCol NGs enthalten neben polyAla-Motiven auch Wiederholungen der Sequenz XaaGly<sub>n</sub>, wobei Gly ein- bis dreimal vorkommen kann und Xaa ebenfalls hydrophoben Aminosäuren wie Ala, Leu, Val und Phe entspricht, welche helikale Strukturen wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Schleifen bilden können (Qin & Waite, 1998; Waite et al., 1998). Diese Charakteristika kommen auch in Gly-reichen Proteinen von Pflanzenzellwänden (Condit & Meagher, 1986) und Trematoden-Eierschalen (Bobek et

al., 1988) vor. Ala-reiche Sequenzen falten üblicherweise entropisch bevorzugt in eine  $\alpha$ -helikale Struktur (Fraser & MacRae, 1973a; Pace & Scholtz, 1998). Allerdings können Scherkräfte wie beim Verspinnen von Spinnenseide (Knight et al., 2000) oder möglicherweise beim Bildungsprozess des Byssusfadens (Kapitel 1.2.2) eine Konformationsänderung zu  $\beta$ -Faltblättern induzieren. Da preCol NG nicht graduell über den Byssusfaden verteilt ist, könnten die Ala-reichen Sequenzen der flankierenden Domänen, welche im proximalen Fadenteil vorliegen, in eine  $\alpha$ -helikale Struktur falten, während die preCol NG-Domänen des distalen Fadenteils  $\beta$ -Faltblätter ausbilden. In biologischen Materialien wie Elastin und Resilin spielen helikale Proteinstrukturen eine wesentliche Rolle in der Vermittlung elastischer Eigenschaften. Die Ausbildung helikaler Konformationen in den flankierenden Domänen von preCol P und NG trägt somit maßgeblich zur Elastizität des proximalen Byssusfadenteils bei.

Für den distalen Byssusfadenteil wurde in FTIR-spektroskopischen Analysen ein hoher Anteil  $\beta$ -strukturierter Konformationen wie  $\beta$ -Faltblätter und  $\beta$ -Schleifen detektiert (Kapitel 3.4.2.1). Darüber hinaus deuten Absorptionen im Wellenzahlbereich von 800-1100  $\text{cm}^{-1}$  (Kapitel 3.4.2.1, Abschnitt Amid III- und Fingerprint-Region) auf die Anwesenheit von  $\beta$ -Faltblättern hin, die von polyAla-Sequenzen und Gly-reichen Strukturen gebildet werden können (Tab. 3-VII). Im distalen Byssusfaden entsprechen 96 % des gesamten Proteingehalts den preCols D und NG (Waite et al., 2002). Folglich kann der Anteil des Matrixproteins TMP (Sagert & Waite, 2009), dessen Struktur bisher unbekannt ist, an den detektierten Proteinstrukturen vernachlässigt werden.

Die flankierenden Domänen des preCol NG können, wie oben besprochen, sowohl helikale als auch  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausbilden. PreCol D hingegen enthält eine hohe Zahl an Ala-reichen Sequenzen, welche durch Bereiche von mindestens fünf Aminosäuren voneinander getrennt sind und voluminöse, polare Aminosäuren wie Gln und Arg enthalten. Möglicherweise wirken diese durch gegenseitige elektrostatische Wechselwirkungen stabilisierend und vergrößern zudem den Abstand zwischen den Faltblättern. Des Weiteren kommen in den flankierenden Domänen von preCol D auch sich wiederholende GlyGlyXaa-Motive mit vornehmlich hydrophoben Aminosäuren wie Ala, Leu und Phe in Xaa-Position (Qin et al., 1997) vor. Beide Sequenzmotive sind die Hauptcharakteristika der Spinnenseidenproteine des Abseilfadens und vermitteln hier eine entsprechende Zugfestigkeit des Materials (Scheibel, 2004). In Spinnenseidenproteinen bilden polyAla-Motive mikrokristalline  $\beta$ -Faltblätter, während die Gly-reichen Bereiche

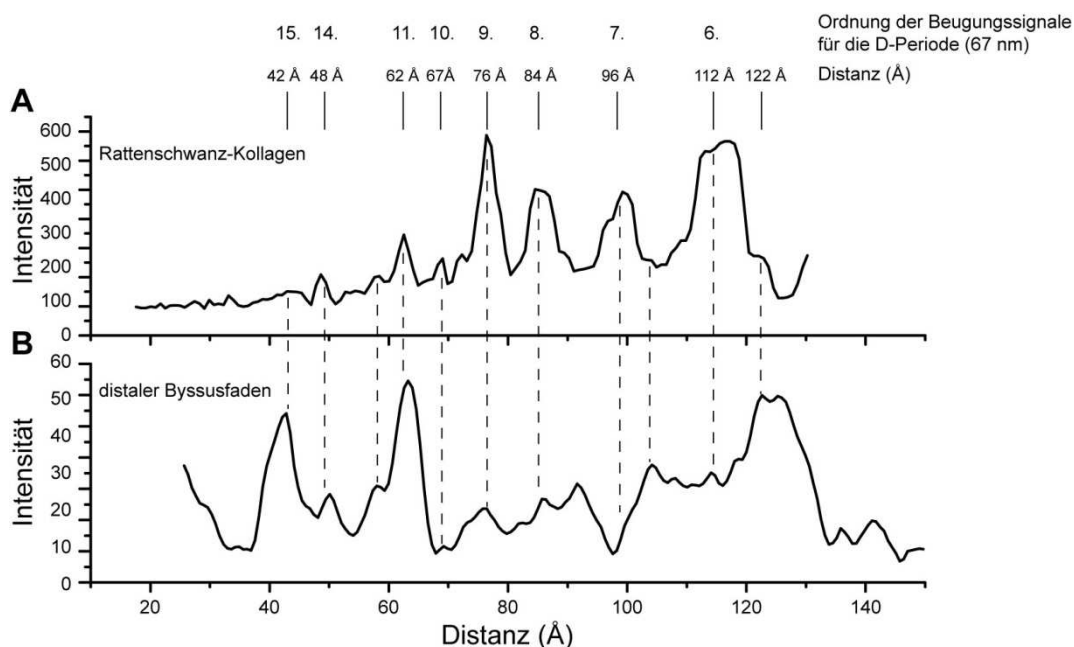
sowohl in  $\beta$ -Faltblätter involviert sein können aber auch in Konformationen wie eine  $3_1$ -Helix falten (van Beek et al., 2002). In den FTIR-spektroskopischen Analysen des distalen Byssusfadens wurde eine Absorption bei  $966\text{ cm}^{-1}$  detektiert, was darauf hin deutet, dass die Ala-reichen Sequenzen eine dicht gepackte  $\beta$ -Faltblatt-Struktur ausbilden. Darüber hinaus lässt eine IR-Bande bei  $1015\text{ cm}^{-1}$  den Schluss zu, dass Gly-reiche Motive in eine polyGly I-Faltblattstruktur falten (Kapitel 3.4.2.1, Abschnitt Amid III- und Fingerprint-Region). Das Vorhandensein von  $\beta$ -Faltblättern im distalen Byssusfaden wird zudem von Röntgenbeugungsanalysen bestätigt (Kapitel 3.4.5). Dabei können die erhaltenen nicht-kollagenen Signale den Distanzen in  $\beta$ -Faltblättern zugeordnet werden. Ein *off*-meridionales Signal bei  $3,8\text{ \AA}$  kann dem Abstand zwischen  $C_\alpha$ -Atomen des Peptidrückgrats in  $\beta$ -Faltblättern entsprechen (Fraser & MacRae, 1973c), während äquatoriale Beugungsmuster mit einer Distanz von  $5,8\text{ \AA}$  dem intermolekularem Abstand zwischen gestapelten  $\beta$ -Faltblättern zugewiesen werden können (Fraser & MacRae, 1973c). Der hohe  $\beta$ -Faltblattanteil erhöht die Rigidität der flankierenden Domänen des preCol Ds und trägt vergleichbar zu den Spinnenseidenproteinen des Abseilfadens zur Steifigkeit des distalen Byssusfadens bei.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen das Vorhandensein elastischer helikaler Proteinstrukturen im proximalen und steifer  $\beta$ -Faltblattstrukturen im distalen Fadenteil, und unterstützen damit die Hypothese früherer Publikationen, dass die flankierenden Domänen der preCols einen wesentlichen Faktor bei der Vermittlung der mechanischen Eigenschaften der einzelnen Byssusfadenteile darstellen (Harrington & Waite, 2008a; Waite et al., 1998).

#### **4.2.3 Die Anordnung der preCol-Moleküle im Byssusfaden**

Röntgenbeugungsanalysen entlang des Byssusfadens zeigen, dass der distale Fadenteil parallel zur Fadenachse ausgerichtete, hochorientierte Strukturen besitzt, während im proximalen Teil eine geringe Orientierung der Strukturen vorliegt (Kapitel 3.4.5). Die geringe Orientierung im proximalen Fadenteil kann zurückgeführt werden auf eine wellenförmige Anordnung der Fibrillen im Kern des proximalen Fadens (Bairati & Vitellaro Zuccarello, 1976; Qin & Waite, 1995). Dadurch sind die Proteinstrukturen nicht entlang einer Vorzugsrichtung ausgerichtet und eine Beugung der Röntgenstrahlung erfolgt willkürlich, was sich in einem Beugungsmuster mit diffusen, ungerichteten Signalen widerspiegelt.

Neben Aussagen über die Struktur und Ausrichtung der preCol-Kollagendomäne bzw. den flankierenden Bereichen geben die Röntgenbeugungsanalysen Hinweise auf die lineare Anordnung der preCol-Moleküle. Meridionale Signale bei kleinen Beugungswinkeln weisen auf eine periodische Anordnung der preCols vergleichbar zur D-Periode von Typ I-Kollagenfibrillen (Kapitel 3.4.5) hin. Die D-Periode kennzeichnet das in transmissions-elektronenmikroskopischen Aufnahmen detektierbare, gebänderte Muster von Kollagenfibrillen, welches aus der versetzten Assemblierung von Tropokollagen-Molekülen resultiert. Nach abgeschlossener Modifikation und Quervernetzung entstehen dabei elektronenreiche (Überlapp-Region) und elektronenarme (Lücken-Region) Bereiche, welche die D-Periode mit einer Dimension von 67 nm (670 Å) bilden (Abb. 1-1) (Antipova & Orgel, 2009; Shoulders & Raines, 2009). Der direkte Vergleich der Beugungssignale des distalen Byssusfadens mit den Daten von Rattenschwanz-Kollagen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Joseph P.O.R. Orgel, Pritzker Institute of Biomedical Science and Engineering Illinois, Illinois Institute of Technology, Chicago, IL, USA) zeigt, dass ein Großteil der meridionalen Beugungssignale von Kollagenfibrillen auch beim distalen Byssusfaden detektiert und den einzelnen Ordnungen der D-Periode zugeordnet werden können (Abb. 4-5).



**Abb. 4-5 Vergleich der meridionalen Signale bei kleinen Beugungswinkeln von Rattenschwanz-Kollagen (A) und distalen Byssusfaden (B)**

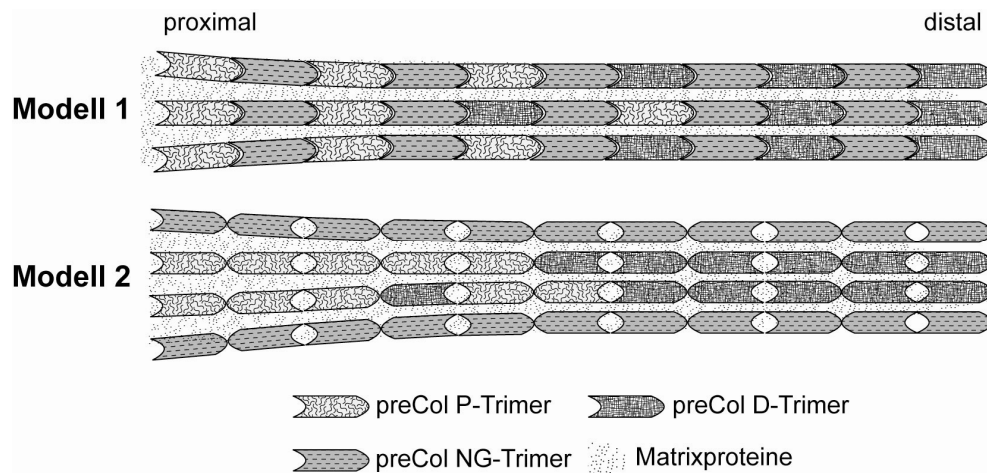
Die wichtigsten Beugungssignale sind gekennzeichnet, und die jeweiligen Distanzen sowie die entsprechende Ordnung der Beugungssignale sind entsprechend der D-Periode von Typ I-Kollagenfibrillen zugeordnet.



Lediglich die Intensitäten der Signale unterscheiden sich. Während bei Rattenschwanz-Kollagen für die Signale mit den Distanzen 62 Å, 76 Å, 84 Å, 96 Å und 112 Å die höchste Intensität erhalten wurde, gilt dies bei den Beugungsmustern der distalen Fäden nur bei den Distanzen von 42 Å, 62 Å und 122 Å.

Zur exakten Anordnung der preCol-Moleküle im Byssusfaden gibt es bisher nur wenige Informationen. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Byssusfadenskern aus langgestreckten, entlang der Fadenachse ausgerichteten Fibrillen mit einem Durchmesser von ca. 70 nm bestehen (Kapitel Abb. 3-5). Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des Fadens dokumentieren bei höherer Vergrößerung Filamente, die einen Durchmesser von 7 nm besitzen und im Querschnitt eine hexagonale Anordnung mit einem Abstand von 20-23 nm zwischen den Zentren benachbarter Filamente zeigen (Bairati & Vitellaro Zuccarello, 1976). Darüber hinaus belegen Studien an Drüsenzellen des Muschelfußes die Anwesenheit von vorgeformten Filamenten mit einem Durchmesser von 7-9 nm in sekretorischen Vesikeln (Zuccarello, 1980). Diese zeigen eine Anordnung der Form "6+1", was einem hexagonalen Arrangement von sechs preCol-Trimeren und einem weiteren im Zentrum entspricht. Es wird angenommen, dass diese 6+1-Filamentbündel eine Bananen-förmige Morphologie mit einer Länge von 200 nm ausbilden (Hassenkam et al., 2004).

Für die Anordnung der preCol-Moleküle existieren zwei Modelle (Waite et al., 2002). Modell 1 sieht eine Assemblierung der preCol-Trimere in C→N-Orientierung vor, wobei die carboxyterminale His&DOPA-Domäne des einen preCols mit der aminoterminalen des benachbarten interagiert. Dabei arrangieren sich preCol D bzw. P-Trimere, gemäß ihrer graduellen Verteilung, abwechselnd mit preCol NG-Trimere parallel zur Byssusfadenachse (Abb. 4-6 A).



**Abb. 4-6 Modelle zur Anordnung der preCol-Trimere im Muschelbyssusfaden**

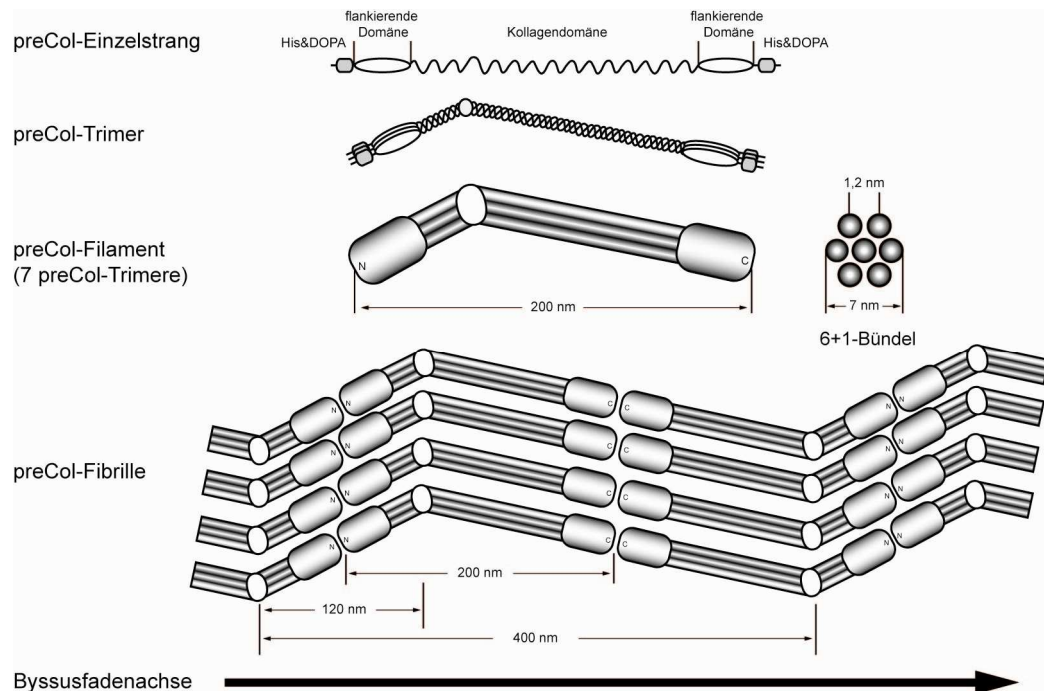
Modell 1: Arrangement in C→N-Orientierung, Modell 2: Assemblierung in C→C- bzw. N→N-Orientierung. Der Anteil an Matrixproteinen nimmt jeweils zum distalen Teil hin ab.

Während bei Modell 1 immer kurze und lange Domänen jeweils miteinander interagieren, trifft dies bei einer C→C- bzw. N→N-Orientierung nicht zu. Somit sieht Modell 2 eine lineare Assemblierung von preCol P und D entsprechend ihres Verteilungsgradienten und preCol NG mit sich selbst vor (Abb. 4-6 B). Für Modell 2 sprechen die Ergebnisse der AFM-Studien am proximalen Byssusfaden (Hassenkam et al., 2004). Hier wurde eine Topographie detektiert, deren Dimensionen denen des Modells 2 entsprechen. Darüber hinaus wurde in den Analysen am ungestreckten Byssusfaden eine 25°-Neigung der Fibrillen bezüglich der Fadenachse detektiert, was sterisch nur bei einer Assemblierung gemäß Modell 2 möglich ist.

Im Gegensatz zur D-Periode bei Kollagenfibrillen setzen diese beiden Modelle eine nicht-versetzte Assemblierung der preCols voraus. Die in Röntgenbeugungsanalysen detektierte Periodizität entlang des distalen Byssusfadens kann demzufolge auf die regelmäßige Aufeinanderfolge struktureller Einheiten wie globulärer Domänen bzw. Molekülknicken zurückgeführt werden. Legt man, trotz aller Zweifel an der Richtigkeit der Interpretation der AFM-Studien am proximalen Faden, die Dimensionen für die detektierte Fibrillenmorphologie zu Grunde (Hassenkam et al., 2004) und nimmt an, dass die preCols nach Modell 2 assemblieren, ergibt sich für aufeinanderfolgende globuläre Bereiche ein Abstand von ca. 200 nm, wobei Molekülknicke im Abstand von 120 nm, 280 nm bzw. 400 nm erfolgen würden (Abb. 4-7 preCol-Fibrillen). Die meridionalen Signale bei 42 Å, 62 Å und 122 Å für den distalen Byssusfaden könnten somit dem Beugungsmuster dieser Abstände entsprechen. Eine Erweiterung dieses Modells sieht eine Assemblierung der preCol-Moleküle gemäß ihrer Verteilung zu Fibrillenbündeln mit mehr als 100 nm

Durchmesser vor, welche sich, separiert durch Matrixproteine, lateral leicht versetzt anordnen (Sagert & Waite, 2009).

Anhand der Ergebnisse und Betrachtungen der vorliegenden Arbeit zur Struktur der einzelnen preCol-Domänen und deren linearer Anordnung ergibt sich zusammenfassend ein Modell zum hierarchischen Aufbau der preCols im Byssusfaden (Abb. 4-7). Drei preCol-Einzelstränge formen unter Ausbildung einer stabförmigen Tripelhelix im zentralen Bereich des Moleküls ein preCol-Trimer, dessen carboxy- und aminoternale Enden globuläre Domänen mit helikalen und  $\beta$ -Faltblattstrukturen enthalten. Die tripelhelikale Domäne enthält darüber hinaus Abschnitte mit einer vom Triplettmuster abweichenden Sequenz, was zu einer erhöhten Flexibilität der Tripelhelix in diesem Bereich führt und eine Biegung der Kollagendomäne verursachen könnte. Sieben preCol-Trimere assemblieren zu einem hexagonalen 6+1-Filamentbündel, welche in C $\rightarrow$ C- bzw. N $\rightarrow$ N-Orientierung parallel zur Byssusfadenachse assemblieren. Bei dieser Anordnung würden Knicke bzw. Bereiche relaxierter tripelhelikaler Struktur jeweils nebeneinander liegen und eine Stapelung der  $\beta$ -Faltblätter wäre gegeben. Darüber hinaus ermöglicht diese Assemblierung die Ausbildung lateraler Disulfidbrücken.



**Abb. 4-7 Schema zum hierarchischen Aufbau der preCol-Moleküle im Byssusfaden**

Bereiche der preCol-Kollagendomäne mit vom Triplettmuster GlyXaaYaa abweichender Sequenz werden als flexible Molekülabschnitte betrachtet, die möglicherweise zu einer Biegung der kollagenen Tripelhelix führen.

Basierend auf den vorliegenden Kenntnissen wäre nach diesem Modell die Fibrillen-Assemblierung lediglich für preCol P- und NG-Filamente denkbar. Aufgrund der unterschiedlichen Dimensionen und Morphologien der preCol-Kollagendomänen von preCol D und NG wäre bei einer lateralen Anordnung gemäß Modell 2 eine dichte Packung der Trimere nicht gegeben. Dies führt zu der Hypothese, dass möglicherweise die preCol-Filamente zu homomeren statt, wie in Modell 2 vorgesehen, heteromeren Fibrillen assemblieren, was somit ein regelmäßiges laterales Arrangement der einzelnen Domänen der preCol-Trimere erlaubt. Demnach ordnen sich in der nächsten Hierarchie-Ebene, eingebettet in die entsprechenden Matrixproteine, abwechselnd preCol D- bzw. P-Fibrillen mit preCol NG-Fibrillen nebeneinander an. Ein Gradient der Proteine preCol P und D wäre dann vermutlich über eine graduelle Verteilung einzelner Fibrillen gegeben.

### **4.3 Struktur-Funktionsbeziehung im distalen Muschelbyssusfaden**

Nach eingehender Betrachtung der Struktur und des Arrangements der preCol-Proteine, stellt sich die Frage, welche der strukturellen Elemente des Byssusfadens dessen mechanische Eigenschaften vermitteln.

Die Infrarot-Spektroskopie eignet sich dabei als Methode zur Untersuchung der Effekte äußerer mechanischer Belastung auf der Ebene der Molekülschwingungen. Wird an einem Material gezogen, erfolgt die Weiterleitung der mechanischen Energie bis hin zu den Atombindungen. Entsprechend dem Quantenmechanischen Modell (Papadopoulos et al., 2007; Schwabl, 2002) wird dabei die Molekülschwingung geringfügig beeinflusst, was zu einer Verminderung der Anregungsenergie führt, die zum Erreichen des nächst höheren Schwingungslevels benötigt wird. Somit verschieben sich in einem IR-Spektrum die entsprechenden Absorptionsbanden zu niedrigeren Wellenzahlen. Diese Verschiebung kann direkt proportional zur äußeren mechanischen Belastung erfolgen, wenn die betrachtete Schwingung linear zur Krafteinwirkung ausgerichtet ist. Senkrecht ausgerichtete Vibrationen hingegen sind nur indirekt betroffen und somit kann eine Wellenzahlverschiebung nur qualitativ gewertet werden. Eine Molekülbindung ist dann krafttragend, wenn es bei einer Verschiebung zu niedrigeren Frequenzen gleichzeitig zu einer Erhöhung der Orientierung der Schwingung kommt.

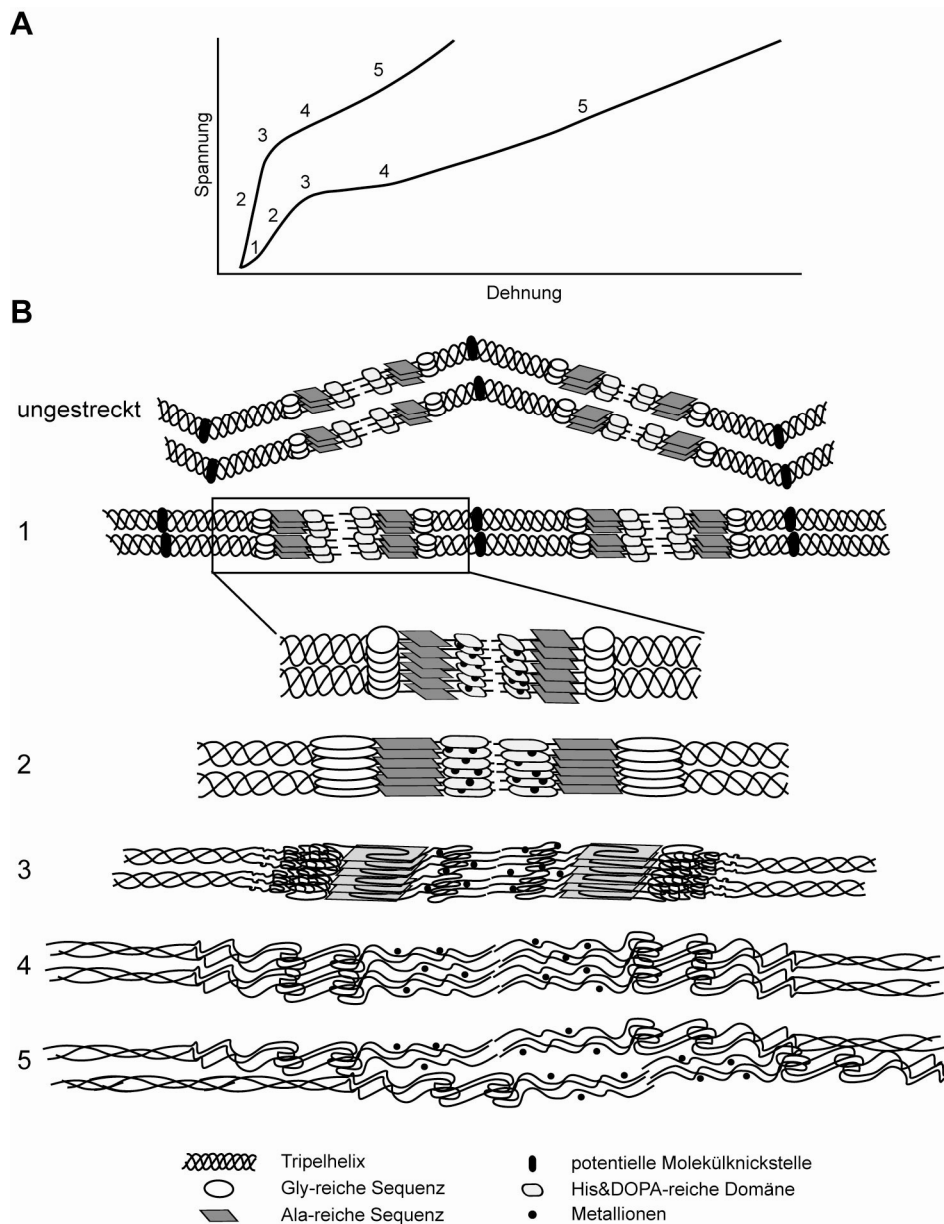
FTIR-spektroskopische Untersuchungen mit polarisiertem IR-Licht an distalen Byssusfäden, die sukzessive bis zum Reißen gestreckt wurden, erlauben die Analyse der

Auswirkungen externer, linearer Krafteinwirkung auf Molekülschwingungen von tripelhelikalen und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (Kapitel 3.4.3). Die Interpretation der Ergebnisse bezieht sich hauptsächlich auf die distalen Proteine preCol D und NG, da der Anteil an Matrix- und Kutikulaproteinen in diesem Fadenteil gering ist. Somit können die Absorptionsbanden bei  $966\text{ cm}^{-1}$  und  $1015\text{ cm}^{-1}$  der Hauptkettenschwingung in den Ala- und Gly-reichen  $\beta$ -Faltblättern der flankierenden Domänen der preCols D und NG zugeordnet werden, während die Absorptionen bei  $1204\text{ cm}^{-1}$  (Peptidbindung),  $1030\text{ cm}^{-1}$  (C-O-Bindung in Hyp) und  $1240\text{ cm}^{-1}$  (N-H-Gruppe der Peptidbindung) Schwingungen der Tripelhelices der preCol-Kollagendomänen entsprechen (Tab. 3-VII). Die aufgeführten Seitengruppen sind in intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken (in einem Einzelstrang bzw. zwischen benachbarten Peptidsträngen einer Tripelhelix) und Wassernetzwerke eingebunden und tragen somit zur Stabilität der Tripelhelix bei.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die C-N-Streckschwingungen der Peptidbindungen in den Tripelhelices der preCol-Kollagendomänen bis zum Reißen des Byssusfadens unter Spannung stehen, während andere Schwingungen ihre krafttragenden Eigenschaften ab einer gewissen Fadenspannung verlieren. Anhand den Ergebnissen der FTIR-spektroskopischen Studien sowie den mechanischen Zugmessungen (Kapitel 3.2), und unter Einbeziehung der Erkenntnisse früherer Veröffentlichungen ergibt sich somit ein qualitatives Modell für die strukturellen Ereignisse im distalen Byssusfaden (Abb. 4-8).

Die Spannungs-Dehnungsdiagramme des distalen Fadens können in fünf Phasen unterteilt werden (Abb. 4-8A). In der ersten Phase werden zunächst bei geringer Fadendehnung Falten des Materials, Biegungen der Fibrillen und mögliche Knicke der Moleküle gestreckt (Abb. 4-8B-1) (Bertoldi & Boyce, 2007; Hassenkam et al., 2004). Die zweite Phase ist gekennzeichnet durch eine hohe Steifigkeit und entspricht dem linear-elastischen Bereich des Byssusfadens. Die FTIR-spektroskopischen Analysen zeigen, dass in dieser Phase sowohl die Ala-reichen  $\beta$ -Faltblättern der flankierenden Domänen der preCols als auch alle Schwingungen der tripelhelikalen Struktur krafttragend sind (Abb. 4-8B-2, Tab. 3-IX). Die Seitengruppenschwingungen der preCol-Kollagendomäne stehen ebenfalls unter Spannung, da sie durch Einbindung in stabilisierende Wasserstoffbrücken ein aneinander Vorbeigleiten der Moleküle verhindern und somit sterisch blockiert sind. Die mechanische Spannung wird direkt auf die Hauptkettenschwingungen der  $\beta$ -Faltblätter der flankierenden Domänen und der preCol-Tripelhelices transferiert, was zu einer

molekularen Streckung der preCol-Kollagendomäne von bis zu 1,7 % führt (Harrington et al., 2009).



**Abb. 4-8 Modell zur Struktur-Funktionsbeziehung beim Strecken eines distalen Byssusfadens bis zum Reißen.**

A) Schematisches Spannungs-Dehnungsdiagramm von hydrierten und dehydrierten distalen Byssusfäden, B) Molekulare Auswirkungen auf preCol-Trimere in den einzelnen Phasen mechanischer Belastung . 1 – Strecken von Falten, Fibrillenbiegungen und Molekülknicken, 2 – Molekulares Strecken der tripelhelikalen preCol-Kollagendomäne und der globulären flankierenden preCol-Domänen. 3 – Das Auflösen von His-Metall-Chelatkomplexen und die Entfaltung globulärer Domänen ermöglicht am *Yield*-Punkt eine effektive Kraftdissipation. 4 – Die flankierenden Domänen sind komplett entfaltet, während die Hauptketten der preCol-Kollagendomänen maximal gestreckt und weiterhin krafttragend sind. Mit Erreichen der mechanischen Belastungsgrenze brechen jedoch die intermolekularen Wasserstoffbrücken in den Tripelhelices. 5 – In hydrierten Byssusfäden vermittelt Wasser vermutlich ein aneinander Vorbeigleiten der Moleküle und Fibrillen. Sobald die molekulare Reibung die Kapazität des Materials überschreitet, reißt der Byssusfaden.

(nach Hagenau et al., 2011 mit Erlaubnis des Verlags Elsevier)

Leider konnten in den FTIR-Studien keine Aussagen über die helikalen Gly-reichen Bereiche der flankierenden Domänen getroffen werden, da die Absorptionsbande für polyGly II-Helices bei  $1030\text{ cm}^{-1}$  von der C-O-Schwingung des Hyp in Tripelhelices überlagert wurde. Dennoch ist anzunehmen, dass in der zweiten Phase diese helikalen Bereiche auseinandergezogen werden (Bertoldi & Boyce, 2007).

Nach dem linear-elastischen Bereich in der dritten Phase, dem *Yield*-Punkt, ändert sich die Steifigkeit, wobei der Byssusfaden bei geringem Kraftaufwand verlängert wird (Abb. 4-8B-3). In dieser Phase sind die Haupt- und Seitenkettenbindungen der tripelhelikalen preCol-Kollagendomäne weiterhin krafttragend, während die  $\beta$ -Faltblätter der Ala- und Gly-reichen Bereiche der flankierenden Domänen diese Eigenschaft nicht mehr zeigen.

Möglicherweise entfalten diese Bereiche partiell und orientieren sich neu, wodurch die Kraft aufgrund von Molekülverlängerungen dissipiert wird. Modellierungsdaten zu den Auswirkungen äußerer mechanischer Belastung auf die preCol-Moleküle erklären diesen Effekt mit einer Reduzierung der Energiebarriere, welche bei der Entfaltung überwunden werden muss, durch Einwirkung mechanischer Spannung auf die Molekülbindungen (Bertoldi & Boyce, 2007). Darüber hinaus zeigen weitere Studien, dass am *Yield*-Punkt die quervernetzten Histidin-Metall-Chelatkomplexe der Belastung nicht mehr standhalten und brechen (Vaccaro & Waite, 2001). Die His&DOPA-Domänen der preCols entfalten somit ebenfalls, und die intermolekularen Quervernetzungen zwischen benachbarten preCols gehen verloren. Dies führte zu der Hypothese, dass bei den simultanen molekularen Ereignissen am *Yield*-Punkt zunächst die His-Metall-Komplexe in preCol D geschwächt werden, und gleichzeitig die Gly-reichen Regionen der flankierenden Domäne von preCol NG eine Konformationsänderung erfahren. Die Kollagendomänen und  $\beta$ -Faltblattstrukturen der Ala-reichen Bereiche sowie die His&DOPA-Regionen von preCol NG bleiben allerdings weiterhin gefaltet (Harrington & Waite, 2007). Die FTIR-Studien der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch eine sofortige Entfaltung der Ala-reichen  $\beta$ -Faltblätter. Somit ergibt sich eine neue Hypothese für die molekularen Auswirkungen am *Yield*-Punkt. Demnach brechen zuerst die His-Metall-Chelate und die Ala-reichen  $\beta$ -Faltblätter entfalten, während die helikalen Strukturen der Gly-reichen Bereiche maximal gestreckt werden und erst später entfalten. Eine genauere Betrachtung der Effekte auf His-Metall-Chelate mittel FTIR-Spektroskopie war in den vorliegenden Studien leider nicht möglich. PolyHistidine und His-Metall-Komplexe zeigen IR-Absorptionsbanden bei  $1100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$  und mehrere Banden unterhalb  $940\text{ cm}^{-1}$

(Barth, 2000; Khoury & Hellwig, 2009). Während die Intensität der Bande bei  $1100\text{ cm}^{-1}$  zu schwach war, wurde die Bande bei  $1080\text{ cm}^{-1}$  durch Absorptionen von polyPro-Strukturen überlagert. Außerdem zeigte das IR-Spektrum für Wellenzahlen unter  $940\text{ cm}^{-1}$  durch Erreichen des Detektorlimits eine schlechte Auflösung.

Nach dem *Yield*-Bereich (Phase 4) zeigt der distale Byssusfaden eine höhere Steifigkeit (Abb. 4-8B-4). Die Bindungen des Peptidrückgrats der Tripelhelices befinden sich weiterhin unter Spannung. Im Gegensatz dazu verlieren die senkrecht ausgerichteten N-H-Bindungen der Amidgruppe und die C-O-Bindung der Hyp-Seitengruppe bei einer Fadenspannung von 100 MPa ihre krafttragenden Eigenschaften und Orientierung. Diese Gruppen sind, wie bereits erwähnt, in Wasserstoffbrückenbindungen eingebunden. Vermutlich wird in der vierten Phase die Kapazität dieser Quervernetzungen gegenüber mechanischer Belastung erreicht, was zum Aufbrechen der Wasserstoffbrücken führt. Dadurch kommt es zu einer konformationellen Entspannung der N-H- und C-O-Bindungen, wodurch deren Schwingungscharakter verändert wird.

In der fünften Phase (Abb. 4-8B-5) sind die Hauptkettenbindungen der kollagenen Tripelhelices weiterhin krafttragend bis der Byssusfaden reißt. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass die preCol-Kollagendomäne nach Erreichen des Yield-Punktes eine maximale molekulare Dehnung von 2 % aufweist (Harrington et al., 2009). Da der Byssusfaden jedoch eine Dehnung von bis zu 130 % im hydrierten Zustand erreichen kann, spielen vermutlich weitere Prozesse eine entscheidende Rolle. Der Hydratationsgrad hat großen Einfluss auf die Dehnbarkeit der Byssusfäden. Somit stellt Wasser einen wichtigen Faktor bei der Funktionalität des Materials dar und beeinflusst maßgeblich das plastische Deformationsverhalten des Byssusfadens. Wie in Kapitel 4.2.1.3 besprochen bildet Wasser in hydrierten Kollagenmaterialien hochgeordnete, mehrschichtige Wassernetzwerke um die Tripelhelices und wirkt als Quellmittel, indem es sich in Kavitäten des Materials anreichert (Bella et al., 1995). Dies verleiht den Molekülen eine höhere Flexibilität und Mobilität, welche in dehydrierten Materialien aufgrund niedrigerer Entropie nicht gegeben ist („Polymer-in-Box-Theorie“, Miles & Ghelashvili, 1999). In der fünften Phase liegen die meisten nicht-kollagenen Domänen der preCols entfaltet vor, und alle relevanten Quervernetzungen wurden unterbrochen. Folglich kann eine weitere Fadendehnung durch das aneinander Vorbeigleiten der preCol-Fibrillen bzw. den preCol-Trimeren vergleichbar dem von fibrillärem Typ I-Kollagen (Fratzl et al., 1998) verursacht



werden, wobei Wasser als Gleitmittel wirkt. Wird schließlich die mechanische Belastungsgrenze des Materials erreicht, reißt der distale Byssusfaden.

Das Modell zur Struktur-Funktionsbeziehung im distalen Byssusfaden zeigt, dass die preCol-Kollagendomäne die hauptsächlich krafttragende Einheit des Fadens darstellt, und die flankierenden Domänen maßgeblich an der Ableitung mechanischer Spannung beteiligt sind. Neben der Erhöhung der Steifigkeit des Materials durch Struktur motive wie  $\beta$ -Faltblätter in den nicht-kollagenen Bereichen der preCols besitzen diese auch die Fähigkeit durch Domänenentfaltung zur Dehnbarkeit des Byssusfadens beizutragen und somit dessen Zähigkeit zu erhöhen. Das vorliegende Modell bezieht sich allerdings nur auf die Hauptkomponenten des distalen Byssusfadens und berücksichtigt nicht die Beiträge der Matrixproteine und Kutikula zu den mechanischen Eigenschaften. Des Weiteren bleibt offen, welche strukturellen Ereignisse der Funktionsweise des proximalen Fadens zu Grunde liegen, und wie ein Zusammenspiel beider Fadenteile die Funktionalität des Gesamtfadens vermittelt.

## 5 Zusammenfassung

Miesmuscheln (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) sind in der Lage unterschiedliche Habitats zu besiedeln. Ihr Erfolg basiert auf einer einzigartigen Befestigungsweise – dem Muschelbyssus, einem Bündel extrazellulärer Fäden, die sich in einen elastischen proximalen Bereich und einen steifen distalen Fadenteil unterteilen. Die Hauptbestandteile der Byssusfäden bilden fibrillenbildende, kollagenähnliche Multi-domänenproteine, die in eine Proteinmatrix eingebettet sind. Während die Proteine preCol P und preCol D in einem definierten Gradienten in Fäden vorliegen, ist preCol NG homogen über den Faden verteilt.

Die mechanischen Studien der vorliegenden Arbeit geben zum ersten Mal eine umfassende Übersicht zur Mechanik der einzelnen Byssusfadenteile und zeigen, dass der proximale Fadenteil stark elastisch verformbar ist, während der distale Teil eine hohe Steifigkeit und Zugfestigkeit aufweist, wobei der Hydratationsgrad der Fäden eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zähigkeit spielt.

Proteinstrukturanalysen mittels Festphasen-NMR, FTIR-spektroskopischen Methoden und Röntgenbeugung deuten darauf hin, dass die Proteine des Byssusfadens dicht gepackt sind und im proximalen Fadenteil ungeordnet vorliegen, während sie im distalen Teil hochgeordnet parallel entlang der Fadenachse ausgerichtet sind. Neben tripelhelikalen Strukturen wurde im proximalen Fadenteil ein hoher Anteil an  $\alpha$ -helikalen Konformationen detektiert, während im distalen Teil hauptsächlich  $\beta$ -Faltblattstrukturen vorliegen. Die Röntgenbeugungssignale weisen auf eine ausgeprägte Periodizität dichter und weniger dichter Bereiche entlang der Fadenachse ähnlich der D-Periode von fibrillären Kollagenen hin.

In der vorliegenden Arbeit wurden cDNA-Banken von Muschelfüßen erstellt, um die Erbinformationen aller am Bildungsprozess des Byssusfadens beteiligten Proteine zu erhalten. Vergleiche der Sequenzen von preCol-Varianten, welche aus den cDNA-Banken isoliert wurden, mit den publizierten zeigen, dass sich die cDNA-Bank basierten Sequenzen in einzelnen Aminosäurepositionen und durch Insertionen und Deletionen unterscheiden. Diese Erkenntnis und die Analysen der Tripletsequenzen der preCol-Kollagendomänen hinsichtlich der Ausbildung einer stabilen Tripelhelix führten zu einer im Vergleich zu den publizierten Modellen Neuinterpretation der molekularen Struktur der

preCols. Diese bilden in der Kollagendomäne somit Bereiche dicht gepackter, sehr stabiler Tripelhelix aus, während andere Abschnitte eine voluminösere Konformation zeigen. Entgegen der bisherigen Vorstellung wird angenommen, dass die preCols P und NG keine Molekülknicke aufweisen, sondern Bereiche stark relaxierter Tripelhelix enthalten, welche eine höhere Flexibilität des Moleküls in diesem Bereich vermitteln. PreCol D hingegen weist Tripletts mit Substitutionen und Insertionen auf, welche möglicherweise Molekülknicke verursachen können.

Anhand der Sequenzanalysen, den Ergebnissen der Studien am natürlichen Byssusfaden und unter Einbeziehung bereits veröffentlichter Studien konnte in der vorliegenden Arbeit ein Modell zum hierarchischen Aufbau des Byssusfadens entworfen werden. Dieses sieht vor, dass drei preCol-Einzelstränge in ein preCol-Trimer mit einer tripelhelikalen Kollagendomäne und strukturierten flankierenden Domänen falten. Dabei enthalten die flankierenden Bereiche des preCols P helikale, Gly-reiche Strukturen, während die von preCol D Ala-reiche  $\beta$ -Faltblätter ausbilden. PreCol NG hingegen könnte sowohl  $\alpha$ -Helices als auch  $\beta$ -Faltblätter aufweisen. Je sieben preCol-Trimere bilden in der nächsten Hierarchieebene preCol-Filamente, welche linear in C $\rightarrow$ C- bzw. N $\rightarrow$ N-Orientierung parallel zur Byssusfadenachse assemblieren. Somit ist eine regelmäßige Anordnung der einzelnen Domänen gegeben.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit anhand FTIR-spektroskopischer Untersuchungen an Byssusfäden, die bis zum Reißen gestreckt wurden, ein Modell zu den molekularen Ereignissen bei der Dehnung des Fadens zusammengefasst werden. Bei kleinen Dehnungswerten strecken sich dabei zunächst Falten des Fadens, Fibrillenbiegungen und potentielle Molekülknicke. Anschließend kommt es zum molekularen Strecken der tripelhelikalen preCol-Kollagendomäne und der globulären flankierenden preCol-Domänen, wobei helikale Sekundärstrukturen in diesen Domänen preCol P und NG Elastizität verleihen, während die Ala-reichen  $\beta$ -Faltblätter preCol D Steifigkeit vermitteln. Am *Yield*-Punkt lösen sich His-Metall-Chelatkomplexe auf und die globulären Domänen entfalten. Mit kompletter Entfaltung der flankierenden Domänen bleiben die Hauptketten der preCol-Kollagendomänen maximal gestreckt und sind weiterhin krafttragend. Nach weiterer Krafteinwirkung brechen jedoch die intermolekularen Wasserstoffbrücken in den Tripelhelices, wodurch die Fibrillen aber auch einzelne Moleküle aneinander vorbeigleiten können, bis die Höhe der Scherkräfte die Kapazität des Materials erreichen und der Byssusfaden reißt.



## 6 Literatur

- Adams, E. (1978) Invertebrate Collagens. *Science* **202**, 591-598.
- Aldred, N., Wills, T., Williams, D.N., Clare, A.S. (2007) Tensile and dynamic mechanical analysis of the distal portion of mussel (*Mytilus edulis*) byssal threads. *J R Soc Interface* **4**, 1159-1167.
- Antipova, O., Orgel, J.P. (2009) In situ D-periodic molecular structure of type II collagen. *J Biol Chem* **285**, 7087-7096.
- Bairati, A., Zuccarello, L.V. (1974) Ultrastructure of byssal apparatus of *Mytilus galloprovincialis* .3. Analysis of byssus characteristics by polarized-light microscopy. *J Submicr Cytol Path* **6**, 367-379.
- Bairati, A., 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.
- Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog Biophys Mol Bio* **74**, 141-173.
- Bear, R.S. (1944) X-ray diffraction studies on protein fibers. I. The large fiber-axis period of collagen. *J Am Chem Soc* **66**, 1297-1305.
- Beck, K., Chan, V.C., Shenoy, N., Kirkpatrick, A., Ramshaw, J.A.M., Brodsky, B. (2000) Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4273-4278.
- Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., Petibois, C. (2009) Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* **395**, 829-837.
- Bell, E., Gosline, J. (1996) Mechanical design of mussel byssus: material yield enhances attachment strength. *J Exp Biol* **199**, 1005-1017.
- Bella, J., Brodsky, B., Berman, H.M. (1995) Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* **3**, 893-906.
- Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., Berman, H.M. (1994) Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **266**, 75-81.
- Bella, J., Liu, J., Kramer, R., Brodsky, B., Berman, H.M. (2006) Conformational effects of Gly-X-Gly interruptions in the collagen triple helix. *J Mol Biol* **362**, 298-311.
- Bennett, A.E., Rienstra, C.M., Auger, M., Lakshmi, K.V., Griffin, R.G. (1995) Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J Chem Phys* **103**, 6951-6958.
- Bertoldi, K., Boyce, M.C. (2007) Mechanics of the hysteretic large strain behavior of mussel byssus threads. *J Mater Sci* **42**, 8943-8956.
- Bielecki, A., Kolbert, A.C., Levitt, M.H. (1989) Frequency-switched pulse sequences: Homonuclear decoupling and dilute spin NMR in solids. *Chem Phys Lett* **155**, 341-346.
- Bigi, A., Cojazzi, G., Roveri, N., Koch, M.H.J. (1987) Differential scanning calorimetry and X-ray-diffraction study of tendon collagen thermal-denaturation. *Int J Biol Macromol* **9**, 363-367.
- Bobek, L.A., Rekosh, D.M., Loverde, P.T. (1988) Small gene family encoding an eggshell (chorion) protein of the human parasite *Schistosoma-Mansoni*. *Mol Cell Biol* **8**, 3008-3016.
- Boot-Handford, R.P., Tuckwell, D.S. (2003) Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *Bioessays* **25**, 142-151.
- Boudko, S.P., Engel, J., Okuyama, K., Mizuno, K., Bachinger, H.P., Schumacher, M.A. (2008) Crystal structure of human type III collagen Gly991-Gly1032 cystine knot-

- containing peptide shows both 7/2 and 10/3 triple helical symmetries. *J Biol Chem* **283**, 32580-32589.
- Brazeo, S.L., Carrington, E. (2006) Interspecific comparison of the mechanical properties of mussel byssus. *Biol Bull* **211**, 263-274.
- Brodsky, B., Shah, N.K. (1995) Protein motifs: 8. The triple-helix motif in proteins. *FASEB J* **9**, 1537-1546.
- Brodsky, B., Ramshaw, J.A. (1997) The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol* **15**, 545-554.
- Brodsky, B., Eikenberry, E.F., Belbruno, K.C., Sterling, K. (1982) Variations in collagen fibril structure in tendons. *Biopolymers* **21**, 935-951.
- Brodsky, B., Thiagarajan, G., Madhan, B., Kar, K. (2008) Triple-helical peptides: an approach to collagen conformation, stability and self-association. *Biopolymers* **89**, 345-353.
- Buehler, M.J., Keten, S., Ackbarow, T. (2008) Theoretical and computational hierarchical nanomechanics of protein materials: Deformation and fracture. *Prog Mat Sci* **53**, 1101-1241.
- Condit, C.M., Meagher, R.B. (1986) A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature* **323**, 178-181.
- Cowan, P.M., McGavin, S., North, A.C.T. (1955) Polypeptide chain configuration of collagen. *Nature* **176**, 1062-1064.
- Coyne, K.J., Qin, X.X., Waite, J.H. (1997) Extensible collagen in mussel byssus: a natural block copolymer. *Science* **277**, 1830-1832.
- De Simone, A., Vitagliano, L., Berisio, R. (2008) Role of hydration in collagen triple helix stabilization. *Biochem Biophys Res Co* **372**, 121-125.
- Dwivedi, A.M., Gupta, V.D. (1972) Dispersion Curves of Poly-L-Proline I Chain. *Chem Phys Lett* **16**, 109-113.
- Dwivedi, A.M., Krimm, S. (1982a) Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins: XV. crystalline polyglycine-II. *Biopolymers* **21**, 2377-2397.
- Dwivedi, A.M., Krimm, S. (1982b) Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins: XI. beta-poly(L-alanine) and its N-deuterated derivative. *Macromolecules* **15**, 186-193.
- Ehrenstein, G.W., Riedel, G., Trawiel, P. (1998) Praxis der Thermischen Analyse von Kunststoffen *Carl Hanser Verlag München Wien*.
- Eikenberry, E.F., Brodsky, B. (1980) X-ray-diffraction of reconstituted collagen-fibers. *J Mol Biol* **144**, 397-404.
- Ene, R., Papadopoulos, P., Kremer, F. (2009) Combined structural model of spider dragline silk. *Soft Matter* **5**, 4568-4574.
- Ene, R., Papadopoulos, P., Kremer, F. (2010) Partial deuteration probing structural changes in supercontracted spider silk. *Polymer* **51**, 4784-4789.
- Fabian, H., Schultz, C.P. (2000) Fourier transform infrared spectroscopy in peptide and protein analysis, In: R. A. Meyers, (Herausg), Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation, *John Wiley & Sons, Ltd*.
- Fairbank, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of major polypeptides of human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617.
- Franchi, M., Trire, A., Quaranta, M., Orsini, E., Ottani, V. (2007) Collagen structure of tendon relates to function. *TheScientificWorldJOURNAL* **7**, 404-420.
- Fraser, R.D.B., MacRae, T.P. (1973a) The alpha helix, p. 179-217, In: B. Horecker, et al., (Herausg), Conformation in fibrous proteins and related synthetic polypeptides, *Academic Press New York and London*, New York.

- Fraser, R.D.B., MacRae, T.P. (1973b) The influence of composition on conformation, p. 276-290, In: B. Horecker, et al., (Herausg), Conformation in fibrous proteins and related synthetic polypeptides, *Academic Press New York and London*, New York.
- Fraser, R.D.B., MacRae, T.P. (1973c) Collagens, p. 344-402, In: B. Horecker, et al., (Herausg), Conformation in fibrous proteins and related synthetic polypeptides, *Academic Press New York and London*, New York.
- Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H., Bernstorff, S. (1998) Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J Struct Biol* **122**, 119-122.
- Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T. (2003) Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1531-1546.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruyschaert, J.M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell Biochem* **23**, 405-450.
- Gosline, J.M., Guerette, P.A., Ortlepp, C.S., Savage, K.N. (1999) The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol* **202**, 3295-303.
- Gough, K.M., Zelinski, D., Wiens, R., Rak, M., Dixon, I.M.C. (2003) Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: Effect of chronic AT(1) suppression. *Anal Biochem* **316**, 232-242.
- Hagenau, A., Scheibel, T. (2010) Towards the recombinant production of mussel byssal collagens. *J Adhesion* **86**, 10-24.
- Hagenau, A., Papadopoulos, P., Kremer, F., Scheibel, T. (2011) Mussel collagen molecules with silk-like domains as load-bearing elements in distal byssal threads. *J Struct Biol*.
- Hagenau, A., Scheidt, H.A., Serpell, L., Huster, D., Scheibel, T. (2009) Structural analysis of proteinaceous components in byssal threads of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Macromol Biosci* **9**, 162-168.
- Harel, R., Tanzer, M.L. (1993) Extracellular-Matrix: 3. Evolution of the extracellular-matrix in Invertebrates. *Faseb Journal* **7**, 1115-1123.
- Harrington, M.J., Waite, J.H. (2007) Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads. *J Exp Biol* **210**, 4307-18.
- Harrington, M.J., Waite, J.H. (2008a) How nature modulates a fiber's mechanical properties: Mechanically distinct fibers drawn from natural mesogenic block copolymer variants. *Adv Mater* **20**, 1-5.
- Harrington, M.J., Waite, J.H. (2008b) Short order tendons: Liquid crystal mesophases, metal complexation and protein gradients in the externalized collagens of mussel byssal threads, p. 30-45, In: T. R. Scheibel, (Herausg), Fibrous Proteins, *Landes Bioscience*, Austin, Texas, USA.
- Harrington, M.J., Gupta, H.S., Fratzl, P., 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., Fratzl, P. (2010) Iron-clad fibers: a metal-based biological strategy for hard flexible coatings. *Science* **328**, 216-220.
- Hassenkam, T., Gutschmann, T., Hansma, P., Sagert, J., Waite, J.H. (2004) Giant bent-core mesogens in the thread forming process of marine mussels. *Biomacromolecules* **5**, 1351-1355.
- Hayashi, C.Y., Lewis, R.V. (2001) Spider flagelliform silk: lessons in protein design, gene structure, and molecular evolution. *Bioessays* **23**, 750-756.

- Hepburn, H.R., Chandler, H.D., Davidoff, M.R. (1979) Extensomeric properties of insect fibroins: The green lacewing cross- $\beta$ , honeybee  $\alpha$ -helical and greater waxmoth parallel- $\beta$  conformations. *Insect Biochem* **9**, 69-77.
- Hisatsun, I.C., Adl, T. (1970) Thermal Decomposition of Potassium Bicarbonate. *J Phys Chem* **74**, 2875-2877.
- Holten-Andersen, N., Waite, J.H. (2008) Mussel-designed protective coatings for compliant substrates. *J Dent Res* **87**, 701-709.
- Holten-Andersen, N., Fantner, G.E., Hohlbauch, S., Waite, J.H., Zok, F.W. (2007) Protective coatings on extensible biofibres. *Nat Mater* **6**, 669-672.
- Hong, M., Gross, J.D., Griffin, R.G. (1997) Site-resolved determination of peptide torsion angle phi from the relative orientations of backbone N-H and C-H bonds by solid-state NMR. *J Phys Chem B* **101**, 5869-5874.
- Huang, X.Q., Miller, W. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv App Math* **12**, 337-357.
- Inoue, K., Odo, S. (1994) The adhesive protein cDNA of *Mytilus galloprovincialis* encodes decapeptide repeats but no hexapeptide motif. *Biol Bull* **186**, 349-55.
- Isemura, T., Okabayas.H, Sakakiba.S (1968) Steric structure of L-proline oligopeptides .I. Infrared absorption spectra of oligopeptides and poly-L-proline. *Biopolymers* **6**, 307-321.
- Jenkins, C.L., Raines, R.T. (2002) Insights on the conformational stability of collagen. *Nat Prod Rep* **19**, 49-59.
- Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A., Chapman, J.A. (1996) Collagen fibril formation. *Biochem J* **316** 1-11.
- Khoury, Y., Hellwig, P. (2009) Infrared spectroscopic characterization of copper-polyhistidine from 1,800 to 50 cm(-1): model systems for copper coordination. *J Biol Inorg Chem* **14**, 23-34.
- Knight, D.P., Knight, M.M., Vollrath, F. (2000) Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *Int J Biol Macromol* **27**, 205-210.
- Kristensen, E. (1990) Characterization of biogenic organic-matter by stepwise thermogravimetry (Stg). *Biogeochemistry* **9**, 135-159.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lazarev, Y.A., Grishkovsky, B.A., Khromova, T.B. (1985) Amide-I band of IR-spectrum and structure of collagen and related polypeptides. *Biopolymers* **24**, 1449-1478.
- Lim, J.J., Shamos, M.H. (1974) Evaluation of kinetic-parameters of thermal-decomposition of native collagen by thermogravimetric analysis. *Biopolymers* **13**, 1791-1807.
- Lucas, J.M., Vaccaro, E., 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.
- Mascolo, J.M., Waite, J.H. (1986) Protein gradients in byssal threads of some marine bivalve molluscs. *J Exp Zool* **240**, 1-7.
- Mercer, E.H. (1952) Observations of the molecular structure of byssus fibres. *Aust J Mar Freshwater Res* **3**, 199-204.
- Miles, C.A., Ghelashvili, M. (1999) Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers. *Biophys J* **76**, 3243-3252.
- Moeser, G.M., Carrington, E. (2006) Seasonal variation in mussel byssal thread mechanics. *J Exp Biol* **209**, 1996-2003.
- Morcombe, C.R., Zilm, K.W. (2003) Chemical shift referencing in MAS solid state NMR. *J Magn Reson* **162**, 479-486.



- Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U. (2008) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev* **43**, 134-179.
- Munovitz, M.G., Griffin, R.G., Bodenhausen, G., Huang, T.H. (1981) Two dimensional rotational spin-echo nuclear magnetic resonance in solids: correlation of chemical shift and dipolar interactions. *J Am Chem Soc* **103**, 2529-2533.
- Nagarajan, V., Kamitori, S., Okuyama, K. (1999) Structure analysis of a collagen-model peptide with a (Pro-Hyp-Gly) sequence repeat. *J Biochem* **125**, 310-318.
- Okuyama, K. (2008) Revisiting the molecular structure of collagen. *Connect Tissue Res* **49**, 299-310.
- Okuyama, K., Nagarajan, V., Kamitori, S. (1999) 7/2-Helical model for collagen - Evidence from model peptides. *P Indian AS-Chem Sci* **111**, 19-34.
- Okuyama, K., Xu, X.Z., Iguchi, M., Noguchi, K. (2006) Revision of collagen molecular structure. *Biopolymers* **84**, 181-191.
- Okuyama, K., Tanaka, N., Ashida, T., Kakudo, M., Sakakibara, S. (1972) An x-ray study of the synthetic polypeptide (Pro-Pro-Gly) 10. *J Mol Biol* **72**, 571-576.
- Pace, C.N., Scholtz, J.M. (1998) A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophysical Journal* **75**, 422-427.
- Papadopoulos, P., Solter, J., Kremer, F. (2007) Structure-property relationships in major ampullate spider silk as deduced from polarized FTIR spectroscopy. *Eur Phys J E* **24**, 193-199.
- Papadopoulos, P., Solter, J., Kremer, F. (2009a) Hierarchies in the structural organization of spider silk-a quantitative model. *Colloid Polym Sci* **287**, 231-236.
- Papadopoulos, P., Ene, R., Weidner, I., Kremer, F. (2009b) Similarities in the structural organization of major and minor ampullate spider silk. *Macromol Rapid Comm* **30**, 851-857.
- Pearce, T., Labarbera, M. (2009) A comparative study of the mechanical properties of Mytilid byssal threads. *J Exp Biol* **212**, 1442-1448.
- Persikov, A.V., Ramshaw, J.A., Brodsky, B. (2005) Prediction of collagen stability from amino acid sequence. *J Biol Chem* **280**, 19343-19349.
- Persikov, A.V., Ramshaw, J.A., Kirkpatrick, A., Brodsky, B. (2000) Amino acid propensities for the collagen triple-helix. *Biochemistry* **39**, 14960-14967.
- Price, H. (1983) Structure and formation of the byssus complex of the byssus in *Mytilus* (Mollusca, Bivalvia). *J Moll Stud* 9-17.
- Qin, X., Waite, J.H. (1995) Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis*. *J Exp Biol* **198**, 633-644.
- Qin, X.X., Waite, J.H. (1998) A potential mediator of collagenous block copolymer gradients in mussel byssal threads. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 10517-10522.
- Qin, X.X., Coyne, K.J., Waite, J.H. (1997) Tough tendons. Mussel byssus has collagen with silk-like domains. *J Biol Chem* **272**, 32623-32627.
- Qu, A., Leahy, D.J. (1995) Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, aL132) integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 10277-10281.
- Ramachandran, G.N., Kartha, G. (1954) Structure of collagen. *Nature* **174**, 269-270.
- Ramshaw, J.A.M., Shah, N.K., Brodsky, B. (1998) Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: A context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol* **122**, 86-91.
- Rich, A., Crick, F.H.C. (1955) Structure of Collagen. *Nature* **176**, 915-916.
- Richter, G. (2003) Praktische Biochemie Grundlagen und Techniken. 1 ed. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Rudall, K.M. (1955) The distribution of collagen and chitin. *Symp Soc Exp Biol* **9**, 49-95.
- Sadler, J.E. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* **67**, 395-424.

- Sagert, J., Waite, J.H. (2009) Hyperunstable matrix proteins in the byssus of *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Biol* **212**, 2224-2236.
- Scheibel, T. (2004) Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb Cell Fact* **3**, 14-24.
- Scheibel, T., Serpell, L. (2005) Physical methods for studies of fiber formation and structure, p. 197-251, In: J. Buchner and T. Kiefhaber, (Herausg), Protein Folding Handbook Part II, Wiley-VVH, Weinheim, Weinheim.
- Schulz, J., M. Pretzsch, I. Khalaf, A. Deiwick, H. A. Scheidt, G. von Salis-Soglio, A. Bader, and D. Huster (2007) Quantitative monitoring of extracellular matrix production in bone implants by <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P solid-state NMR spectroscopy. *Calcif Tissue Int* **80**.
- Schwabl, F. (2002) Quantenmechanik. 6 ed. Springer, Berlin.
- Shoulders, M.D., Raines, R.T. (2009) Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* **78**, 929-958.
- Silver, F.H., Freeman, J.W., Seehra, G.P. (2003) Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech* **36**, 1529-1553.
- Smeathers, J.E., Vincent, F.F.V (1979) Mechanical Properties of Mussel Byssal Threads. *J moll Stud* **45**, 219-230.
- Stylianopoulos, T., Aksan, A., Barocas, V.H. (2008) A structural, kinetic model of soft tissue thermomechanics. *Biophys J* **94**, 717-725.
- Sun, C., Waite, J.H. (2005) Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads. *J Biol Chem* **280**, 39332-6.
- Sun, C., Vaccaro, E., Waite, J.H. (2001) Oxidative stress and the mechanical properties of naturally occurring chimeric collagen-containing fibers. *Biophys J* **81**, 3590-3595.
- Sun, C., Lucas, J.M., Waite, J.H. (2002) Collagen-binding matrix proteins from elastomeric extraorganismic byssal fibers. *Biomacromolecules* **3**, 1240-1248.
- Suresh, S. (2001) Graded materials for resistance to contact deformation and damage. *Science* **292**, 2447-2451.
- Suzuki, S., Iwashita, Y., Shimanou, T., Tsuboi, M. (1966) Infrared spectra of isotopic polyglycines. *Biopolymers* **4**, 337-350.
- Sweeney, S.M., Guy, C.A., Fields, G.B., San Antonio, J.D. (1998) Defining the domains of type I collagen involved in heparin- binding and endothelial tube formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7275-7280.
- Taga, K., Sowa, M.G., Wang, J., Etori, H., Yoshida, T., Okabayashi, H., Mantsch, H.H. (1997) FT-IR spectra of glycine oligomers. *Vib Spectrosc* **14**, 143-146.
- Tamarin, A., Keller, P.J. (1972) Ultrastructural study of byssal thread forming system in *Mytilus*. *J Ultrastruct Res* **40**, 401-416.
- Tatulian, S.A., Biltonen, R.L., Tamm, L.K. (1997) Structural changes in a secretory phospholipase A(2) induced by membrane binding: A clue to interfacial activation? *J Mol Biol* **268**, 809-815.
- Thiagarajan, G., Li, Y., Mohs, A., Strafacci, C., Popiel, M., Baum, J., Brodsky, B. (2008) Common interruptions in the repeating tripeptide sequence of non-fibrillar collagens: sequence analysis and structural studies on triple-helix peptide models. *J Mol Biol* **376**, 736-748.
- Vaccaro, E., Waite, J.H. (2001) Yield and post-yield behavior of mussel byssal thread: a self-healing biomolecular material. *Biomacromolecules* **2**, 906-911.
- van Beek, J.D., Hess, S., Vollrath, F., Meier, B.H. (2002) The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10266-10271.

- Vidal, B.D., Mello, M.L.S. (2011) Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* **42**, 283-289.
- Vitellaro-Zuccarello, L., De Biasi, S., 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.
- Vrhovski, B., Weiss, A.S. (1998) Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* **258**, 1-18.
- Waite, J.H. (2002) Adhesion a la Moule. *Integr Comp Biol* **42**, 1172-1180.
- Waite, J.H., Qin, X.X., Coyne, K.J. (1998) The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biol* **17**, 93-106.
- Waite, J.H., Vaccaro, E., Sun, C., 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.
- Waite, J.H., Lichtenegger, H.C., Stucky, G.D., Hansma, P. (2004) Exploring molecular and mechanical gradients in structural bioscaffolds. *Biochemistry* **43**, 7653-7662.
- Wright, N.T., Humphrey, J.D. (2002) Denaturation of collagen via heating: An irreversible rate process. *Annu Rev Biomed Eng* **4**, 109-128.
- Young, R.J., Eichhorn, S.J. (2007) Deformation mechanisms in polymer fibres and nanocomposites. *Polymer* **48**, 2-18.
- Zernia, G., Huster, D. (2006) Collagen dynamics in articular cartilage under osmotic pressure. *NMR Biomed* **19**, 1010-1019.
- Zuccarello, L.V. (1980) The collagen gland of *Mytilus galloprovincialis*: an ultrastructural and cytochemical study on secretory granules. *J Ultrastruct Res* **73**, 135-147.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| %                | Prozent  |
| µL               | Mikroliter   |
| A, mA, nA, pA    | Ampere, Milli-Ampere, Nano-Ampere, Piko-Ampere                                     |
| A.U.             | <i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit                                       |
| Abb.             | Abbildung  |
| Ala              | Alanin   |
| APS              | <i>Advanced Photon Source</i>  |
| Arg              | Arginin  |
| Asn              | Asparaginsäure   |
| Asp              | Asparagin  |
| ATR              | <i>attenuated total reflection</i>   |
| B                | Breite   |
| bp               | Basenpaare   |
| bzw.             | beziehungsweise  |
| ca.              | zirka  |
| CaF <sub>2</sub> | Kalziumfluorid   |
| cDNA             | <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| cm               | Zentimeter   |
| CP               | <i>cross polarisation</i>  |
| cpm              | counts per minute  |
| Cys              | Cystein  |
| dCTP             | Desoxycytidintriphosphat   |
| DMTA             | Dynamisch-Mechanische Thermoanalyse  |
| DNA              | <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure                             |
| DOPA             | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin  |
| DSC              | Dynamische Differenzkalorimetrie, <i>differential scanning calorimetry</i>         |
| E                | E-Modul/ <i>Young's</i> Modul/Elastizitätsmodul                                    |
| E'               | Speichermodul  |
| E''              | Verlustmodul   |
| FT               | Fourier-transformiert  |
| Gln              | Glutamin   |
| Glu              | Glutaminsäure  |
| Gly              | Glycin   |
| His              | Histidin   |
| HSP              | Hitzeschockprotein   |
| Hyp              | Hydroxyprolin  |
| Ile              | Isoleucin  |
| IR               | Infrarot   |
| K                | Kelvin   |
| kb               | Kilo-Basen   |
| KBE              | kolonie-bildende Einheit   |
| kHz, MHz         | Kilo-Hertz, Mega-Hertz   |
| KMW              | künstliches Meerwasser   |

|              |   |
|--------------|---|
| kV           | Kilovolt  |
| L            | Länge   |
| Leu          | Leucin  |
| Lys          | Lysin   |
| M            | Molar, $\text{g mol}^{-1}$  |
| $\text{m}^3$ | Kubikmeter  |
| MAS          | <i>magic angle spinning</i>   |
| mbar         | Millibar  |
| MCT          | Mercury Cadmium Telluride (HgCdTe)  |
| Met          | Methionin   |
| Mfpgp-1      | <i>mussel foot protein 1</i> der Muschelspecies <i>M. galloprovincialis</i> |
| Mfp-1        | <i>mussel foot protein 1</i> , Protein der Kutikula                         |
| mg           | Milligramm  |
| min          | Minute  |
| MJ           | Mega-Joule  |
| mL           | Milli-Liter   |
| mm           | Millimeter  |
| mN           | Millinewton   |
| MPa          | Mega-Pascal   |
| ms           | Millisekunde  |
| ng           | Nano-Gramm  |
| p            | pico  |
| PAGE         | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| pg           | Piko-Gramm  |
| Phe          | Phenylalanin  |
| pmol         | piko-mol  |
| ppm          | parts per million   |
| preCol       | Collagen-ähnliches Protein des Muschelbyssusfadens                          |
| Pro          | Prolin  |
| PTMP-1       | <i>proximal matrix protein 1</i> , Matrixprotein des proximalen Fadenteils  |
| R            | Resilienz   |
| REM          | Rasterelektronenmikroskopie   |
| RF           | relative Feuchte  |
| rpm          | Umdrehungen pro Minute  |
| RT           | Raumtemperatur  |
| RW           | Reinstwasser  |
| sA           | spezifische Aktivität   |
| SDS          | Natriumlaurylsulfat, <i>Sodium-dodecyl-sulfat</i>                           |
| Se           | Selen   |
| sek.         | Sekunde   |
| Ser          | Serin   |
| $S^{mol}$    | Ordnungsparameter der Ausrichtung von Molekülschwinungen                    |
| ssNMR        | <i>solid state nuclear magnetic resonance</i>                               |
| Tab.         | Tabelle   |
| tan $\delta$ | Verlustfaktor   |
| TGA          | Thermogravimetrische Analyse  |

---

|                     |  |
|---------------------|--|
| Thr                 | Threonin   |
| TMA                 | Thermomechanische Analyse  |
| Trp                 | Tryptophan   |
| Tyr                 | Tyrosin  |
| U                   | Unit, Einheit für Enzymaktivität: 1 U = 1 $\mu$ mol Substrat/min |
| $\square$           | Wellenzahl   |
| Val                 | Valin  |
| W                   | Watt   |
| Zn                  | Zink   |
| $\alpha$            | Längenausdehnungskoeffizient                                     |
| $\varepsilon$       | Dehnung  |
| $\varepsilon_E$     | Dehnung an der Elastizitätsgrenze                                |
| $\varepsilon_{max}$ | Zugfestigkeit, maximale Spannung, Bruchspannung                  |
| $\varepsilon_r$     | reale Dehnung  |
| $\varepsilon_Y$     | Dehnung am Yield-Punkt   |
| $\sigma$            | Spannung   |
| $\sigma_E$          | Spannung an der Elastizitätsgrenze                               |
| $\sigma_{max}$      | Dehnbarkeit, maximale Dehnung, Bruchdehnung                      |
| $\sigma_r$          | reale Spannung   |
| $\sigma_Y$          | Spannung am Yield-Punkt  |
| $\Omega$            | Polarisationswinkel  |

## 8 Publikationen

Hagenau, A., Scheidt, H.A., Serpell, L., Huster, D. & Scheibel, T.R.: “Structural analysis of proteinaceous components in byssal threads of the mussel *Mytilus galloprovincialis*”, *Macromol. Biosciences*, 2009, 9, 162-168; doi: 10.1002/mabi.200800271

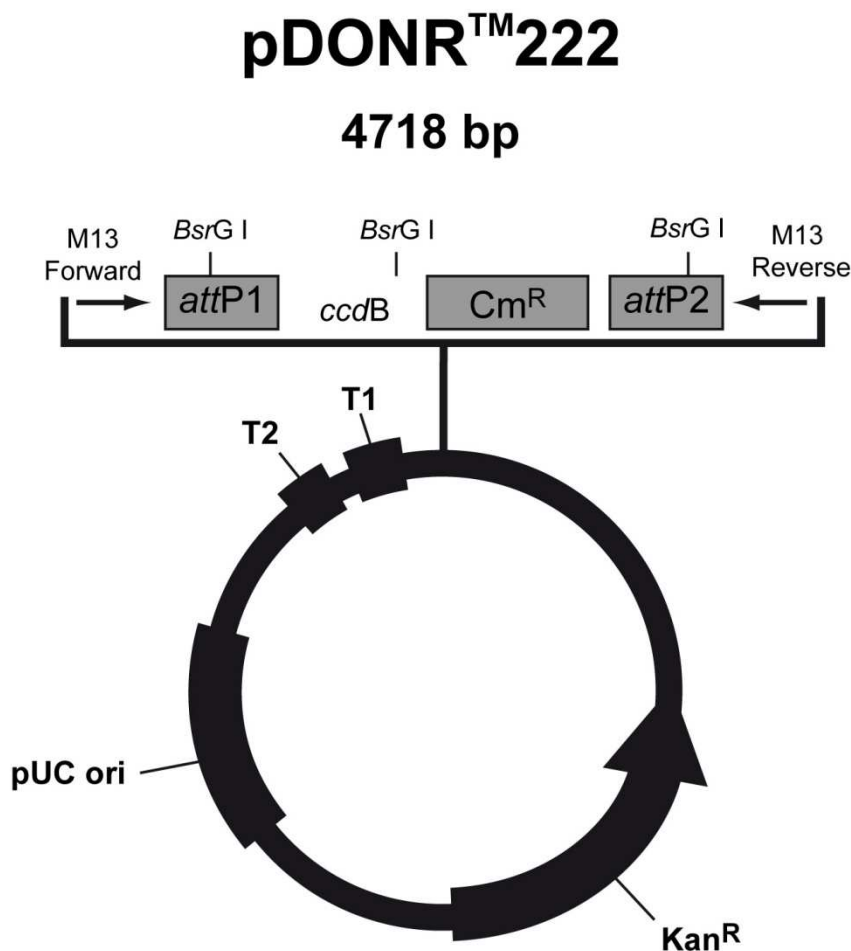
Hagenau, A., Scheibel, T.R.: “Towards the recombinant production of mussel byssal collagens”, *J. Adhesion*, 2010, 86, 10-24; doi:10.1080/00218460903417701

Hagenau, A., Papadopoulos, P., Kremer, F., Scheibel, T.R.: “Mussel collagen molecules with silk-like domains as load-bearing elements in distal byssal threads”, *J. Struct. Biol.*, 2011, 175 (3), 339-347, doi:10.1016/j.jsb.2011.05.016

## 9 Anhang

### 9.1 Vektorkarten

#### 9.1.1 pDONR<sup>TM</sup>222 (Invitrogen CloneMiner cDNA Library Construction Kit)



*rrnB* T2 Transkriptions-Terminations-Sequenz: Basen 58-85(c)  
*rrnB* T1 Transkriptions-Terminations-Sequenz: Basen 217-260 (c)  
 M13 Forward (-20) Primerbindestelle: Basen 327-342 (c)  
*attP1*: Basen 360-561 (c)  
*BsrG I* Restriktionsstellen: Basen 442, 1232, 2689 (c)  
*ccdB* Gen: Basen 987-1292 (c)  
*Cm<sup>R</sup>* - Chloramphenicol Resistenzgen: Basen 1612-2295 (c)  
*attP2*: Basen 2543-2774 (c)  
 M13 Revers Primerbindestelle: Basen 2816-2832 (c)  
*Kan<sup>R</sup>* - Kanamycin Resistenzgen: Basen 2899-3714 (c)  
 pUC origin: Basen 4045-4718

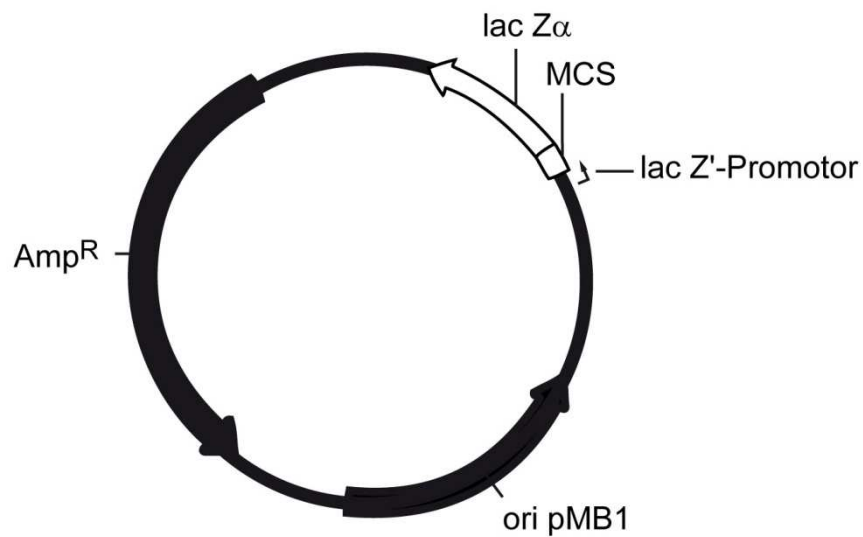
(c) - Komplementärstrang



### 9.1.2 pUC 19 (GenBank Zugangsnummer: L09137)

## pUC 19

2686 bp



lacZ $\alpha$ : Basen 469-146

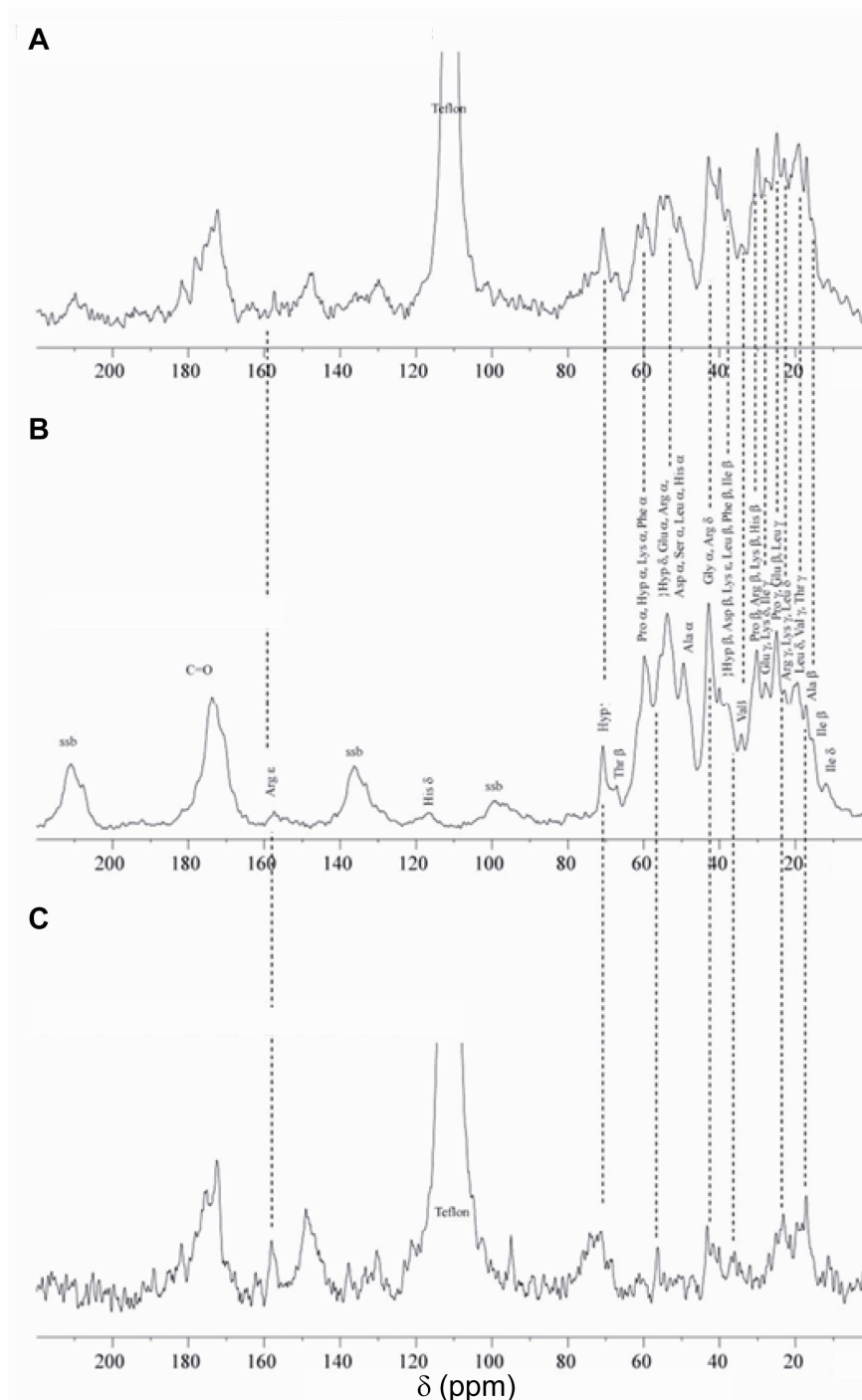
ori pMB1 - Replikationsursprung: Basen 1455-867

Amp<sup>R</sup> - Ampicillin-Resistenzgen: Basen 2486-1626

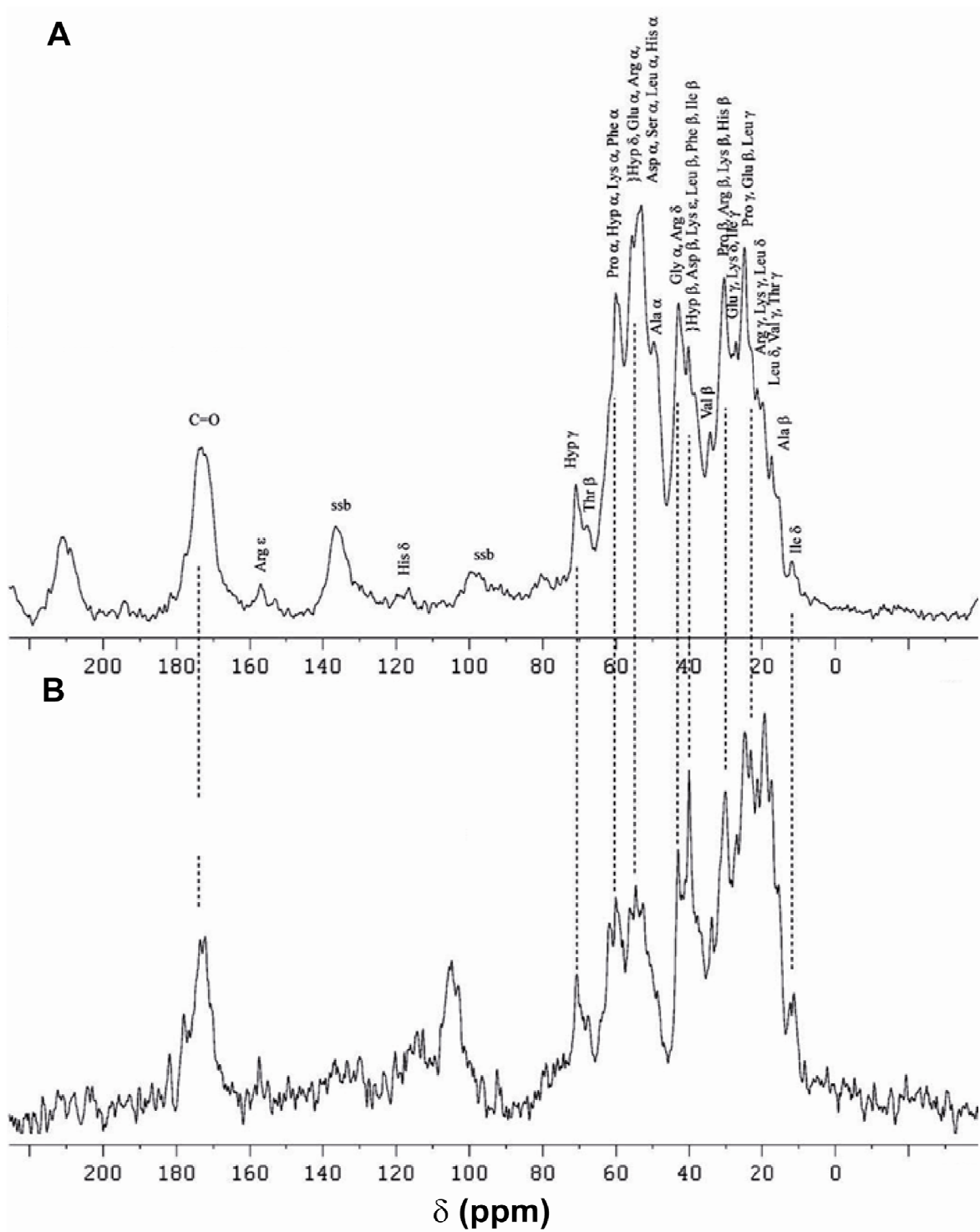
MCS - *multiple cloning site*: Basen 396-452

EcoRI    SmaI    KpnI    SmaI    BamHI    XbaI    SalI    SbfI    PstI    SphI    HindIII  
 agtgAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGcgtaatcatggcat  
 400            410            420            430            440            450            460            L  
lacZ  $\alpha$  Translationsstart

## 9.2 Festphasen-Kernspinresonanzspektroskopie (ssNMR, *solid state nuclear magnetic resonance*)

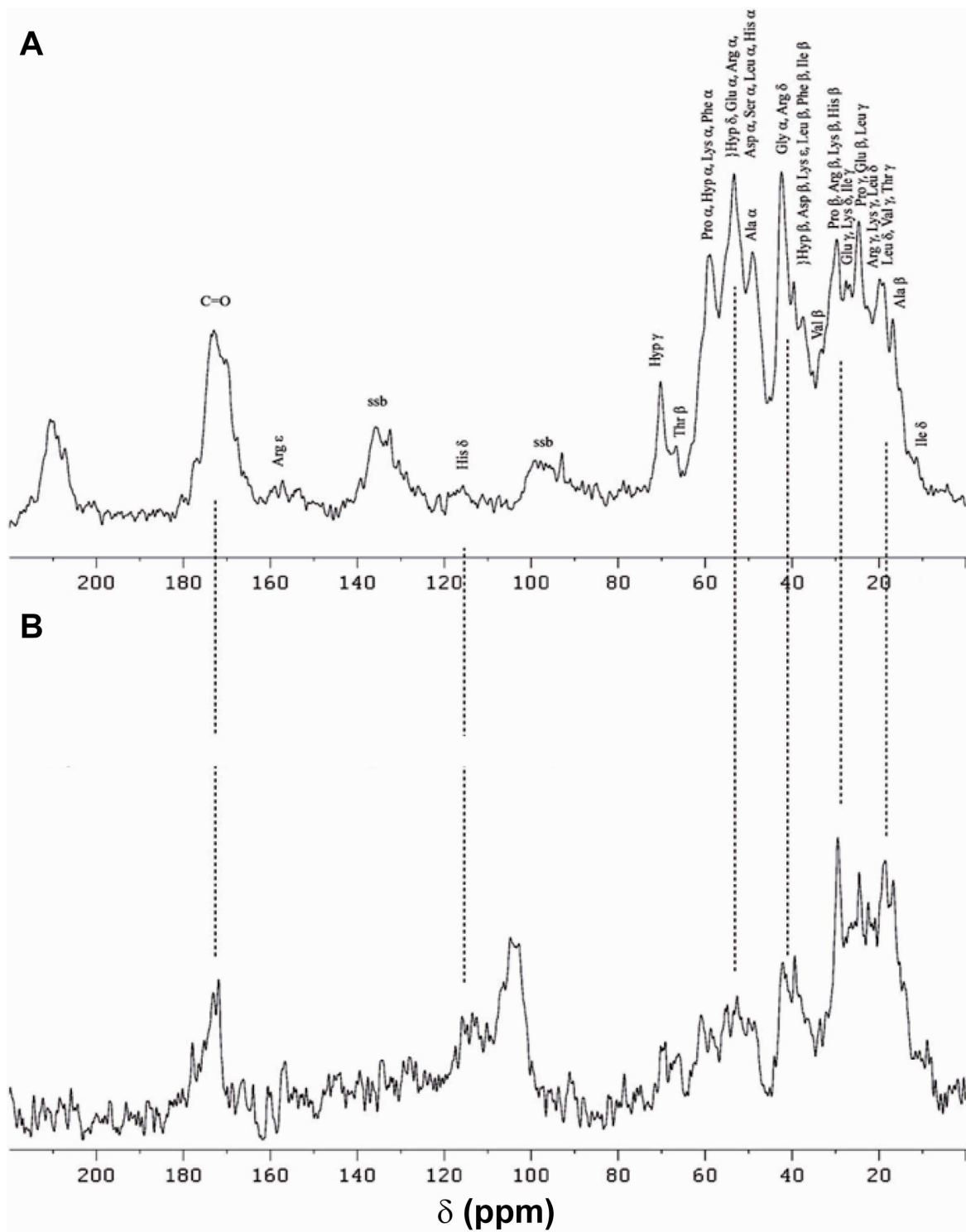


**Abb. 9-1 Protonen-entkoppelte 188 MHz  $^{13}\text{C}$  MAS-Spektren von hydrierten, gesamten Byssusfäden.** Peaks gekennzeichnet mit *ssb* (*spinning side band*) sind messtechnische Nebeneffekte und das Teflon-Signal in den Bloch-Spektren wird durch die Beschichtung des Probenhalters verursacht. A) Direkt angeregtes  $^{13}\text{C}$ -Spektrum mit niedriger  $^1\text{H}$ -Entkopplerstärke (6,5 dB) zur Detektion hoch flexibler Moleküle. B)  $^{13}\text{C}$  CP MAS Spektrum C) Direkt angeregtes  $^{13}\text{C}$ -Spektrum mit hoher  $^1\text{H}$ -Entkopplerstärke (20 dB) zur Detektion moderat beweglicher Moleküle. Die höheren Signalintensitäten bei hoher Entkopplung zeigen, dass es keine hoch flexiblen Aminosäuren im Byssusfaden gibt.



**Abb. 9-2** 188 MHz  $^{13}\text{C}$  MAS-Spektrum des proximalen Fadenteils.

Das direkt angeregte Bloch-Spektrum (B) zeigt nur ein schwaches Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu dem kreuzpolarisierten Spektrum (A). Die Signale der wichtigsten Aminosäuren sind gekennzeichnet. (ssb...*spinning side band*, messtechnischer Nebeneffekt)



**Abb. 9-3 188 MHz  $^{13}\text{C}$  MAS-Spektrum des distalen Fadenteils.**

Das direkt angeregte Bloch-Spektrum (B) zeigt nur ein schwaches Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu dem kreuzpolarisierten Spektrum (A). Die Signale der wichtigsten Aminosäuren sind gekennzeichnet. (ssb...*spinning side band*, messtechnischer Nebeneffekt)

### 9.3 Vergleich der DNA-Sequenzen

Der Vergleich der DNA-Sequenzen von den cDNA-basierten und publizierten preCols (UniProtKB: Q8MW54, Q8MW53, Q8MW55) (Lucas et al., 2002) erfolgte mittels CLC Sequence Viewer 6.4 und einige Aminosäurepositionen wurden nachträglich manuell korrigiert.

Zeichenerklärung:

gelbe Markierung - Übereinstimmung,

orange Markierung – abweichende Basen







## 9.3.2 preCol D

|                  |                     |                       |                     |                       |                     |                     |                     |                     |                     |      |
|------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|
| preCol D_cDNA    | -----               | -----                 | -----               | -----                 | -----               | -----               | GACTATCAGG          | GTAACAAACA          | GSTATGGGGC          | 30   |
| preCol D_Lucas-1 | A TGGTCTAGA         | A A C T C G C T G A G | G G T G T G T C T   | G T A G C A T C T C   | T T C T A G A G A   | T T G C T T A G G T | GACTATCAGG          | GTAACAAACA          | GSTATGGGGC          | 90   |
| preCol D_cDNA    | CGATACGGCA          | ACAGATTTCGG           | AGGTGGTATT          | GGTGGTGCAG            | GAGCCGTAGC          | CCATGCCCAT          | GCCCATGCCC          | ATGCTAGTGC          | CGGAGCAAAC          | 120  |
| preCol D_Lucas-1 | A G A T A C G G C A | A C A G A T T C G G   | A G G T G G T A T T | G G T G G T G C A G   | G A G C C G T A G C | C C A T G C C C A T | G C C C A T G C C C | A T G C T A G T G C | C G G A G C A A A C | 180  |
| preCol D_cDNA    | GGAAGAGCAA          | GAGCACAATGC           | ACGAGCCTTG          | GCCCATGAC             | ATGCCGGTGG          | TAGCGTGC            | CATGGACACC          | CAGGATTC            | AGTTGGTGGT          | 210  |
| preCol D_Lucas-1 | G G A A G A G C A A | G A G C A C A T G C   | A C G A G C C T T G | G C C C A T G A C     | A T G C C G G T G G | T A G C G T G C     | C A T G G A C A C C | C A G G A T T C C C | A G T T G G T G G T | 270  |
| preCol D_cDNA    | AGCGCAAGCG          | CAGCCGACG             | AGCAGCAGCA          | CGAGCATCAG            | CAGGAGGATT          | AGGAGGACTA          | GGTGGATTCC          | GATCAGCAGC          | AGCCAATGCA          | 300  |
| preCol D_Lucas-1 | A G C G C A A G C G | C A G C C G A C G     | A G C A G C A G C A | C G A G C A T C A G   | C A G G A G G A T T | A G G A G G A C T A | G G T G G A T T C C | G A T C A G C A G C | A G C C A A T G C A | 360  |
| preCol D_cDNA    | GCAGCAGCAG          | CAAACCGCAG            | AGCAGGATTT          | GGTGGATTCC            | GTGGATTCCG          | AGGATTCGGA          | GGAGTCGGCG          | GTCCAGGTCA          | ACCAGGCGGT          | 390  |
| preCol D_Lucas-1 | G C A G C A G C A G | C A A A C C G C A G   | A G C A G G A T T T | G G T G G A T T C C   | G T G G A T T C C G | A G G A T T C G G A | G G A G T C G G C G | G T C C A G G T C A | A C C A G G C G G T | 450  |
| preCol D_cDNA    | CCAGGAGGTC          | CAGGAGTCC             | AGGAGGTCCA          | GGCGTCCAG             | GTATGCCAGG          | GGTCCAGGA           | GGCCATCAG           | GTCCAGGTAC          | CGGAGGTCCA          | 480  |
| preCol D_Lucas-1 | C C A G G A G G T C | C A G G A G T C C     | A G G A G G T C C A | G G C G T C C A G     | G T A T G C C A G G | G G T C C A G G A   | G G C C A T C A G   | G T C C A G G T A C | C G G A G G T C C A | 540  |
| preCol D_cDNA    | GGTCAACCAG          | GTGGTCCAGG            | AGTCCAGGC           | GGTCCAGGAG            | GTCCAGGTGG          | TCCAGGTATG          | CCAGGCGGTC          | CAGGAGTCC           | AGGTGGACCA          | 570  |
| preCol D_Lucas-1 | G G T C A A C C A G | G T G G T C C A G G   | A G T C C A G G C   | G G T C C A G G A G   | G T C C A G G T G G | T C C A G G T A T G | C C A G G C G G T C | C A G G A G T C C   | A G G T G G A C C A | 621  |
| preCol D_cDNA    | GGTATGCCAG          | GTGGACCAGG            | AGGACCAGGA          | GGACCAGGTC            | TTGGAGGAGG          | TGATGGAGGA          | ATCCCAGGCA          | TGCCCGGACC          | AGCAGGACCA          | 680  |
| preCol D_Lucas-1 | G G T A T G C C A G | G T G G A C C A G G   | A G G A C C A G G A | G G A C C A G G T C   | T T G G A G G A G G | T G A T G G A G G A | A T C C C A G G C A | T G C C C G G A C C | A G C A G G A C C A | 702  |
| preCol D_cDNA    | CCAGGCCAG           | CCGGCCACA             | AGGACCAGAA          | GGCGAACAA             | GACCACGAGG          | AGAACCCCA           | CGAGGAACAC          | CAGGCCACCC          | AGGCAATCCA          | 750  |
| preCol D_Lucas-1 | C C A G G C C A G   | C C G G C C A C A     | A G G A C C A G A A | G G C G A A C A A G   | G A C C A C G A G G | A G A A C C C C A   | C G A G G A A C A C | C A G G C C A C C C | A G G C A A T C C A | 792  |
| preCol D_cDNA    | GGAGAACCAG          | GACAAGGAGG            | AGCACCAGGC          | GCACCAGGAG            | CACCAGGACA          | TGCCGGTAAA          | CCCGGAACCG          | CAGGACCAGC          | AGGCAAAAGCA         | 840  |
| preCol D_Lucas-1 | G G A G A A C C A G | G A C A A G G A G G   | A G C A C C A G G C | G C A C C A G G A G   | C A C C A G G A C A | T G C C G G T A A A | C C C G G A A C C G | C A G G A C C A G C | A G G C A A A G C A | 882  |
| preCol D_cDNA    | GGAGTCCAG           | GACCAAGAGG            | ACAATCAGGA          | GCATCAGGAT            | CATCAGGCCA          | ACACGGAGCA          | TCAGGAGCAC          | CAGGTCGTCC          | AGGTAACCCA          | 930  |
| preCol D_Lucas-1 | G G A G T C C A G   | G A C C A A G A G G   | A C A A T C A G G A | G C A T C A G G A T   | C A T C A G G C C A | A C A C G G A G C A | T C A G G A G C A C | C A G G T C G T C C | A G G T A A C C C A | 972  |
| preCol D_cDNA    | GGATCCACC           | GACGTCACCG            | AGCAACCGGA          | GACCCAGGTC            | GTCCAGGAGC          | AACCGGAACA          | ACAGGAAGAC          | CAGGACCATC          | AGGAGCACCA          | 1020 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A T C C A C C   | G A C G T C A C C G   | A G C A A C C G G A | G A C C C A G G T C   | G T C C A G G A G C | A A C C G G A A C A | A C A G G A A G A C | C A G G A C C A T C | A G G A G C A C C A | 1062 |
| preCol D_cDNA    | GGAAACCAG           | GAGCACCAGG            | AGCACTCGGA          | GCACCAGGAC            | CACGAGGAGC          | ACCAGGATTT          | GTCCGACTTC          | CAGGACCACG          | AGGATCCCCA          | 1110 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A A A C C A G   | G A G C A C C A G G   | A G C A C T C G G A | G C A C C A G G A C   | C A C G A G G A G C | A C C A G G A T T T | G T C C G A C T T C | C A G G A C C A C G | A G G A T C C C C A | 1152 |
| preCol D_cDNA    | GGAGAACCAG          | GAAACCAAGG            | ACCAATCGGA          | GGCCACAGGAT           | ACCCAGGACC          | ACGAGGACCA          | CAAGGACTCG          | ATGGTGTAT           | GGGACCACAA          | 1200 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A G A A C C A G | G A A A C C A A G G   | A C C A A T C G G A | G G C C A C A G G A T | A C C C A G G A C C | A C G A G G A C C A | C A A G G A C T G   | A T G G T G T A T   | G G G A C C A C A A | 1242 |
| preCol D_cDNA    | GGACCATGT           | GAGATAGAGG            | AGCACCAGGA          | GTACCAGGCCA           | AACAAGGACC          | AGTAGGAGGA          | CAAGGACCAG          | CAGGACCACG          | AGGACCACGA          | 1290 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A C C A T G T   | G A G A T A G A G G   | A G C A C C A G G A | G T A C C A G G C C A | A A C A A G G A C C | A G T A G G A G G A | C A A G G A C C A G | C A G G A C C A C G | A G G A C C A C G A | 1332 |
| preCol D_cDNA    | GGAGATGGAG          | GACCAAGTGG            | ACCAAAGGGC          | GAACCAGGAG            | CAAAAGGAGC          | TGATGGTAAA          | CCAGGAGACA          | GAGGACCTGA          | TGGAGAAACC          | 1380 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A G A T G G A G | G A C C A A G T G G   | A C C A A A G G G C | G A A C C A G G A G   | C A A A A G G A G C | T G A T G G T A A A | C C A G G A G A C A | G A G G A C C T G A | T G G A G A A A C C | 1422 |
| preCol D_cDNA    | GGACCACAAG          | GACCAGCTGG            | ACCAAAGGGA          | CAAGTAGGAG            | ACCAAGGCCA          | ACCAGGAGCA          | AAGGGAGAAA          | CCGGAGATCA          | AGGAGCACGA          | 1470 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A C C A C A A G | G A C C A G C T G G   | A C C A A A G G G A | C A A G T A G G A G   | A C C A A G G C C A | A C C A G G A G C A | A A G G G A G A A A | C C G G A G A T C A | A G G A G C A C G A | 1512 |
| preCol D_cDNA    | GGTGAAGCAG          | GAAAGCCCGG            | AGAACAAGGA          | CCAGGAGGCCA           | TCCAAGGACC          | AAAGGGACCA          | GTAGGAGGAC          | AAGGACCAGC          | AGGACCACGA          | 1560 |
| preCol D_Lucas-1 | G G T G A A G C A G | G A A A G C C C G G   | A G A A C A A G G A | C C A G G A G G C C A | T C C A A G G A C C | A A A G G G A C C A | G T A G G A G G A C | A A G G A C C A G C | A G G A C C A C G A | 1602 |
| preCol D_cDNA    | GGACCACGAG          | GAGATGAAGG            | ACCAAGTTGA          | CCAAAGGGTC            | AACCAGGAGC          | AAAGGGAGCT          | GATGGTAAAC          | CAGGAGACAG          | AGGACCTGAT          | 1650 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A C C A C G A G | G A G A T G A A G G   | A C C A A G T T G A | C C A A A G G G T C   | A A C C A G G A G C | A A A G G G A G C T | G A T G G T A A A C | C A G G A G A C A G | A G G A C C T G A T | 1692 |
| preCol D_cDNA    | GGAGAAACC           | GACCACAAGG            | ACCAAGTTGA          | CCAAAGGGAC            | AAGTAGGAGA          | CCAAGGAGCA          | CAAGGAGACC          | AAGGAGCAAG          | TGGCCTGAT           | 1740 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A G A A A C C   | G A C C A C A A G G   | A C C A A G T T G A | C C A A A G G G A C   | A A G T A G G A G A | C C A A G G A G C A | C A A G G A G A C C | A A G G A G C A A G | T G G C C T G A T   | 1782 |
| preCol D_cDNA    | GGCAAAAAGG          | GAGAACCACG            | AGAGAGAGGA          | CAACAAGGAG            | CAGCAGGACC          | AGTCGGCCGA          | CCAGGACCAA          | GAGGAGATAG          | AGGAGCAAAG          | 1830 |
| preCol D_Lucas-1 | G G C A A A A A G G | G A G A A C C A C G   | A G A G A G A G G A | C A A C A A G G A G   | C A G C A G G A C C | A G T C G G C C G A | C C A G G A C C A A | G A G G A G A T A G | A G G A G C A A A G | 1872 |
| preCol D_cDNA    | GGAAATCCAAG         | GAAAGCCGAG            | AGCACCAGGT          | GGTATGGGTA            | GACGAGGAAA          | CCGAGGATCC          | CAAGGAGCAG          | TAGGACCACG          | AGGAGAAACT          | 1920 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A A T C C A A G | G A A A G C C G A G   | A G C A C C A G G T | G G T A T G G G T A   | G A C G A G G A A A | C C G A G G A T C C | C A A G G A G C A G | T A G G A C C A C G | A G G A G A A A C T | 1962 |
| preCol D_cDNA    | GGCCACAGC           | GTAACCAAGG            | ACAACGTGGA          | GAACAAGGAG            | CACCAGGAGT          | TATCACCCCT          | GTCATTGAAG          | ACCTCAGAAC          | AGCCGGAGTA          | 2010 |
| preCol D_Lucas-1 | G G C C A C A G C   | G T A A C C A A G G   | A C A A C G T G G A | G A A C A A G G A G   | C A C C A G G A G T | T A T C A C C C T T | G T C A T T G A A G | A C C T C A G A A C | A G C C G G A G T A | 2052 |
| preCol D_cDNA    | GAAAGCCCGG          | TAGAAACATT            | TGACGCAGGA          | GCAGGAACCG            | GTGGACCAGC          | ACCAGGAGCA          | GGAGCAACAG          | CAGGAGCATT          | TGCAGGAGCA          | 2100 |
| preCol D_Lucas-1 | G A A A G C C C G G | T A G A A A C A T T   | T G A C G C A G G A | G C A G G A A C C G   | G T G G A C C A G C | A C C A G G A G C A | G G A G C A A C A G | C A G G A G C A T T | T G C A G G A G C A | 2142 |
| preCol D_cDNA    | GGACCAGGAG          | GAGCTAATGC            | AGGAGGAAAC          | GCAGCCGACG            | GAGCAGGACC          | AGGTGGACTC          | GGAGGAGCAG          | GACCAGGAGG          | ACTCGGAGGA          | 2190 |
| preCol D_Lucas-1 | G G A C C A G G A G | G A G C T A A T G C   | A G G A G G A A A C | G C A G C C G A C G   | G A G C A G G A C C | A G G T G G A C T C | G G A G G A G C A G | G A C C A G G A G G | A C T C G G A G G A | 2232 |
| preCol D_cDNA    | CTAGGAGGTC          | GACTCGGAGG            | ACTTGGAGGT          | GGACTCGGAG            | GATTAGGAGG          | AGCAGGAGGT          | TTAGTGGTGT          | GACTCGGAGG          | ATTAGGAGGA          | 2280 |
| preCol D_Lucas-1 | C T A G G A G G T C | G A C T C G G A G G   | A C T T G G A G G T | G G A C T C G G A G   | G A T T A G G A G G | A G C A G G A G G T | T T A G T G G T G T | G A C T C G G A G G | A T T A G G A G G A | 2322 |
| preCol D_cDNA    | GCAGGAGGTT          | TAGGTGGTGG            | ACTCGGAGGA          | TTAGGAGGAG            | CAGGAGGTTG          | AGCAGGTGGA          | GCAGGAGGAG          | CAGGAGGAGC          | AGGTGCAATA          | 2370 |
| preCol D_Lucas-1 | G C A G G A G G T T | T A G G T G G T G G   | A C T C G G A G G A | T T A G G A G G A G   | C A G G A G G T T G | A G C A G G T G G A | G C A G G A G G A G | C A G G A G G A G C | A G G T G C A A T A | 2403 |
| preCol D_cDNA    | GCAGCTGCAG          | CAGCACAAGC            | AGCAGCAGCA          | GCAGGAGCAG            | GAGGAAACGG          | TGGAGCAGCA          | CAAGCAGCAG          | CACAAGCAGC          | AGCATCAGCA          | 2460 |
| preCol D_Lucas-1 | G C A G C T G C A G | C A G C A C A A G C   | A G C A G C A G C A | G C A G G A G C A G   | G A G G A A A C G G | T G G A G C A G C A | C A A G C A G C A G | C A C A A G C A G C | A G C A T C A G C A | 2493 |
| preCol D_cDNA    | GCAGCAAAAT          | CAGGACTTGG            | AGCAGGAGCA          | GCAAGAGCAG            | CAGCATCAGC          | AGCTGCTAGA          | GCAACCCTAG          | CAGGACATGG          | AAGTGGAAAC          | 2550 |
| preCol D_Lucas-1 | G C A G C A A A A T | C A G G A C T T G G   | A G C A G G A G C A | G C A A G A G C A G   | C A G C A T C A G C | A G C T G C T A G A | G C A A C C C T A G | C A G G A C A T G G | A A G T G G A A A C | 2583 |
| preCol D_cDNA    | GCCGACGACG          | CAGCCAACGC            | AGCCGCACAA          | GCACATGCAG            | CAACACGAGG          | ACAAGGAGGA          | TCACACGCAC          | ACGCTGCCCG          | CGCAGCTCAC          | 2640 |
| preCol D_Lucas-1 | G C C G A C G A C G | C A G C C A A C G C   | A G C C G C A C A A | G C A C A T G C A G   | C A A C A C G A G G | A C A A G G A G G A | T C A C A C G C A C | A C G C T G C C C G | C G C A G C T C A C | 2673 |
| preCol D_cDNA    | GCAGCCGCAA          | GTAGCGTAAT            | CCATGGTGGT          | GGACACGGTG            | GACATGGTGG          | TGACTATCAC          | GGAGGCGGAT          | CCGGCTATCA          | CAAACCCAGGA         | 2730 |
| preCol D_Lucas-1 | G C A G C C G C A A | G T A G C G T A A T   | C C A T G G T G G T | G G A C A C G G T G   | G A C A T G G T G G | T G A C T A T C A C | G G A G G C G G A T | C C G G C T A T C A | C A A A C C A G G A | 2763 |
| preCol D_cDNA    | TAT-----            | ATTGACAATA            | ATAGACATTA          | AAATATTGTA            | AATTGAATAT          | GTTACTTTAT          | GAATAAAATC          | TGGAAGGTTT          | -----               | 2733 |
| preCol D_Lucas-1 | T A T               | A T T G A C A A T A   | A T A G A C A T T A | A A A T A T T G T A   | A A T T G A A T A T | G T T A C T T T A T | G A A T A A A A T C | T G G A A G G T T T |                     | 2843 |



### 9.3.3 preCol NG

|                     |            |             |            |             |             |            |             |             |            |      |
|---------------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| preCol NG_cDNA      | ATGGTCCATA | ATTTCTGTGAC | TGTGTTCTTA | ATAGCGGGCTA | TTGCCCGCCAC | AGGACTAGCC | GGGAGCATCG  | GATATGGCAA  | ACCCGGATAC | 90   |
| preCol NG_DNA_Lucas | ATGG       | ATTTCTGTGAC | TGTGTTCTTA | ATAGCGGGCTA | TTGCCCGCCAC | AGGACTAGCC | GGGAGCATCG  | GATATGGCAA  | ACCCGGATAC | 17   |
| preCol NG_cDNA      | GGTGGTGGTA | GAGATTTCTT  | TAACGGCCAC | GGAGGAGGTC  | ATGGAGGTGG  | ACACGGAGGT | GGTCA       | GGAG        | GAAGTGCTTC | 180  |
| preCol NG_DNA_Lucas | GGTGGTGGTA | GAGATTTCTT  | TAACGGCCAC | GGAGGAGGTC  | ATGGAGGTGG  | ACACGGAGGT | GGTCA       | GGAG        | GAAGTGCTTC | 107  |
| preCol NG_cDNA      | CATGCAGCAG | CAGTTGCAAA  | TGCTCTAGT  | GGCGGTGGAG  | GAGGAAGTGC  | CTCAGCAGCA | GCCCCAGCTG  | CAGCTGCTGC  | ACGTGCTCTA | 270  |
| preCol NG_DNA_Lucas | CATGCAGCAG | CAGTTGCAAA  | TGCTCTAGT  | GGCGGTGGAG  | GAGGAAGTGC  | CTCAGCAGCA | GCCCCAGCTG  | CAGCTGCTGC  | ACGTGCTCTA | 197  |
| preCol NG_cDNA      | GGTGGTGGTG | GAGGAAGTGC  | CTCAGCAGCA | GCCCCAGCTG  | CAGCCGCTGC  | ACGTGCTCTT | GGTGGTGGTG  | GAGGTGCATC  | TGCAGCCGCC | 360  |
| preCol NG_DNA_Lucas | GGTGGTGGTG | GAGGAAGTGC  | CTCAGCAGCA | GCCCCAGCTG  | CAGCCGCTGC  | ACGTGCTCTT | GGTGGTGGTG  | GAGGTGCATC  | TGCAGCCGCC | 287  |
| preCol NG_cDNA      | CGTGCAGCAG | CAGCCGCAAG  | TGCTCT     | GGCGGGGGTG  | GTGGTTTTGG  | AGGCTCT    | GGAGGTTCTT  | GCGGCTCTGG  | CGGAGGTGCT | 435  |
| preCol NG_DNA_Lucas | CGTGCAGCAG | CAGCCGCAAG  | TGCTCT     | GGCGGGGGTG  | GTGGTTTTGG  | AGGCTCT    | GGAGGTTCTT  | GCGGCTCTGG  | CGGAGGTGCT | 377  |
| preCol NG_cDNA      | GGAGGCCCTT | GCGGACTTTG  | AGTGGACTTT | GGCGGACTCG  | GAGGAGGTGG  | AGCTGGAGGA | GGTGGAGTGC  | GAGGAGTTGG  | AGTCCGGAGG | 525  |
| preCol NG_DNA_Lucas | GGAGGCCCTT | GCGGACTTTG  | AGTGGACTTT | GGCGGACTCG  | GAGGAGGTGG  | AGCTGGAGGA | GGTGGAGTGC  | GAGGAGTTGG  | AGTCCGGAGG | 453  |
| preCol NG_cDNA      | ATCGGACCTG | GAGGACTTTT  | GGGCGGCGGG | GGTGGCCCTG  | GTAGTGCAGG  | TGCATTCCGG | AACGGAAATG  | CAGCTGCTGG  | ACCAGGAGGG | 615  |
| preCol NG_DNA_Lucas | ATCGGACCTG | GAGGACTTTT  | GGGCGGCGGG | GGTGGCCCTG  | GTAGTGCAGG  | TGCATTCCGG | AACGGAAATG  | CAGCTGCTGG  | ACCAGGAGGG | 542  |
| preCol NG_cDNA      | GCTGGTGCAA | CGCGTAGTGC  | AGGAGCATT  | GCAACTGGCG  | GAGGAGGATT  | CCCCTTACCA | GGTGACCCCG  | GACCACAAGG  | CCCAAGAGGA | 705  |
| preCol NG_DNA_Lucas | GCTGGTGCAA | CGCGTAGTGC  | AGGAGCATT  | GCAACTGGCG  | GAGGAGGATT  | CCCCTTACCA | GGTGACCCCG  | GACCACAAGG  | CCCAAGAGGA | 632  |
| preCol NG_cDNA      | CCAGCTGGAC | CACCGGTGA   | CCAAGGACAT | GGTGGACCAC  | CAGGACCCCG  | CGGACACTCA | CCACAAGGAC  | CACAAGGTTT  | CCGAGGAGCT | 795  |
| preCol NG_DNA_Lucas | CCAGCTGGAC | CACCGGTGA   | CCAAGGACAT | GGTGGACCAC  | CAGGACCCCG  | CGGACACTCA | CCACAAGGAC  | CACAAGGTTT  | CCGAGGAGCT | 722  |
| preCol NG_cDNA      | CCAGGAGCAC | CAGGTGAACA  | AGGAGCCAAT | GGAAACCCAG  | GACAACCCGG  | AAACGCAGGA | GCACCAGGTC  | AACCAAGTGC  | ACCTGGCCAA | 885  |
| preCol NG_DNA_Lucas | CCAGGAGCAC | CAGGTGAACA  | AGGAGCCAAT | GGAAACCCAG  | GACAACCCGG  | AAACGCAGGA | GCACCAGGTC  | AACCAAGTGC  | ACCTGGCCAA | 812  |
| preCol NG_cDNA      | GCTGGAGCAC | CAGGAGCAAG  | AGGACCATCA | GGAGCTGCAG  | GACATCAAGG  | AGCACAAGGA | GGTGTCCGCC  | AACCCGGATC  | TCCTGGACAA | 975  |
| preCol NG_DNA_Lucas | GCTGGAGCAC | CAGGAGCAAG  | AGGACCATCA | GGAGCTGCAG  | GACATCAAGG  | AGCACAAGGA | GGTGTCCGCC  | AACCCGGATC  | TCCTGGACAA | 902  |
| preCol NG_cDNA      | CAAGGAAGTG | CTGGACAACC  | TGGAGCCCCA | GGAAATCCAG  | GTGCCCCAGG  | AGCACCAGGA | CCAACTGGAC  | AAGCCGGAAG  | TGTTGGAAGC | 1065 |
| preCol NG_DNA_Lucas | CAAGGAAGTG | CTGGACAACC  | TGGAGCCCCA | GGAAATCCAG  | GTGCCCCAGG  | AGCACCAGGA | CCAACTGGAC  | AAGCCGGAAG  | TGTTGGAAGC | 992  |
| preCol NG_cDNA      | ATCGGAGGAC | CAGGAGAACC  | AGGTGCACAA | GGATCAGCCG  | GACCACGAGG  | TATTCAGGCT | AGACCAGGAT  | GCAAAGGACT  | TCCAGGACCA | 1155 |
| preCol NG_DNA_Lucas | ATCGGAGGAC | CAGGAGAACC  | AGGTGCACAA | GGATCAGCCG  | GACCACGAGG  | TATTCAGGCT | AGACCAGGAT  | GCAAAGGACT  | TCCAGGACCA | 1082 |
| preCol NG_cDNA      | AAGGAGCCAC | ATGGACCCCA  | AGGAGCACCT | GGCAAACTCG  | GTCCCGATGG  | ACCAGCAGGA | GTTAGAGGCC  | CAATTGGGCC  | AGCTGGAGGA | 1245 |
| preCol NG_DNA_Lucas | AAGGAGCCAC | ATGGACCCCA  | AGGAGCACCT | GGCAAACTCG  | GTCCCGATGG  | ACCAGCAGGA | GTTAGAGGCC  | CAATTGGGCC  | AGCTGGAGGA | 1172 |
| preCol NG_cDNA      | AAAGGACCCA | CAGGCCCAAA  | AGGAGCACCA | GGGATGTTTG  | GACCAGAAGG  | ACCAGAAGGC | CCAGCAGGTC  | GACCAGGACC  | AAAAGGACCA | 1335 |
| preCol NG_DNA_Lucas | AAAGGACCCA | CAGGCCCAAA  | AGGAGCACCA | GGGATGTTTG  | GACCAGAAGG  | ACCAGAAGGC | CCAGCAGGTC  | GACCAGGACC  | AAAAGGACCA | 1262 |
| preCol NG_cDNA      | ACCGGACCAC | AAGGTGCAAA  | GGGATCTCCA | GGAGAAGATG  | GAGAACCAGG  | AGCCGAGGGC | GAACCAGGAG  | CAAAGGGAGG  | TGATGGTTTA | 1425 |
| preCol NG_DNA_Lucas | ACCGGACCAC | AAGGTGCAAA  | GGGATCTCCA | GGAGAAGATG  | GAGAACCAGG  | AGCCGAGGGC | GAACCAGGAG  | CAAAGGGAGG  | TGATGGTTTA | 1352 |
| preCol NG_cDNA      | CCAGGACAAG | CCGGACCACG  | AGGAAATGCT | GGTCCACAAG  | GACCAGAAGG  | ACCAGTCCGA | GACAAAGGTC  | CTCCAGGAGA  | ATCTGGCGGA | 1515 |
| preCol NG_DNA_Lucas | CCAGGACAAG | CCGGACCACG  | AGGAAATGCT | GGTCCACAAG  | GACCAGAAGG  | ACCAGTCCGA | GACAAAGGTC  | CTCCAGGAGA  | ATCTGGCGGA | 1442 |
| preCol NG_cDNA      | CCCGGTGCAC | CAGGACCACA  | CGGCCACAAA | GGACAGCTGT  | GTGAACAAGG  | AGACCTCCGA | GAAGTTGGAC  | CCGCTGGTGA  | AGCAGGAGCT | 1605 |
| preCol NG_DNA_Lucas | CCCGGTGCAC | CAGGACCACA  | CGGCCACAAA | GGACAGCTGT  | GTGAACAAGG  | AGACCTCCGA | GAAGTTGGAC  | CCGCTGGTGA  | AGCAGGAGCT | 1532 |
| preCol NG_cDNA      | GCAGGAGTTC | CAGGCCCAAA  | AGGAATTCAA | GGACCAGAAG  | GAGAACTTGG  | ACCAGTCCGC | AAAGAAGGAC  | CAGCAGGAGA  | AGCTGGACCA | 1695 |
| preCol NG_DNA_Lucas | GCAGGAGTTC | CAGGCCCAAA  | AGGAATTCAA | GGACCAGAAG  | GAGAACTTGG  | ACCAGTCCGC | AAAGAAGGAC  | CAGCAGGAGA  | AGCTGGACCA | 1622 |
| preCol NG_cDNA      | AAAGGTAGAC | TGGGCCAAAA  | AGGACCTGCC | GGAGAACCAG  | GACAACCAGG  | AGAAGAAGGC | AAACAAGGAG  | ATCTTGGAGC  | ACCAGGAAAT | 1785 |
| preCol NG_DNA_Lucas | AAAGGTAGAC | TGGGCCAAAA  | AGGACCTGCC | GGAGAACCAG  | GACAACCAGG  | AGAAGAAGGC | AAACAAGGAG  | ATCTTGGAGC  | ACCAGGAAAT | 1712 |
| preCol NG_cDNA      | AGAGGAGCAA | CTGGTGTGG   | TGGTGTCAA  | GGACCAACAG  | GATTCCGAGG  | AAACAGAGGT | AAACCCGGAA  | ATGCAGGACG  | ACCAGGCAGA | 1875 |
| preCol NG_DNA_Lucas | AGAGGAGCAA | CTGGTGTGG   | TGGTGTCAA  | GGACCAACAG  | GATTCCGAGG  | AAACAGAGGT | AAACCCGGAA  | ATGCAGGACG  | ACCAGGCAGA | 1802 |
| preCol NG_cDNA      | CCAGGCAGAA | ATGGACCAG   | AGGACCAACA | GGACCAACA   | GTCTACGAGG  | AAACCAAGGA | CCTGATGGTG  | AACAAGGTTG  | ATCCGGCGCT | 1965 |
| preCol NG_DNA_Lucas | CCAGGCAGAA | ATGGACCAG   | AGGACCAACA | GGACCAACA   | GTCTACGAGG  | AAACCAAGGA | CCTGATGGTG  | AACAAGGTTG  | ATCCGGCGCT | 1892 |
| preCol NG_cDNA      | GCTGGAGTTG | GAGGAACCAT  | TCATATTATT | GTTGATGATA  | ATGGTCTGCT  | ATTTGGAGAC | TTTCGCTGATA | TAAGTGGACC  | AAACAGCAAT | 2055 |
| preCol NG_DNA_Lucas | GCTGGAGTTG | GAGGAACCAT  | TCATATTATT | GTTGATGATA  | ATGGTCTGCT  | ATTTGGAGAC | TTTCGCTGATA | TAAGTGGACC  | AAACAGCAAT | 1982 |
| preCol NG_cDNA      | GAAGTAAACA | TGCAGCTTGT  | ACGAGAATTC | ATTGGAGATC  | TTGATACATT  | CCTGAGCTTG | AACGCCCCAG  | GTGGACCAGC  | TGGAGTCGGT | 2145 |
| preCol NG_DNA_Lucas | GAAGTAAACA | TGCAGCTTGT  | ACGAGAATTC | ATTGGAGATC  | TTGATACATT  | CCTGAGCTTG | AACGCCCCAG  | GTGGACCAGC  | TGGAGTCGGT | 2072 |
| preCol NG_cDNA      | GCAGGAGAAG | CGGAGCCCG   | AGGTGCCCGT | GGTGGTCTGT  | GTGGAGCCCG  | TGGACTCCGA | GGTGGAGCCG  | GAGGAGCTGG  | TGGACTCCGA | 2235 |
| preCol NG_DNA_Lucas | GCAGGAGAAG | CGGAGCCCG   | AGGTGCCCGT | GGTGGTCTGT  | GTGGAGCCCG  | TGGACTCCGA | GGTGGAGCCG  | GAGGAGCTGG  | TGGACTCCGA | 2159 |
| preCol NG_cDNA      | GGTGGATTTC | GAGGACTCTG  | TGGTGGAGCA | GGTGGACTTG  | GTGGTCTCGG  | TGGTGGAGCA | GGAGGAGCTG  | GTGGAGTCTG  | AGGACTCTGG | 2325 |
| preCol NG_DNA_Lucas | GGTGGATTTC | GAGGACTCTG  | TGGTGGAGCA | GGTGGACTTG  | GTGGTCTCGG  | TGGTGGAGCA | GGAGGAGCTG  | GTGGAGTCTG  | AGGACTCTGG | 2249 |
| preCol NG_cDNA      | GGTGGAGTTC | GTGGACTCTG  | AGGAGTCCGA | GGATTAGGAT  | TTGGAGGAGC  | CGGTGCAAGT | GCAGGAGCAG  | GAGCAAAATG  | AGGAGCAGGA | 2415 |
| preCol NG_DNA_Lucas | GGTGGAGTTC | GTGGACTCTG  | AGGAGTCCGA | GGATTAGGAT  | TTGGAGGAGC  | CGGTGCAAGT | GCAGGAGCAG  | GAGCAAAATG  | AGGAGCAGGA | 2339 |
| preCol NG_cDNA      | GGTGCAGGCG | GTAGTGCAG   | TGCTCATGCC | CATGCACATG  | CCCATGCATC  | ATCAGCAGGC | GGACTTGGAG  | GAGGATCCGG  | TCAGGCACAT | 2505 |
| preCol NG_DNA_Lucas | GGTGCAGGCG | GTAGTGCAG   | TGCTCATGCC | CATGCACATG  | CCCATGCATC  | ATCAGCAGGC | GGACTTGGAG  | GAGGATCCGG  | TCAGGCACAT | 2429 |
| preCol NG_cDNA      | GCCGACGAC  | ACGCACATTC  | AGTAAGTCAC | GCCGAGGAGT  | CACACGCACA  | CGCAGCTGCC | GCAAGCACAC  | GCACATTTCAG | TAAGTCAC   | 2593 |
| preCol NG_DNA_Lucas | GCCGACGAC  | ACGCACATTC  | AGTAAGTCAC | GCCGAGGAGT  | CACACGCACA  | CGCAGCTGCC | GCAAGCACAC  | GCACATTTCAG | TAAGTCAC   | 2519 |
| preCol NG_cDNA      | CCGGAGGATC | ACACGCACAC  | GCAGCTGCCG | CAGGCACACG  | CACATGCTGC  | ATCTCTCCGA | GGATCTACTG  | GAGGACACTC  | ACTGCACTAC | 2682 |
| preCol NG_DNA_Lucas | CCGGAGGATC | ACACGCACAC  | GCAGCTGCCG | CAGGCACACG  | CACATGCTGC  | ATCTCTCCGA | GGATCTACTG  | GAGGACACTC  | ACTGCACTAC | 2609 |
| preCol NG_cDNA      | AACGATCCAT | TTTATGGCAA  | AAAAGCCGAC | TATTGAGCTT  | AAATGAACTA  | TATTGTAAT  | GAATATGTTT  | TATTAGTAAT  | AAAAGGTCGA | 2718 |
| preCol NG_DNA_Lucas | AACGATCCAT | TTTATGGCAA  | AAAAGCCGAC | TATTGAGCTT  | AAATGAACTA  | TATTGTAAT  | GAATATGTTT  | TATTAGTAAT  | AAAAGGTCGA | 2699 |
| preCol NG_cDNA      | AGTTCCT    | 2718        |            |             |             |            |             |             |            |      |
| preCol NG_DNA_Lucas | AGTTCCT    | 2706        |            |             |             |            |             |             |            |      |



Die vorliegende Arbeit wurde von September 2005 bis Dezember 2007 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität München in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Scheibel begonnen und von Januar 2009 bis Juli 2011 am Lehrstuhl Biomaterialien von Prof. Dr. Thomas Scheibel der Universität Bayreuth fortgesetzt.

Mein besonderer Dank gilt meinem direkten Betreuer Prof. Dr. Thomas Scheibel, der mir die Chance gab, an diesem Thema zu arbeiten, und mir das Vertrauen schenkte, auch schwierigen Aufgabenstellungen, wie der Einrichtung seines neuen Lehrstuhls, gewachsen zu sein. Ich danke ihm für die Unterstützung und hilfreichen Diskussionen, in denen er mich immer wieder neu motivierte, auch wenn die Projekte nicht wie geplant verliefen.

Prof. Dr. Sevil Weinkauff danke ich herzlichst für ihre Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der TU München und somit das Amt des Erstprüfers zu übernehmen.

Bei Prof. Dr. Johannes Buchner bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl in den ersten Jahren meiner Doktorarbeit bedanken.

Da die Arbeit in vielen, sehr erfolgreichen Kooperationen entstanden ist, möchte ich mich ganz herzlich bei folgenden Kooperationspartnern bedanken:

- ... Prof. Dr. Daniel Huster und Holger Scheidt für die ssNMR-Messungen
- ... Dr. Louise Serpell für die Röntgenbeugungsanalysen
- ... Sebastian Rammensee für die Unterstützung bei meinen ersten FTIR-Messungen
- ... Prof. Dr. Jerzey Adamski (GSF, München) für seine Unterstützung bei meinen Gastaufenthalt in seinem Labor an der GSF zur Erstellung der cDNA-Banken
- ... Dr. Periklis Papadopoulos (MPI Mainz) für seine Hilfe und Unterstützung bei den unzähligen FTIR-Messungen und für die nützlichen Diskussionen, die letztlich zu einer Publikation führten
- ... Dr. Joseph P.O.R. Orgel für die Einladung nach Chicago und die Messzeit an der BioCAT-Beamline des APS in Argonne sowie seine Hilfe bei der Auswertung und Diskussion der Röntgenbeugungsmuster
- ... Reiner Giesa für seine Unterstützung bei den TMA, DMTA und Zugmessungen
- ... Ute Kuhn für die DSC- und TGA-Messungen
- ... Claudia Blüm und Hendrik Bargel für die stundenlangen Aufnahmen am REM
- ... Andrew Smith dafür, dass er mir immer mal wieder auf die Sprünge geholfen hat
- ... Michael Suhre für die Hilfe bei der Auswertung und Diskussion der Sequenzdaten

Allen alten *Fibers* (Einmal *Fiber*, immer *Fiber*!) und neuen *BioMats* danke ich für die familiäre Atmosphäre, immer gefüllte Gummibäarchenvorräte und die angeregten Kaffeepausen-Diskussionen. Ute, Markus und Kristina danke ich besonders für unserer gute, langjährige Büroallianz und die zahlreichen außer-dienstlichen Ablenkungen.

Ganz herzlich bedanke ich mich meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und meiner Schwester, die immer zu mir halten und auf die ich mich immer verlassen kann. Ohne Euch wäre ich heut nicht da, wo ich jetzt bin.

Kurzum ich danke allen Menschen, die mich in dieser Zeit unterstützt, mir beigestanden und mir gutgetan haben.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.



Bayreuth, Juli 2011