

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von

Master of Science Theresa Katharina Bentele
aus Tettwang

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2018

Der molekulare Aufbau der Nematocysten kapsel bei *Hydra* als
Modell für synthetische Polymere

Gutachter: Prof. Dr. Suat Özbek

Prof. Dr. Thomas Holstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	1
Abstract	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Phylogenetische Einordnung der Cnidaria	3
1.2 <i>Hydra</i> als Modellsystem.....	5
1.2.1 Körperbauplan.....	6
1.2.2 Zelltypen und Stammzellsystem	7
1.2.3 Regeneration.....	8
1.3 Nesselzellen in <i>Hydra</i>	10
1.4 Entstehung der Nematocyten.....	12
1.4.1 Die Entladung der Kapsel	13
1.5 Molekularer Aufbau der Nematocystenwand.....	16
1.5.1 Minikollagene.....	16
1.5.2 CPP-1 (Cnidarian Prolin-rich Protein 1)	17
1.5.3 Cnidoin	18
1.5.4 Cysteinreiche Domänen (CRDs).....	19
1.6 Biopolymere als medizinische Applikation.....	21
1.6.1 Die Nematocystenwand als Modell für die Synthese neuer Materialien – Projektidee und Konzept von „SynNess“ (BW-Stiftung).....	22
1.6.2 Prinzip des Elektrosinnings zur Herstellung von biomimetischen Materialien	23
1.6.3 Nanofasern als extrazelluläre Matrix für Stammzellen.....	24
1.7 Zielsetzung.....	25
2 Material	26
2.1 Organismen.....	26
2.2 Chemikalien.....	27
2.3 Medien, Puffer und Lösungen	30
2.4 Puffer für die Aufreinigung von exprimierten Proteinen und Enzymen	36
2.5 Geräte.....	38
3 Methoden	40
3.1 Arbeiten mit Tieren	40
3.1.1 Hydrakultur	40

3.1.2	Elektroporation von Hydren mit siRNA	40
3.1.3	In situ Hybridisierung (ISH)	41
3.1.4	Immunohistochemische Färbung	42
3.1.5	Kapselisolation	43
3.1.6	Enzymatische Deglykosylierung mit PNGase von NEB	43
3.1.7	Chemische Deglykosylierung	44
3.2	Arbeiten mit Zellen.....	44
3.2.1	Zellkultur.....	44
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl	45
3.2.3	Transfektion von humanen Zellen.....	45
3.3	Arbeiten mit Bakterien	46
3.3.1	Herstellung chemokompetenter Zellen	46
3.3.2	Transformation von <i>E. coli</i>	47
3.3.3	Herstellung des CRD-GB1 Fusionsprotein mittels Fermentation.....	47
3.3.4	Rekombinante Expression des CRD-GB1 Fusionsprotein mittels Schüttelkultur 48	
3.3.5	Native Aufreinigung des CRD-GB1 Fusionsproteins	48
3.3.6	Denaturierende Aufreinigung des CRD-GB1 Fusionsproteins	49
3.3.7	Rekombinante Expression und Aufreinigung der PreScission-Protease.....	50
3.3.8	Schneideprozess des CRD-GB1 Fusionsproteins und Aufreinigung der CRD..	50
3.3.9	Rekombinante Expression und Aufreinigung des Cnidoins	51
3.3.10	Rekombinante Expression und Aufreinigung von CPP-1 aus dem Pellet	52
3.3.11	Aufreinigung von CPP-1 aus dem Überstand	53
3.4	Arbeiten mit Proteinen.....	54
3.4.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
3.4.2	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran	55
3.4.3	Immunblotting	55
3.4.4	Proteinfärbung mit Coomassie	56
3.5	Herstellung von Biomaterialien	56
3.5.1	Elektrospinning	56
3.5.2	Ermittlung der mechanischen Eigenschaften von Proteinpolymeren mit dem Atomkraftmikroskop.....	57
4	Ergebnisse 1. Teil: Molekulare und funktionelle Charakterisierung von CPP-1.....	59
4.1	Das CPP-1: Ein pflanzliches Zellwandprotein in <i>Hydra</i> ?	59
4.2	Expression von <i>CPP-1</i> in <i>Hydra</i>	60

4.3	Charakterisierung eines CPP-1 Antikörpers und immunohistochemische Analysen von CPP-1 in <i>Hydra</i>	61
4.4	CPP-1 und Cnidoin sind Teil des Kapselwandpolymers	64
4.5	Herstellung des rekombinanten CPP-1 Proteins	66
4.6	Analyse posttranslationaler Modifikationen von CPP-1	68
4.7	Funktionelle Analyse von <i>CPP-1</i>	70
5	Ergebnisse 2. Teil: Synthese neuer Materialien auf der Grundlage von Nematocystenproteinen	74
5.1	Synthese von Hybridmaterialien	74
5.1.1	Herstellung und Aufreinigung des CRD-Peptids	74
5.1.2	Synthese eines Biokonjugats mit CRD-Einheiten	77
5.2	Herstellung synthetischer Fasern aus Nematocystenproteinen	80
5.2.1	Mechanische Eigenschaften der Nematocystenproteine	80
5.2.2	Elektrospinning: Vorversuche mit Polyethylenglycol (PEO)	81
5.2.3	Elektrospinning von CPP-1- und Cnidoin-Proteinfasern	83
5.2.4	Die Faserbildung wird durch die Anwesenheit freier CRDs inhibiert	85
5.2.5	Charakterisierung der Proteinfasern durch Kraftmikroskopie (AFM)	86
5.3	Verwendung von synthetischen Fasern aus Nematocystenproteinen als Substrat für Stammzellen	89
6	Diskussion	91
6.1	Prolinreiche Proteine sind ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix	91
6.2	CPP-1 ist ein Strukturprotein der Nematocyste	92
6.3	Das CPP-1: Ein integraler Bestandteil der Nematocyste	95
6.4	Komplementäre mechanischen Eigenschaften der Nematocystenproteine	97
6.5	Nematocystenproteine in der Anwendung:	98
	Definierte Proteinfasern durch Elektrospinning	98
6.6	Nanofasern aus Nematocystenproteine sind biokompatibel	101
6.7	Die CRD: Ein multifunktionelles Werkzeug	102
7	Literaturverzeichnis	104
8	Danksagung	116
9	Anhang	117

Abkürzungsverzeichnis

Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen werden Großteils im Text erläutert.

Die folgende Liste gibt zusätzlich Auskunft über die im Text enthaltenen Abkürzungen.

Abb.:	Abbildung
AFM:	Atomkraftmikroskop
AGP:	Arabinogalactan-Protein
AK:	Antikörper
Amp.:	Ampicillin
AP:	anterior-posterior
APS:	Ammoniumpersulfat
BioMat:	Bioinspirierte Materialsynthese
°C:	Grad Celsius
ca.:	circa
CHAPS:	3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate
cm:	Zentimeter
CO ₂ :	Kohlenstoffdioxid
CPPs:	Cnidarian Prolin-reiche Proteine
CPP-1:	Cnidarian Prolin-reiches Protein 1
CRD:	Cystein-reiche Domäne, (<i>cysteine rich domain</i>)
CTGF:	<i>connective tissue growth factor</i>
Cys:	Cystein
d:	Ablenkung des Cantilevers
δ:	Eindruck des Cantilevers
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF:	Dimethylformamid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DPBS:	Dulbecco's phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, (Dulbecco's phosphate-buffered saline)
DTT:	Dithiotreitol
DV:	dorsal-ventral

ECL:	Elektrochemoluminiszenz, (<i>enhanced-chemoluminescence</i>)
E-Modul:	Elastizitätsmodul, (<i>Young`s modulus</i>)
EZM:	Extrazelluläre Matrix
F:	Kraft
FCS:	Fötales Kälberserum, (<i>fetal calf serum</i>)
FWHM:	Halbwertsbreite, (<i>Full Width at Half Maximum</i>)
GFP:	Grün fluoreszierendes Protein
GPa:	Gigapascal
GS-Bead:	Glutathion-Sepharose Beads
h:	Stunde
HEK-Zellen:	menschliche embryonale Nierenzellen
H ₂ O:	Wasser
His ₆ -Tag:	Polyhistidin Tag
hMSC:	humane mesenchymale Stammzellen
HRP:	Horseradish Peroxidase
HRGPs:	Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine (<i>hydroxyproline-rich glycoproteins</i>)
ISH:	<i>In situ</i> Hybridisierung
IPTG:	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
i – Zellen:	interstitielle Zellen
k:	Federkonstante des Cantilevers
kDa:	Kilodalton
kV:	Kilovolt
L:	Liter
Lac-Operon:	Laktose-Operon
LogNorm:	logarithmischen Normalverteilung
LRP:	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
m:	Meter
M:	Mol
mA:	Milliampere
Mbar:	Millibar
μ l:	Mikroliter
ml:	Milliliter
μ M:	Mikromol
MAB:	Maleinsäurepuffer

MALDI:	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung
MSCGM™:	<i>Mesenchymal Stem Cell Growth Medium</i>
min:	Minute
mM:	Millimol
mm:	Millimeter
µm:	Mikrometer
MPa:	Megapascal
mRNA:	messenger Ribonukleinsäure
N:	Newton
NCol-1:	Minikollagen-1
NCol-15:	Minikollagen-15
NMR:	Kernspinresonanzspektroskopie
OD ₆₀₀ :	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
P:	Pellet
Pa:	Pascal
Page:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS:	phosphatgepufferte Salzlösung
Pen/Strep:	Penicillin/Streptomycin
PEO:	Polyethylenglykol
PTM:	posttranslationale Modifikation
pO ₂ :	Sauerstoffpartialdruck
PP:	Polyprolin
R:	Radius
RAFT:	Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragung
rpm:	Umdrehungen pro Minute, (<i>rounds per minute</i>)
RT:	Raumtemperatur
s:	Sekunde
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
siRNA:	kleine eingreifende RNA, (<i>small interfering RNA</i>)
s.o.:	siehe oben
s.u.:	siehe unten
SV:	Säulenvolumen
TB:	Terrific Broth
TE:	Transformationseffizienz

TEA:	Triethanolamin
TEMED:	Tetramethylethyldiamin
TFMS:	Trifluormethansulfonsäure
TGF β :	<i>Transforming growth factor β</i>
TGN:	trans-Golgi-Netzwerk
ToF:	Flugzeit, (<i>time of flight</i>)
TRP:	<i>transient-receptor-potential</i>
Ü:	Überstand
v :	Poissonzahl
V:	Volt
vgl.:	vergleiche
WLC:	<i>worm-like chain</i>
z.B.:	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phylogenie der Cnidarier.....	4
Abb. 2: Schematische Darstellung der <i>Hydra</i>	7
Abb. 3: Verschiedene Zelltypen im Ekto- und Endoderm der <i>Hydra</i>	8
Abb. 4: Nematocysten von <i>Hydra</i>	11
Abb. 5: Die Entstehung der Nematocyste.	13
Abb. 6: Entladungsprozess der Nematocysten von <i>Hydra</i>	14
Abb. 7: Domänenorganisation von Minikollagen.	17
Abb. 8: Domänenorganisation von CPP-1.	18
Abb. 9: Domänenorganisation und Sequenzelemente von Cnidoin.....	19
Abb. 10: Cysteinmuster und Sekundärstruktur der N- und der C-CRD.....	21
Abb. 11: Schematische Darstellung der Elektrospinningapparatur.....	24
Abb. 12: Expressionsmuster der CPP-1 mRNA in <i>Hydra</i>	60
Abb. 13: Antikörper-Nachweis des CPP-1 in Hydralysaten.	61
Abb. 14: Lokalisation von CPP-1 in <i>Hydra magnipapillata</i>	62
Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von CPP-1 und Cnidoin in <i>Hydra magnipapillata</i>	63
Abb. 16: Western Blot-Analysen von CPP-1 in Hydralysat.	65
Abb. 17: Western Blot-Analyse von Cnidoin in Lysaten verschiedener Körperregionen von <i>Hydra</i>	66
Abb. 18: Abb. 18: Western Blot-Analyse von CPP-1 nach bakterieller Expression.	67
Abb. 19: Expression von CPP-1 in HEK293 T Zellen.....	67
Abb. 20: Analyse von PTMs des CPP-1 in isolierten Kapseln von <i>Hydra magnipapillata</i>	69
Abb. 21: Western Blot-Analyse des CPP-1 in <i>Hydra</i> nach Inkubation mit 2,2-Dipyridyl.	70
Abb. 22: siRNA-Knockdown von CPP-1 in <i>Hydra vulgaris</i> (AEP) führt zur Reduktion des CPP-1-Proteins in Hydralysaten.....	71
Abb. 23: Abb. 23: Immunfärbungen für Nematocystenproteine nach CPP-1 Knockdown durch siRNA-Behandlung in <i>Hydra vulgaris</i> (AEP) (Akt::GFP ekto)..	73
Abb. 24: Darstellung des finalen CRD-GB1-Fusionsproteins mit der Schnittstelle der PreScission-Protease.	74
Abb. 25: Herstellung des GB1-CRD Fusionsproteins im Fermenter <i>Biostat A</i>	75
Abb. 26: Aufreinigung des CRD-Peptids.....	76
Abb. 27: MALDI-ToF Spektrum der reinen CRD.	77

Abb. 28: Synthese eines CRD-Biokonjugats.	78
Abb. 29: Funktionalisierung der Oberflächen mit Hilfe der CRD.	79
Abb. 30: Rekombinantes CPP-1 und Cnidoin aggregiert zu makroskopischen Fasern.	80
Abb. 31: Histogramme der E-Module von rekombinanten Protein-Polymeren von CPP-1 und Cnidoin in PBS.	81
Abb. 32: Elektrospinning von reinen PEO-Fasern mit unterschiedlichen Konzentrationen an PEO.	83
Abb. 33: Proteinfasern und deren Detektion durch Western Blot-Analysen.	84
Abb. 34: Western Blot-Nachweis von CPP-1 und Cnidoin in PEO-freien Fasern.	85
Abb. 35: AFM-Analysen von gesponnenem Cnidoin mit und ohne CRD-Peptid.	86
Abb. 36: AFM-Messungen der Cnidoinfasern.	87
Abb. 37: AFM-Messungen zur Analyse der mechanischen Eigenschaften von CPP-1-Fasern.	88
Abb. 38: Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf CPP-1- oder Cnidoinfasern.	90
Abb. 39: Domänenschema der CPP-Familie.	92
Abb. 40: Modell der Assemblierung der Proteine in der Nematocystenwand.	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten siRNAs.....	28
Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.....	28
Tabelle 3: Pufferlösungen für die native Aufreinigung des CRD-GB1-Fusionsproteins.	36
Tabelle 4: Puffer für die denaturierende Aufreinigung des CRD-GB1-Fusionsproteins.	36
Tabelle 5: Puffer für die Aufreinigung der PreScission.....	36
Tabelle 6: Puffer für die Aufreinigung des Cnidoids.....	37
Tabelle 7: Puffer für die Aufreinigung des CPP-1 aus dem Pellet.....	37
Tabelle 8: Puffer für die Aufreinigung des CPP-1 aus dem Überstand.	37
Tabelle 9: Auflistung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Geräte.....	38
Tabelle 10: Zusammensetzung des Sammelgels und der Trenngele.....	54
Tabelle 11: Auflistung der Primärantikörper mit den korrespondierenden Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen.....	55
Tabelle 12: Überblick zu Elastizitätsmodulen und Dimensionen der Proteinfasern mit PEO oder nach Waschen mit H ₂ O in Luft und in PBS.....	89
Tabelle 13: Zusammenfassung der mechanischen Eigenschaften von CPP-1- und Cnidoinfasern, sowie von publizierten Spidroin- und Kollagenfasern (Yang et al., 2008; Zhu et al., 2015).....	100
Tabelle 14: Erstantikörper, die für die immunohistochemischen Analysen verwendet wurden.	117
Tabelle 15: Erstantikörper, die für Western Blot-Analysen verwendet wurden.	117

Zusammenfassung

Der Süßwasserpolyt *Hydra* gehört zum Stamm der Cnidarier und dient seit über 270 Jahre als Modellorganismus. Die Nesselzellen oder Nematocyten sind charakteristisch für Cnidarier und enthalten spezielle Organelle, die Nematocysten. Diese werden vorwiegend zur Verteidigung und zum Beutefang eingesetzt. Nematocysten bestehen aus einem zylindrischen Körper und einem invertierten Schlauch, der innerhalb von Nano- bis Mikrosekunden wie eine Harpune herausgeschleudert werden kann. Der molekulare Aufbau der elastischen Nesselkapsel, deren Entladung von einem enorm hohen Innendruck (150 bar) angetrieben wird, ist daher von besonderem Interesse für das Gebiet der Biomechanik.

Im ersten Teil der Arbeit wurden biochemische und funktionelle Untersuchungen an Proteinen der Nematocystenwand durchgeführt. Das makromolekulare Proteinpolymer der Wandstruktur basiert auf reversiblen Disulfidverknüpfungen. Die Hauptkomponente des Biopolymers sind Minikollagene und das elastische Protein Cnidoin. Diese enthalten an beiden Termini der Proteinkette cysteinreiche Domänen, die für die Polymerisierung essentiell sind. Innerhalb dieser Arbeit wurde erstmalig das Protein CPP-1 in *Hydra* charakterisiert. Es besitzt eine minikollagenähnliche Architektur mit einer zentralen Polyprolinsequenz und weist Ähnlichkeiten zu den Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen (HRGPs) der Pflanzenzellwand auf. Es konnte gezeigt werden, dass CPP-1 struktureller Bestandteil der Kapselwand ist und wie die HRGPs posttranslational modifiziert wird. Der genetische Knockdown von *CPP-1* in *Hydra* durch siRNAs führte zu einer veränderten Verteilung von Nematocystenproteinen im Verlauf der Morphogenese und deutet auf eine Gerüstfunktion in diesem Prozess.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Entwicklung von innovativen Biomaterialien mit Nematocystenproteinen im Fokus. Bei der bioinspirierten Materialsynthese liefert die Natur Strukturen und Funktionalitäten, die als Modell für neuartige Syntheseverfahren verwendet werden. Im Rahmen eines interdisziplinären Kooperationsprojektes wurden mit den cysteinreichen Domänen der Nematocystenproteine Hybridpolymere synthetisiert und funktionelle Oberflächen hergestellt. In einem weiteren Projekt fungierte das Proteinpolymer der Nematocystenwand als Modell für die Herstellung von Nanofasern. Durch Elektrospinning konnten kontinuierliche Fasern aus Cnidoin und CPP-1 synthetisiert werden. Deren Struktur und mechanische Eigenschaften wurden mit dem Atomkraftmikroskop im trockenen und hydratisierten Milieu charakterisiert. Die Biokompatibilität der erhaltenen Fasern wurde durch die Kultur mit humanen mesenchymalen Stammzellen bestätigt. Die etablierten Nanofasern können somit einen Beitrag für die Entwicklung innovativer Zellsubstrate leisten.

Abstract

The freshwater polyp *Hydra* belongs to the phylum Cnidaria and has served as a model system for over 270 years. Stinging cells or nematocytes are the characteristic feature of all Cnidarians. They produce a specialized organelle, the nematocyst, which is used for defense, locomotion and capture of prey. Each nematocyst consists of a cylindrical capsule body and an inverted tubule, which is expelled in a harpoon-like manner in nano- to microseconds. The composition of the elastic nematocyst, whose discharge is driven by a high osmotic pressure of the capsule (150 bar), has important implications for biomechanical research.

In the first part of the thesis project, biochemical and functional properties of candidate nematocyst proteins were analyzed. The protein polymer of the capsule wall is based on disulfide cross-linking. Main components of this biopolymer are short collagens, so-called mini-collagens, and the elastic Cnidoin. Both contain N- and C-terminal cysteine-rich domains, which are essential for polymerization. The Cnidarian proline-rich protein-1 (CPP-1) was characterized here for the first time. CPP-1 shows a minicollagen-like architecture with a central polyproline-sequence and exhibits similarities to the hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) in plant cell walls. CPP-1 is localized in the nematocyst wall and exhibits considerable posttranslational modifications. A genetic knockdown of CPP-1 using siRNA treatment led to impaired assembly of nematocyst proteins during morphogenesis suggesting a role for CPP-1 as a scaffold protein.

The second part of the thesis is focused on the development of novel biomaterials using nematocyst proteins. For bioinspired materials, biological structures and functions are used as a model to create novel approaches for the synthesis processes. In an interdisciplinary approach, the cysteine-rich domains of nematocyst proteins were utilized to design hybrid polymers and functionalized surfaces. In a second project the polymerization mode of the nematocyst structure was applied for the synthesis of protein nano-fibers. Continuous Cnidoin and CPP-1 fibers could be produced by electrospinning. Using atomic force microscopy, the structure and mechanical properties of the fibers were characterized in dry as well as hydrated state. Furthermore, the biocompatibility of nano-fibers was demonstrated by cell culture experiments using human mesenchymal stem cells indicating that they could serve as promising candidates for the development of novel cell substrates.

1 Einleitung

1.1 Phylogenetische Einordnung der Cnidaria

Der bereits über 600 Millionen Jahre alte Stamm der Cnidaria (Nesseltiere) repräsentiert eine Schwestergruppe der Bilateria; gemeinsam werden sie als Planulozoa bezeichnet (Hejnol and Martindale, 2008; Zapata et al., 2015). Die Unterschiede der beiden Schwestergruppen werden vor allem bei der Ausbildung der Körperachsen deutlich. Die Bilateria besitzen zwei Körperachsen, die erste verläuft von vorne nach hinten, also anterior-posterior (AP). Die zweite Körperachse verläuft orthogonal zur ersten, bzw. dorsal-ventral (DV) (Niehrs, 2010). Im Gegensatz dazu weisen die meisten Cnidaria nur eine Körperachse (AP) auf (Genikhovich and Technau, 2017). Sie stellen eine diploblastische, basale Lebensform dar und leben ausschließlich im Wasser (Schierwater et al., 2009). Alle Lebewesen innerhalb dieses Phylums besitzen charakteristische Organellen, die Nesselzellen, auch Nematocyten oder Cnidocyten genannt. Diesen spezifischen Organellen haben die Cnidaria ihren Namen zu verdanken (Daly et al., 2006; Holstein, 1981). Außerdem zeichnen sie sich durch ein Nervensystem aus. Es handelt sich hier um das erste Tierstamm, der überhaupt ein Nervensystem besitzt (Miljkovic-Licina et al., 2004). Sie sind lebende Fossilien und sind somit bedeutend für evolutionäre Fragestellungen, zum Beispiel der Entstehung von Signalwegen, der Ausbildung der Körperachsen oder den Alterungsprozess (Bode, 2011; Schaible et al., 2015).

Der Stamm Cnidaria ist in zwei Hauptgruppen unterteilt, die Anthozoa und die Medusozoa (Zapata et al., 2015). Zu den Anthozoa gehören zum Beispiel Korallen und Anemonen. Die Lebewesen dieser Gruppe weisen keine Medusenform auf. Die Medusozoa sind wiederum in vier Untergruppen aufgeteilt, die Cubozoa, die Scyphozoa, die Staurozoa und die Hydrozoa. Oftmals werden die Medusozoa an Hand des frei schwimmenden Medusenstadiums charakterisiert (Berntson et al., 1999). Ein Beispiel für die Cubozoa ist die Würfelqualle. Die Scyphozoa werden durch die Schirmqualle, die auch als echte Qualle bezeichnet wird, vertreten und zu den Staurozoa zählt die Stiel- oder Becherqualle (Abb. 1) (Schierwater et al., 2009; Steele et al., 2011). Die Hydrozoa, zu denen auch der in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus *Hydra* gehört, nehmen allerdings eine Sonderstellung ein, da ein Medusenstadium im Generationswechsel fehlt. Eine weitere Besonderheit liegt in ihrem Lebensraum. Während die Mehrheit der Cnidarier in marinen Gewässern leben, sind Hydren vor allem im Süßwasser zu finden.

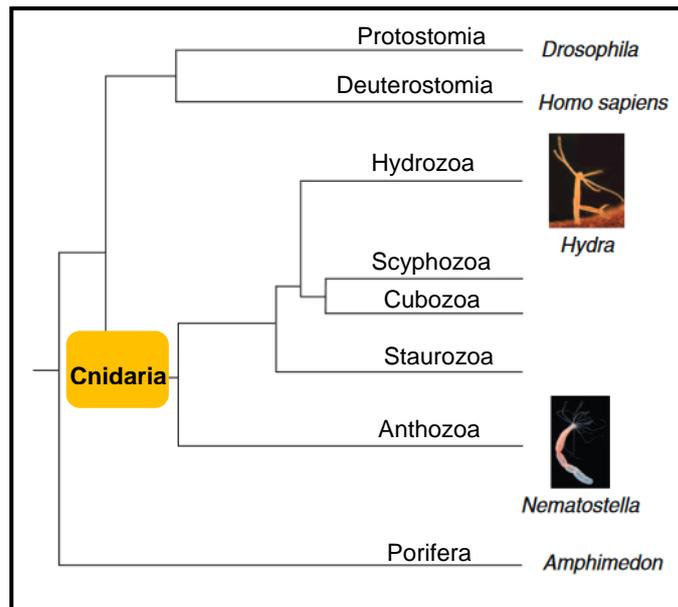


Abb. 1: Phylogenie der Cnidaria (adaptiert von Steele et al., 2011). Die Abbildung zeigt die evolutionären Verbindungen zwischen den Bilateria (Protostomia und Deuterostomia), den Cnidaria mit ihren fünf Klassen und den Porifera.

Die Vielfältigkeit der Cnidaria zeigt sich in den 9000 verschiedene Tierarten (Technau and Steele, 2011). Um deren genetische Variation auf evolutionärer Basis besser verstehen zu können, wurden die Genome von *Nematostella vectensis* der Klasse Anthozoa und *Hydra magnipapillata* der Klasse Medusozoa bereits sequenziert (Technau and Steele, 2011). Durch den Vergleich der Genome wird deutlich, dass die meisten Komponenten der wichtigsten Signalwege wie TGF β , Wnt und Hedgehog sowohl in *Hydra* als auch in *Nematostella* konserviert sind (Lengfeld et al., 2009; Matus et al., 2008; Petersen et al., 2015). Die bisher am besten charakterisierten Signalmoleküle in den Cnidaria sind die Wnt-Gene. Bereits in diesen einfachen Organismen ist ein komplettes Repertoire an Wnt-Liganden vorhanden; lediglich die Anzahl der Frizzled und LRP (low density lipoprotein receptor-related protein) – Rezeptoren zeigt eine geringere Komplexität im Vergleich zu höheren Vertebraten auf. Ähnlich wie bei den höheren Vertebraten ist der Wnt-Signalweg für die Etablierung der anterior-posterioren Körperachse als auch bei der Regeneration essentiell (Holstein, 2012a; Kusserow et al., 2005; Lengfeld et al., 2009). Dementsprechend ist der Wnt-Signalweg hoch konserviert und spielt höchstwahrscheinlich bei der evolutionären Entstehung multizellulärer Organismen eine wichtige Rolle (Niehrs, 2010).

1.2 *Hydra* als Modellsystem

Der Süßwasserpolyp *Hydra* dient der Forschung bereits über 270 Jahre als Modellorganismus. Der in Genf geborene Naturwissenschaftler Abraham Trembley war 1744 der erste, der die kleinen Tiere nicht nur beobachtete, sondern auch Experimente mit ihnen durchführte. Dabei entdeckte er ihre erstaunliche Regenerationsfähigkeit. Er schnitt die Tiere in zwei Teile und stellte fest, dass sich beide Teile wieder vollständig regenerieren (Galliot, 2012; Trembley, 1744). Auf Grund dieser enormen Regenerationsfähigkeit stellt *Hydra* bis heute einen optimalen Organismus für Regenerationsstudien dar (Holstein et al., 2003). Da die Regeneration bestimmter Körperstrukturen auch die Rekapitulation von Musterbildungsprozessen beinhaltet, findet *Hydra* vor allem in der Entwicklungsbiologie als Modellorganismus Verwendung (Hoffmeister-Ullerich, 2007). Die Einfachheit des Organismus, welcher sich nicht nur in Form des Körperbauplans wiederfindet, sondern auch auf Ebene der Zelltypen eine geringe Komplexität aufweist, ermöglicht eine schnelle Analyse von Phänotypen durch einen einfachen „Readout“. Darüber hinaus zeichnet sich *Hydra* durch günstige Haltungskosten und schnelle Regenerationszeiten von drei bis vier Tagen aus, die durch die asexuelle Reproduktion mittels Knospung erreicht wird (Bosch, 2007). Heute findet *Hydra* in diversen Forschungsfeldern Verwendung. Umfassende Studien wurden bereits in der Immunbiologie (Bosch et al., 2009), der Stammzellforschung (David, 2012) und der Evolutionsbiologie (Hemrich et al., 2007) durchgeführt.

Zudem gilt *Hydra* als nahezu unsterbliche Lebensform, was durch ein ständig aktives Stammzellsystem erreicht wird (Martinez and Bridge, 2012). So konnte in einer vier Jahre langen Studie keine erhöhte Sterblichkeit mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden. Da *Hydra* keine Anzeichen von Seneszenz zeigt, gilt der Organismus als unsterblich und ist damit für die Altersforschung von großer Bedeutung (Martinez, 1998). Eine weitere Anwendung findet *Hydra* als Bioindikator für die Wasserqualität. Die Tiere reagieren sehr sensibel auf Kontaminationen mit toxischen Substanzen im Wasser, welches sich in einer beeinträchtigten Regenerationsfähigkeit sowie generellen Veränderungen der Morphologie widerspiegelt (Quinn et al., 2012).

Somit ist *Hydra* durch die Vielzahl an herausragenden Eigenschaften bis heute ein fest etablierter Modellorganismus in der Biologie, welcher die Forschung in den unterschiedlichsten Disziplinen bereichert.

1.2.1 Körperbauplan

Hydren leben viele Jahre ohne ihren Körper oder ihre Größe zu verändern. Ihr Körper ist radiärsymmetrisch gebaut. Die Kopfreion verfügt über eine Mundöffnung, das sogenannte Hypostom, welches zum Beutefang von einem Kranz aus filiformen Tentakeln umgeben ist und zu einem verdauenden Gastralraum führt. Da die Körpersäule der Hydren hohl ist, zählt der Süßwasserpolymp zu den Hohltieren. Mit der basalen Scheibe, dem Fuß am anterioren Ende der *Hydra* kann der Polyp am Untergrund anhaften (Campbell, 1967; Meinhardt, 2002) (Abb. 2). Prinzipiell besitzt *Hydra* eine einzige, klar definierte Körperachse (oral-aboral). Nur während der ungeschlechtlichen Vermehrung, die häufiger auftritt als die geschlechtliche, weisen die Hydren eine bilaterale Symmetrie auf. Die Art der Fortpflanzung wird durch die Umweltbedingungen bestimmt. *Hydra* ist in der Lage die Umweltbedingungen, wie die Verfügbarkeit von Futter oder die Temperatur, wahr zu nehmen. Die asexuelle Reproduktion tritt bei günstigen Umweltbedingungen auf. Hierbei erfolgt eine initiale Ausstülpung des Gewebes, die anschließend zu einem kleinen Polypen auswächst, welcher sich schlussendlich vom Muttertier abschnürt. Dieser Prozess wird auch Knospung genannt und liegt der kontinuierlichen Zellteilung und damit verbundenen Dynamik der Körperzellen zu Grunde. Die sexuelle Fortpflanzung hingegen tritt nur bei Nahrungsmangel bzw. ungünstigen Lebensbedingungen auf (Kaliszewicz, 2011; Schaible et al., 2011). Dabei differenzieren sogenannte interstitielle Zellen geschlechtsspezifisch zu Hoden und Eizellen, wobei das befruchtete Ei letztendlich als Dauerstadium angesehen werden kann, das widrigen Lebensbedingungen standhält (Habetha et al., 2003; Schaible et al., 2011; Watanabe et al., 2014).

Die Körperwand der *Hydra* besteht aus zwei einlagigen Gewebeschichten. Außen befindet sich das Ektoderm, welches vor äußeren Einflüssen wie osmotischen Schwankungen oder eindringenden Pathogenen schützt. Innen befindet sich das Endoderm, das zur Nahrungsaufnahme und Verdauung beiträgt. Die beiden Schichten sind durch eine zellfreie extrazelluläre Matrix, die Mesoglea, separiert (Buzgariu et al., 2015).

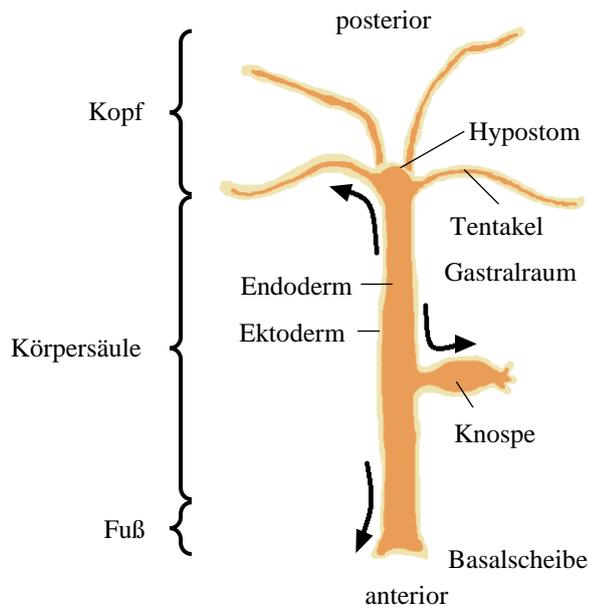


Abb. 2: Schematische Darstellung der *Hydra*. *Hydra* kann in drei Abschnitte unterteilt werden, wobei der erste Abschnitt aus der Kopfregion besteht, welche ein Hypostom und Tentakel aufweist. Dem schließt sich die Körpersäule mit dem Gastralraum und der Knospe an und als letzte Unterteilung kann der Fuß mit der basalen Scheibe am anterioren Ende der *Hydra* benannt werden. Der Organismus hat zwei Gewebeschichten, das Ektoderm und das Endoderm. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Gewebedynamik an.

1.2.2 Zelltypen und Stammzellsystem

Im Vergleich zu höheren Vertebraten besitzt *Hydra* nur wenige Zelltypen. Der Organismus besteht aus lediglich 20 verschiedenen Zelltypen. Der menschliche Organismus hingegen besitzt hunderte von unterschiedlichen Zelltypen (Kelleher, 2012; Siebert et al., 2008).

In *Hydra* sind drei distinkte Stammzelllinien vorhanden. Im Gegensatz zu höheren Organismen sind die Stammzellen in *Hydra* permanent aktiv. Die Epithelzellen der Körpersäule sind kontinuierlich in der mitotischen Phase. Es handelt sich hier um die endodermalen epithelialen Stammzellen und die ektodermalen epithelialen Stammzellen. Daraus resultiert, dass das Gewebe der Körpersäule ständig Richtung oralelem Ende und aboralem Ende in Richtung Knospe bzw. Fußscheibe verschoben wird. Somit wird der Organismus stetig mit neuen Zellen versorgt, während ältere, möglicherweise beschädigte Zellen am Fuß und an den Tentakelspitzen abgestreift werden (Campbell, 1967; Siebert et al., 2008). Die Epithelzellen migrieren selbst nicht, aber als Resultat der raschen Proliferation in der Körpersäule werden sie lateral in die Knospung verlagert. So entsteht innerhalb weniger Tage eine neue *Hydra*, die sich dann vom Muttertier ablöst und selbstständig weiterlebt. Abschließend differenzieren die Zellen in der G2 Phase und werden zu den neuen Epithelzellen im Fuß-, Kopf-, oder in den Tentakeln (Buzgariu et al., 2014; Dubel and Schaller, 1990). Bosch et al. beschreibt die Morphallaxis als einen weiteren Mechanismus der Regeneration von *Hydra* durch eine Umordnung von Zellen (siehe dazu Kapitel 1.2.3) (Bosch, 2007).

Durch die fortlaufende Erneuerung des Gewebes ist *Hydra* im Stande, dem Alterungsprozess zu entkommen und gilt als quasi unsterbliche Lebensform (Martinez, 1998). Die dritte Stammzelllinie sind die multipotenten interstitiellen Stammzellen, auch i-Zellen genannt. Sie liegen meist paarweise zwischen den ektodermalen Epithelzellen eingebettet (interstitiell) in der Körpersäule. Aus diesen kleinen i-Zellen gehen viele Zelltypen wie die Neuronen, Keimzellen, Drüsenzellen und Nematoblasten, die Vorstufe der Nesselzellen, hervor (David, 2012; Fujisawa and David, 1981; Siebert et al., 2008). Die Nematoblasten befinden sich im Ektoderm in Form von Clustern, sogenannten “Nestern“, zwischen den Epithelzellen. Im endodermalen Gewebe sind die Drüsenzellen und die Neuronen zu finden. Letztere sind ebenfalls im Ektoderm lokalisiert. Sensorische Neuronen befinden sich zwischen den Epithelzellen und den Nervenzellen, die an der Basis des Epithels an der Muskelfaser liegen (Technau and Steele, 2011) (Abb. 3).

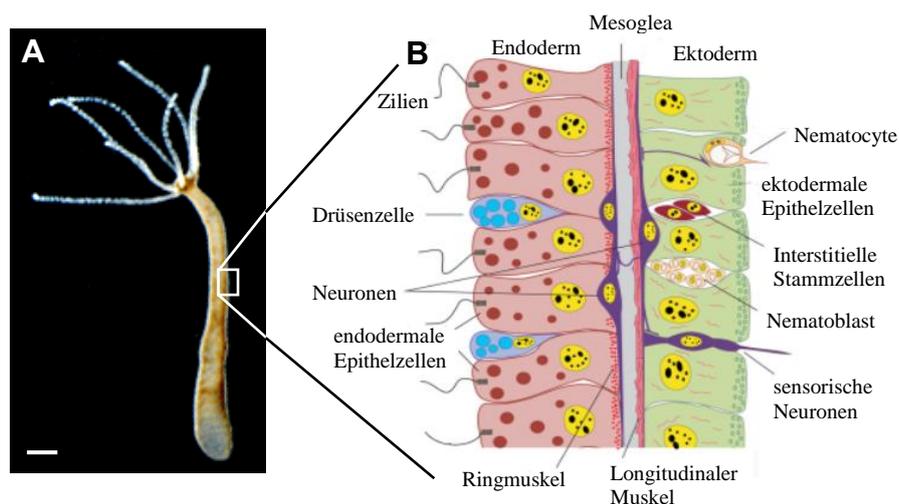


Abb. 3: Verschiedene Zelltypen im Ekto- und Endoderm der *Hydra* (adaptiert von Technau und Stehle, 2011). A) Lichtmikroskopische Aufnahme von *Hydra magnipapillata* (Größenmaßstab: 1 mm). B) Verschiedene Zelltypen der *Hydra* und ihre Lokalisierung in einem schematischen Längsschnitt.

1.2.3 Regeneration

In der Natur gibt es zwei Regenerationsmechanismen, Epimorphose und Morphallaxis. Bei der Epimorphose werden durch Zellproliferation die verlorenen Körperteile neu gebildet, was bei Amphibien wie Molchen beobachtet werden kann (Agata et al., 2007; Flowers and Crews, 2018). Durch die Zellproliferation bildet sich ein Blastem aus undifferenzierten Zellen zur Regeneration der Körperteile. Bei der Morphallaxis werden die Körperteile durch Migration vorhandener Zellen regeneriert. Es ist also im Gegensatz zur Regeneration durch Epimorphose keine Blastembildung vorhanden. Dies trifft bei dem Modellorganismus *Hydra* zu, welcher

durch Morphallaxis zur Regeneration fähig ist. Da an dem Ende des regenerativen Gewebes keine Zellproliferation der endodermalen Epithelzellen stattfindet, erfolgt die Regeneration von *Hydra* hauptsächlich durch die Transformation von existierenden Zellen bzw. Gewebe in neu organisierte Strukturen (Agata et al., 2007; Bosch, 2007). Es handelt sich um eines der herausragenden Merkmale von *Hydra*, da komplette Strukturen wieder neu gebildet werden (Bosch, 2007; Holstein et al., 2003). Jedes isolierte Fragment der *Hydra*, das aus mehr als ein paar hundert Epithelzellen besteht, kann zu einem kompletten Tier regenerieren, wobei ausgehend von der originalen Polarität sich posterior wieder ein Kopf und anterior wieder ein Fuß bildet. Selbst eine Dissoziation der Tiere in Einzelzellen mit anschließender Zentrifugation zu einem Zellpellet resultiert in der Regeneration multipler Hydren (Gierer et al., 1972).

Die Morphologie des Organismus kann sich auf Grund von Organisatoren ausbilden. Das Gierer-Meinhardt Modell zeigt, dass sich die Morphogradienten durch zwei miteinander gekoppelte Prozesse bilden können. Der sich selbst produzierende Aktivator ist dabei an einen Antagonisten mit höherer Diffusität gekoppelt (Gierer and Meinhardt, 1972).

Die Entdeckung dieser embryonalen Signalzentren liegt den Experimenten von Hans Spemann und Hilde Mangold zu Grunde. Im Jahre 1935 erhielt Hans Spemann dafür den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin. Bei dem Spemann-Mangold Organisator handelt es sich um eine Zellpopulation, die induktive Signale von sich gibt (Spemann and Mangold, 2001). Diese werden anschließend an das umliegende Gewebe weitergegeben und beeinflussen so die weitere Entwicklung besonders im Hinblick der Ausbildung der Körperachsen und Regeneration (Harland and Gerhart, 1997; Spemann and Mangold, 2001).

Es wurden bereits Gradienten für einen Kopffaktivator sowie Kopfinhibitor beim Modellorganismus *Hydra* postuliert. Das Maximum der beiden Gradienten ist im Hypostom lokalisiert, wobei das Maximum des Kopfinhibitors knapp unter dem des Kopffaktivators liegt. Von dort aus diffundieren sie entlang der Körpersäule (MacWilliams, 1983; Wilby and Webster, 1970). Die Existenz solcher Gradienten wurde bisher lediglich indirekt durch Versuche in Form von Transplantationsexperimenten bestätigt. Transplantiert man ein Gewebestück, welches ursprünglich näher am Kopf lokalisiert war, in die Körpersäule einer Akzeptor-Hydra, so bildet sich mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an dieser Stelle eine Sekundärachse aus als bei Transplantation eines Gewebestücks, welches von der Kopfregion weiter entfernt war (Meinhardt, 2009).

Der kanonische Wnt-Signalweg ist die molekulare Basis des Kopfforganisators (Bode, 2012). Im Falle der *Hydra* werden spezifische Wnt-Gene unmittelbar nach der Amputation des Kopfes

aktiviert (Hobmayer et al., 2000; Petersen et al., 2015). Diese initiale Aktivierung des Wnt- β -Catenin Signalwegs ist für die Kopfregeneration und die Knospenbildung essentiell (Lengfeld et al., 2009). Da sich die Komponenten des Wnt-Signalwegs in *Hydra* kaum von denen in höheren Vertebraten unterscheiden, ist der Wnt-Signalweg hoch konserviert. Der Wnt-Signalweg ist einer der wichtigsten embryonalen Signalwege, welcher die Bildung der anterior-posterioren Körperachse bestimmt und auch in adulten Organismen in der Regulation der Zellproliferation eine wichtige Funktion besitzt (Hikasa and Sokol, 2013). Obwohl Wnt ein wesentlicher Faktor zur Etablierung des Kopffaktivators zu sein scheint, ist die Identität des Kopfinhibitors bisher höchst spekulativ. Einen ersten Hinweis auf die Identität des Kopfinhibitors könnte durch das kürzlich identifizierte Protein Sp5 gegeben sein, welches die Bildung von mehreren Köpfen in *Hydra* inhibiert (Vogg et al., 2018). Schaller et al. postuliert ebenso einen Gradienten des Fußaktivators/-inhibitors. Die maximale Konzentration dieser Gradienten befindet sich im Fuß der *Hydra* (Schaller et al., 1996). Die tatsächliche Identität des Fußaktivators ist allerdings bis heute noch nicht eindeutig nachgewiesen.

1.3 Nesselzellen in *Hydra*

Die Cnidaria verdanken ihren Namen einer spezifischen Zellform, den Nesselzellen auch Cnido- oder Nematocyten genannt. Alle Mitglieder der Cnidaria besitzen diese charakteristischen Organellen (Holstein, 1981; Ozbek et al., 2009). Bis heute sind bis zu 30 verschiedene Typen von Nesselkapseln bekannt (Weber, 1989). Davon können 25 Nematocystentypen auf Grund ihrer Morphologie voneinander unterschieden werden (Kass-Simon, 2002). Je nach Spezialisierung werden sie zum Beutefang, zur Abwehr oder zur Fortbewegung verwendet (F. and Munro, 1947). Die Nesselkapseln sind in drei Kategorien unterteilt: Die Nematocysten, die Spirocysten und die Ptychocysten (MARISCAL et al., 1977a; Mariscal et al., 1977b). Die bislang größte Variation an Nematocysten ist bei den Hydrozoa zu finden. Dabei variiert die Größe dieser Organellen zwischen 5 μm und 100 μm . Auch in der Form weisen sie erhebliche Unterschiede auf. Manche sind eher rundlich, andere zylindrisch oval. Dennoch gibt es eine gemeinsame Grundstruktur. Alle Nematocysten verfügen über eine rundliche oder zylindrische Form mit einer Kapselwand und einem invertierten Schlauch, welcher teilweise über Widerhacken (Stilet) verfügt (Beckmann and Ozbek, 2012; Ozbek et al., 2004; Teragawa and Bode, 1995). Eine Deckelstruktur, das Operculum, verschließt die Kapsel (Chapman and Tilney, 1959b).

Der Süßwasserpolymp verfügt über vier verschiedene Nematocysten: Die großen Stenotelen, die kleinen Desmonemen sowie die holotrichen und die atrichen Isorhizen (Abb. 4). Die Stenotelen und Desmonemen werden zum Beutefang verwendet. Dafür schleudern sie ihren Nesselschlauch heraus. Die Desmonemen wickeln den Schlauch um das Beutetier, während die größeren Stenotele zusätzlich ein Stilet besitzen, das extrem schnell ausgeschleudert wird und die Körperwand der Beute durchschlägt. Da die Stenotelen zusätzlich über Nesselgift verfügen, wird dem Beutetier über diesen Mechanismus das Toxin injiziert. Die holotrichen Isorhizen entladen sich nur bei Tieren, die nicht zu den Beutetieren zählen (F. and Munro, 1947). Dies impliziert, dass diese Nematocysten zur Verteidigung genutzt werden, während die atrichen Isorhizen der Fortbewegung dienen (Chapman and Tilney, 1959a; Scappaticci et al., 2010; Tardent and Holstein, 1982).

In den Tentakeln werden zehn bis zwanzig Nematocysten in eine einzelne Epithelzelle eingelagert. Dies verleiht ihnen das Erscheinungsbild einer Batterie aus Nesselkapseln. In diesen sogenannten Batteriezellen sind alle vier Arten der Nematocysten vertreten. Mehr als 95 % der Nematocysten befinden sich bei *Hydra attenuata* in den Tentakeln (Bode and Flick, 1976). Da die Nesselkapseln in den Tentakeln nur einmal entladen werden können, besteht die Notwendigkeit, dass diese kontinuierlich ersetzt werden müssen, weshalb in der Körpersäule fortwährend neue Nesselzellen differenzieren (Beckmann and Ozbek, 2012; Bode and Flick, 1976).

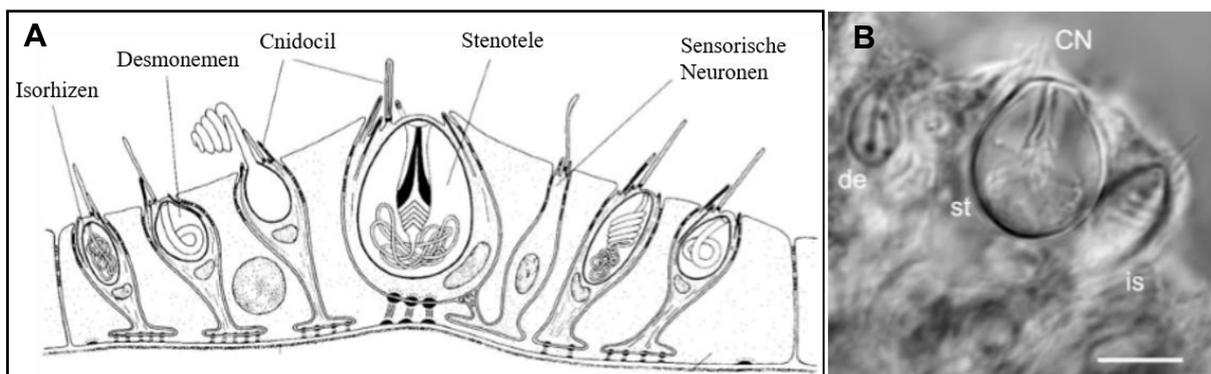


Abb. 4: Nematocysten von *Hydra*. A) Schematische Darstellung von Batteriezellen, adaptiert nach Holstein et al. (Holstein, 2012b). B) Batteriezelle in den Tentakeln von *Hydra* mit der zentralen Stenotele (st), Isorhizen (is) und Desmonemen (de). Das Cnidocil (CN) ist nach außen gerichtet (Größenmaßstab 5 μm) (Beckmann and Ozbek, 2012).

1.4 Entstehung der Nematocyten

Um fortlaufend neue Nematocysten für den Beutefang bereitstellen zu können, werden sie ständig neu gebildet. Die Entwicklung der Nematocyten im Allgemeinen ist charakterisiert durch eine Korrelation zwischen der Ausbildung der Nematocysten und die des sensorischen Apparats (Holstein, 1981). Die neuen Nematocyten gehen aus den Cnidoblasten im Bereich der Körpersäule hervor. Diese wiederum werden von den kleinen undifferenzierten, interstitiellen Zellen gebildet und treten in Clustern von 4 bis 32 Zellen auf. Alle Zellen vom selben Cluster sind durch zytoplasmatische Brücken verbunden und bilden somit ein Syncytium, welches eine Synchronisierung des Differenzierungsprozesses gewährleistet. Die Initiierung der Nematocystenmorphogenese in den Cnidoblasten findet in deren Zytoplasma statt (Abb. 5). Hierbei entsteht initial ein post-Golgi Vesikel, welcher stetig durch Fusion mit neuen sekretorischen Vesikeln aus dem Trans-Golgi Netzwerk wächst, bis er die gesamte Zelle ausfüllt (Slautterback and Fawcett, 1959). Die Kontur der entwickelnden Nematocyste wird durch die Anordnung der Mikrotubuli bestimmt. Sie bilden eine Gerüststruktur, an welche sich Vesikel anlagern können. Die Vesikel wiederum enthalten strukturelle Proteine, die sich während des Wachstums der Nematocysten zu einem Netz oder Matrixstrukturen assemblieren und so die Kapselwand bilden. Zuerst lagert sich eine Schicht aus Proteinen an der Gerüststruktur an, die den äußeren Bereich der Kapselwand bildet. Daraufhin können weitere Strukturproteine angelagert werden, um letztendlich die innere Struktur der Kapselwand zu bilden (Engel et al., 2002). Die Bildung des Schlauches wird an der apikalen Seite der Nematocyste durch eine Evagination der Membran durch die Umstrukturierung des Cytoskeletts initiiert. Die äußere Schicht des entwickelnden Schlauches wird von einer Chondroitin-reichen Struktur gebildet (Adamczyk et al., 2010). Aus der initialen Evagination bildet sich sukzessive ein Schlauch durch die Fusion von sekretorischen Vesikeln (Holstein, 1981). Nachdem die Nematocyste ihre volle Größe erreicht hat, wird der Schlauch in die Kapsel verlagert und liegt dort eng zusammengerollt vor. Durch diesen Prozess wird die Kapselreifung initiiert, wodurch sich die Strukturproteine zu einem Polymer zusammen lagern, sodass sich die Kapselwand verdichtet und aushärtet (Engel et al., 2001). Gleichzeitig beginnt die Synthese von Poly- γ -Glutamat. Im Innern der Kapseln liegen enzymatisch hergestellte lineare Polymere von γ -Polyglutaminsäure vor, die mit Kationen wie Calcium oder Kalium interagieren können und somit einen extrem hohen osmotischen Druck von 150 bar generieren. Die Konzentration der monomeren Glutaminsäure erreicht *in situ* bis zu 2 M (Weber, 1989; Weber, 1990). Wie die Morphogenese ist auch der Reifungsprozess der Nematocysten innerhalb eines Clusters

synchronisiert. Nachdem der Reifungsprozess abgeschlossen ist, trennen sich die Nematocyten eines Clusters und wandern vereinzelt Richtung Tentakel (Campbell and Marcum, 1980). Kurz vor dem Eintritt in die Tentakelregion ist ein Maximum der Kapselreifung erreicht. Von dort an liegt die Kapselwand als ein überaus dichtes Polymer vor (Beckmann et al., 2015).

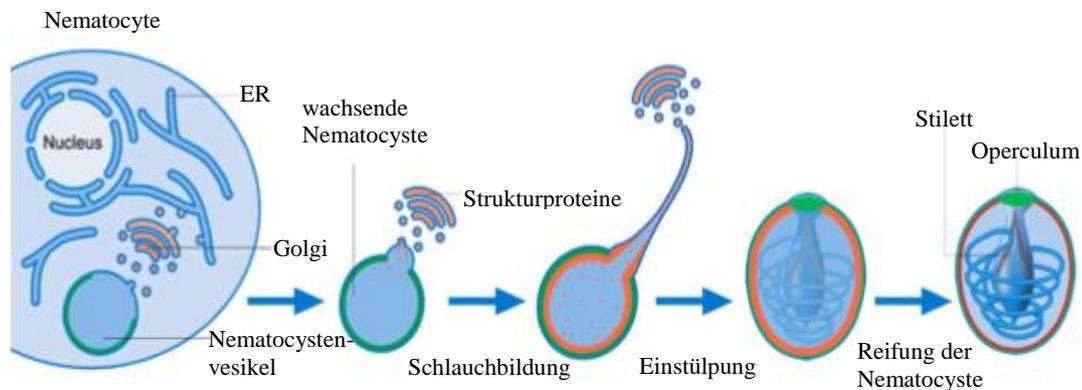


Abb. 5: Die Entstehung der Nematocyste. Die Entstehung der Nematocyste beginnt im Zytosol. Die Nematocysten-Vesikel wächst durch Addition von Proteinen des Golgi-Apparats. Durch Evagination der Membran auf der apikalen Seite der Nematocysten wird der Schlauch gebildet. Nach der Bildung des Schlauchs wird dieser in die Nematocyste eingebracht und die Kapsel durch eine Deckelstruktur (Operculum) geschlossen. Das Stilet wird gebildet und die Reifung der Nematocyste beginnt. Die Verhärtung der Kapselwand beruht auf der Polymerbildung von Strukturproteinen (Beckmann and Ozbek, 2012).

1.4.1 Die Entladung der Kapsel

Die Nematocyten, insbesondere die Stenotelen von *Hydra*, kommen beim Beutefang zum Einsatz. Dabei wird der in der Kapsel aufgerollte Schlauch explosionsartig herausgeschleudert. Um den Entladungsprozess zu initiieren, sind sensorische Rezeptoren essentiell. Alle Stenotelen verfügen über ein Cnidocil, welches sich apikal an den Nematocyten befindet. Das Cnidocil enthält sensorische Rezeptoren, die auf mechanische Reize reagieren (Cormier and Hessinger, 1980). Paraloge von TRP-N (*transient-receptor-potential*) wurden bereits in der sensorischen Struktur des Cnidocils von *Hydra* identifiziert. Die TRP-Kationenkanäle werden durch mechanische Stimuli aktiviert (Schuler et al., 2015). Zusätzlich wird die Entladung der Nematocyte über Chemorezeptoren in speziellen sensorischen Neuronen, die auf sezernierte Substanzen der Beutetiere reagieren, kontrolliert (McLaughlin, 2017; Watson and Hessinger, 1989).

Die vollständige Entladung der Nematocysten kann in vier Phasen unterteilt werden. Die Initiierung der Entladung erfolgt in Phase A (Ozbek et al., 2009). Calcium spielt dabei eine wichtige Rolle. Die Reizung des Cnidocils führt zu einer Depolarisation der Zelle und zur Öffnung spezifischer Calciumkanäle. So kann Calcium aus dem umgebenden Medium des

Polypen ins Innere der Nematocyste gelangen (Gitter et al., 1994). Auf Grund der Hydrophilie der Ionen geht dieser Prozess mit dem Zufluss von Wasser einher (Fernandez et al., 1991). Somit steigt das Volumen der Nematocyste vor der Entladung für einen kurzen Moment um 10 % an. Dadurch wird der Druck in der Kapsel zusätzlich erhöht (Holstein and Tardent, 1984; Lubbock and Amos, 1981; Lubbock et al., 1981). In Phase B erfolgt die Entladung der Nematocyste. Der Nematocysten-Vesikel fusioniert mit der Membran der und der Entladungsprozess startet (Ozbek et al., 2009). Vor der Entladung herrscht in der Kapsel ein hoher osmotischer Druck von 150 bar, der durch die Anreicherung des Poly- γ -Glutamats gebildet wird (Lubbock et al., 1981; Weber, 1989). Nach der Reizung des Cnidocils (s.o.) wird das Operculum geöffnet. Durch den hohen osmotischen Druck wird das Stilet mit dem Schlauch explosionsartig mit einer extrem hohen Beschleunigung von 5.410.000 g herausgeschleudert (Nuchter et al., 2006). Das initiale Herausschleudern dauert etwa 700 ns (Abb. 6). Während der Entladung schrumpft das Volumen der Nematocyste bis auf 50 % des ursprünglichen Volumens (Beckmann et al., 2015; Tardent and Holstein, 1982). Der komplette Entladungsprozess ist bereits nach 3 Millisekunden beendet. Es handelt sich hier um einen der schnellsten Prozesse in der Natur (Holstein and Tardent, 1984; Nuchter et al., 2006). Auf Grund des hohen osmotischen Drucks in der Nematocyste und der Änderung des Volumens während der Entladung ist eine stabile und gleichzeitig elastische Kapselwand essentiell.

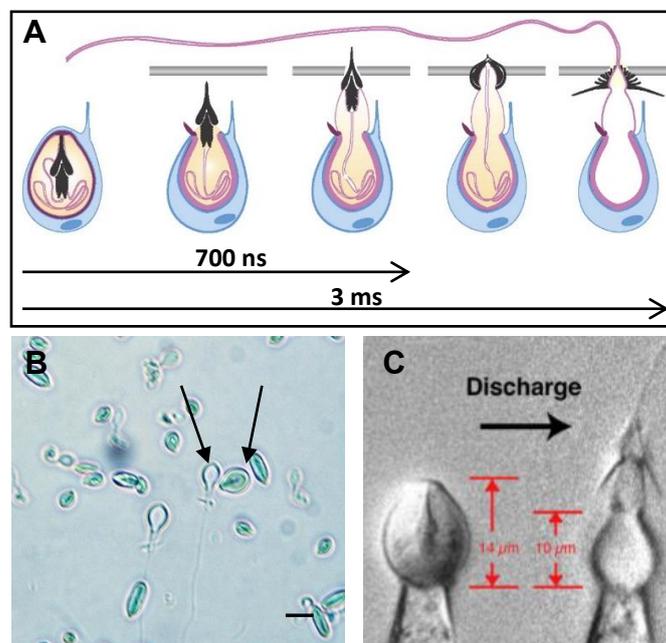


Abb. 6: Entladungsprozess der Nematocysten von *Hydra*. A) Schematische Darstellung der Entladung von Stenotelen (adaptiert von Nuchter et al., 2006). B) Verschiedene Namtocysten, teilweise entladen. Der linke Pfeil deutet auf eine entladene und der rechte auf eine nicht entladene Stenotele. Diese Kapseln unterscheiden sich in ihrer Größe (Größenmaßstab 20 μm). C) Nahaufnahme Stenotele: Die Entladung der Stenotele geht mit der Reduktion ihres Volumens einher (Beckmann et al., 2015).

Phase C ist eine relativ lange Phase von ungefähr 150 μ Sek, in welcher das Stilet in den Körper des Beutetieres geschossen wird (Holstein and Tardent, 1984; Ozbek et al., 2009). Das Stilet formt dabei eine Art Pfeilspitze, mit der ein Loch in die Haut des Beutetiers geschlagen werden kann (Holstein and Tardent, 1984). Der Prozess ist beendet, wenn das letzte Stück des Schlauches vom Innern der Kapsel ausgestülpt wurde (Phase D). Die Phase D geht am langsamsten von statten. Das Herausschleudern des Schlauches erfolgt in einer Geschwindigkeit von 0,3 m/s, deutlich langsamer als das des Stiletts in Phase B (Holstein and Tardent, 1984). Auch die Injektion des lähmenden Nesselgifts in die Beute zählt zu der letzten Phase der Entladung der Nematocyste (Ozbek et al., 2009).

Auch die Nematocysten der Anthozoa werden zum Beutefang eingesetzt (Schlesinger et al., 2009; Todaro and Watson, 2012; Zenkert et al., 2011). Bei der Regulation der Entladung sind sowohl mechanische Reize als auch Chemorezeptoren beteiligt, die Komponenten der Beutetiere identifizieren (Thorington and Hessinger, 1988). Der Entladungsprozess dieser Nematocysten kann ebenfalls in vier Phasen unterteilt werden (Kass-Simon, 2002). Im Gegensatz zu den Nematocyten der Hydren verfügen sie über eine dreiteilige Deckelstruktur (Westfall, 1966), die in der Phase A geöffnet wird (Kass-Simon, 2002). Kurz vor der Entladung schwillt die Kapsel durch den Influx von Meerwasser bis zu 150 % an, was darauf hindeutet, dass der osmotische Druck im Innern steigt (Robson, 1973). Phase B beinhaltet die Ausstülpung des Schafts. Der Schlauch alleine ist nicht in der Lage die in das Beutetier zu penetrieren. Im Gegensatz zu dem Stilet der Stenotelen von Hydra, sind bei den Nematocysten der Anthozoa, wie z.B. bei *Anemonia sulcata*, ungefähr 380 Lamellen in dicht gepackter, helikaler Anordnung um den Schlauch lokalisiert. Bei der Entladung stellen sich die Lamellen in einem Winkel von 90° auf und geben dem Schaft die nötige Struktur und Dichte um ein Loch in das Beutetier zu stoßen. In Phase C wird der Schlauch vollends aus der Nematocyste herausgeschleudert und in der Phase D die löslichen Stoffe aus dem Innern der Nematocyste in das Beutetier injiziert (Kass-Simon, 2002). Die Nematocyste schwillt nach der Entladung wieder bis zu ihrem ursprünglichen Volumen ab (Robson, 1973).

1.5 Molekularer Aufbau der Nematocystenwand

Das gesamte Kapselproteom umfasst ca. 400 Proteine (Balasubramanian et al., 2012). Die Nematocytenwand selbst besteht hauptsächlich aus Strukturproteinen. Erstaunlicherweise sind die Kapselproteine der Nematocyste den Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) sehr ähnlich (Balasubramanian et al., 2012; Ozbek et al., 2009), da sie reich an Minikollagenen, Metalloproteasen und Proteinen mit EZM-spezifischen Domänen, wie etwa Fibronektin-, Trombospondin- oder Lektin-Motiven (Balasubramanian et al., 2012).

Durch die verschiedenen spezifischen Domänen der Proteine ist eine korrekte Assemblierung der Kapselwand möglich, so dass sie in der Lage ist, den extremen physikalischen Bedingungen in der Nematocyste Stand zu halten (Balasubramanian et al., 2012). Viele Proteine der Kapselwand enthalten am N- und am C-Terminus kurze cysteinreiche Domänen (CRDs). Über diese können unterschiedliche Proteine kovalent miteinander verknüpft werden, um ein stabiles Disulfid-vernetztes Polymer auszubilden (Tursch et al., 2016). Die Hauptbestandteile der Nematocystenwand sind die strukturgebenden Elemente, wie die Minikollagene oder das elastische Protein Cnidoin (Beckmann et al., 2015).

1.5.1 Minikollagene

Eine der wichtigsten Komponenten der Nematocyten sind die Minikollagene, die mit großer Wahrscheinlichkeit der Kapselstruktur ihre ungewöhnliche Stabilität verleihen. Allein im Genom von *Hydra* sind 17 Vertreter dieser Gruppe vorhanden (David et al., 2008). Die Minikollagene werden bei der Nematomorphogenese im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in sekretorische Vesikel gepackt und gelangen von dort in die Kapsel. Kurz bevor der TGN-Vesikel mit der Membran der Nematocyte fusioniert wird das Propeptid abgeschnitten. Dadurch wird die Löslichkeit der Minikollagene reduziert und die Proteine werden später in die Kapselwand eingebaut (Milbradt et al., 2005b). Durch ihre Verlinkung mit anderen Kapselproteinen bilden sie ein Netzwerk in der Kapselwand. Die starre Struktur der Minikollagene ist in der Lage, dem extremen Druck im Innern der Nematocyste Stand halten zu können (Holstein et al., 1994). Sie weisen strukturelle Übereinstimmungen mit den Kollagenen der extrazellulären Matrix von Vertebraten auf (Balasubramanian et al., 2012). Wie Kollagene höherer Metazoen besitzen Minikollagene eine zentrale Kollagendomäne, die aus Gly-X-Y Tripeptiden besteht, wobei meist X durch Prolin und Y durch Hydroxyprolin belegt ist. Jeweils drei Kollagenketten lagern sich zu einer Kollagen-Tripelhelix zusammen, welche eine alpha-helikale Struktur aufweist. Für die Stabilisierung des Trimers ist Hydroxylierung des

Prolins essentiell, da die Hydroxygruppe die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen unter den drei Kollagenhelices ermöglicht. Interessanterweise zeigen Minikollagene die gleichen strukturellen Charakteristika auf mit der Ausnahme, dass ihre zentrale Kollagendomäne lediglich 12 bis 16 Glycin-XY Triplets umfasst. Die Kollagendomäne bei Minikollagenen wird von Polyprolindomänen und CRDs flankiert (Abb. 7). Durch die CRDs sind die Minikollagene untereinander und mit weiteren Proteinen in der Kapselwand verlinkt (Ozbek, 2011).

Minikollagen-1 (NCol-1) ist das bisher am besten charakterisierte Protein dieser Gruppe. Es ist integraler Bestandteil der Kapselwand und besitzt posttranslationale Modifikationen wie N-Glykosylierungen (Ozbek et al., 2002b). Erste Struktur/Funktions-Analysen an Minikollagenen und deren CRDs wurden am Beispiel von NCol-1 durchgeführt (Milbradt et al., 2005a; Pokidysheva et al., 2004).

Die Minikollagene sind jedoch nicht ausschließlich in der Nematocystenwand lokalisiert. Minikollagen-15 (NCol-15) wurde im Gegensatz zu NCol-1 im Schlauch der Nematocyste detektiert (Adamczyk et al., 2008). Dies lässt auf eine funktionelle Differenzierung der Minikollagene schließen, wobei die molekulare Basis hierfür vermutlich in Sequenzunterschieden der CRDs kodiert ist (Adamczyk, 2008, Tursch, 2016).



Abb. 7: Domänenorganisation von Minikollagenen (adaptiert von Balasubramanian, 2011). Typische Domänenorganisation der Minikollagene. Die helikale Gly-X-Y-Domäne ist von jeweils einer Polyprolin-Sequenz und N- und C-terminalen cysteinreichen Domänen flankiert (PP= Polyprolin).

1.5.2 CPP-1 (Cnidarian Prolin-rich Protein 1)

Neben den typischen Minikollagenen sind zusätzlich minikollagenähnliche Proteine wie das CPP-1 im Nematocystenproteom nachgewiesen worden. CPP-1 ist ein Vertreter von sechs prolinreichen Proteinen im Kapselproteom, die zum Teil CRDs besitzen. CPP-1 zeichnet sich als einziger Vertreter durch eine deutlich Minikollagenähnliche Domänenstruktur aus, in der allerdings die zentrale Kollagendomäne durch eine Polyprolinsequenz ersetzt ist, welche von terminalen CRDs flankiert ist (Abb. 8). Auf Grundlage dieser Strukturmerkmale wurde die Hypothese aufgestellt, dass Minikollagene evolutionär aus den CPPs hervor gegangen sein könnten (Balasubramanian et al., 2012). Über die Funktion von CPP-1 im Nematocystenbau lagen bisher keine Daten vor. Jedoch sind prolinreiche Motive in der Natur häufig zu finden. Oftmals sind gerade an diesen Proteinen posttranslationale Modifikationen zu finden, wie zum

Beispiel die Hydroxylierung (Stoehr et al., 2016). Interessanterweise sind in Pflanzen eine Vielzahl von Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen (HRGPs) in der Zellwand lokalisiert. Die strukturelle Funktion der HRGPs in der Pflanzenzellwand wurden bereits intensiv studiert. Die Extensine und die Arabinogalactan-Proteine (AGPs) sind Vertreter dieser Gruppe. Die AGPs in *Arabidopsis thaliana* können mit anderen Proteinen interagieren und tragen so zur Stabilität der Zellwand bei (Hijazi et al., 2014). Sie besitzen repetitive Alanin- oder Serinmotife die mit weiteren hydroxyprolinreichen Molekülen interagieren. Zudem unterstützen ihre posttranslationalen Modifizierungen die stabilisierende Wirkung. Durch Glykosylierungen sind die AGPs gegen proteolytische Enzyme in ihrem nativen Zustand resistent (Kavi Kishor et al., 2015). Auch die Extensine interagieren mit ihrer Umgebung. Sie sind für die korrekte Assemblierung der Zellwand essentiell (Pereira et al., 2011). Biochemische Studien weisen auf Ionenbindungen zwischen Extensinen und Pektinen in der Zellwand hin. Die positiv geladenen Lysin-Reste und die protonierten Histidin-Reste der Extensine treten in ionische Interaktionen mit den negativ geladenen Uronsäuren der Pektine (Showalter, 1993), was sowohl die Stabilisierung als auch die korrekte Anordnung der Proteine in der Zellwand unterstützt. Die strukturelle Ähnlichkeit der Extensine und der CPPs geben Hinweis auf mögliche analoge Funktionen der beiden Proteingruppen. Auch die Lokalisation der HPRGs in der Pflanzenzellwand und die der CPPs im strukturgebenden Anteil der Nematocyste sprechen dafür.



Abb. 8: Domänenorganisation von CPP-1 (adaptiert von Balasubramanian, 2011). Domänenorganisation von CPP-1. Die zentrale Polyprolin-domäne wird von CRDs flankiert (PP= Polyprolin).

1.5.3 Cnidoin

Reißfeste molekulare Komponenten wie die Minikollagene sind in der Kapselwand essentiell um dem hohen osmotischen Druck stand halten zu können. Jedoch sind ebenso elastische Strukturen notwendig. Durch diese kann die Energie, die durch den hohen Druck aufgebaut wird (Spannungsenergie), gespeichert und bei der Entladung der Nematocyste wieder abgegeben werden. Der elastische Gegenspieler der Minikollagene ist das Cnidoin. Es handelt sich dabei um ein Elastomer, welches in der Kapselwand wie auch in der Schlauchstruktur lokalisiert ist (Beckmann et al., 2015). Das Cnidoin besitzt eine zentrale Glycin-Glutamin reiche Domäne, die von CRDs flankiert ist (Abb. 9). Die zentrale Domäne ähnelt in ihrer Sequenz der Glycin-reichen Domäne von Spidroin-2, einem Hauptprotein der Spinnenfaser. Beide Proteine weisen das konservierte GXGQQ-Motiv auf. Die Position X ist bei Cnidoin mit

der Aminosäure Cystein besetzt, bei Spidroin-2 mit Prolin (Beckmann et al., 2015; van Beek et al., 2002). Die Ähnlichkeit der beiden Proteine deutet bereits auf die elastische Funktion des Cnidoins hin. Zudem wurden die biomechanischen Eigenschaften einzelner Cnidoinmoleküle experimentell untersucht. Auch diese Ergebnisse bestätigen die Elastizität des Cnidoins. Eine Persistenzlänge von $0,37 \pm 0,23$ nm wurde dabei mit dem Atomkraftmikroskop (AFM) ermittelt (Beckmann et al., 2015). Dies stimmt mit der anzunehmenden Persistenzlänge von gedehnten Proteinen überein, die mittels AFM gemessen wurde über ein (Rief et al., 1997). Zusätzlich wurden Simulationen bezüglich der Moleküldynamik durchgeführt. An Hand diesen Messungen konnte eine Persistenzlänge von 0,74 nm bestimmt werden (Beckmann et al., 2015). Was anzeigt, dass sich das Cnidoin, verglichen mit der Spinnenseide, wie ein elastisches Protein verhält (Cheng et al., 2010).

Das Cnidoin wird sich entwickelnden Nematocysten exprimiert und ko-lokalisiert mit dem Minikollagen in der Kapselwand. Es wird angenommen, dass sich über die terminalen CRDs beider Moleküle Cnidoin-Minikollagen Copolymere ausbilden (Beckmann et al., 2015).

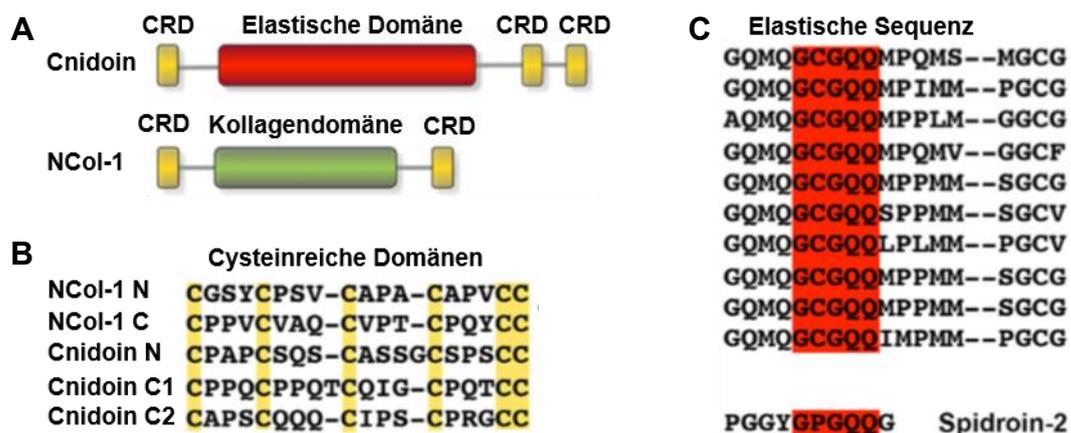


Abb. 9: Domänenorganisation und Sequenzelemente von Cnidoin (adaptiert von Beckmann, 2015). A) Domänenorganisation von Cnidoin und Minikollagen 1 (NCol-1). B) Darstellung der betreffenden cysteinereichen Domänen (CRDs). Die konservierten Cysteine sind gelb markiert. C) Elastische Domäne von Cnidoin mit der homologen Sequenz des Spidroin-2. In beiden Sequenzen ist das rot markierte Motiv GxGQQ vorhanden.

1.5.4 Cysteinreiche Domänen (CRDs)

Eine Vielzahl von Nematocystenproteinen besitzt Minikollagen-typische CRDs. CRDs sind kleine globuläre Domänen, die nicht mehr als 20 Aminosäuren besitzen. Sie sind durch ein konserviertes Cystein-Sequenzmuster von 6 Cysteinen (CX₃CX₃CX₃CX₃CC) charakterisiert, welches für die Polymerisierung der jeweiligen Proteine durch Disulfidbrücken verantwortlich ist. In den frühen Stadien der Kapsel-Morphogenese liegen die Disulfidbrücken der CRDs zunächst intramolekular innerhalb einer Domäne vor, welche dann während der Reifung

umgelagert werden, sodass intermolekulare Disulfide gebildet werden können, die die CRDs von zwei Proteinen verknüpfen (Engel et al., 2001; Ozbek et al., 2002a).

Die bisher am besten charakterisierten CRDs sind die N- und C-terminalen CRDs von NCol-1. Von beiden Peptiden wurden NMR-Strukturen in oxidiertem Zustand bestimmt worden (Milbradt et al., 2005a). Trotz ihres identischen Cystein-Sequenzmusters weisen sie komplett unterschiedliche dreidimensionale Strukturen und Disulfidmuster auf, die von Aminosäuren, die keine Cysteine enthalten, induziert werden (Boulegue et al., 2006; Milbradt et al., 2005a). Meier und Kollegen waren in der Lage durch den Austausch von lediglich 2 Aminosäuren (Gly4Val, Lys14Pro) die Struktur der N-CRD in die der C-CRD zu überführen. Dadurch erfolgte eine Konformationsänderung des konservierten Prolins (Position 11) von *cis* (N-CRD) zu *trans* (C-CRD), was wiederum wesentlich die Disulfid-Konnektivitäten beeinflusst. Bei der N-CRD werden dadurch Disulfidbrücken zwischen Cys8/Cys20, Cys12/Cys25 und zwischen Cys16/Cys24 gebildet. Bei der C-CRD liegen Disulfidbrücken zwischen Cys8/Cys24, Cys12/Cys20 und Cys16/Cys25 vor (Abb. 10) (Meier et al., 2007).

Die strukturellen Unterschiede haben auch Konsequenzen für die Funktion der jeweiligen Domäne im Polymerisationsprozess der Nematocyste. N- und C-CRDs weisen hierbei verschiedene intermolekulare Verknüpfungsmodi und Unterschiede bezüglich der Kinetik auf (Tursch et al., 2016). Die C-CRD kann mit mindestens zwei weiteren CRDs Interaktionen eingehen und somit verzweigte Disulfidverknüpfungen ausbilden, während die N-CRD nur „monovalent“ ist und lineare Polymere bildet (Tursch et al., 2016). Auch in der Faltungskinetik im Verlauf der Reoxidation sind erhebliche Unterschiede zu verzeichnen. Die komplette Oxidation der N-CRD benötigt 20 Stunden während die vollständige Oxidation der C-CRD innerhalb ca. einer Stunde abgeschlossen ist (Boulegue et al., 2006). Die Begründung dafür liegt in der unterschiedlichen Bildung der Tertiärstruktur. Die Disulfidbrücken der N-CRD werden kooperativ gebildet. Erst nachdem die erste Disulfidbrücke korrekt vorliegt, können die weiteren Verlinkungen nach Durchlaufen mehrerer Intermediate gebildet werden. Die Disulfidbrücken der C-CRD sind im Gegensatz dazu unabhängig voneinander, was zu einer schnelleren Faltungskinetik führt (Milbradt et al., 2005b).

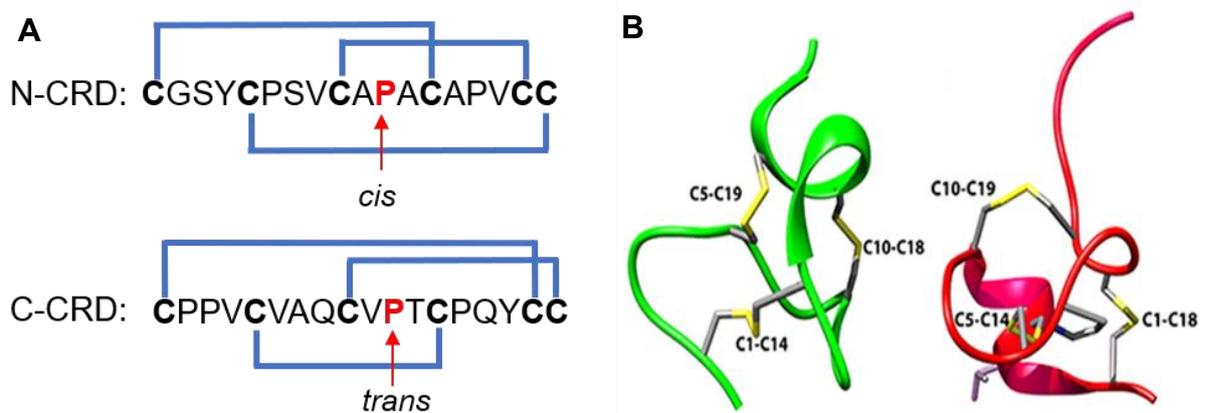


Abb. 10: Cysteinmuster und Sekundärstruktur der N- und der C-CRD. A) Beide Sequenzen weisen ein identisches Cysteinmuster auf. Für die Faltung der CRD-Peptide ist ein hochkonserviertes Prolin an Position 11 essentiell, dass in der N-CRD in cis-Konformation und bei der C-CRD in trans-Konformation vorliegt. In blau sind die Disulfidbrücken verdeutlicht. B) Darstellung der Sekundärstruktur der N-CRD (grün) und der C-CRD (rot). Dabei wurden die Kohlenstoffatome (grau), die Schwefelatome (gelb) und die Stickstoffatome (blau) markiert (Tursch et al., 2016).

Tursch et al. konnten zeigen, dass GFP oder mCherry durch die Fusionierung mit CRDs zu makromolekularen, disulfidvernetzten Polymeren umgewandelt werden können. CRDs bieten daher interessante Möglichkeiten für die Herstellung von bioinspirierten Materialien. Disulfidbrücken werden bereits eingesetzt, um therapeutisch interessante Peptide zu stabilisieren und dadurch ihre therapeutische Wirkung zu verbessern (Gongora-Benitez et al., 2014). Da über die Verwendung unterschiedlicher CRDs nicht nur die Polymerisierung selbst, sondern auch dessen Kinetik und Vernetzungsgrad gezielt gesteuert werden kann, könnte dies vor dem Hintergrund biomedizinischer Anwendungen eine neue Möglichkeit zur Synthese von Makromolekülen mit maßgeschneiderten Eigenschaften darstellen.

1.6 Biopolymere als medizinische Applikation

Auf Grund der hohen Bioverfügbarkeit und der Fähigkeit, eine natürliche EZM zu imitieren, stellen die Biopolymere ein attraktives Material für medizinische Anwendungen dar (Chen and Liu, 2016). Um die Gesundheitspflege zu verbessern, werden ständig neue biomimetische Materialien in den Forschungslaboren getestet. Die Einsatzgebiete finden sich hauptsächlich in der regenerativen Medizin, Gewebedesign und der Verwendung als Implantate (Borzacchiello et al., 2015; Griffith, 2002; Mir et al., 2018; Qiu and Park, 2001). Diesbezüglich werden sowohl natürlich vorkommende Biopolymere, als auch eigens für medizinische Applikationen synthetisierte biomimetische Polymere (z.B. Hydrogele) verwendet.

Kollagen spielt beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Wundheilung. Während dem Heilungsprozess ist dessen Synthese besonders erhöht. Basierend auf dessen funktionellen und bioaktiven Eigenschaften wird Kollagen als ein vielseitiges Biomaterial verwendet. Es kann sowohl den Heilungsprozess positiv beeinflussen als auch zum Modellieren von Gewebestrukturen dienen. Dabei aggregiert isoliertes Kollagen zu einem Gel mit einem neutralen pH-Wert und stellt so die strukturelle Basis für eine 3D Matrix zum Gewebedesign dar (Fleck and Simman, 2010; Kanta, 2015).

Die Hyaluronsäure ist ein Vertreter der natürlich vorkommenden Biopolymere und wird bereits bei der Gewebekonstruktion oder als dermatologische Füllung eingesetzt (Fakhari et al., 2014). Die synthetischen Biomaterialien haben neben ihrer Bioverfügbarkeit zusätzliche Vorteile. Sie können je nach Bedarf in eine beliebige dreidimensionale Struktur geformt werden und je nach Materialeigenschaften zugleich die Proliferation, sowie die Differenzierung von Zellen unterstützen. Gerade die regenerative Medizin profitiert von diesen Materialeigenschaften (Krishna et al., 2016).

Das Design von biologischen Polymeren wird durch die Feinabstimmung mehrerer Parameter während der Polymersynthese und der Wahl des Rohstoffes verändert. Je nach Applikation werden Eigenschaften wie mechanische Stabilität, Härte und biologische Abbaubarkeit variiert. Auch die Formen sind variabel. Die biomimetischen Materialien liegen je nach Verwendung beispielsweise als Faser oder als Gel vor (Petersen, 2016; Xia et al., 2017).

1.6.1 Die Nematocystenwand als Modell für die Synthese neuer Materialien – Projektidee und Konzept von „SynNess“ (BW-Stiftung)

Die Entwicklung von neuen biomimetischen Materialien trägt erheblich zum medizinischen und technischen Fortschritt in unserer Gesellschaft bei (Hwang et al., 2015). Die Natur liefert viele Modellbeispiele für innovative Strukturen, Rohstoffe und Funktionalitäten (Dickert, 2014; Liu et al., 2016a; Pu et al., 2016). Durch die spezifische Nutzung von natürlichen Prinzipien für die Herstellung neuer Materialien, können umweltfreundliche Materialien synthetisiert werden, die an die Anforderungen der jeweiligen Anwendung angepasst sind. Das Forschungsprogramm „Bioinspirierten Materialsynthese“ (BioMat) der Baden-Württemberg Stiftung unterstützt die regionale Forschung in diesem Bereich und war Förderer des vorliegenden Projektes („SynNess“).

Das Konzept im Projekt „SynNess“ bestand darin, die biochemische Polymerisation von Nematocystenproteinen auf synthetische Hybridmaterialien zu übertragen. Hybridpolymere

bestehen klassischerweise aus polymeren Strukturen von verschiedener Materialklassen (Sanchez et al., 2005). Da die Polymerbildung der Kapselwand auf der Disulfidbrückenbildung der CRD-Einheiten beruht (Ozbek et al., 2002a), stellte dieses Peptid ein optimalen Kandidaten für die Synthese von neuen Materialien dar. Bei der Entwicklung dieser Materialien sollten die Eigenschaften der CRD mit denen synthetischer Polymere kombiniert werden. Innerhalb der Masterarbeit von Anja Tursch konnte gezeigt werden, dass CRDs mit Nichtkollagen-Proteinen fusioniert werden können, um dann kontrolliert in einer Redoxreaktion zu polymerisieren (Tursch, 2015). Im Projekt „SynNess“ sollten CRD-Einheiten an α,ω -funktionale Polymere gekoppelt werden, um dann hieraus mittels eines Stufenwachstumsprozesses durch intermolekulare Disulfidverknüpfung der CRD-Motive Hybridpolymere zu synthetisieren. Dieser Teil des Projektes wurde am KIT, Karlsruhe, durchgeführt.

1.6.2 Prinzip des Elektrosinnings zur Herstellung von biomimetischen Materialien

Das Elektrosinning ist eine bewährte Technologie um Nanofasern aus natürlichen Proteinen für die Biomedizin herzustellen (Buttafoco et al., 2006; Liu et al., 2017). Das Prinzip ist einfach und zugleich kostengünstig. Durch Variation der Produktionsparameter kann die Beschaffenheit der Nanofasern exakt an die jeweilige Anwendung angepasst werden. Sowohl der Durchmesser als auch die mechanischen Eigenschaften der einzelnen Fasern sind variabel. Zudem können sowohl flächige als auch dreidimensionale Nanostrukturen erzeugt werden (Braghirolli et al., 2015; Cramariuc et al., 2013) und ermöglichen so die Herstellung einer kontrollierbaren und dennoch variablen Gerüststruktur (Nam et al., 2007). Typischerweise wird beim Elektrosinning eine hohe elektrische Spannung genutzt. Dies führt zu Wechselwirkungen der Polymerlösung im elektrischen Feld. Der Aufbau der Apparatur besteht aus einer Hochspannungsquelle, einer metallischen Kanüle, die durch ein Reservoir mit der zu spinnenden Polymerlösung gespeist wird und einem Kollektor, auf dem die Fasern gesammelt werden (Abb. 11). Die Flussgeschwindigkeit der Polymerlösung wird durch eine Pumpe bestimmt. Die Kanüle ist mit der Spannungsquelle verbunden und der Kollektor geerdet. Dadurch entsteht ein elektrisches Feld, wodurch eine elektrostatische Ladung der Moleküle der Polymerlösung induziert wird (Babitha et al., 2017; Teo et al., 2011). Sobald die Oberflächenspannung der Tropfen überwunden wurde, bildet sich ein Polymerjet. Nach dem Austreten aus der Kanüle bildet diese geladene Polymerlösung eine Kegelform, auch „Taylor cone“ genannt (Taylor, 1969). Auf dem Weg zum Kollektor verdampft das Lösungsmittel (Frenot and Chronakis, 2003; Liu et al., 2017). Das Resultat sind Polymerfasern deren

Durchmesser durch die Prozessparameter wie Spannung und der Flussgeschwindigkeit der Polymerlösung variiert werden können (Cramariuc et al., 2013)

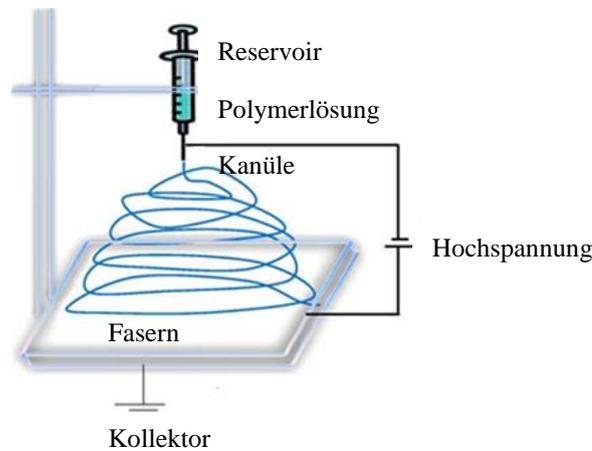


Abb. 11: Schematische Darstellung der Elektrospinningapparatur (adaptiert von Bhardwaj and Kundu, 2010). Die Polymerlösung befindet sich in dem Reservoir. An der metallenen Kanüle wird eine Spannung angebracht und der Kollektor ist geerdet. Die Fasern werden auf dem Kollektor gesammelt (Bhardwaj and Kundu, 2010).

1.6.3 Nanofasern als extrazelluläre Matrix für Stammzellen

Durch die Imitierung einer natürlichen extrazellulären Matrix konnten Nanofasern neben anderen Nanomaterialien bereits einen hohen Stellenwert in der Biomedizin erlangen (Babitha et al., 2017). Potentielle Applikationsbereiche für Nanofasern sind unter anderem Gewebedesign, Biosensorik oder Wundheilung (Bhardwaj and Kundu, 2010; Chen et al., 2016). *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass die Komponenten der extrazellulären Matrix, sowie Wachstumsfaktoren, die Differenzierung von Stammzellen regulieren (Xu et al., 2001). Diese Zellen sind in Kontakt mit verschiedenen löslichen und unlöslichen Komponenten der extrazellulären Matrix, die ihr Verhalten beeinflussen (Czyz and Wobus, 2001). Die Mikroumgebung regt an Hand spezifischer, exogener Reize die Differenzierung der Stammzellen an (Scadden, 2006). Stammzellen sind besonders durch ihr hohes Proliferations- und Differenzierungspotenzial für die Rekonstruktion von Geweben und Organen geeignet (Rahaman and Mao, 2005). Sie können in beliebige Typen der über 200 körpereigenen Zellen differenzieren und verfügen über die Fähigkeit der Selbsterneuerung (Alberts, 2014).

Die an Hand von Elektrospinning synthetisierten Nanofasern aus Poly(ϵ -caprolacton) und Fibroin stellen *in vitro* eine günstige Umgebung für die Proliferation, Adhäsion und Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) dar (Kim et al., 2015). Nicht nur die Herstellung von Hybridmaterialien ist eine Möglichkeit zu Funktionalisierung der Fasern (Lee et al., 2015; Sanchez et al., 2011); durch die Verwendung von bioaktiven Molekülen (z.B. Adhäsionsproteine, Wachstumsfaktoren, chemischen Medikamenten) bei der

Produktion von Nanofasern, kann ein künstliche Matrix produziert werden, die die therapeutische Effizienz steigert. Die Fasern dienen dabei als Zellsubstrat (Shin et al., 2012). In diesem Kontext stellen die EZM-ähnlichen Proteine CPP-1 und Cnidoin interessante, potentielle Kandidaten für die Biopolymersynthese dar.

1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hat folgende Ziele:

1. Die erstmalige Charakterisierung des Strukturproteins CPP-1 in Nematocysten von *Hydra* hinsichtlich der Genexpression, der Lokalisierung auf Proteinebene sowie posttranslationale Modifikationen und möglichen Funktion bei der Assemblierung der Kapselstruktur.
2. Die Herstellung von neuartigen Materialien. Dazu zählt die rekombinante Produktion der CRD, die für die Synthese von Hybridpolymeren verwendet werden soll. Weiterhin sollen neuartigen Nanofasern aus rekombinant exprimierten CPP-1 und Cnidoin-Protein durch Elektrospinning hergestellt werden. Dies beinhaltet sowohl die Etablierung des Herstellungsprozesses als auch die biophysikalische Charakterisierung der Proteinfasern. Zusätzlich sollen diese synthetisch produzierten Nanofasern hinsichtlich ihres Einsatzes als Substrat für Stammzellen erprobt werden.

2 Material

Die Forschungsexperimente wurden hauptsächlich in den Laboratorien und mit der Ausstattung der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Özbek und Prof. Dr. Holstein, Abteilung Molekulare Evolution und Genomik des Centre for Organismal Studies (COS) an der Universität Heidelberg, durchgeführt.

Abweichend davon erfolgten die Entwicklung der Herstellungsmethode von Proteinfasern sowie deren Produktion mit dem Elektrosinner NANON-03 und die AFM-Messungen in den Laboren von Prof. Motomu Tanaka an den Universitäten Heidelberg und Kyoto (Japan). Die Lyophylle für die Gefriertrocknung der isolierten Nematocysten wurde von Herrn Dr. Büttner bereitgestellt.

2.1 Organismen

Hydren

Für die Experimente wurden ausschließlich Hydren des Laborstammes *Hydra magnipapillata* 105 (Sugiyama and Fujisawa, 1977) und der transgenen Linie *Hydra vulgaris* (AEP) (Act::GFP ekto) von Robert Steel, Irvine, USA, verwendet.

Zellen

HEK293 T Zellen wurden für die eukaryotische Expression von Proteinen verwendet.

Stammzellen

hMSC (humane mesenchymale Stammzellen) wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Tanaka gestellt.

Bakterienstämme

Für die bakterielle Expression der Proteine wurde ausschließlich der Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21(DE3) verwendet.

2.2 Chemikalien

Antibiotika

Ampicillin (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)

Kanamycin (Roth; Karlsruhe, Deutschland)

Rifampicin (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)

Streptomycin (Serva; Heidelberg, Deutschland)

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (Gibco über Thermo Scientific; Waltham, USA)

Antikörper

Anti-Cnidoin (Eurogentec)

Anti-CPP-1 (Eurogentec)

Anti-Tubulin (Sigma Aldrich)

Anti-N-CRD (Eurogentec)

Goat-anti- mause HRP (Jackson Immuno Research)

HRP Goat-anti-rat IgG (H+L) (Invitrogen)

Donkey-anti-guinea pig (Jackson Immuno Research)

Alexa Fluor® 647 goat anti-guinea pig Ig H(H+L) (Invitrogen)

Donkey anti-rat; IgG Fluor (Alexa) 488; A21208 (Thermo Scientific)

Anti-DIG, alkalische Phosphatase Antikörper (Roche, über Sigma-Aldrich)

Enzyme

Proteinase K (AppliChem; Darmstadt, Deutschland)

PNGase F (NEB)

0,05 % Trypsin-EDTA (1x) (Gibco)

PreScission (rekombinant exprimiert)

Gebrauchsfertige Mischungen

BM-Purple (Roche, über Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)

Amintra Ni-NTA Resin (Amintra Harston; Cambs, UK)

Blocking Reagent (Roche, über Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)

Kits

NucleoSpin Plasmid (NoLid) DNA, RNA and protein purification Kit (Macherey-Nagel; Düren, Deutschland)

GlycoProfile™ IV Chemical Deglycosylation Kit (Sigma-Aldrich; St-Louis, USA)

Proteinmarker

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific; Waltham, USA)

siRNA

Die verwendeten siRNAs wurde mit UU-Überhang von Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten siRNAs.

Bezeichnung der siRNA	Sequenz
CPP-1_1	AA ACCAAACAACAGCGATATA TT
CPP-1_2	AA GCAATTCAAGCAGGAAAGT TT
CPP-1_3	AA GGAGACTGGTCATATGAAA

Weitere Chemikalien

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller und Firmensitz
Agar	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Ammoniumperoxisulfat	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Chroma-Gesellschaft Schmid & Co.; Köngen, Deutschland
BSA, Fraktion V	Roth; Karlsruhe, Deutschland
CaCl ₂	Roth; Karlsruhe, Deutschland
CHAPS	Roche; über Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich; St-Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva; Heidelberg, Deutschland
DMSO	Serva; Heidelberg, Deutschland
Dodecylsulfate-Na-salt (SDS)	Serva; Heidelberg, Deutschland
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

EDTA	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Essigsäure	Honeywell Fluka; Morristown, USA
Ficoll	Fluka; über Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Formamid	Sigma Aldrich; St-Louis, USA
Glutathion (red.)	VWR; Darmstadt, Deutschland
Glycerol	VWR; Darmstadt, Deutschland
3-Glycidoxypentyltrimethoxysilan	Sigma Aldrich; St.Louis, USA
Glycin	Sigma Aldrich; St.Louis, USA
Hefeextrakt	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Hefe-RNA	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Heparin	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Imidazol	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
IPTG	Serva; Heidelberg, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich; St- Louis, USA
KCl	Sigma-Aldrich; St-Louis, USA
KH ₂ PO ₄	GERBU Biotechnik GmbH; Gaiberg, Deutschland
L-Arginin	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
Methanol	Tiedel de Haen, Seelze, Deutschland
MgCl ₂	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
MnCl ₂	Grüssing; Filsum, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	AppliChem; Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	Roth; Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Sigma Aldrich; St-Louis, USA
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich; St-Louis, USA
Percoll™	GE Healthcare; Uppsala Schweden
PIPES	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Poly(ethylenoxid) (Mv 900 000)	Sigma Aldrich; St-Louis, USA
Polyvinylpyrrolidon	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor cOmplete EDTA-free	Roche Diagnostik GmbH; Mannheim, Deutschland
Rotiphorese® Gel (29:1)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	J.T. Baker; Deventer, Holland
TEMED	Roth; Karlsruhe, Germany

Tris HCl	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Urethan	Sigma-Aldrich; St-Louis, USA
Wasserstoffperoxid 30%	AppliChem; Darmstadt, Deutschland

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

Hydramedium

1,0 mM Tris HCl (pH 7,6)

1,0 mM NaHCO₃

0,1 mM KCl

0,1 mM MgCl₂

1,0 mM CaCl₂

in Elix-H₂O

Nach der Herstellung wurde das Hydramedium mindestens über Nacht bei 18 °C gelagert bis es für die Kultivierung der Tiere verwendet wurde.

LB-Medium mit Ampicillin (pro 1 L)

10 g NaCl

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

Das Medium wurde nach der Herstellung autoklaviert. Kurz vor Gebrauch wurde 1 ml (100 mg/ml) Ampicillin hinzugegeben.

Terrific Broth Medium (TB-Medium) (pro 4 L)

48 g Trypton

96 g Hefeextrakt

20 ml Glycerol

Für die Fermentation wurden 100 ml 10x TB-Phosphatpuffer zu je 900 ml TB-Medium zugegeben.

10xTB-Phosphatpuffer (80 mM)

0,17 M KH_2PO_4

0,72 M K_2HPO_4

Agarplatten:

0,5 L LB-Medium

1,5 % Agar

Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung bei RT etwas abgekühlt, das Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Platten gegossen.

Dissoziationsmedium

3,6 mM KCl

6,0 mM CaCl_2

1,2 mM MgSO_4

6,0 mM Natriumcitrat

6,0 mM Pyruvat

5,0 mM Glukose

12,5 mM TES

in H_2O gelöst

Der pH-Wert wurde auf 6,9 eingestellt und anschließend die folgenden Antibiotika hinzugeben:

0,10 g/l Streptomycin

0,05 g/l Kanamycin

0,05 g/l Rifampicin

Anschließend wurde die Lösung steril filtriert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Restorationspuffer

20 % Dissoziationsmedium

50 % Hydramedium

Der Restorationspuffer wurde unmittelbar vor dem Gebrauch frisch hergestellt.

20x SSC (Sodiumchloride, Sodiumcitrate, pH 7,0)

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

Über Nacht rühren und autoklavieren.

CHAPS, 1 % (w/v)

0,5 g CHAPS 50 ml H₂O

Das CHAPS wurde in einer gebackenen Flasche angesetzt und nicht autoklaviert.

Denhardt's 50x

1 % Polyvinylpyrrolidon

1 % Ficoll

1 % BSA Fraktion V

40 ml H₂O

Die Lösung wurde in Reaktionsgefäße aliquotiert (1 ml) und bei -20 °C gelagert.

Glycin-Stock 10x

40 mg Glycin/ml H₂O

Der Glycin-Stock wurde in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

Glycin-Gebrauchslösung (in PBST)

1:10 Verdünnung der Glycin 10x-Stock-Lösung in PBST.

Hefe-RNA

10 mg/ml in warmem H₂O lösen.

Heparin-Stock

10 mg/ml H₂O

Die Stocklösung wurde in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

Hybridisierungslösung

25 ml Formamid

12,5 ml 20x SSC

1 ml Hefe-RNA (10mg/ml)

50 µl Tween-20

5 ml 1% CHAPS

1 ml 50x Denhardt's

500 µl Heparin (10mg/ml)

5 ml H₂O

MAB (Maleinsäurepuffer, pH 7,5)

100 mM Maleinsäure

150 mM NaCl

Über Nacht rühren lassen und anschließend autoklavieren.

NTMT

100 mM NaCl

100 mM Tris-HCl (pH 9,5)

50 mM MgCl₂

0,1 % Tween 20

10x TEA (Triethanolamin)

1 M Triethanolamin, Hydrochlorid

pH 7,8 einstellen

4 % Paraformaldehyd

1 g Paraformaldehyd in 25 ml PBS ansetzen.

Im Wasserbad unter Rühren leicht erhitzen bis sich das PFA gelöst hat. Danach bei RT abkühlen lassen und anschließend bei 4 °C lagern (bis zu einer Woche).

Lavdovsky

12,5 ml Ethanol

1 ml Essigsäure

2,5 ml Formaldehyd

9 ml H₂O

2 % Urethan

200 mg in 10 ml Hydramedium lösen.

Transformationspuffer für chemokompetente Zellen

0,055 mM MnCl₂

0,015 mM CaCl₂

0,250 mM KCl

10 mM PIPES pH 6,7

PIPES Stocklösung

0,5 M PIPES

Mit KOH eingestellter pH 6,7.

Lagerpuffer chemokompetente Zellen

Transformationspuffer für chemokompetente Zellen mit DMSO (7,5 %).

10x SDS Laufpuffer

1,92 M Glycine

0,25 M Tris

1 % (w/v) SDS

Nativer Laufpuffer

1,92 M Glycine

0,35 M Tris

Steril filtriert.

10x PBS-Stocklösung (Phosphate buffered saline, pH 7,4)

8 % (w/v) NaCl

0,2 % (w/v) KCl

2,68 % (w/v) Na₂HPO₄

0,24 % (w/v) KH₂PO₄

Transferpuffer

10 % (v/v) 10xSDS-Puffer

20 % (v/v) Methanol

70 % (v/v) H₂O

Bei 4 °C lagern.

Blockierlösung für Western Blot

5 % Milch

0,1 % Tween

0,8 % PBS

PBST

PBS + 0,1 % Tween

5x Probenpuffer (Laemmli)

5 ml Glycerol (88 %)

1 ml 1 M Tris pH 6,8

0,25 ml Bromphenolblau (10 %)

5 ml SDS (10 %)

Vor dem Gebrauch 10 μ l β -Mercaptoethanol bzw. H₂O für 90 μ l Puffer zugeben.

Färbelösung mit Coomassie

10 % (v/v) Essigsäure

45 % (v/v) Ethanol

45 % (v/v) H₂O

3 g/L Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung bei Proteinfärbung mit Coomassie

10 % (v/v) Essigsäure in H₂O

ECL1

90 mM Cumarsäure

200 mM Luminol

2,5 ml 1 M Tris pH 8

Auf 20 ml mit H₂O auffüllen.

ECL 2

12 μ l Wasserstoffperoxid

2 ml Tris 1 M pH 8

Auf 20 ml mit H₂O auffüllen.

2.4 Puffer für die Aufreinigung von exprimierten Proteinen und Enzymen

Native Aufreinigung des CRD-GB1-Fusionsproteins

Alle Puffer wurden steril filtriert (0,22 µM-Filter) und mit einem Protease-Inhibitor-Mix (Roche) versetzt.

Lysepuffer: 1 Tablette/10 ml

Waschpuffer und Elutionspuffer: 1 Tablette/30 ml

Tabelle 3: Pufferlösungen für die native Aufreinigung des CRD-GB1-Fusionsproteins.

Lysepuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
300 mM KCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM KH ₂ PO ₄	50 mM KH ₂ PO ₄	50 mM KH ₂ PO ₄
5 mM Imidazol	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol
pH 8 einstellen	pH 8 einstellen	pH 7 einstellen

Denaturierende Aufreinigung des CRD-GB1-Fusionsprotein

Tabelle 4: Puffer für die denaturierende Aufreinigung des CRD-GB1-Fusionsproteins.

Denaturierungspuffer	Waschpuffer 1	Waschpuffer 2	Elutionspuffer
8 M Urea	50 mM Tris pH 8	50 mM Tris pH 8	50 mM Tris pH 8
50 mM Tris pH 8	1 mM DTT	5 mM Imidazol	250 mM Imidazol
1 mM DTT		1 mM DTT	1 mM DTT

Aufreinigung der PreScission

Der Bindepuffer wurde vor Gebrauch mit dem Proteaseinhibitor von Roche (1 Tablette/30 ml) versetzt.

Tabelle 5: Puffer für die Aufreinigung der PreScission.

Bindepuffer	Elutionspuffer	Schneidepuffer
140 mM NaCl	150 mM NaCl	50 mM Tris-HCl
2,7 mM KCl	50 mM Tris	100 mM NaCl
10 mM Na ₂ HPO ₄	15 mM Glutathion (red.)	1 mM EDTA
1,8 mM KH ₂ PO ₄	pH 8 einstellen	pH 7 einstellen
pH 7,3 einstellen		

Aufreinigung von Cnidoin

Tabelle 6: Puffer für die Aufreinigung des Cnidoins.

Lysepuffer	Waschpuffer 1	Denaturierungspuffer
PBS 1 mM DTT	PBS 1 mM DTT	8 M Urea 50 mM Tris pH 8 1 mM DTT
Waschpuffer 2	Waschpuffer 3	Elutionspuffer
8 M Urea 50 mM Tris pH8 10 mM DTT	PBS 500 mM NaCl 10 mM DTT	PBS 250 mM Imidazol 0,4 M L-Arginin 10 mM DTT

Aufreinigung von CPP-1.

Tabelle 7: Puffer für die Aufreinigung des CPP-1 aus dem Pellet.

Lysepuffer	Denaturierungspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM Tris pH 8	8M Urea 50 mM Tris pH8 1 mM DTT	PBS 10 mM NaCl 1 mM DTT	PBS 250 mM Imidazol 1 mM DTT

Tabelle 8: Puffer für die Aufreinigung des CPP-1 aus dem Überstand.

Lysepuffer	Waschpuffer 1	Waschpuffer 2	Elutionspuffer
50 mM Tris pH 8	5 mM Imidazol 50 mM Tris pH 8 150 mM NaCl	50 mM Tris pH 8 10 mM Imidazol 150 mM NaCl	50 mM Tris pH 8 250 mM Imidazol 150 mM NaCl

2.5 Geräte

Für die Anfertigung dieser Arbeit wurden folgende Geräte verwendet.

Tabelle 9: Auflistung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Instrument	Hersteller und Firmensitz
Atomkraftmikroskop JPKNanowizard 3	JPK Instruments; Berlin, Deutschland
Bakterieninkubator	Memmert; Schwabach, Deutschland
Bakterienschüttler	INFORS; Bottmingen, Schweiz
Biostat A	Sartorius, stedim biotech; Göttingen, Deutschland
Geldokumentation INTAS UV-System mit integriertem Transilluminator UVP	INTAS; Göttingen, Deutschland
GenePulser Xcell TM	Bio-Rad; München, Deutschland
Gilson Pipetten (1000µl, 200µl, 20µl, 2µl)	Gilson; Middleton, USA
HERACell 150i CO2 Inkubator	Thermo Scientific; Waltham, USA
kleiner Inkubator (in <i>situ</i> Hybritisierung)	Memmert; Schwabach, Deutschland
LAMBDA PERIFLOW (Peristaltikpumpe)	LAMBDA; Brno, Tschechien
Magnetrührer D-6010	NeoLab; Heidelberg, Deutschland
Mini-Tischzentrifuge für Eppendorf	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (Zentrifuge 5424)	
NanoDrop ND-100	NeoLab; Heidelberg, Deutschland
NANON-03 (Elektrospinner)	MECC; Japan
Nikon ECLIPSE 80iMikroskop mit DS-IQM Kamera	Nikon Corporation; Tokyo, Japan
Nikon SMZ445 mit SCHOTT KL200 LED	Nikon Corporation; Tokyo, Japan
Nikon Stereomikroskop SMZ25 mit DS-Ri2 Kamera	Nikon Corporation; Tokyo, Japan
Nikon Type102	Nikon Corporation; Tokyo, Japan
Nikon Inversmikroskop Ti-U	Nikon Corporation; Tokyo, Japan
Regulier Trafo	Carls Zeiss; Oberkochen, Deutschland
Pioneer OHAUS (Feinwaage)	Ohaus Europe; Greifensee, Schweiz
Pipettboy 8-5010	NeoLab; Heidelberg, Deutschland
Sartorius Universal U4800P balance	Sartorius; Göttingen, Deutschland
Schüttler Duomax1030	Heidolph; Schwabach, Deutschland

Sonifier 250	Branson Ultrasonics; Danbury, USA
Sterile Werkbank	Thermo Scientific; Waltham, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge Sorvall mit GS3-Rotor und Sa-600 Rotor	Sorvall, über Thermo Scientific; Waltham, USA
Votexer	Heidolph; Schwabach, Deutschland
Wasserbad Julabo U3	Julabo; Seelbach, Deutschland

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Tieren

3.1.1 Hydrakultur

Alle Hydren wurden in Hydramedium bei 18 °C kultiviert. Dabei wurde auf einen gleichbleibenden Futterrhythmus mit frisch geschlüpften *Artemia salina* Nauplius-Larven geachtet. Die Artemien wurden vor dem Füttern mit Hydramedium gewaschen. Die Tiere, die für die Experimente verwendet wurden, wurden 24 h vor der Durchführung des Experiments gehungert.

3.1.2 Elektroporation von Hydren mit siRNA

Die Elektroporation wurde in Anlehnung an die Vorschrift in Lommel et al. durchgeführt (Lommel et al., 2017).

Für die Elektroporation wurden 20 Tiere (*Hydra vulgaris* AEP der Linie Akt:: GFP ekto) pro Probe mit einer abgeflamten Pipette in eine Petrischale überführt. Die Hydren wurden zweimal mit ddH₂O innerhalb von 20 Minuten gewaschen, um Salze zu entfernen, welche die Elektroporation beeinflussen können. Jeweils 20 Tiere wurden in eine Küvette (Bio-Rad) mit einer Breite von 0,4 cm überführt. Das überschüssige ddH₂O wurde entfernt und 200 µl der siRNA-ddH₂O-Mischung zugegeben. Dabei wurde eine finale Konzentration der siRNA von 3 µM verwendet. Die Probe, die ausschließlich gegen GFP gerichtete siRNA und ddH₂O enthielt, wurde als Kontrolle verwendet.

Sobald die Tiere wieder relaxiert waren, wurde die Küvette in den Elektroporator (GenePulser XCell mit CEModul; BioRad) gestellt und die Tiere mit einem einzelnen Puls bei 250 V von 30 msec elektroporiert. Im Anschluss wurde sofort das auf Eis gekühlte Restorationsmedium in die Küvette dazugegeben und diese auf Eis gestellt bis alle Tiere elektroporiert wurden. Danach wurden die Tiere vorsichtig in eine Petrischale mit Restorationsmedium überführt und fortan im Labor bei 18 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Hydren vorsichtig in Hydramedium umgesetzt. An den folgenden 4 Tagen wurden die Hydren täglich gefüttert. Im Anschluss folgten 2 Tage ohne Fütterung. Daraufhin wurde der Knockdown mittels Western Blot und Antikörperfärbung ganzer Tiere analysiert.

Für den Western Blot wurden jeweils 5 Tiere vereinigt und die Proteinmenge von einer Hydra auf ein 12%iges Gel geladen. Um die spezifischen CPP-1-Signale, die aus dem Western Blot resultieren, quantifizieren zu können, wurde zusätzlich eine α-Tubulin-Färbung als

Ladekontrolle durchgeführt. Die CPP-1-Signale wurden mit Hilfe der Ladekontrolle quantifiziert. Für die Normalisierung wurden die Signale der Kontrolle auf 100 % gesetzt. Die Auswertung der Banden erfolgte mit dem Programm ImageJ und konnte mit Excel in einem Balkendiagramm veranschaulicht werden.

3.1.3 In situ Hybridisierung (ISH)

Die ISH wurde in Anlehnung an das Protokoll von Anna Beckmann (Beckmann et al., 2015) durchgeführt.

Die LNA-Sonden wurden von der Firma EXIQON hergestellt. Für die ISH wurden jeweils 30 Tiere (*Hydra magnipapillata*) in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Hydramedium wurde abgenommen und die Hydren in einer 2%igen Urethanlösung für eine Minute inkubiert. Danach erfolgte über Nacht bei 4 °C die Fixierung in 4%iger PFA-Lösung in Hydramedium. Anschließend wurden die Hydren zweimal für jeweils eine halbe Stunde mit 100 % Ethanol inkubiert und dann in einem Zeitabstand von je 5 Minuten mit 75 %, 50 %, 25 % Ethanol in PBST (PBS, 0,1 % Tween) versetzt. Daraufhin wurden die Hydren 3 mal 5 Minuten mit PBST gewaschen. Danach wurden die Hydren in Proteinase K in PBST (10 µg/ml) für 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 4 mg/ml Glycin in PBST bei RT gestoppt. Die Tiere wurden mit der frisch hergestellten 0,1 M Triethanolaminlösung (TEA) für 5 Minuten äquilibriert und jeweils für 5 Minuten mit 0,25 % und 0,5 % Essigsäureanhydrid in TEA versetzt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte je für 5 Minuten mit PBST. Für die 20-minütige Refixierung wurde wieder eine 4%ige PFA-Lösung in Hydramedium verwendet, der 5 Waschschrte für jeweils 5 Minuten mit PBST folgten. Die Tiere wurden für 10 Minuten mit 50%iger Hybridisierungslösung in PBST auf die Prähybridisierung vorbereitet. Danach erfolgte die 10-minütige Inkubation der 100%igen Hybridisierungslösung. Die Tiere wurden im Anschluss erneut in ca. 500 µl Hybridisierungslösung überführt und für 2 h bei 55 °C prähybridisiert. Die Sonden wurden in einer Konzentration von 25 nM in Hybridisierungslösung verdünnt und vor der Zugabe zu den Tieren 5-10 Minuten bei 65-80 °C in Hybridisierungslösung denaturiert. Nach Zugabe der Lösung zu den Tieren erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde bei 55-60 °C für 2-3 Tage.

Die überschüssige Sonde wurde durch Waschschrte entfernt. Alle Waschlösungen wurden im Wasserbad auf 50 °C erhitzt. Die Tiere wurden daraufhin mit dem Hybridisierungsmix für 5 Minuten bei 50 °C und 500 rpm gewaschen. Zum Umpuffern wurden die Tiere je 5 Minuten bei 55 °C und 500 rpm mit 75 %, 50 % und 25%iger Hybridisierungslösung in 2x SSC inkubiert und dann 2-4-mal für je 30 Minuten bei 55 °C mit 2x SSC mit 0,1 % CHAPS gewaschen. Die

Äquilibrium für die Antikörperfärbung erfolgte bei RT in Maleinsäurepuffer (MAB, pH 7,5) zweimal für 10 Minuten.

Anschließend wurden die Hydren für 2 h bei RT mit dem 1%igen Blockierreagenz (Roche) in MAB inkubiert. Zur Detektion der markierten RNA-Sonde wurde ein Anti-Digoxigen Antikörper mit konjugierter, alkalischen Phosphatase (Roche) in einer Verdünnung von 1:4000 in Blockierreagenz verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

Der ungebundene Antikörper wurde über 8-12 Waschschrte von je 30 Minuten bei RT mit MAB entfernt. Für die Farbreaktion wurden die Tiere zuerst zweimal für 5-10 Minuten in alkalischem Puffer (NTMT) bei RT äquilibriumiert. Die Farbreaktion resultierte aus dem Substrat NBT/BCIP (Roche), das von der alkalischen Phosphatase des Antikörpers zu einem blauen Präzipitat umgesetzt wurde. Dafür wurden die Hydren in eine 24-Wellplatte überführt. Die NTMT-Lösung wurde entfernt und 500 µl der Färbelösung (10 ml NTMT, 50 µl NBT, 37,5 µl BCIP) in jedes Well gegeben. Die Inkubation fand bei 37 °C im Dunkeln statt. Der Verlauf der Färbung wurde mit dem Binokular (Nikon SMZ 445) beobachtet. Die Reaktion wurde nach ca. 1,5 h mit 100 % Ethanol (absolut) gestoppt. Die Tiere werden in PBST gewaschen und mit einer Mischung aus PBS und Glycerin (1:9) eingebettet und mit farblosem Nagellack fixiert.

3.1.4 Immunohistochemische Färbung

Für die Antikörperfärbung ganzer Hydren wurden 20 Tiere in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 Minute mit 2%iger Urethanlösung in Hydramedium relaxiert. Für die CPP-1-Einzelfärbung wurde ausschließlich das Lavdovsky-Fixativ verwendet, mit dem die Hydren über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Bei der Ko-Färbung folgten nach der Fixierung mit Lavdovsky-Fixativ 3 Waschschrte mit PBS für jeweils 10 Minuten und eine zusätzliche Fixierung mit 4 % PFA in PBS bei RT für 30 Minuten.

Zum Solubilisieren wurden die Hydren dreimal für je 10 Minuten mit Triton X-100 in PBS versetzt. Für die Einzelfärbung wurde eine Konzentration von 1 % Triton X-100 und für die Ko-Färbung 0,5 % Triton X-100 in PBS verwendet.

Im Anschluss folgten 3 Waschschrte für je 10 Minuten mit PBST. Für die Blockierung wurde eine BSA-Lösung verwendet. Die Einzelfärbungen wurden mit einer Lösung aus 1 % BSA in PBST und die Ko-Färbungen mit einer Lösung aus 0,5 % BSA in PBST bei RT für 30 Minuten inkubiert. Die Erstantikörper wurden in der jeweiligen Blockierlösung verdünnt (CPP-1 1:250 und Cnidoin 1:125) und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Danach folgten 3 Waschschrte für je 10 Minuten mit PBST. Der Zweitantikörper wurde ebenso in der jeweiligen Blockierlösung verdünnt (Donkey anti-rat Alexa Fluor 488 1:1000 und

Goat anti-guinea pig IgH (H+L) Alexa Fluor 647 1:1000) und im Dunkeln für 2 h mit den Tieren inkubiert.

Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Hierfür wurde eine Verdünnung von 1:1000 in PBST verwendet. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei RT. Anschließend folgten 3 Waschschrte für je 10 Minuten mit PBST. Die Tiere wurden in einer Mischung aus Glycerin in PBS (90:10) eingebettet und mit Nagellack fixiert.

Die Mikroskopie erfolgte mit dem konfokalen Mikroskop (Nicon ECLIPSE Ti) und die Auswertung mit der Software NIS-Elements.

3.1.5 Kapselisolation

Für die Isolation der Kapseln wurden möglichst viele Hydren in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gesammelt und über Nacht bei -80 °C gelagert.

Das Auftauen erfolgte bei RT. Die Hydren wurden mit 2 ml einer Lösung aus 50 % (v/v) Percoll in ddH₂O, 10 % Sucrose, 0,003 % Triton X-100 versetzt. Mit einer 5 ml-Spritze (BD Plastipak™) mit Kanüle (BD Microlance™ 3 Nr.17) wurden die Tiere resuspendiert bis eine homogene Färbung entstand. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C, 15 Minuten und 7500 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml einer Lösung aus 50 % (v/v) Percoll in ddH₂O, 10 % Sucrose, 0,003 % Triton X-100 gelöst und erneut zentrifugiert (4 °C, 15 Minuten, 7500 rpm). Für den folgenden Waschschrte wurde das Pellet mit 1 ml PBS mit 10 % Sucrose und 0,003 % Triton X-100 gelöst und dann bei RT für 10 Minuten bei 7500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 15 µl PBS mit 10 % Sucrose resuspendiert und die Konzentration mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Kapselsuspension wurde verdünnt und unter das Deckglas auf der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Anzahl der Kapseln wurden in den vier Eckquadranten gezählt und mit folgender Formel berechnet.

Kapselzahl * Verdünnung / 4*10⁴ = Kapselzahl pro ml

3.1.6 Enzymatische Deglykosylierung mit PNGase von NEB

Die enzymatische Deglykosylierung wurde mit der PNGaseF und unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden für jede Probe 150 000 Kapseln verwendet. Diese wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und jeweils 1 µl Glycoprotein Denaturing Puffer (NEB) zugegeben. Anschließend wurde mit H₂O bis zu einem Volumen von 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 99 °C inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt und für 10 Sekunden zentrifugiert.

Danach wurden 2 µl 10x GlycoPuffer2 (NEB), 2 µl 10 % NP-40 (NEB) und 6 µl H₂O zugegeben. Einer Probe wurden 1 µl PNGaseF und der Kontrolle 1 µl H₂O zugegeben. Alle Proben wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert.

3.1.7 Chemische Deglykosylierung

Für die chemische Deglykosylierung wurde das *GlycoProfile™ IV Chemical Deglycosylation Kit* von Sigma-Aldrich verwendet.

Für die Gefriertrocknung wurde 1 mg isolierte Kapseln (1 Kapsel entspricht 145 pg) verwendet, die mehrere Stunden mit der Lyophylle gefriergetrocknet wurden. Danach wurden 135 µl Trifluormethansulfonsäure (TFMS) und 15 µl Anisol gemischt und der Probe zugegeben. Die Probe wurde invertiert bis eine Lösung entsteht. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 3 h bei 4 °C im Kühlraum bei leichtem Schwenken.

Im Anschluss wurde die Reaktion in Eiswasser, das Zusätze von Natriumchlorid enthielt, abgekühlt. Als Farbindikator wurden 4 µl der in dem Kit enthaltenen Lösung mit 2 % Bromphenolblau zugegeben. Die 60%ige Pyrimidinlösung wurde vor Gebrauch in Eiswasser gekühlt und tropfenweise dem Reaktionsansatz zugegeben bis sich eine gelbe Färbung einstellte und sich Aggregate bildeten. Durch Zugabe von 20 µl H₂O wurden die Aggregate wieder in Lösung gebracht. Die Zugabe von Pyrimidin wurde vorsichtig fortgeführt bis in der Probe eine grüne Färbung auftrat bzw. die mitgelieferte Kontrolle blau gefärbt war. Anschließend wurden die Probe und die Kontrolle in PBS über Nacht dialysiert. Dafür wurde eine Dialysemembran (SnakeSkin®Dialysis Tubing, 10k MWCO, Thermo Scientific) verwendet.

3.2 Arbeiten mit Zellen

3.2.1 Zellkultur

Die HEK293 T-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % Kohlendioxidanteil (CO₂) und bei ca. 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Dem Kulturmedium DMEM-Medium (high glucose) von Gibco wurden 10 % fötales Kälberserum (FCS) (Gibco) und 1 % Penizillin/Streptomycin (Gibco) hinzugefügt. Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur wurden ausschließlich in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Um die Zellen zu passagieren, wurde das Kulturmedium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und anschließend die Zellen mit 5 ml Dulbecco`s Phosphat-gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (DPBS) (Gibco) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA (Gibco, Invitrogen) benetzt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von ca. 2 bis

3 Minuten lösten sich die Zellen vollständig vom Boden der Kulturflasche ab und die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml DMEM-Medium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und die gewünschte Suspensionsmenge in eine neue, mit Kulturmedium vorbereitete Kulturflasche, überführt.

Für die Kultivierung der humanen, mesenchymalen Stammzellen wurde das Zellmedium MSCGMTM (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium) verwendet, das alle zwei Tage erneuert wurde. Auch diese Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dabei wurden 15 ml der Zellsuspension unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert. Die Anzahl der Zellen aller vier Eckquadranten wurden gezählt und die finale Zellzahl mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl} / 4 \cdot 10^4 = \text{Zellzahl/ml.}$$

3.2.3 Transfektion von humanen Zellen

Für die Expression von CPP-1 in HEK293T-Zellen wurde der Vektor pCDNA3.1 verwendet. Zur Vorbereitung der Transfektion wurde zunächst eine Kulturflasche mit Zellen ohne Zusätze von Antibiotika (-ab) jedoch mit FCS im Medium kultiviert. Nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA wurde aus der Zellsuspension jeweils 0,5 ml pro Well einer 6-Well-Platte überführt und mit Kulturmedium auf 1,5 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Am Tag darauf wurde die Transfektion durchgeführt.

Dafür wurden 100 µl DMEM (-ab -FCS) mit 2 µg pCDNA3.1 in einem Reaktionsgefäß gemischt und 100 µl DMEM (-ab -FCS) mit 10 µl Lipofektamin R 2000 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) in einem separaten Reaktionsgefäß gemischt. Die beiden Lösungen wurden vereinigt, gevortext, anschließend für 5 Minuten bei RT inkubiert und dann auf die Zellen gegeben.

Die Überstände wurden jeweils 24 h und 48 h nach der Transfektion abgenommen. Da das rekombinant hergestellte Protein über einen Polyhistidin-Tag verfügt wurde der Überstand mit 40 µl Ni-NTA-Suspension versetzt und 1 h damit inkubiert. Die Proben wurden mit red. 5x Probenpuffer versetzt und die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert.

3.3 Arbeiten mit Bakterien

3.3.1 Herstellung chemokompetenter Zellen

Für die Amplifizierung von Vektoren wurden die Bakterienzellen *E. coli* BL21 verwendet. Für die Aufnahme der DNA in die Bakterien ist eine Kompetenz der Zellen Voraussetzung (Tang et al., 1994). Die Herstellung von chemokompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Hanahan et. al (Hanahan, 1983).

Für die Herstellung chemokompetenter Zellen wurden die Bakterienzellen *E. coli* BL21 auf Agarplatten ohne Antibiotikum ausgestrichen. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und hiermit eine Vorkultur von 25 ml angeimpft, welche über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert wurde. Die Vorkultur wurde so verdünnt, dass sie eine OD₆₀₀ von 0,09 und ein Endvolumen von 500 ml hat. Die so angeimpfte Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm weiter geschüttelt. Das exponentielle Wachstum der Bakterien wurde an Hand der optischen Dichte in regelmäßigen Abständen überprüft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen auf Eis gestellt und für 10 Minuten gekühlt. Anschließend wurde die Bakterienkultur in die vorgekühlten Zentrifugengefäße überführt und 15 Minuten bei 4 °C und 3500 rpm zentrifugiert. Die folgenden Schritte wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Um das restliche Medium vollständig abtropfen zu lassen, wurden die Zentrifugengefäße umgekehrt und kurz auf Papiertücher gestellt. Das Pellet wurde mit je 40 ml gekühltem Transformationspuffer durch vorsichtiges Schwenken gelöst und die Suspension 20 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien für 15 Minuten, bei 4 °C und 3800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach dem Abtropfen des restlichen Mediums wurden die Bakterien in 20 ml (10 ml/Pellet) Lagerpuffer durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst. Die Suspension wurde aliquotiert (200 µl /Reaktionsgefäß) und bei - 80 °C gelagert.

Die Transformationskompetenz der chemokompetenten Bakterien wurde durch eine Testtransformation ermittelt, bei der die Bakterienzellen mit einer definierten DNA-Menge transformiert wurden. Dafür wurden 0,5 ng oder 1 ng pBS-Vektor transformiert und unterschiedliche Volumina (100 µl, 200 µl, 500 µl) des Transformationsansatzes auf LB-Platten ausgestrichen. Diese wurden bis zum folgenden Tag über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die Kolonien wurden ausgezählt und die Transformationseffizienz (TE) wie folgt berechnet:

$$TE = (\text{Anzahl der Kolonien} \times \text{Verdünnungsfaktor}) / \text{eingesetzte DNA-Menge}$$

3.3.2 Transformation von *E. coli*

Die DNA-Insertion in die Bakterienzellen *E. coli* BL21(DE3) erfolgte mittels Transformation durch Hitzeschock. Dafür wurden die gefrorenen, kompetenten Zellen für 3 Minuten auf Eis aufgetaut. Den Bakterien wurden ca. 100 ng Vektor-DNA zugegeben. Die Mischung wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte ein Hitzeschock für 2 Minuten bei 42 °C. Die Bakterien wurden danach sofort wieder für 1 Minuten auf Eis gekühlt. Dem Ansatz wurden 1 ml LB-Medium zugegeben und für 45-60 Minuten bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Davon wurden jeweils 100 µl bis 200 µl auf die Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin ausgestrichen. Nach kurzem Trocknen wurden die Platten über Kopf bei 37 °C inkubiert.

3.3.3 Herstellung des CRD-GB1 Fusionsprotein mittels Fermentation

Für die rekombinante Expression des CRD-GB1 Proteins wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt. Dafür wurde eine Transformation mit den Bakterienzellen *E. coli* BL21(DE3) und dem entsprechenden Vektor durchgeführt (s.o.). Durch die Verwendung des GEV2-Vektors wird ein N-terminaler Polyhistidin-Tag an dem GB1-Protein eingeführt sowie die Induktion mittels ITPG möglich. Die transformierten Zellen wurden mit LB-Medium heruntergespült und somit eine Vorkultur mit LB-Amp.-Medium hergestellt, die über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert wurde. Das finale Volumen der Vorkultur betrug 200 ml. Am Folgetag wurde die Fermentation mit dem Bioreaktor Biostat A durchgeführt.

Die pH-Elektrode wurde vor dem Fermentationsbeginn gemäß der Anleitung kalibriert. Die Fermentation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dafür wurde der Bioreaktor, der mit 2,5 L H₂O befüllt und steril verschlossen wurde, autoklaviert. Das H₂O wurde danach mit Hilfe einer Pumpe entfernt.

Für die Fermentation wurden 3,6 L TB-Medium mit 0,4 L TB-Phosphatpuffer in den Bioreaktor gegeben und der Setpoint der Produktionsparameter (Rührer: 300 rpm; EXHST: 100 %; pH: 7,15; pO₂: 50 %; Temperatur: 37 °C) eingestellt. Alle genannten Produktionsparameter wurden in den Automatikmodus gestellt, außer der Rührer (Kaskadenmodus). Zusätzlich wurden die Parameter ACIDT, A FOAMT und FOAM auf den Automatikmodus umgestellt.

Die Zelldichte wurde an Hand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm während der Fermentation beobachtet. Zu Beginn wurde der Eichlösung gemessen. Anschließend wurde die Vorkultur (OD₆₀₀ < 2) zugegeben. Um einen konstanten pH-Wert während der Fermentation zu gewährleisten, wurde eine 1 M NaOH-Lösung und eine 85%ige Ortho-Phosphorsäure hergestellt und steril filtriert (Sterilfilter: ExpressTM Plus 0,22 µm von Millipore). Die Zugabe

der Säure sowie der Lauge erfolgt durch einen Schlauch mit dem die Lösungen direkt in die Bakterienkultur tropfen. Um eine starke Schaumbildung zu vermeiden, wurden 45 ml von autoklaviertem H₂O mit 5 ml Antifoam Y-30 von Sigma (nicht autoklaviert) gemischt und ebenfalls bei Bedarf über das Schlauchsystem steril zugegeben.

Da die Genexpression dem Lac-Operon unterliegt, wurde diese bei einer OD₆₀₀ von 13 mit einer finalen Konzentration von 1 mM an IPTG gestartet. In regelmäßigen Zeitabschnitten von je einer halben Stunde wurde die OD₆₀₀ gemessen. Nach 3,5-4 h wurde die Fermentation gestoppt und die Zellen abzentrifugiert. Die Sonifizierung und die Aufreinigung erfolgte gemäß dem Protokoll der nativen Aufreinigung des CRD-GB1 Fusionsproteins (s.u.).

3.3.4 Rekombinante Expression des CRD-GB1 Fusionsprotein mittels Schüttelkultur

Für die native Gewinnung des Fusionsproteins wurden chemokompetente BL21(DE3)-Zellen mit dem GEV2-Vektor wie oben beschrieben transformiert und auf LB-Amp.-Platten selektioniert. Die Kolonien wurden mit LB-Medium von der Platte gespült. Damit wurden zweimal jeweils 1 L LB-Amp.-Medium in 5 L Kolben bis zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei ca. 28 °C und 200 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Genexpression mittels IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Daraufhin wurde die Bakterienkultur für 2 h, bei ca. 28 °C und 200 rpm in den Schüttler gestellt. Durch eine anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 5000 rpm wurde ein Zellpellet gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet über Nacht bei -20 °C gelagert.

3.3.5 Native Aufreinigung des CRD-GB1 Fusionsproteins

Die Zusammensetzung der für die native Aufreinigung verwendeten Puffer ist in Tabelle 3 dargestellt. Die Zellpellets, welche aus der rekombinanten Expression stammen, wurden in Lysepuffer resuspendiert und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden 4 x für jeweils 1 Minute sonifiziert mit jeweils 1 Minute Pause auf Eis. Anschließend wurden die durch Sonifizierung aufgebrochenen Zellen filtriert.

Die Aufreinigung erfolgte mittels Nickel-Chelatchromatographie. Dafür wurde eine Ni-NTA-Kartusche (Bio-Scale™ Mini, Profinity™ IMAC cartridge, Bio-Rad) verwendet, die an eine Peristaltikpumpe angeschlossen wurde, um die Lösungen und die Probe über die Kartusche zu pumpen. Für die Aufreinigung wurde die Kartusche zunächst mit 2 Säulenvolumen (SV) bei einer Flussrate von 10 ml/min gewaschen und mit 5 SV mit dem Waschpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Danach wurde die Probe bzw. das Filtrat auf die Kartusche geladen und über die Kartusche gepumpt (1 ml/min). Dabei sollte eine Flussrate von 1 ml/min

nicht überschritten werden. Das Ni²⁺-Kation interagiert mit 2 benachbarten Histidin-Resten des Proteins und bildet einen Protein-Nickel-Chelatkomplex (Petty, 2001). Die nicht gebundenen Komponenten der Proteinlösung wurden durch Waschschriffe entfernt. Dafür wurden 6 SV des Lysepuffers über die Kartusche gepumpt (1 ml/min). Der zweite Waschschriff erfolgte mit 6 SV des Waschpuffers (2 ml/min). Um sicherzustellen, dass keine ungebundenen Komponenten in der Kartusche sind, wurde der Waschpuffer vor und nach dem Durchlauf der Kartusche bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen. Konnte aus diesen Messungen ein identischer Wert gewonnen werden, erfolgte die Elution mit dem Elutionspuffer. Das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol ist für die Gewinnung des Fusionsproteins essentiell. Es verdrängt das Histidin des Proteins kompetitiv aus dem Chelat-Komplex. Während der Elution wurden 5-10 Fraktionen je 1 ml gesammelt und ebenfalls bei 280 nm vermessen. Der Elutionspuffer wurde dabei als Eichlösung verwendet. Je nach Ausbeute wurde die Elution früher bzw. später gestoppt.

3.3.6 Denaturierende Aufreinigung des CRD-GB1 Fusionsproteins

Für die Aufreinigung (denaturiert) wurden die Lösungen und Puffer aus Tabelle 4 verwendet. Die aus der rekombinanten Expression gewonnenen Pellets wurden mit insgesamt 100 ml Waschpuffer 1 resuspendiert und die Suspension in Zentrifugengefäße (SA 600) überführt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 15 Minuten bei 4 °C und 16000 rpm. Die gewonnenen Pellets wurden mit Denaturierungspuffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlraum über Kopf rotiert.

Am folgenden Tag wurde die Proteinlösung zentrifugiert (15 Minuten, 4 °C und 16250 rpm). Der Überstand wurde erneut bei denselben Bedingungen zentrifugiert.

Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der Nickel-Chelatchromatographie. Dafür wurden 2 ml Ni-NTA in eine Säule gepackt, die an eine Peristaltikpumpe angeschlossen wurde. Die Ni-NTA-Säule wurde mit 10 ml H₂O (3 ml/ min) gewaschen und mit 10 ml Denaturierungspuffer (1 ml/min) äquilibriert. Daraufhin wurde der Überstand mit dem Protein über die Säule gegeben (1 ml/min). Auf Grund des His₆-Tags bildete sich ein Protein-Chelat-Komplex mit den Nickelionen des Ni-NTAs. Ungebundene Komponenten wurden durch Waschschriffe entfernt. Dazu wurden 100 ml Denaturierungspuffer (1 ml/min), dann 100 ml Waschpuffer 1 und danach 100 ml Waschpuffer 2 (2 ml/min) über die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit dem Elutionspuffer, welcher ebenfalls Imidazol enthält. Während der Elution wurden Aliquots von jeweils 1 ml gesammelt. Die Ausbeute wurde mit dem NanoDrop bei einer Wellenlänge von 280 nm und die Reinheit durch Gelelektrophorese analysiert.

3.3.7 Rekombinante Expression und Aufreinigung der PreScission-Protease

Für die rekombinante Expression der PreScission-Protease in *E. coli* BL21(DE3) wurde der Vektor pGEX-6P verwendet. Die Durchführung der Transformation ist oben beschrieben. Dafür wurden jeweils 137 ng DNA/Vektor verwendet.

Nach der Selektion auf LB-Platten mit dem Antibiotikum Ampicillin über Nacht bei 37 °C wurden die Bakterien von der Platte mit LB-Medium heruntergespült und die Zellen in LB-Amp.-Medium bei 28 °C und 200 rpm kultiviert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur nicht über 28 °C steigt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 erfolgte die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM), das als künstlicher Induktor des Lac-Operons fungiert und somit die Genexpression startet.

Nach einer 3-stündigen Kultivierung bei 28 °C und 200 rpm wurden die Zellen in Zentrifugengefäße überführt und für 15 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert.

Das Pellet wurde mit Bindepuffer (10 ml/250 ml Kultur) resuspendiert und anschließend mit dem Sonifier 250 sonifiziert (4-mal jeweils eine Minute auf Eis, dazwischen jeweils eine Minute Pause auf Eis). Nach dem Aufschluss der Zellen erfolgt die Zentrifugation bei 20 000 xg für 30 Minuten. Der Überstand wurde mit einem Faltenfilter filtriert.

Die Aufreinigung der PreScission erfolgte über eine Kartusche (GSTrapTM HP von Sigma-Aldrich) mit einem SV von 5 ml. Die verwendeten Puffer sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die Kartusche wurde an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und mit 5 SV (2 ml/min) gewaschen. Anschließend wurde das Filtrat auf die Säule geladen (1 ml/min). Die mit Gluthation-Sepharose bepackte Säule ermöglicht die spezifische Bindung von GST-markierten Proteinen. Um ungebundene Komponenten zu entfernen wurde die Säule mit ca. 150 ml Bindepuffer gewaschen (2 ml/min) und das Eluat bei 280 nm spektrometrisch auf Reinheit kontrolliert. Für die Elution wurde der Elutionspuffer, der Glutathion (red.) enthält, verwendet. Dadurch wurde das Protein von der Säule gelöst und konnte so eluiert werden. Während der Elution wurden mindestens 6 Fraktionen mit jeweils 1 ml gesammelt. Die Säule wurde nach Gebrauch mit 50 ml Bindepuffer, 10 ml H₂O und 10 ml Ethanol gewaschen und in Ethanol bei 4 °C gelagert. Die Reinheit des 46 kDa großen Enzyms wurde mittels Gelelektrophorese analysiert, sowie die Ausbeute mit Hilfe des NanoDrops bei 280 nm bestimmt.

3.3.8 Schneideprozess des CRD-GB1 Fusionsproteins und Aufreinigung der CRD

Das Fusionsprotein CRD-GB1 hat zwischen der CRD-Sequenz und der Sequenz des GB1-Proteins eine PreScission-Schnittstelle. Um das CRD-Peptid aus dem Fusionsprotein

CRD-GB1 aufzureinigen, wurde das Fusionsprotein mit Hilfe der Protease PreScission enzymatisch geschnitten. Hierfür musste das Fusionsprotein in den Schneidepuffer mit Hilfe einer Entsalzungssäule (PD-10 Desalting column, GE Healthcare) umgepuffert werden. Die Zusammensetzung des Schneidepuffers ist in der Tabelle 5 dargestellt. Die Entsalzungssäule wurde mit 20 ml Schneidepuffer äquilibriert. Danach wurden 2,5 ml der Proteinlösung auf die Säule gegeben. Nach dem Einsinken der Probelösung in das Säulenmaterial beginnt die Elution mit dem Schneidepuffer (4,5 ml). Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt. Die Ausbeute wurde mit dem NanoDrop bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

Für den enzymatischen Schneideprozess wurden ca. 10 mg Fusionsprotein verwendet und mit der PreScission über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der enzymatischen Proteolyse wurde die PreScission entfernt. Dafür wurden dem Ansatz in Schneidepuffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose-Beads zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Der N-terminale GST-Tag der PreScission bindet an die Beads, die anschließend abzentrifugiert wurden. Der Überstand enthielt nun CRD und GB1-Protein. Dem Überstand wurden wiederum in Schneidepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose zugegeben. Das GB1-Protein bindet durch dessen N-terminalen His₆-Tag an die Ni-NTA-Beads. Nach 1 h Inkubation bei RT erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt. Dieser Vorgang wurde wiederholt um eine reine CRD in der Lösung gewährleisten zu können. Mit dem NanoDrop wurde die Ausbeute an CRD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

3.3.9 Rekombinante Expression und Aufreinigung des Cnidoids

Die rekombinante Expression des Cnidoids wurde in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen unter Verwendung des pET21b-Vektors durchgeführt. Dieser führt einen C-terminalen His₆-Tag ein und ermöglicht die Induktion der Expression durch IPTG. Die verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 6 aufgelistet. Zunächst wurde, wie oben beschrieben, eine Transformation mit ca. 100 ng in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Nach dem Selektionieren auf LB-Amp.-Platten wurden die Klone mit LB-Medium in 2 jeweils 1 L LB-Amp.-Medium gespült und bei 37 °C bei 200 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 erfolgte die Induktion mittels IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach einer weiteren 2-stündigen Kultivierung bei 37 °C und 200 rpm wurde erneut die OD₆₀₀ ermittelt und die Zellen für 15 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert.

Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in insgesamt 100 ml Lysepuffer resuspendiert und in 4 Reaktionsgefäße mit jeweils 50 ml aufgeteilt. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gefroren und danach im Wasserbad bei 30 °C wieder aufgetaut. Dieser Prozess wurde

zweimal wiederholt. Nach der Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht wurden die Zellen wieder aufgetaut und mit dem Sonifier 250 bei einer Stärke von 40 sonifiziert (4-mal jeweils 1 Minute mit dazwischen 1 Minute Pause auf Eis). Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 16000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in insgesamt ca. 240 ml Waschpuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 16000 rpm abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Danach wurden die Pellets in 160 ml Denaturierungspuffer aufgenommen und über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Kopf rotieren gelassen.

Nach der Zentrifugation für 15 Minuten bei 16000 rpm wurde der Überstand über einen Faltenfilter gegeben und das Pellet verworfen. Das Filtrat wurde mit DTT (Endkonzentration 10 mM) versetzt und über eine Säule mit 2 ml Ni-NTA chromatographisch aufgereinigt. Die Säule wurde an eine Peristaltikpumpe angeschlossen, mit 10 ml H_2O gewaschen und mit 10 ml Denaturierungspuffer äquilibriert. Im Anschluss wurde das Filtrat mit einer Flussrate von 1 ml/min über die Säule gegeben. Auf Grund des His₆-Tags interagiert das Protein mit dem Ni-NTA und bildet einen Protein-Chelat-Komplex aus. Um ungebundene Bestandteile des Filtrats zu entfernen, wurden 2 Waschschrte durchgeführt. Dabei wurden zunächst 50 ml Denaturierungspuffer über die Säule gegeben (1 ml/min). Die Säule wurde dann in Denaturierungspuffer über Nacht bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurden weitere 50 ml Denaturierungspuffer bei 1-2 ml /min über die Säule gegeben. Für den zweiten Waschschrte wurden 100 ml Waschpuffer über die Säule gegeben (2 ml/min). Für die Elution wurden 10 ml Elutionspuffer hergestellt. Das darin enthaltene Imidazol konkurriert mit den Bindungsstellen des Cnidoids bzw. der Histidine an dem Ni-NTA und verdrängt dieses kompetitiv. Die Elution erfolgte mittels Schwerkraft. Dabei wurden jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Konzentration wurde spektrometrisch mit dem NanoDrop bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und die Reinheit mittels Gelelektrophorese überprüft.

3.3.10 Rekombinante Expression und Aufreinigung von CPP-1 aus dem Pellet

Die bakterielle Expression des CPP-1 in *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit Hilfe des Vektors pET21 durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Dadurch ist eine Induktion mittels IPTG möglich und es wird ein C-terminaler His₆-Tag eingeführt, der für die Aufreinigung des Proteins essentiell ist.

Zunächst wurde, wie oben beschrieben, eine Transformation mit ca. 130 ng des DNA/Vektors durchgeführt. Die aus LB-Amp.-Platten selektionierten Klone wurden mit LB-Medium in 2 je 1 L LB-Amp.-Medium gespült und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm so lange kultiviert bis die Zellen

eine OD₆₀₀ von 0,6 erreichten. Daraufhin erfolgte die Induktion der Genexpression mit Hilfe des Lac.-Operons durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach einer weiteren 2-stündigen Kultivierung bei 37 °C und 200 rpm wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt und die Zellen für 15 Minuten bei 6000 rpm mit dem GS3-Rotor zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in insgesamt in 100 ml Lysepuffer resuspendiert und in 4 Zentrifugengefäße (SA 600) aufgeteilt. Die folgende Zentrifugation erfolgte für 15 Minuten bei 6000 rpm. Danach wurden die Pellets in insgesamt 100 ml Denaturierungspuffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 16000 rpm wurden erneut Pellets gewonnen bzw. Überstände, in denen sich das CPP-1 befindet. Die Pellets wurden verworfen und der Überstand über einen Faltenfilter gegeben. Das Filtrat wurde über eine Säule mit 2 ml Ni-NTA aufgereinigt.

Die Säule mit Ni-NTA wurde zunächst an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und mit ca. 10 ml H₂O gewaschen. Die Äquilibrierung erfolgte mit 10 ml des Denaturierungspuffers (2 ml /min). Im Anschluss daran wurde die filtrierte Probe über die Säule gegeben (1 ml/min). Um ungebundene Komponenten zu entfernen, folgten 2 Waschschrte. Der erste wurde mit 100 ml Denaturierungspuffer (1 ml/min) durchgeführt und der zweite mit 100 ml des Waschpuffers (2 ml/min). Für die Elution wurden 10 ml Elutionspuffer verwendet, wobei jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Elution des CPP-1 erfolgte durch Schwerkraft.

Die Ausbeute wurde mit dem NanoDrop bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Als Eichlösung wurde der Elutionspuffer verwendet. Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels SDS-PAGE und der Proteinfärbung mittels Coomassie.

3.3.11 Aufreinigung von CPP-1 aus dem Überstand

Die Zusammensetzungen der für diese Aufreinigung verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Nach der Expression des CPP-1 in *E. coli*, die analog der Beschreibung (s.o.) durchgeführt wurde, wurde die Zellsuspension für 15 Minuten bei 6000 rpm mit dem GS3-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in insgesamt 100 ml Lysepuffer resuspendiert und in vier 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden nun in flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall (4 mal 1 min Stufe 4, jeweils 1 Minute Pause auf Eis) aufgeschlossen. Für die Zentrifugation bei 16250 rpm für 15 Minuten mit dem SA 600 Rotor wurden die aufgeschlossenen Zellen in Zentrifugenröhrchen (SA 600) überführt. Der Überstand wurde abgenommen und über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt.

Für die Säule wurden 2 ml Ni-NTA verwendet und die Peristaltikpumpe an die Säule angeschlossen. Zunächst wurde die Säule mit Wasser gereinigt und danach mit Lysepuffer äquilibriert. Im Anschluss wurde der Überstand bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 100 ml Waschlösung 1 (1 ml/min), ein Waschschrift mit 100 ml mit Waschlösung 2 (2 ml/min) und danach die Elution mit dem Elutionspuffer. Dabei wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt, mit dem NanoDrop die Konzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt und die Reinheit an Hand der SDS-PAGE und Proteinfärbung durch Coomassie analysiert.

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteinproben nach ihrer Größe erfolgte mit einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Innerhalb dieser Arbeit wurden 12%ige, 15%ige und 20%ige Trenngele verwendet. Die Zusammensetzungen der Gele sind in Tabelle 10 aufgelistet. Nach der vollständigen Polymerisierung der Gele wurden diese in einer Elektrophorese-Apparatur befestigt und die Kammer mindestens zu 2/3 mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit 5 x Probenpuffer gemischt und bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert. Um eine Kondensation der Probelösung an der Innenseite des Deckels zu vermeiden, wurden die Proben mit der Tischzentrifuge für 10 Sekunden zentrifugiert. Als Proteinmarker diente der Leitemix PageRuler™ Prestained Protein Ladder von ThermoFisher Scientific. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 4 mA.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Sammelgels und der Trenngele.

Chemikalie	Sammelgel 4 %	Trenngel 20 %	Trenngel 15 %	Trenngel 12 %
H ₂ O	3,7 ml	2,86 ml	4,36 ml	5,26 ml
0,5 m Tris pH 6,8	1,5 ml	-	-	-
1,5 m Tris pH 8,8	-	3 ml	3 ml	3 ml
AA/BA pH 8,8	0,6 ml	6 ml	4,5 ml	3,6 ml
10 % SDS	100 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	15 µl	20 µl	20 µl	20 µl
10 % APS	80 µl	120 µl	120 µl	120 µl

3.4.2 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran

Im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (GE Healthcare, Amersham) mit einer Transfer-Apparatur (Bio-Rad). Dafür wurde eine 7x9 cm große Membran verwendet und in Transferpuffer kurz inkubiert. Auf ein 0,2 mm dickes, mit Transferpuffer angefeuchtetes Whatman-Papier wurden die Membran und darauf das Gel in die Blotting-Apparatur gelegt. Die oberste Schicht bildete wieder ein mit Transferpuffer angefeuchtetes Whatman-Papier. Dieser „Sandwich“ wurde so in die Apparatur gestellt, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode bzw. Membran transferieren können. Zusätzlich wurde ein Kühl-Akku in die Blotting-Apparatur gestellt und die Apparatur zu 2/3 mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 360 mA.

Zum Blockieren von unspezifischen, freien Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierlösung geschwenkt.

3.4.3 Immunblotting

Die Membran wurde nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten mit PBST mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der Primärantikörper wurde jeweils 1:1000 in Blockierlösung verdünnt. Daraufhin folgten drei Waschschritte mit PBST bei RT jeweils für 10 Minuten. Die Membran wurde für 1h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, der 1:5000 in Blockierlösung verdünnt wurde, für 45 Minuten bei RT inkubiert. Für welche Primärantikörper welcher Sekundärantikörper verwendet wurde, ist der Tabelle 11 zu entnehmen. Die Detektion der an die Membran gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte nach 3 Waschgängen mit PBST. Dafür wurden ECL-Lösungen hergestellt, die mindestens alle 2 Wochen erneuert wurden. Die Lösung ECL1 und ECL2 wurde kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran damit für 1 Minute inkubiert.

Unter Verwendung eines Western Blot-Imagers (Chemoluminesz) von INTAS wurde das Chemolumineszenzsignal detektiert.

Tabelle 11: Auflistung der Primärantikörper mit den korrespondierenden Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen.

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-Cnidoin	Donkey-anti-guinea pig
Anti-CPP-1	HRP Goat-anti-rat IgG (H+L)
Anti- α -Tubulin	Goat-anti- mause HRP
Anti-N-CRD	Donkey-anti-guinea pig

3.4.4 Proteinfärbung mit Coomassie

Für die Detektion der Proteine mittels Coomassie wurde zunächst wie oben beschrieben eine SDS-Page durchgeführt.

Für die Detektion der Proteine wurde das Gel mit einer Färbelösung, die Coomassie enthält, für ca. 1 h inkubiert. Um die Hintergrundfärbung zu eliminieren erfolgte danach eine Inkubation von mindestens ca. 30 Minuten mit einer Entfärbelösung.

3.5 Herstellung von Biomaterialien

3.5.1 Elektrosponning

Die Herstellung der Proteinfasern erfolgte mit dem Elektrosponner NANON-3 (MECC). Es wurden folgende Parameter verwendet: 17 kV, 1,2 ml/h Flussrate, 15 cm Distanz von der Nadel zu dem Kollektor, maximale Luftfeuchtigkeit 30 %.

Die Nanofasern wurden auf Deckgläser gesponnen, die jeweils 3 Minuten in Aceton, Ethanol, Methanol und dann in H₂O in einer Kammer im Ultraschallbad gereinigt wurden. Nach dem Trocknen der Deckgläser wurden die Fasern auf diesen gesponnen.

Für die Faserproduktion wurde eine Mindestkonzentration der Proteine von 40 mg/ml eingesetzt. Die Proteine Cnidoin und CPP-1 wurden wie oben beschrieben exprimiert und aufgereinigt. CPP-1 wurde ausschließlich aus dem Pellet aufgereinigt und verarbeitet. Zu jedem Ansatz wurde 4 w/v % PEO hinzugefügt, da mit einer reinen Proteinlösung die nötige Viskosität für das Elektrosponning nicht erreicht werden konnte.

Die Proteine und das PEO wurden mit dem Elutionspuffer der Cnidoinaufreinigung, welcher zur Hälfte mit Wasser verdünnt wurde, gelöst. Das DTT wurde jeweils frisch für jede Faserproduktion in der entsprechenden Menge dazu gegeben. Die Endkonzentration an DTT betrug jeweils 0,25 M. Die fertige Proteinlösung wurde in eine Spritze mit metallener Kanüle (BD Microlance™ 3 Nr.17) gefüllt.

Als Kollektor wurde eine Alufolie verwendet, auf der die gereinigten Deckgläser platziert wurden. Die Kammer, in der die Apparatur stand, wurde verschlossen und der Prozess bei einer Luftfeuchtigkeit unter 30 % gestartet. Dabei wurde die Kanüle in horizontaler Richtung hin und her gesteuert, sodass zeitgleich bis zu 5 Deckgläser besponnen werden konnten. Die Dichte wurde durch die Dauer des Herstellungsprozesses bestimmt und je nach gewünschter Faserdichte auf den Deckgläser gestoppt. Die Deckgläser mit den Fasern wurden in einer Petrischale befestigt und bei RT gelagert.

Um die Trägersubstanz (PEO) zu entfernen, wurden die Deckgläser mit den Fasern für mindestens 10 Minuten in Wasser gewaschen.

3.5.2 Ermittlung der mechanischen Eigenschaften von Proteinpolymeren mit dem Atomkraftmikroskop

Die Elastizität der Proteinaggregate aus Cnidoin und CPP-1 sowie der hergestellten Nanofasern wurde an Hand von Messungen mit dem Atomkraftmikroskop NanoWizard 3 kombiniert mit dem Inversmikroskop Ti-U (Nikon) bestimmt (Ferencz et al., 2012).

Für die Messung der Aggregate wurden die Proteine auf 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan beschichtete Deckgläschen überführt. Durch die Silanisierung haften die Proteine während der AFM-Messung besser an den Deckgläschen.

Die Silanisierung wurde wie folgt durchgeführt. Zuerst wurden die 24x24 mm Deckgläser mit Sauerstoffplasma gereinigt (5 min, 0,1 mbar, 100 W) und anschließend für 30 min in eine 1 mM 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan-Lösung in Toluol gelegt. Die Deckgläschen wurden mit Toluol und Ethanol gewaschen und danach mit Stickstoff getrocknet. Von jedem Protein wurden ca. 50 µl der Proteinsuspension, die direkt aus dem Reaktionsgefäß der Aufreinigung entnommen wurden, auf ein Stück Parafilm gegeben, darauf das beschichtete Deckglas gelegt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe analysiert.

Das Prinzip der AFM-Messung wird im Folgenden beschrieben. Für die Messung der mechanischen Eigenschaften wird eine Blattfeder, der sogenannte Cantilever verwendet, der mit seiner Spitze die Probe abtastet. Für die Messung der Kraft-Abstandskurven wurde der Cantilever auf die Probe abgesenkt und mit einer bestimmten Kraft auf die Probe gedrückt. Dabei wurde eine Ablenkung des Cantilevers erzeugt, welche mit einem Lasersystem detektiert wurde. Anschließend wurde der Cantilever wieder zurückgeführt. Da für die Messungen der „Contact-Mode“ verwendet wurde, war die Spitze des Cantilevers dennoch ständig in Kontakt mit der Oberfläche.

Die Elastizität wird an Hand des E -Moduls (*Young's modulus*) dargestellt. Die Theorie des E -Moduls wird im Folgenden erläutert. Das E -Modul hat die Einheit Pascal ($\text{N/m}^2 = \text{Pascal}$), also Kraft pro Fläche (Vinckier and Semenza, 1998). Dabei definiert die Spitze des Cantilevers die analysierte Fläche der Probe. Die Kraft (F) wurde mit dem Hookschen Gesetz $F=k*d$ berechnet, wobei k die Federkonstante und d die Ablenkung des Cantilevers darstellt. Die berechnete Kraft (F) wird in die Hertzsche Gleichung $E = \frac{3F(1-\nu^2)}{4\sqrt{R}\delta^{3/2}}$ eingesetzt, wobei R den Radius der Cantileverspitze, ν die Poissonzahl, δ den Eindruck des Cantilevers in die Probe und E das E -Modul darstellt (T. Lewis et al., 2008). Die Poissonzahl ist eine Materialkonstante und beschreibt das Verhältnis aus relativer Dickenänderung zur relativen Längenänderung eines Körpers bei Einwirkung einer äußeren Kraft oder Spannung. Für biologische Proben wird eine Poissonzahl von 0,5 verwendet (Nijenhuis et al., 2014; Radmacher, 1997). Je nach

Cantilever wird zu Berechnung des E -Moduls eine andere Formel verwendet (Lin et al., 2007). Für die Messungen innerhalb dieser Arbeit wurde ein Cantilever mit pyramidalen Spitze verwendet. Die Formel für die Berechnung des E -Moduls für pyramidale Spitzen lautet:

$E = \frac{F\pi(1-\nu^2)}{2 \tan(\alpha) \delta^2}$. Hier wird zusätzlich der halbe Winkel der Cantileverspitze (α) in die Formel einbezogen.

Die Proteinaggregate wurden in PBS gemessen. Dafür wurde der Cantilever MLCT von Bruker, Cantilever F mit einer nominellen Federkonstante von 0,6 N/m verwendet. Die Proteinaggregate wurden jeweils an verschiedenen Positionen eines 8x8 Raster über einer Fläche von 15x15 μm^2 gemessen.

Die ungewaschenen und die gewaschenen Proteinfasern wurden an Luft mit dem Cantilever RTESTA-150 analysiert und die Nanofasern in PBS mit dem Cantilever MLCT mit der Spitze D charakterisiert. Für die Höhen- und Breitenprofile wurde eine Fläche von 50x50 μm und für die Darstellung der E -Module eine Fläche von 9x9 μm analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Sneddon Model (Sneddon, 1965) für pyramidale Spitzen.

4 Ergebnisse 1. Teil: Molekulare und funktionelle Charakterisierung von CPP-1

4.1 Das CPP-1: Ein pflanzliches Zellwandprotein in *Hydra*?

Prolinreiche Proteine sind in der Natur weit verbreitet (Barbul, 2008; Cannon, 2010; Tziveleka et al., 2017). Auch in *Hydra* konnten durch Proteomstudien prolinreiche Proteine nachgewiesen werden. Dazu zählen die Minikollagene und die Cnidarian Proline-rich Proteins (CPPs). Ein Minikollagen-ähnlicher Vertreter der CPPs ist das CPP-1, das aus einer zentralen Polyprolinsequenz besteht, die von CRDs flankiert ist (Balasubramanian et al., 2012). In der Pflanzenzellwand sind ebenso prolinreiche Proteine lokalisiert. Die Extensine und Arabinogalaktanproteine sind Vertreter der Hydroxyprolinreichen Glykoproteine (HRGPs) (Liu et al., 2016b; Tan et al., 2013). Sie weisen eine prolinreiche Sequenz auf und sind reich an posttranslationalen Modifikationen (PTMs), wie Glykosylierungen und Hydroxylierungen. Die meisten Hydroxyproline sind mit Arabinoseresten glykosyliert. Zusätzlich sind viele Serine mit Galaktosemolekülen modifiziert (Showalter, 1993). Die PTMs sind wichtig für die Eigenschaften der HRGPs in der Pflanzenzellwand (Johnson et al., 2017; Velasquez et al., 2012). Die O-Glykosylierung stabilisiert die helikale Konformation der Extensine, wohingegen unvollständige Hydroxylierung und O-Glykosylierung eine flexible und ungeordnete Struktur begünstigen (Velasquez et al., 2011b). Sowohl ihre Konformation als auch ihre chemischen Eigenschaften sind für die Interaktion der Proteine mit ihrer Umgebung essentiell. Da die chemischen Eigenschaften stark durch die PTMs beeinflusst werden, liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion der HRGPs mit ihrer Umgebung durch die PTMs vermittelt wird (Lee and Yaffe, 2016; Velasquez et al., 2011b). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die HRGPs an der korrekten Assemblierung der primären Pflanzenzellwand beteiligt sind (Pereira et al., 2011).

Es liegt nahe, dass das CPP-1 auf Grund seiner polyprolinreichen Sequenz ebenfalls über PTMs verfügt und somit ähnliche strukturelle Funktionen wie die HRGPs erfüllt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Folgenden immunhistochemische, biochemische und funktionelle Studien an CPP-1 durchgeführt, um erste Einblicke in dessen Funktion zu erlangen.

4.2 Expression von *CPP-1* in *Hydra*

Die Nematocysten bestehen aus einer Vielzahl von Proteinen (ca. 400), zu denen auch das *CPP-1* zählt (Balasubramanian et al., 2012). Um zunächst die Genexpression des *CPP-1* in *Hydra* zu charakterisieren, wurden *in situ* Hybridisierungen (ISH) durchgeführt (Abb. 12). Das Signal des *CPP-1* tritt in *whole mounts* in Form von Clustern auf. Die Clusterbildung ist für die sich entwickelnden Nesselzellen charakteristisch. Somit weist die ISH darauf hin, dass das *CPP-1* in den Nestern sich entwickelnder Nematocyten der Körpersäule lokalisiert ist. Dort findet die Transkription der Gene statt, die für strukturelle Proteine der Nematocysten codieren. Eine Expressionsgrenze knapp unterhalb der Tentakel ist deutlich zu erkennen. In der Fußregion und in den Tentakeln sind auf Grund der Gewebedynamik die reifen Nematocysten lokalisiert (Campbell and Marcum, 1980; Engel et al., 2001). Dort konnte keine *CPP-1* mRNA detektiert werden, da das ausdifferenzierte Gewebe der Tentakeln transkriptionell inaktiv ist.

Das Expressionsmuster des *CPP-1* in *Hydra* ähnelt dem von bereits analysierten Nematocystenproteinen. Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass z.B. auch die mRNA von Minikollagen-1 (Engel et al.), Minikollagen-15 (Adamczyk et al., 2008) und Cnidoin (Beckmann et al., 2015) in den differenzierenden Nesselzellen der Körpersäule detektiert werden kann. Diese Parallelen unterstützen die Hypothese, dass es sich bei dem *CPP-1* um ein strukturelles Protein der Nematocysten handelt.

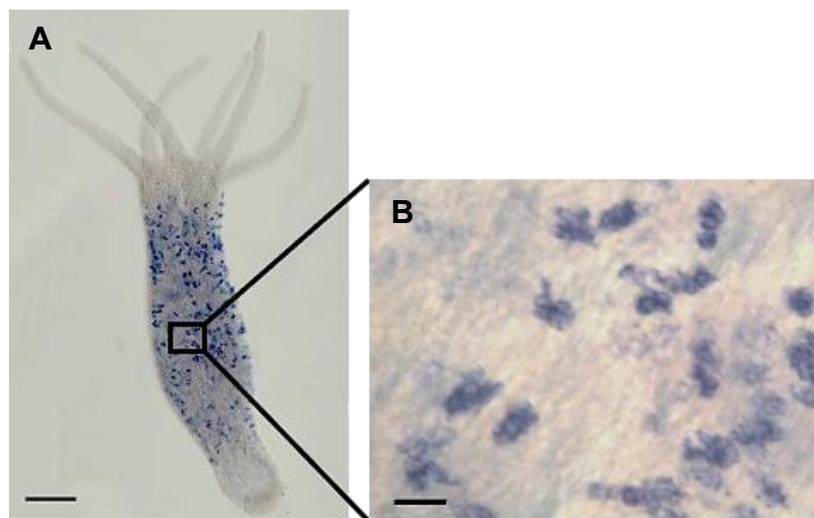


Abb. 12: Expressionsmuster der *CPP-1* mRNA in *Hydra*. A) ISH von *CPP-1* in *Hydra magnipapillata*. Das *CPP-1* wurde ausschließlich in Nestern sich entwickelnder Nematocyten in der Körpersäule detektiert (Größenmaßstab 500 μm). B) Nahaufnahme von *CPP-1*-mRNA positiven Zellen der Körpersäule von *Hydra* (Größenmaßstab 25 μm).

4.3 Charakterisierung eines CPP-1 Antikörpers und immunohistochemische Analysen von CPP-1 in *Hydra*

Um das CPP-1 auch auf Proteinebene detektieren zu können, wurde ein spezifischer, polyklonaler Antikörper verwendet. Der Antikörper ist gegen die N-terminale CRD des CPP-1 gerichtet (Epitopsequenz: CPAPCGGDLNCWPTCDATCC). Durch Western Blot-Analysen wurde die Spezifität des hergestellten Antikörpers untersucht. Die Abbildung 13A zeigt den Antikörpernachweis in Hydralysat mit dem Kontroll-Präimmunserum und dem Serum nach der Immunisierung. Mit dem Präimmunserum ist kein spezifisches Signal im Hydralysat detektierbar. Mit dem Serum nach der Immunisierung sind eine Vielzahl von Banden im Bereich von ca. 40-170 kDa detektierbar. Eine klare Zuordnung zu der errechneten molekularen Masse, die mit Pro- und Signalpeptid bei 28 kDa und ohne bei 25,8 kDa liegt, ist hier nicht möglich. Die Abbildung 13B zeigt, dass das CPP-1 mit dem affinitätsgereinigten Antikörper neben hochmolekularen oligomeren Fraktionen als deutliche singuläre Bande bei ca. 45 kDa nachweisbar ist. Zur Verifizierung wurde der aufgereinigte Antikörper mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid, prä-inkubiert. Unter diesen Bedingungen blieb eine Detektion des CPP-1 aus. Es sind nur schwache unspezifische Banden im Bereich der höheren Molekulargewichte zu sehen. Das Antigen mit der N-terminalen CRD-Sequenz interagiert mit dem Antikörper und inhibiert so die Bindung an das CPP-1 auf der Membran des Western Blots. Dies bestätigt, dass der Antikörper spezifisch das CPP-1 im Hydralysat bindet und für weitere Untersuchungen geeignet ist.

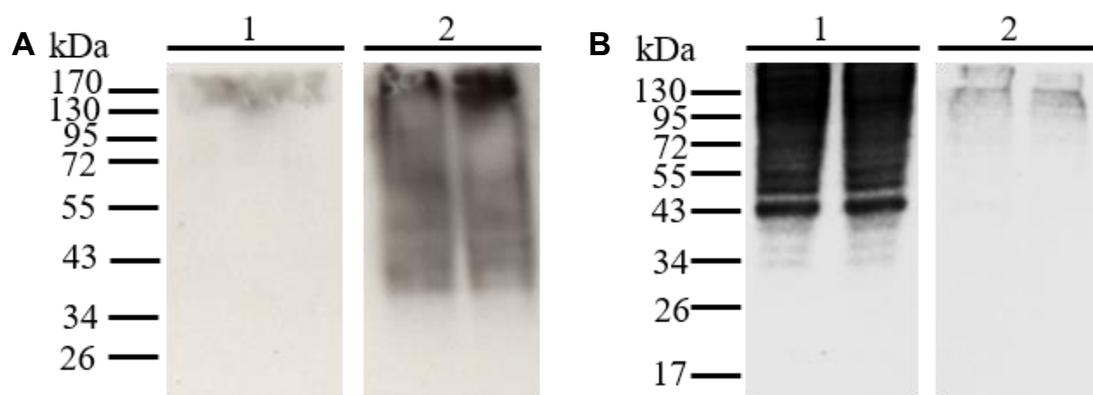


Abb. 13: Antikörper-Nachweis des CPP-1 in Hydralysaten. Es wurde jeweils eine Hydra pro Spur aufgetragen. Jede Probe wurde zur Verifizierung zweimal auf das Gel aufgetragen. Von jeder Probe wurden zwei Hydren aufgetragen. Es wurden pro Ansatz jeweils eine Hydra pro Spur mit je einem biologischen Replikat aufgetragen. A) Der Blot wurde mit dem Präimmunserum (1) oder dem Serum nach Immunisierung mit dem N-CRD-Peptid des CPP-1 (2) durchgeführt. B) CPP-1-Detektion in Hydralysat mit dem affinitätsgereinigten CPP-1 Antikörper (1) und in Anwesenheit des für die Immunisierung verwendeten Antigen-Peptids (2).

Die ISH wies darauf hin, dass das *CPP-1* in *Hydra* von Nesselzellen exprimiert wird. Die genaue Lokalisation des CPP-1 in *Hydra* auf Proteinebene wurde mit Hilfe einer Immunfärbung ermittelt. Hierfür wurde der affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper verwendet. Das CPP-1 konnte in den Tentakeln sowie in der Körpersäule detektiert werden (Abb. 14). Das Protein ist ubiquitär in allen Nematocystentypen von *Hydra* in der Kapselwand lokalisiert. Die Immunfärbung in der Körpersäule zeigte in Entwicklungsstadien der Nematocysten eine diffuse Verteilung in den Nematocystenvesikeln, während in den Tentakeln ein definiertes Signal der Kapselwand erkennbar war. In der Struktur des Schlauches konnte kein CPP-1 detektiert werden. In der Körpersäule sind, wie in der ISH, die Cluster der sich entwickelnden Nematocyten deutlich zu sehen. Die Abbildung 14 B zeigt zusätzlich die Lokalisation des CPP-1 in den bereits vereinzelt Nematocyten. Zudem kann durch die Färbung des CPP-1 in Batteriezellen befindliche reife Nesselkapseln in den Tentakeln nachgewiesen werden.

Diese Detektion des Kapselproteins CPP-1 an Hand der Antikörperfärbung in den reifen Nematocysten stellt eine Ausnahme dar. Die meisten Nematocystenproteine, wie zum Beispiel NCol-15 (Adamczyk et al., 2008) oder NCol-1 (Tursch et al., 2016) lassen sich immunhistochemisch aufgrund der dicht gepackten Kapselwandstruktur, die den Zugang von Antikörpern verhindert, nur in sich differenzierenden Nesselzellen nachweisen.

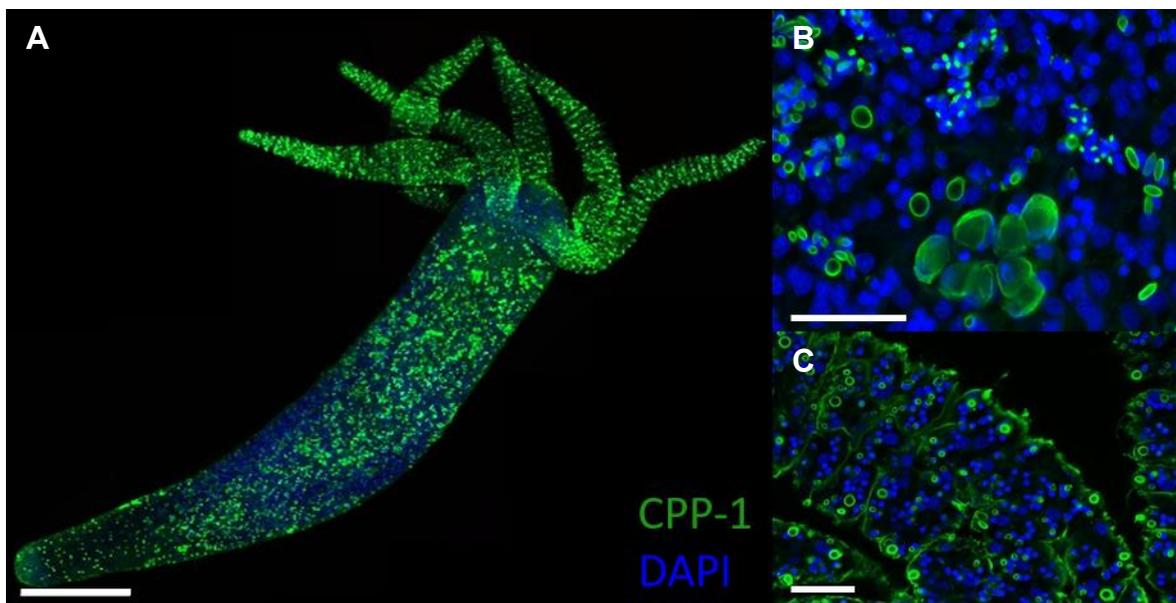


Abb. 14: Lokalisation von CPP-1 in *Hydra magnipapillata*. A) CPP-1 Protein (grün) in *Hydra*. Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt (Größenmaßstab 500 μ m). B) Detektion von CPP-1 in differenzierenden Nematocyten der Körpersäule (Größenmaßstab 50 μ m). C) CPP-1 in den reifen Nematocysten der Tentakel (Größenmaßstab 50 μ m).

Das CPP-1 ist wie die HRGPs in den Pflanzen Teil der Wandstruktur (Cooper and Varner, 1984; J van Holst and E. Varner, 1984). Zur genaueren Lokalisation wurde zusätzlich zum

CPP-1 das Cnidoin gefärbt. Die Cnidoinfärbung erfolgte mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper, der gegen das CRD-Epitop am C-Terminus gerichtet ist (Beckmann et al., 2015). Die Abbildung 15 zeigt Ko-Färbungen von CPP-1 (grün) und Cnidoin (rot) in *Hydra magnipapillata*. In der Übersichtsaufnahme ist Cnidoin ausschließlich in den sich entwickelnden Nematocysten der Körpersäule erkennbar, nicht jedoch in den reifen Nematocysten der Tentakel (Abb. 15 C). Dieses Muster bestätigte bereits publizierte Daten zum immunhistochemischen Nachweis von Cnidoin in *whole mounts* (Beckmann et al., 2015). Das CPP-1 konnte, wie in dem vorangegangenen Experiment, in den Nestern der Körpersäule detektiert werden. Im Unterschied zum Cnidoin war CPP-1 zusätzlichen in den Nesselkapseln der Tentakel sichtbar, was auf eine bessere Zugänglichkeit von CPP-1 durch Antikörper in reifen Nematocysten deutet. Die Nahaufnahme der Körpersäule (Abb. 15 B) zeigt die Färbung von CPP-1 und Cnidoin in der Kapselwand. Die Färbungen deuten darauf hin, dass das CPP-1 hauptsächlich oberflächennah und das Cnidoin eher in der inneren Schicht der Kapselwand angereichert ist. Außerdem konnte nur das Cnidoin zusätzlich im Schlauch detektiert werden. Diese Daten zeigen erstmalig, dass das CPP-1 ein Kapselprotein ist, welches in der Wandstruktur aller Kapseltypen in *Hydra magnipapillata* enthalten ist und darüber hinaus auch in reifen Nematocysten detektiert werden kann.

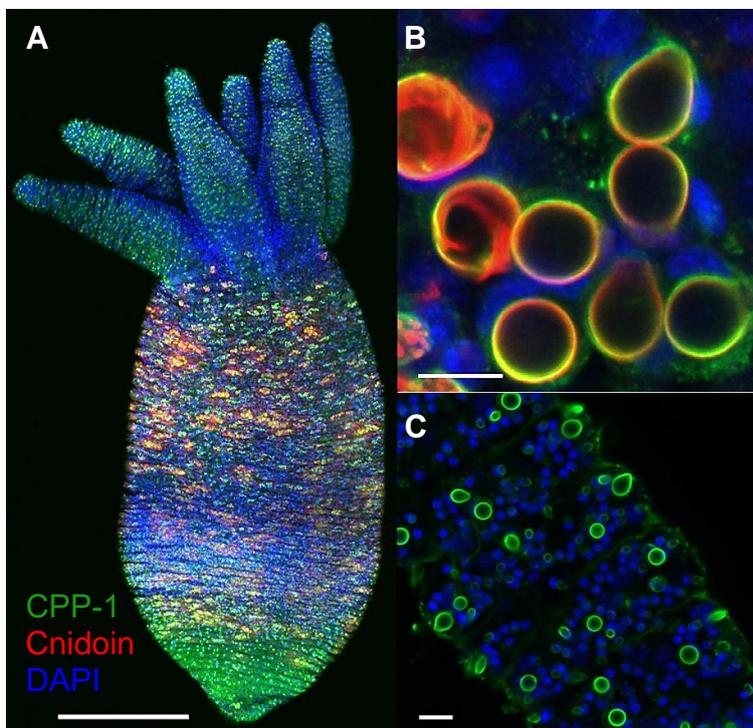


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von CPP-1 und Cnidoin in *Hydra magnipapillata*. A) Antikörperfärbung von CPP-1 (grün) und Cnidoin (rot) in einem adulten Polypen. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt (Größenmaßstab 500 μm). B) Die Nahaufnahme von Stenothelen in der Körpersäule zeigt überlappende Signale in der Kapselwandstruktur. (Größenmaßstab 10 μm). C) Die Nahaufnahme der Tentakel zeigt lediglich Färbungen für CPP-1 in reifen Nesselkapseln (Größenmaßstab 10 μm).

4.4 CPP-1 und Cnidoin sind Teil des Kapselwandpolymers

Die Proteine der Nematocystenwand besitzen typischerweise CRD-Motive, die als Linkerdomäne fungieren. Das dichte Polymer in der Kapselwand basiert somit auf einer Redox-Reaktion der Cysteine in den CRDs. Bei diesem Vorgang handelt es sich um eine Umlagerung von intramolekularen Disulfidbrücken zu intermolekularen Disulfidbrücken, durch die einzelne Proteine kreuzvernetzen (Ozbek et al., 2002b; Tursch et al., 2016). Die Polymerbildung findet während der finalen Reifung der Nematocyste statt und geht mit der Verdichtung der Nematocystenwand einher (Engel et al., 2001). Das CPP-1 wird, wie oben gezeigt, während der Morphogenese in die Nematocystenwand eingelagert. Ob dieser Prozess wie bereits für andere Nematocystenproteine gezeigt mit einer Integration in das Disulfidnetzwerk der Kapselstruktur verbunden ist, wurde im Weiteren über Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 16). Es wurden Lysate von der Körpersäule, von Köpfen mit reifen Kapseln und von isolierten Kapseln präpariert, die anschließend unter reduzierenden oder nicht- reduzierenden Bedingungen in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit dem CPP-1-spezifischen Antikörper detektiert wurden. Die Verwendung von reduzierenden Reagenzien wie β -Mercaptoethanol vermittelt hierbei die Reduktion von Disulfiden zu Thiolen, welches wiederum Hinweise liefert, ob und in welchem Umfang CPP-1 durch die CRDs als Polymer in reifen Kapseln vorliegt. Das CPP-1 wurde unter reduzierendem Bedingungen im Lysat der Körpersäule, der Kopfregion und der isolierten Nesselkapseln in der SDS-PAGE als monomere Proteinbande detektiert. Die Proben der Körpersäule und der Kopfregion unter nicht-reduzierenden Bedingungen wiesen lediglich diffuse hochmolekulare Banden auf, während im Bereich des theoretischen Molekulargewichts von CPP-1 keinerlei Banden detektiert werden konnten. Dies zeigt, dass das CPP-1 in den Nematocysten von *Hydra* Teil eines Polymers ist. Dass dies sogar unter reduzierenden Bedingungen beobachtet werden kann, ist auf eine unvollständige Reduktion durch β -Mercaptoethanol zurückzuführen. Nur die Proben in der reduzierenden SDS-PAGE zeigten klar definierte Monomerbanden bei 40 kDa. Während das CPP-1 in den Kopflysaten und isolierten als einzelne Bande bei etwa 40 kDa detektiert wurde, zeigte das unreife Protein aus den Körperlysaten eine zusätzliche Bande mit einem höheren apparenten Molekulargewicht von ca. 43 kDa. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in den Entwicklungsstadien der Körpersäule das Protein teilweise mit unprozessiertem Pro- und Signalpeptid vorliegt. Die Abbildung 16 C zeigt das CPP-1 in der Körpersäule, im Kopf und in isolierten Kapseln. Die Proben wurden mit und ohne vorheriger Hitzedenaturierung aufgetragen, um eine mögliche Tripelhelixbildung wie bei Minikollagenen zu untersuchen.

Einen Banden-Shift in den trimeren Bereich in der nicht-denaturierten Probe blieb allerdings aus, so dass davon auszugehen ist, dass bei CPP-1 keine kollagenähnliche Trimerisierung stattfindet. Interessanterweise zeigten sich in dem Blot mit den nicht-denaturierten Proben schwache zusätzliche Banden bei ca. 28 kDa, was der molekularen Masse von CPP-1 ohne PTMs entspricht. Es ist daher möglich, dass das nicht-modifizierte CPP-1 aufgrund seiner geringeren Löslichkeit durch die Hitzedeanaturierung aggregiert und so nicht in der SDS-PAGE aufgetrennt werden kann.

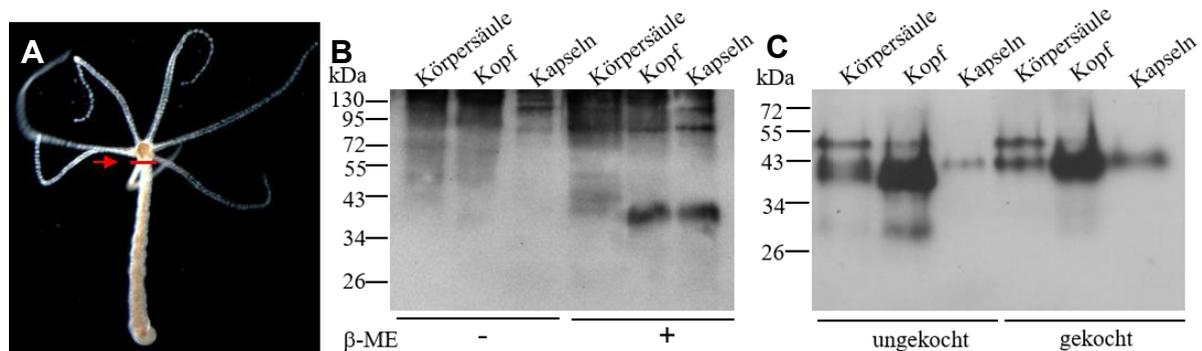


Abb. 16: Western Blot-Analysen von CPP-1 in Hydralysat. A) Die rote Markierung verdeutlicht die Schnittstelle bei der Präparation der Hydren. B und C) Western Blot von CPP-1 in der Körpersäule, dem Kopf und isolierten Kapseln. B) Die ersten drei Proben wurden in nicht-reduzierendem Medium aufgetragen, die letzten drei wurden mit dem reduzierenden Reagenz β -Mercaptoethanol versetzt. Es wurden jeweils 5 Rumpfe, 10 Köpfe und 100000 Kapseln pro Spur aufgetragen. C) Die ersten drei Proben wurden nicht gekocht, die letzten drei wurden bei 95 °C gekocht. Es wurden jeweils 2 Rumpfe, 10 Köpfe und 100000 Kapseln pro Spur aufgetragen.

Um zu bestätigen, dass Cnidoin als weiterer Bestandteil der Kapselwandstruktur ein ähnliches Verhalten in der SDS-PAGE zeigt, wurde das Experiment mit einem anti-Cnidoin-Antikörper wiederholt (Abb. 17). Cnidoin konnte unter reduzierenden Bedingungen in allen Proben (Körpersäule, Kopfreion und isolierte Nematocysten) als einzelne Bande bei etwa 42 kDa detektiert werden. Dies stimmt mit den publizierten Daten von Dr. Anna Beckmann überein, in denen das Cnidoin ebenfalls bei 42 kDa mit Western Blot-Analysen detektiert wurde (Beckmann et al., 2015). Auffallend war, dass im Lysat der Körpersäule Cnidoin auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen als Monomer vorliegt, hier also noch keine Polymerisierung wie in den reifen Kapseln (Kopf, isolierte Kapseln) stattgefunden hat. Dies könnte auf einen im Vergleich zum CPP-1 späteren Einbau in die Kapselwandstruktur deuten, was auch die Ko-Färbung in der Immunhistochemie nahelegt (Abb. 15B).

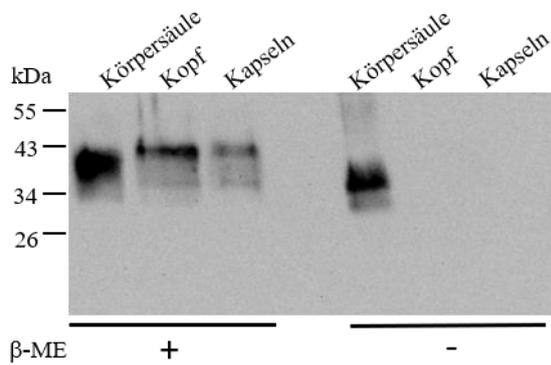


Abb. 17: Western Blot-Analyse von Cnidoin in Lysaten verschiedener Körperregionen von *Hydra*. Die Proben auf der linken Seite wurden mit einem reduzierenden Probenpuffer versetzt, die Proben auf der rechten Seite unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Es wurden jeweils 5 Rumpfe, 15 Köpfe und 100 000 Kapseln pro Bande aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen Cnidoin-Antikörper.

4.5 Herstellung des rekombinanten CPP-1 Proteins

Da in den gezeigten Western Blot-Analysen von CPP-1 eine erhebliche Diskrepanz zwischen dem errechneten (25,8 kDa) und apparenten Molekulargewicht (ca. 42 kDa) bestand, wurde im Folgenden in Bakterien rekombinant exprimiertes CPP-1 analysiert. Hierbei handelte es sich um das CPP-1 ohne Signal- und Propeptid. Mit diesem Experiment sollte evaluiert werden, inwiefern posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen für das höhere apparente Molekulargewicht verantwortlich sind. In *E. coli* exprimierte Protein werden nicht glykosyliert oder hydroxyliert, da im bakteriellen System die entsprechenden Enzyme nicht vorhanden sind (Grunina et al., 2017; Mohs et al., 2007). Dementsprechend wurde eine Methode zur rekombinanten Expression von CPP-1 in *E. coli* entwickelt. Die Expression des CPP-1 wurde über die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert (Abb. 18, t = 0), welches die Repression des Lac-Operons in dem CPP-1-Expressionskonstrukt inhibiert. Der Expressionsverlauf wurde mittels Western Blot-Analysen detektiert. Die maximale Ausbeute wurde durch eine zweistündige Expression nach Induktion (t= +2) mit IPTG erzielt.

Das CPP-1 befand sich nach Aufschluss der Bakterien sowohl im Überstand (Ü) als auch im Pellet (P) des Zelllysats. Das apparente Molekulargewicht von ca. 26 kDa entspricht der errechneten molekularen Masse ohne Signal- und Propeptid. Die zusätzliche Bande bei ca. 50 kDa resultiert vermutlich aus der Dimerisierung des CPP-1 durch partielle Reoxidation der CRDs im Verlauf der SDS-PAGE.

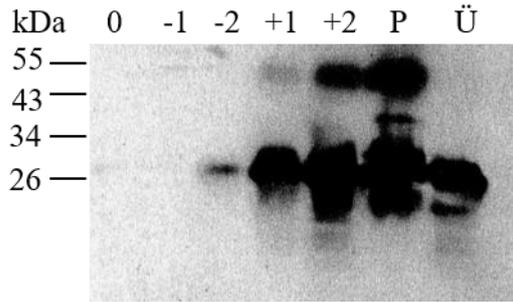


Abb. 18: Western Blot-Analyse von CPP-1 nach bakterieller Expression. Der Western Blot veranschaulicht die Expression von CPP-1 in *E. coli* BL21(DE3) -Zellen. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Induktion mit IPTG analysiert. Zusätzlich zeigt der Western Blot den Anteil von CPP-1-Protein im Pellet (P) und Überstand (Ü) nach Lyse der Bakterienzellen.

Neben der bakteriellen Expression wurde auch eine rekombinante Expression von CPP-1 in einem eukaryontischen System durchgeführt. Hierfür wurde die Zelllinie HEK293T verwendet. Das Konstrukt für die Expression von CPP-1 in humanen Zellen besitzt das native Signalpeptid sowie ein Propeptid und einen Polyhistidin-Tag. Jeweils 24 h und 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen abzentrifugiert und das CPP-1 im Überstand mit Hilfe von Ni-NTA gefällt. Das gewonnenen CPP-1 wurde an Hand Western Blot-Analysen mit dem CPP-1-Antikörper detektiert. Zum Vergleich wurde das bakteriell exprimierte CPP-1 aufgetragen (Abb. 19). Zwischen dem Protein aus humanen Zellen und dem bakteriell exprimierten CPP-1 ist ein deutlicher Unterschied im apparenten Molekulargewicht der entsprechenden Banden zu sehen. Das in HEK293T-Zellen exprimierte Protein zeigt hierbei mit ca. 43 kDa ein Molekulargewicht, das dem aus den Hydralysaten entspricht (vgl. Abb.16). Das errechnete Molekulargewicht des CPP-1 mit Propeptid und Signalpeptid beträgt 28 kDa. Das höhere Molekulargewicht resultiert somit nicht aus einem ungewöhnlichen Migrationsverhalten der Primärstruktur im Polyacrylamidgel, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit aus PTMs wie etwa Glykosylierungen, die von eukaryontischen Zellen durchgeführt werden.

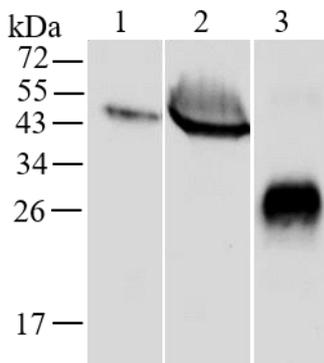


Abb. 19: Expression von CPP-1 in HEK293 T Zellen. Die Zelllysate von HEK293T-Zellen wurden nach 24 h (1) und nach 48 h (2) mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Zum Vergleich wurde aus *E. coli* gewonnenes CPP-1 aufgetragen (3). Die Detektion erfolgt an Hand von Western Blot-Analysen durch einen spezifischen Antikörper gegen CPP-1.

4.6 Analyse posttranslationaler Modifikationen von CPP-1

Um die Differenz von 17 kDa des Molekulargewichtes des CPP-1 in *Hydra* bzw. in humanen Zellen und dem bakteriell exprimierten CPP-1 begründen zu können, wurde das CPP-1 in *Hydra* auf mögliche Glykosylierungen untersucht. Üblicherweise sind Asparaginseitenketten (Asn) innerhalb des Konsensus-Motivs Asparagin-X-Serin/Threonin durch N-Glykosylierungen modifiziert. Hierbei kann X durch jede beliebige Aminosäure außer Prolin ersetzt werden (Kim and Hahn, 2015). Das CPP-1 besitzt eine einzelne potentielle N-Glykosylierungsstelle (Aminosäureposition 105). Durch das Enzym PNGaseF können Zuckermoleküle, die durch N-Glykosylierung an Proteine gebunden sind, entfernt werden (Mamedov and Yusibov, 2013). Dabei hydrolisiert die Glykosidase die Bindung zwischen der Asparaginseitenkette und dem N-Acetylglucosamin. Um mögliche N-gebundene Zucker vom CPP-1 zu entfernen, wurde eine enzymatische Deglykosylierung mit PNGaseF an isolierten, intakten Nesselkapseln durchgeführt. Wie die Abbildung 20 zeigt, konnte durch die Behandlung mit PNGaseF eine Reduktion des Molekulargewichts um 2 kDa von CPP-1 erzielt werden. Diese Reduktion verdeutlicht die Eliminierung von N-gebundenen Zucker. Das CPP-1 ist demnach zu einem geringen Anteil über N-Glykosylierungen modifiziert. Zudem weist die Sequenz 9 potentielle O-Glykosylierungsstellen auf. Die O-Glykosylierung tritt an Aminosäuren wie Serin, Threonin und Prolin auf (Hoffmann et al., 2016). Um auch diese PTMs zu untersuchen, wurden isolierte Kapseln mit TFMS (Trifluormethansulfonsäure) behandelt. Durch eine chemische Deglykosylierung können auch Glykosylierungen entfernt werden, die für Enzyme nicht erreichbar oder aufgrund der Substratspezifität nicht angreifbar sind. Durch eine Deglykosylierung mit TFMS werden somit sowohl N- als auch O-gebundene Zucker entfernt. Die Ausnahme bildet die N-glykosidische Bindung zwischen dem Asparagin und innersten Acetylglucosamin, das an dem Protein durch eine Amidbindung gekoppelt ist und deshalb gegenüber TFMS inert ist (Edge, 2003). Zwischen dem apparenten Molekulargewicht des CPP-1 der unbehandelten Kapseln und dem der mit TFMS behandelten Kapseln, liegt eine Differenz von 5 kDa. Abzüglich des Anteils, welcher allein durch die N-Glykosylierung auftritt, sind ca. 3 kDa des apparenten Molekulargewichts auf O-Glykosylierung zurückzuführen. Das mit TFMS behandelte CPP-1 in den Nematocysten zeigt in der Western Blot-Analyse eine einzelne Bande, was darauf schließen lässt, dass die chemische Deglykosylierung, vollständig abgelaufen ist. Unvollständige Deglykosylierungen erzeugen in der Regel ein heterogenes Muster mit mehreren Banden. Dieses ist z.B. in der enzymatischen Deglykosylierung von

CPP-1 in Form der Doppelbande erkennbar. Somit ist CPP-1 in den Nematocysten von *Hydra* sowohl durch N- als auch O-Glykosylierungen modifiziert.

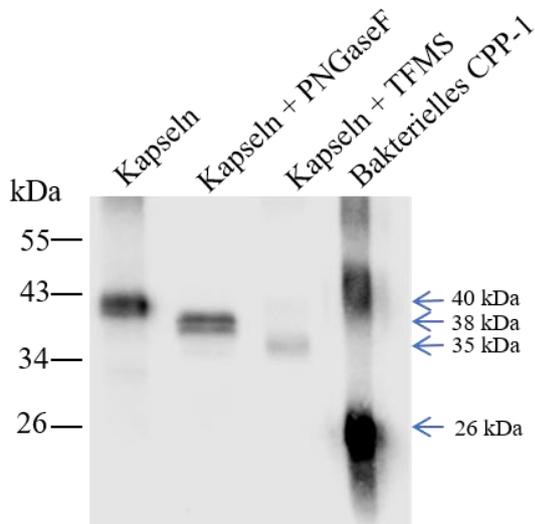


Abb. 20: Analyse von PTMs des CPP-1 in isolierten Kapseln von *Hydra magnipapillata*. Detektion von CPP-1 in unbehandeltem Kapselpräparat und nach Behandlung mit PNGaseF oder TFMS behandelt wurden. Zudem wurde das bakteriell exprimierte CPP-1 aufgetragen.

Auch nach Behandlung mit TFMS ist ein erheblicher Unterschied im apparenten Molekulargewicht des CPP-1 im Vergleich zum bakteriell exprimierten Protein vorhanden. Da das bakterielle CPP-1 keine PTMs besitzt, deutet die Differenz auf weitere PTMs des CPP-1 in *Hydra* hin. Da bei Minikollagen-1 Hydroxylierungen von Prolinen nachgewiesen wurden (Engel et al., 2001), sind solche auch in der Polyprolinsequenz von CPP-1 naheliegend und könnten für das veränderte Migrationsverhalten verantwortlich sein (Phelps and Floros, 1988). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Hydren mit 2,2-Dipyridyl inkubiert, welches bereits als Inhibitor der Prolylhydroxylase in *Arabidopsis* beschrieben wurde. Dieses Enzym katalysiert bei tierischen Vielzellern die Hydroxylierung von Prolinen in Kollagenen (Pitzschke et al., 2016). Auch in *Hydra* wurde da 2,2-Dipyridyl bereits eingesetzt, um die Kollagenbiosynthese zu inhibieren (Aufschnaiter et al., 2011). Eine Prolylhydroxylase-Aktivität im Verlauf der Nematocystenmorphogenese ist aufgrund des hohen Anteils an Minikollagenen sehr wahrscheinlich. Um die Gewebedynamik und die Bildung von neuen Nematocysten anzuregen, wurden die Versuchstiere für drei Tage vor der Inkubation mit 2,2-Dipyridyl täglich gefüttert. Um bei den neu entstehenden Nematocysten die Hydroxylierung von Proteinen zu inhibieren, wurden die Tiere mit 2,2-Dipyridyl für 48 h inkubiert und das CPP-1 mittels Western Blot in Lysaten von Kopf und Körpersäule analysiert (Abb. 21). Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin detektiert. Das 2,2-Dipyridyl wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mit Hydramedium aufgefüllt. So wurde eine Stocklösung von 1 mM hergestellt, die für die Anwendung entsprechend mit Hydramedium verdünnt wurde. Es wurden unterschiedliche

Konzentrationen zwischen 5-60 μM verwendet. Als Kontrolle wurde eine Lösung mit DMSO in Hydramedium angefertigt. Die DMSO-Konzentration der Kontrolllösung entspricht derselben Konzentration an DMSO, in der die höchste verwendete Konzentration an Inhibitor (100 μM) in diesem Experiment verwendet wurde. Aufgrund der Toxizität des 2,2-Dipyridyls ab einer Konzentration ab 80 μM konnten jedoch nur die Tiere, die mit einer Konzentration des Inhibitors bis zu 60 μM inkubiert wurden, ausgewertet werden. Die Lysate von Köpfen (K) und Rümpfen (R) wurden separat auf das Gel aufgetragen. Eine intensivere Bande ist infolge der Anreicherung reifer Kapseln in den Tentakeln bei den Kopflysaten zu beobachten. Jedoch zeigt der Western Blot keine Veränderung in der apparenten molekularen Masse des CPP-1 infolge der 2,2-Dipyridyl-Behandlung. Es ist lediglich eine Reduktion in der Gesamtmenge des CPP-1-Proteins im Konz.-Bereich von 5-20 μM festzustellen.

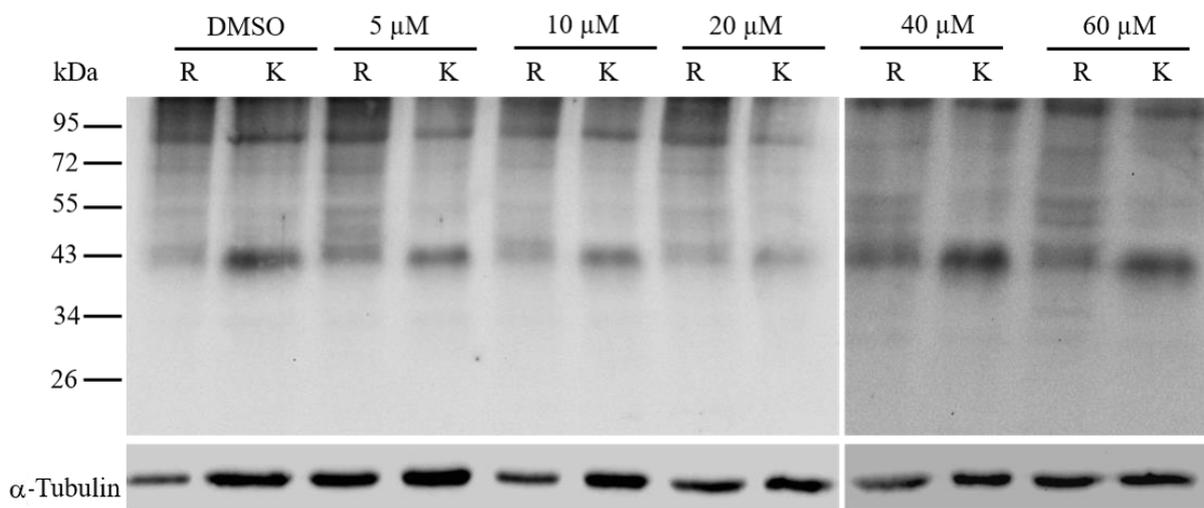


Abb. 21: Western Blot-Analyse des CPP-1 in *Hydra* nach Inkubation mit 2,2-Dipyridyl. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des 2,2-Dipyridyls dem Hydramedium zugesetzt. Für die Kontrolle wurde DMSO verwendet. Es wurden jeweils 10 Köpfe (K) und 5 Rümpfe (R) pro Spur auf das Gel geladen. Eine Reduktion des Molekulargewichtes von CPP-1 durch Inhibition der Prolylhydroxylase konnte nicht detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde die Detektion mit einem α -Tubulin-Antikörper verwendet.

4.7 Funktionelle Analyse von *CPP-1*

Um einen Hinweis auf die biologische Funktion des *CPP-1* in den Nesselkapseln zu erhalten, wurde ein Knockdown mittels siRNA (*small interfering RNA*) durchgeführt. Es wurden drei siRNAs entworfen, die gegen drei unterschiedliche Loci der *CPPI*-mRNA gerichtet sind. Diese wurden in zwei unterschiedlichen Kombinationen (K1 und K2; Abb. 22) in die Zellen adulter Polypen durch Elektroporation eingebracht, welche nach 8 Tagen für weitergehende Analysen verwendet wurden. Als Kontrolle diente eine siRNA, die gegen GFP gerichtet ist.

Die siRNA-Tansfektion zum transienten Knockdown der Genexpression wurde erst kürzlich in *Hydra* als robuste Methode etabliert (Lommel et al., 2017). Durch die siGFP-Kontrolle in Kombination mit einem GFP-transgenen Stamm (*Hydra vulgaris* Akt::GFP), ist ein direkter mikroskopischer Nachweis einer erfolgreichen Elektroporation mit siRNAs möglich. Die transgenen Tiere exprimieren GFP unter Kontrolle des Aktin-Promotors in allen Zellen des Ektoderms. Nach der Elektroporation mit siGFP ist das GFP-Signal der transgenen Hydren an den betroffenen Stellen reduziert, was durch Mikroskopie beobachtet werden kann. Der genetische Knockdown erreicht hierbei nach 7 Tagen seine maximale Effizienz und bleibt danach für eine weitere Woche bestehen (Lommel et al., 2017).

Um eine Reduktion der *CPP-1* Expression auf Proteinebene zu verifizieren, wurden Tiere für Western Blot-Analysen verwendet, die entweder mit *GFP* siRNA oder *CPP-1* siRNA elektroporiert wurden. Als Ladekontrolle diente die Detektion von α -Tubulin. Auf dieser Grundlage wurden die CPP-1-Signale normalisiert und quantifiziert. Die Intensität der CPP-1-Bande in siGFP-behandelten Tiere wurde somit auf 100 % gesetzt. Wie in Abb. 22 gezeigt, ist die Menge an CPP-1-Protein in Tieren, die mit CPP-1-siRNA elektroporiert wurden, auf 54 % bei der Kombination 1 und auf 71 % bei der Kombination 2 reduziert.

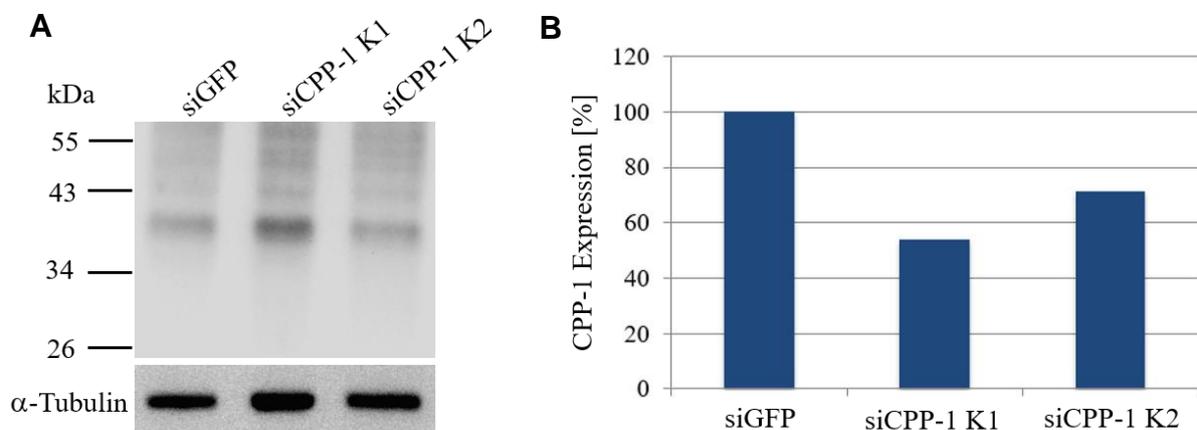


Abb. 22: siRNA-Knockdown von *CPP-1* in *Hydra vulgaris* (AEP) führt zur Reduktion des CPP-1-Proteins in Hydralysaten. A) Detektion der Proteinmenge des CPP-1 an Hand Western Blot-Analysen. Pro Spur wurde jeweils die Proteinmenge einer Hydra aufgetragen. Das CPP-1 wurde sowohl in der mit siGFP, als auch in den mit siCPP-1 K1 und K2 detektiert. Als Ladekontrolle wurde das α -Tubulin detektiert. B) Das Balkendiagramm zeigt die CPP-1 relative Proteinmenge der mit siRNA behandelten Hydren. Die Proteinmenge von CPP-1 in den mit siGFP behandelten Tieren wurde auf 100 % gesetzt. Die Hydren, die mit siCPP-1 Kombination 1 (K1) behandelt wurden, zeigen eine Reduktion auf 54 % und die Hydren, die mit siCPP-1 Kombination 2 (K2) behandelt wurden, weisen eine CPP-1- Reduktion von 71 % auf.

Nach Verifizierung des siRNA-Knockdowns auf Western Blot-Ebene wurde zusätzlich eine Immunfärbung mit Tieren durchgeführt, die entweder mit siGFP als Kontrolle oder siCPP-1 elektroporiert wurden. Durch die Immunfärbungen sollte zudem überprüft werden, ob der Verlust von CPP-1 eine Veränderung in der Nematocystenmorphogenese bewirkt. Als Referenz für die Integrität der Kapselstruktur wurde eine Immunfärbung mit dem Cnidoin-Antikörper durchgeführt. Bereits in der Übersichtsaufnahme ist deutliche eine Reduktion des CPP-1-Signals (grün) in den siCPP-1-behandelten (Kombination 2) Tieren sichtbar, die nahezu ausschließlich nur noch ein Cnidoin-Signal zeigen (rot) (Abb. 23). Dieser Befund bestätigte daher die Western Blot-Daten von siRNA-behandelten Tieren (Abb. 22). Lediglich in den Tentakeln und partiell in den Basalscheiben war in den siCPP-1-behandelten Tieren noch ein CPP-1-Signal in reifen Nematocysten detektierbar. Auf Grund der Gewebedynamik werden neue Nematocysten in der Körpersäule gebildet, die anschließend in Richtung der Tentakeln wandern und somit ältere Stadien repräsentieren (Campbell and Marcum, 1980). Dementsprechend stellen dies vermutlich CPP-1-positive Nematocysten dar, die zu einem Zeitpunkt vor der Elektroporation gebildet worden sind. In den Tentakeln der Kontrolltiere und den mit siCPP-1 behandelten Tieren war deswegen kein wesentlicher Unterschied in der Kapselstruktur zu erkennen. In Entwicklungsstadien im Rumpfbereich zeigten sich im Gegensatz hierzu vereinzelt deutliche Defekte in der Proteinassemblierung des Cnidoins durch den Verlust von CPP-1 (Abb. 23 B). Während Cnidoin in den Kontrolltieren entweder in den bereits invaginierten Schlauchstrukturen und späten Kapselwänden zu erkennen war, zeigten sich in den siRNA-behandelten Tieren Muster mit ungeordneter, diffuser Anordnung in der Wandstruktur. Diese Daten deuten auf eine gestörte Morphogenese der Nematocystenwand hin (Abb. 23 E).

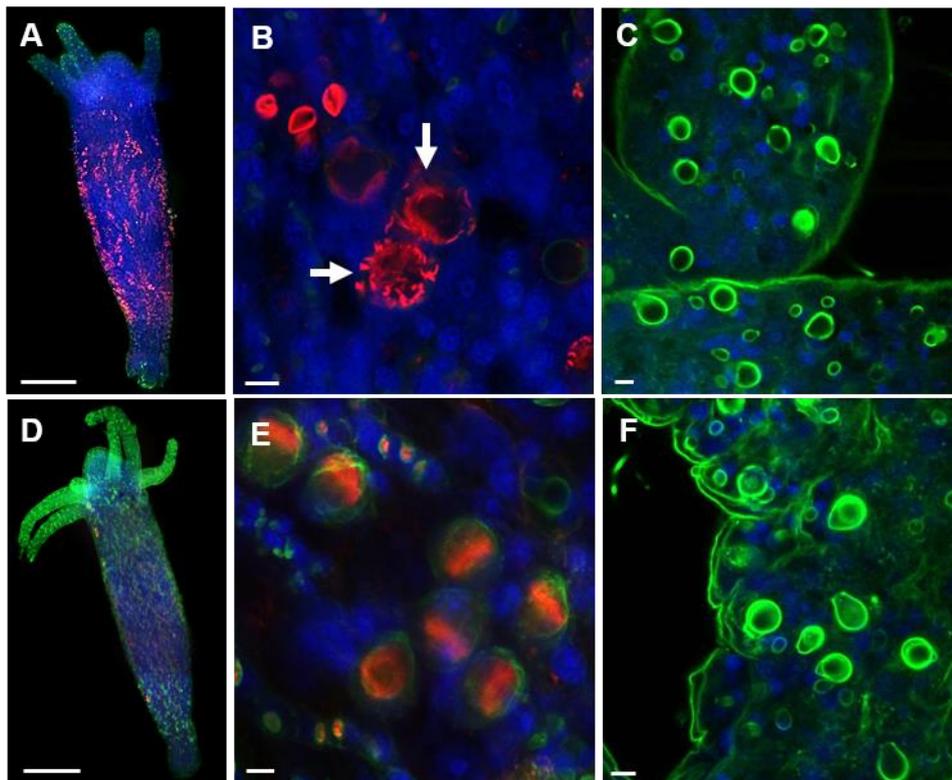


Abb. 23: Immunfärbungen für Nematocystenproteine nach *CPP-1* Knockdown durch siRNA-Behandlung in *Hydra vulgaris* (AEP) (Akt::*GFP* ekto). A-C *CPP-1*/Cnidoin-Doppelfärbung nach si*CPP-1*-Behandlung. D-F Kontrolltiere mit si*GFP*-Behandlung A) Nachweis von *CPP-1* (grün) und Cnidoin (rot) in einem adulten Polyp 8 Tage nach der Elektroporation mit si*CPP-1* (K2) (Größenmaßstab 500 μ m). B) Nahaufnahme der Nematocysten der Körpersäule. Die weißen Pfeile deuten auf die diffuse Anordnung des Cnidoins in den Nematocysten (Größenmaßstab 10 μ m). C) Nahaufnahme der Tentakel (Größenmaßstab 10 μ m). D-F *CPP-1*/Cnidoin-Doppelfärbung in Kontrolltier mit si*GFP*-Behandlung D) Übersichtsaufnahme ganzer Hydra (Größenmaßstab 500 μ m). E) Nahaufnahme der Nematocysten in der Körpersäule (Größenmaßstab 10 μ m). F) Nahaufnahme reifer Nematocysten im Tentakel (Größenmaßstab 10 μ m).

5 Ergebnisse 2. Teil: Synthese neuer Materialien auf der Grundlage von Nematocystenproteinen

5.1 Synthese von Hybridmaterialien

Dieses interdisziplinäre Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Barner-Kowollik am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchgeführt. Bei diesem Projekt sollte die makromolekulare Assemblierung der Nesselkapseln bei Cnidariern als Modell für die Synthese von Hybridmaterialien dienen. Die CRD fungiert als Linkerdomäne in der Nematocystenwand (Tursch et al., 2016), weshalb diese auch hier als Linker von synthetischen Polymeren eingesetzt werden sollte. Das CRD-Peptid wurde hierfür mittels bakterieller Expression in großen Mengen hergestellt. Das so gewonnene CRD-Peptid sollte über eine Kopplung von synthetischen Molekülen an dem freien Aminoterminus funktionalisiert werden. Diese neuartigen Hybridmoleküle sollten dann für verschiedene Anwendungen, wie z.B. funktionalisierte Oberflächen, eingesetzt werden.

5.1.1 Herstellung und Aufreinigung des CRD-Peptids

Für die Gewinnung der N-CRD wurde zunächst das Fusionsprotein GB1-CRD (12161,6 Da) mit einer PreScission-Schnittstelle verwendet. Das GB1-Protein wurde eingeführt, um eine bessere Löslichkeit zu erzielen. Hierdurch konnte die Ausbeute an CRD-Peptid gesteigert werden. Um die Ausbeute zusätzlich zu maximieren, wurde die Kern-CRD-Sequenz in dem Expressionskonstrukt um einige Aminosäuren verlängert und es wurden zusätzliche aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Y) eingeführt. Dies sollte die Löslichkeit weiter erhöhen und zugleich die Detektion über UV-Messung ermöglichen. Das optimierte Fusionsprotein, welches in Vorarbeiten von Anja Tursch etabliert wurde, ist in Abbildung 24 dargestellt.



Abb. 24. Darstellung des finalen CRD-GB1-Fusionsproteins mit der Schnittstelle der PreScission-Protease. Die Sequenzabschnitte und die der korrespondierenden Proteine im Schema sind mit derselben Farbe gekennzeichnet. Die Sequenz der CRD nach Prozessierung ist gelb markiert.

Das Fusionsprotein wurde in *E. coli* BL21(DE3) sowohl in Schüttelkultur als auch per Fermentation mit dem Fermenter *Biostat A* exprimiert. Durch die Fermentation konnte eine weitaus höhere Ausbeute erlangt werden, da hier Sauerstoffzufuhr sowie der pH-Wert kontrolliert werden können (Tripathi et al., 2009) und somit eine höhere Zelldichte resultiert. Die Unterschiede bezüglich der Zelldichte bei den verschiedenen Herstellungsmethoden der CRD waren erheblich. Während der Fermentation konnte eine OD₆₀₀ von 17 erreicht werden (Abb. 25). Die Zelldichte in der Schüttelkultur erreichte nur eine maximale OD₆₀₀ von 1,3 (nicht abgebildet). Mit dem etablierten Fermentationsprotokoll konnten aus 5 Liter Bakterienkultur 200 mg CRD-Fusionsprotein pro Fermentationslauf hergestellt werden. Das Fusionsprotein wurde mit Hilfe eines Histidin-Tags durch Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA Säule nativ aufgereinigt. Im Anschluss folgte die Isolierung des reinen CRD-Peptids (Abb. 26).

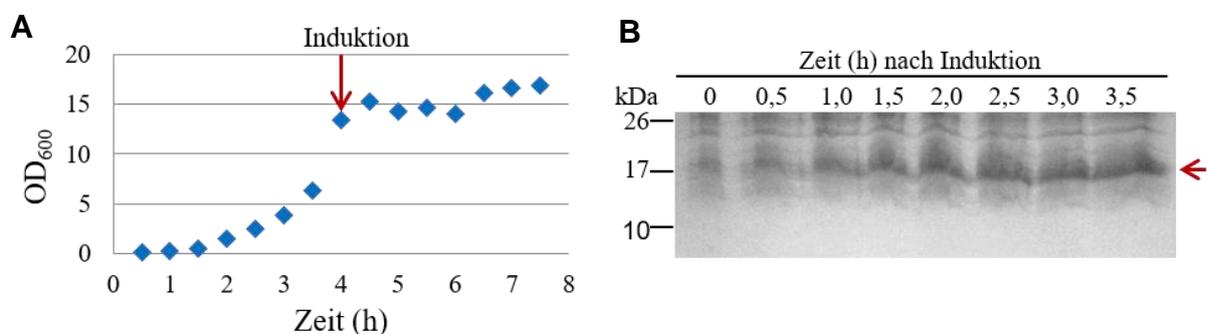


Abb. 25: Herstellung des GB1-CRD Fusionsproteins im Fermenter *Biostat A*. A) Zunahme der Zelldichte im Fermenter. Der rote Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Induktion durch die Zugabe von 1 M IPTG an. B) Detektion des rekombinant exprimierten Fusionsproteins mittels Coomassie Blue-Färbung. Der rote Pfeil deutet die zunehmende Menge des Fusionsproteins in Abhängigkeit der Zeit bei 17 kDa an.

Das exprimierte Fusionsprotein bestand aus dem GB1-Protein, welches mit einem N-terminalen His₆-Tag versehen ist, und der CRD. Zwischen dem GB1-Protein und der CRD befindet sich die Schnittstelle der PreScission-Protease. Die Protease besitzt wiederum einen N-terminalen GST-Tag. Die Schritte zur Isolierung des CRD-Peptids sind in Abbildung 26 schematisch dargestellt.

Die CRD wurde mit der PreScission-Protease enzymatisch von dem GB1-Protein abgespalten. Nach der Spaltung wurde der Ansatz mit Glutathion-Sepharose-Beads versetzt. Die PreScission bindet über ihrem GST-Tag an die Beads und konnte so durch Zentrifugation aus dem Ansatz entfernt werden. Im Überstand verblieb das GB1-Protein und die abgespaltene CRD. Über den N-terminalen His₆-Tag wurde das GB1-Protein mit Hilfe von Ni-NTA-Beads entfernt. Um ein möglichst reines CRD-Peptid zu erhalten, wurde dieser Schritt wiederholt. Die Proteinmenge wurde durch UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Aus 10 mg

Fusionsprotein wurden 3,72 mg an reiner CRD isoliert, was einer Ausbeute von 98,67 % entspricht.

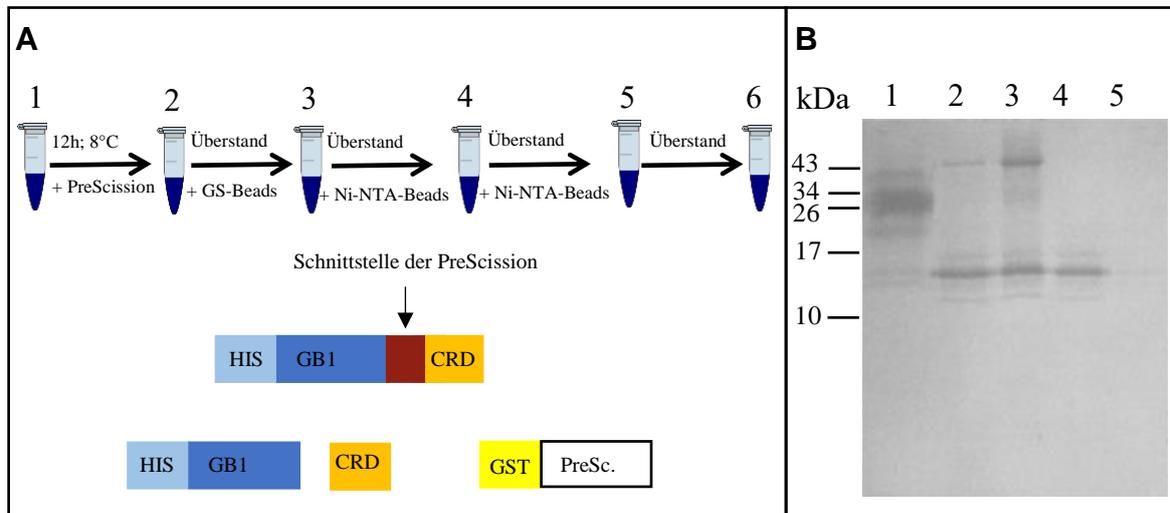


Abb. 26: Aufreinigung des CRD-Peptids. A) Das rekombinant exprimierte CRD-GB1 Fusionsprotein wurde mit der PreScission enzymatisch geschnitten. Die PreScission bindet die Glutathion-Sepharose-Beads (GS-Beads). Nach Zentrifugation verbleiben das GB1-Protein sowie das CRD-Peptid im Überstand. Das GB1-Protein bindet mit dem terminalen HIS-Tag an die Ni-NTA-Beads und wurde durch Zentrifugation entfernt. Das isolierte CRD-Peptid befindet sich im Überstand. B) Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE. Die Proteine wurden mit Coomassie Blue gefärbt. 1) CRD-GB1 Fusionsprotein. 2) Fusionsprotein nach Abspaltung der CRD. Die CRD, das GB1-Protein und die PreScission befinden sich in der Probe 3) Abtrennung der PreScission-Protease mit GS-Beads. Die CRD, das GB1-Protein und die PreScission die an Beads gebunden ist, befinden sich in der Probe. 4) Abtrennung des GB1 Proteins. Die CRD und das GB1-Protein, welches an die Ni-NTA-Beads gebunden hat, befinden sich in der Probe. 5) CRD im Überstand.

Die prozessierte CRD hat ein Molekulargewicht von 4616,40 Da und ist aufgrund der geringen Anzahl von basischen Aminosäuren für eine Anfärbung mit Coomassie Blue im SDS-PAGE-Gel nicht geeignet (Abb. 25). Daher wurde das CRD-Peptid in der aufgereinigten Fraktion durch Massenspektrometrie nachgewiesen (Abb. 27).

Um das isolierte CRD-Peptid identifizieren zu können, wurde in Kooperation mit dem *BAM-Federal Institut for Material Research and Testing* in Berlin das aufgereinigte CRD-Peptid mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) analysiert. Sowohl nach der nativen und der denaturierenden Aufreinigung konnte das CRD-Peptid an Hand einer Masse von 4,6 kDa identifiziert werden. Die Spektren zeigen die reduzierte Form der CRD. Die Rückfaltung der denaturierend aufgereinigten CRD wurde von Dr. Thomas Gegenhuber durch einen Redoxpuffer vorgenommen.

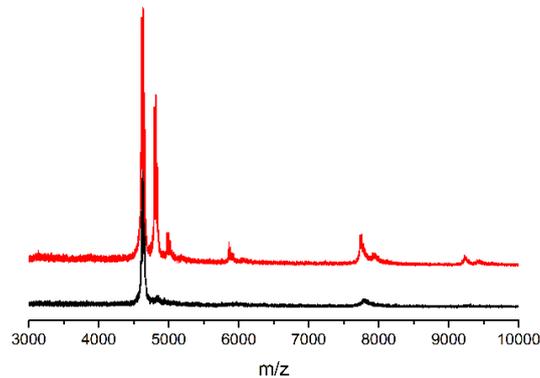


Abb. 27: MALDI-ToF Spektrum der reinen CRD. Die Abbildung zeigt das Signal des denaturierend aufgereinigten CRD-Peptids (schwarz) und des nativ aufgereinigten CRD-Peptids (rot) bei 4,6 kDa.

5.1.2 Synthese eines Biokonjugats mit CRD-Einheiten

Die Synthese des Biokonjugats wurde von Dr. Thomas Gegenhuber in der Arbeitsgruppe von Prof. Barner-Kowollik durchgeführt. Da die für Materialsynthesen erforderliche Menge an CRD-Peptid (5-10 g) selbst mit dem Fermenter nicht erreicht werden konnte, wurde zusätzlich ein durch Festphasensynthese hergestelltes CRD-Peptid mit identischer Aminosäuresequenz verwendet. Für die Kopplung wurde das CRD-Peptid mit einer Ankergruppe (Alkin) funktionalisiert. Das Poly(dimethylacrylamid) mit Azo-Endgruppen wurde mittels RAFT-Polymerisation (Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragung) hergestellt und fungierte hier als Vorläuferpolymer. An Hand der RAFT-Polymerisation ist die Synthese von komplexen Endgruppen vor der Polymerisation möglich und benötigt im Idealfall keine Postmodifikation am Polymer selbst (Bathfield et al., 2006). Auch bei dieser Synthese waren nach der RAFT-Polymerisation keine weiteren Modifizierungen des Vorläuferpolymers nötig. Die Kopplung des funktionalisierten Poly(dimethylacrylamid) und der CRD beruht auf der kupferabhängigen Click-Reaktion, die auf der Reaktion von Alkin und Azo-Gruppe basiert (Choi and Lee, 2015). Das Alkin des funktionalisierten CRD-Peptids reagiert mit den Azo-Gruppen des Poly(dimethylacrylamid). Als Katalysator wurde Kupferbromid eingesetzt. Das Syntheseprodukt konnte neben der Massenspektrometrie durch einen CRD-spezifischen Antikörper durch Western Blot-Analyse detektiert werden (Abb. 28). Das synthetisierte Biokonjugat zeigte hierbei eine breite Verteilung von molekularen Massen zwischen ca. 17-72 kDa. Die Molekulargewichtsverteilung ist ein Resultat der Synthese des Vorläuferpolymers via RAFT-Polymerisation (Chieffari et al., 1998). Bereits bei dem polymeren Vorläufer Poly(dimethylacrylamid) kann eine durch unterschiedliche

Polymerisationsgrade vermittelte Molekulargewichtsverteilung angenommen werden. Da das nicht-konjugierte Poly(dimethylacrylamid) kein CRD-Motiv hat, war sie im Western Blot-Analysen nicht nachzuweisen (Abb. 28). Durch diese interdisziplinäre Forschungsarbeit wurde ein Biokonjugat mit CRD-Einheiten hergestellt. Dies zeigt, dass die CRD der Nematocystenproteine für die Synthese von Hybridmaterialien eingesetzt werden kann.

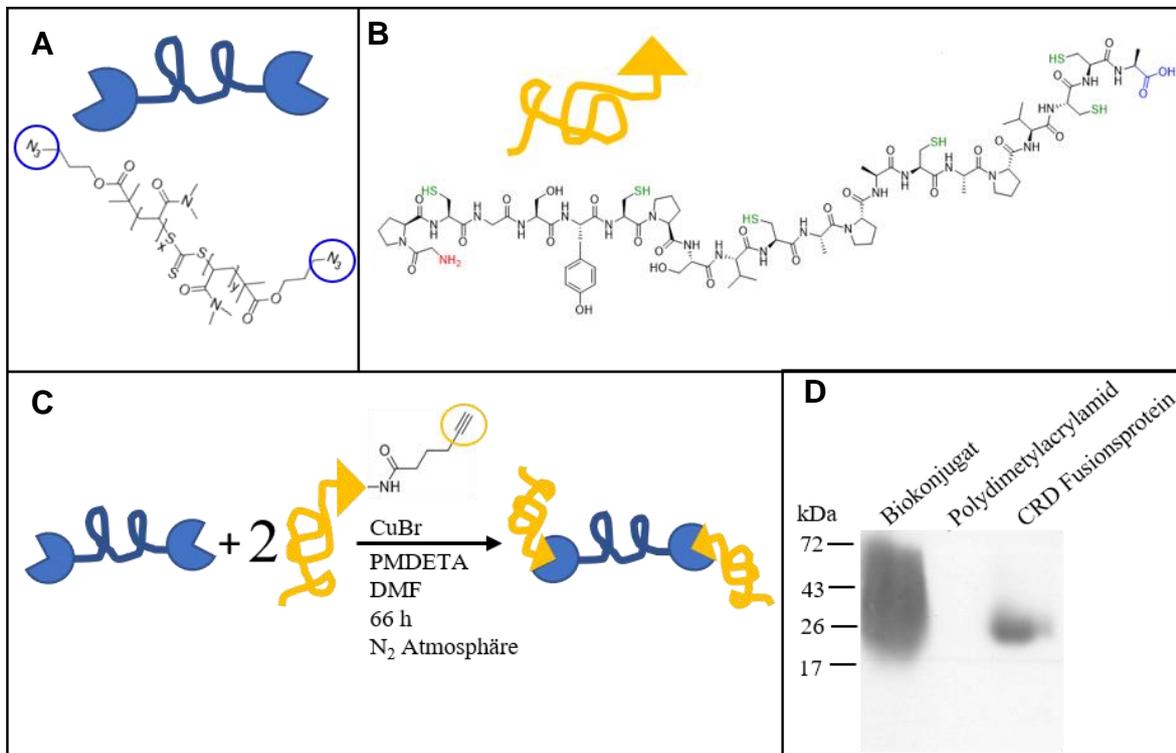


Abb. 28: Synthese eines CRD-Biokonjugats. A) Polydimethylacrylamid mit Azo-Endgruppen, die durch blaue Kreise gekennzeichnet sind. B) Proteinsequenz der N-CRD. Der N-Terminus der CRD wurde rot markiert, der C-Terminus blau und die SH-Gruppen der Cysteine grün. C) Darstellung der Synthese des Biokonjugats. In Blau ist das funktionelle Polydimethylacrylamid dargestellt und in Gelb die funktionalisierte CRD. Das Alkin ist durch den gelben Kreis hervorgehoben. Die kupferabhängige Click-Reaktion wurde mit Kupferbromid (CuBr), Dimethylformamid (DMF) und N,N,N',N'',N''-Pentamethyldiethylentriamin (PMDETA) durchgeführt. D) Der Western Blot zeigt das Biokonjugat, das 2 CRD-Einheiten enthält. Außerdem wurde das funktionalisierte Polydimethylacrylamid und als Positivkontrolle das CRD-GB1 Fusionsprotein aufgetragen.

Eine Anwendung, die aus diesem Ansatz hervorgegangen ist, sind wiederbeschreibbare Oberflächen, die mit funktionalisierten CRD-Peptiden hergestellt wurden (Abb.29). Das im Folgenden dargestellte Verfahren wurde von Dr. Thomas Gegenhuber am Karlsruher Institut für Technologie entwickelt.

Zuerst wurde die Oberfläche mit Polyethylenglykol mit Hilfe einer lichtinduzierten Reaktion selektiv auf die Oberfläche angebracht, um die Belegung der Oberfläche mit Peptideinheiten zu verhindern. Funktionalisierte CRD-Fumarat-Einheiten wurden ebenfalls mit Hilfe von lichtinduzierter Reaktionen auf die Oberfläche geschrieben. An die CRDs, die bereits an die Oberfläche gekoppelt waren, wurden weitere CRDs, die mit einer Brom-Gruppe

funktionalisiert wurden, gekoppelt. Die Bromgruppe wurde als Marker bei der Sekundär-Ionisations-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) verwendet. Durch die Reversibilität der CRD-Gruppen, konnte das funktionalisierte CRD-Br durch Reduktion wieder entfernt werden, wodurch das optische Br-Signal gelöscht wurde (Gegenhuber et al., 2017).

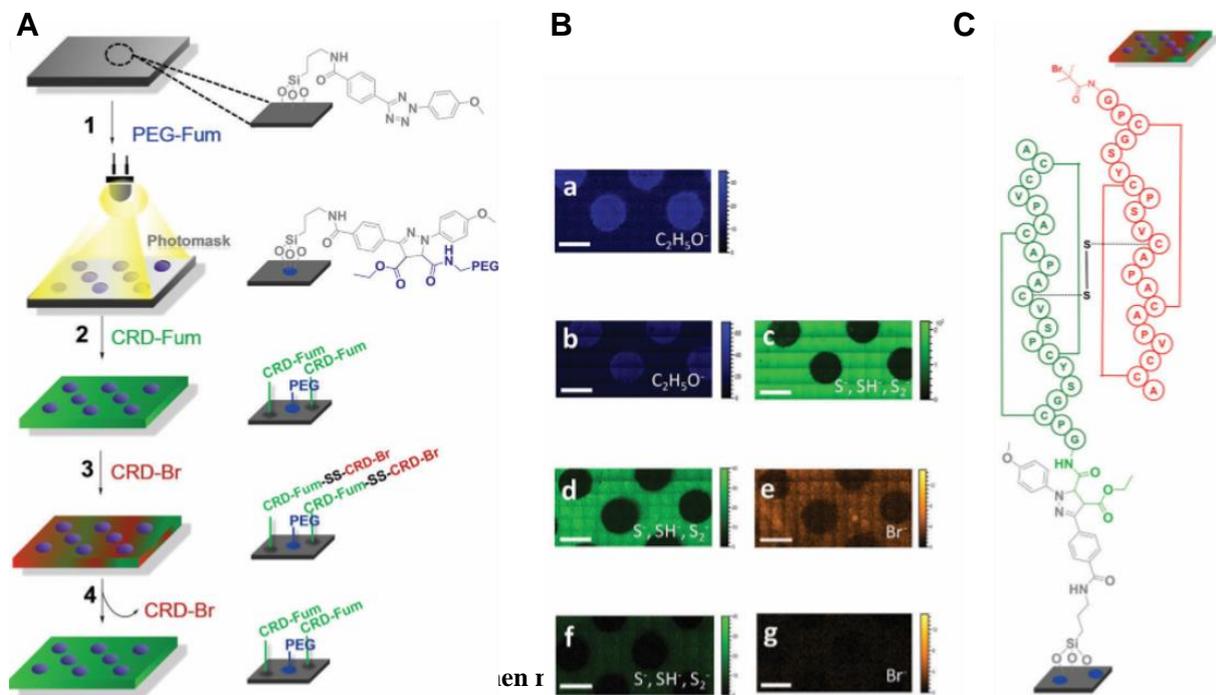


Abb. 29: Funktionalisierung der Oberflächen mit Hilfe der CRD, adaptiert von Gegenhuber et al., 2017. A) Schematische Darstellung des Konzeptes der Kodierung und Rekodierung mit funktionellen CRDs auf Silikonoberflächen, die mit Tetrazol funktionalisiert wurden. 1) Immobilisierung durch Polyethylenglykol-Fumarat (PEG-Fumarat) auf der Oberfläche mit Hilfe von UV-Licht. 2) Immobilisierung von CRD-Fumarat außerhalb der punktförmigen Flächen Oberfläche mit Hilfe von UV-Licht. 3) Kopplung des CRD-Bromid unter reoxidativen Bedingungen außerhalb der punktförmigen Flächen. 4) Entfernung des CRD-Bromids von der Oberfläche unter reoxidativen Bedingungen außerhalb der punktförmigen Flächen. B) Die ToF-SIMS-Abbildung zeigt die Schritte der Oberflächenmodifizierung, die in A dargestellt sind (Größenmaßstab 1 mm). a) nach der Immobilisierung mit PEG. Darstellung der Fragmente C_2H_5O b) Nach der CRD-Fumarat Immobilisierung. Darstellung der Summe von Darstellung der Fragmente C_2H_5O . c) Nach der CRD-Fumarat Immobilisierung. Darstellung der Summe der S, HS, S_2 -Fragmente. d) Nach der CRD-Bromid-Anlagerung Darstellung der Summe der S, HS, S_2 -Fragmente. e) Nach der CRD-Bromid-Anlagerung, Darstellung der Summe der Br^{81} , Br^{79} -Fragmente. f) Nach der CRD-Bromid-Eliminierung, Darstellung der Summe der S, HS, S_2 -Fragmente. g) Nach der CRD-Bromid -Eliminierung. Darstellung der Darstellung der Summe der Br^{81} , Br^{79} -Fragmente. C) Schematische Darstellung von CRD-Fumarat und CRD-Bromid-Immobilisierung durch UV-Licht mit Hilfe der NITEC-Reaktion (repräsentativ, Schritt 3 aus A).

5.2 Herstellung synthetischer Fasern aus Nematocystenproteinen

5.2.1 Mechanische Eigenschaften der Nematocystenproteine

Die Proteine CPP-1 und Cnidoin wurden als geeignete Kandidaten zur Herstellung synthetischer Fasern ausgewählt. Beide Proteine besitzen terminale CRDs zur Polymerisation und lassen sich in ausreichenden Mengen bakteriell herstellen (Balasubramanian et al., 2012). Zudem repräsentieren sie Proteine mit unterschiedlichen biomechanischen Eigenschaften. Cnidoin ist nachweislich ein Elastomer mit struktureller Verwandtschaft zu seidenartigen Proteinen (Beckmann et al., 2015), während CPP-1 aufgrund der zentralen Polyprolin-II-Helix als wesentliches Strukturmerkmal vermutlich kollagen-ähnliche Eigenschaften besitzt. Bakteriell exprimiertes Cnidoin und CPP-1 wurden unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff aufgereinigt. Selbst in Gegenwart von hohen Harnstoffkonzentrationen aggregieren beide Proteine spontan zu irregulären makroskopischen Fasern (Abb. 30).

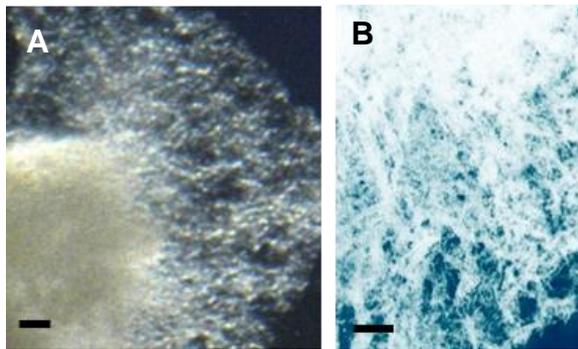


Abb. 30: Rekombinantes CPP-1 und Cnidoin aggregiert zu makroskopischen Fasern. A) Gereinigtes und bei Raumtemperatur auspolymerisiertes CPP-1. B) Gereinigtes und bei Raumtemperatur auspolymerisiertes Cnidoin (Größenmaßstab jeweils 100 μm).

Um die mechanischen Eigenschaften von beiden Proteinen zu ermitteln, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tanaka die Steifigkeit mit Hilfe eines Atomkraftmikroskops untersucht. Dafür wurden auspolymerisiertes Cnidoin und CPP-1 in PBS analysiert. Die Steifigkeit wird mit dem *Young's Modulus*, auch Elastizitätsmodul (*E-Modul*) genannt, charakterisiert. Das *E-Modul* ist ein Begriff aus der Werkstofftechnik und hat die Einheit Kraft pro Fläche ($\text{N}/\text{m}^2 = \text{Pascal}$) (Vinckier and Semenza, 1998). Es beschreibt das Verhältnis von Spannung und Dehnung im linearen Bereich bei der Verformung des gemessenen Körpers (Reed and Brown, 2001; Vinckier and Semenza, 1998; Wang et al., 2015). Je höher der Betrag, desto steifer ist die gemessene Probe.

Die AFM-Messungen wurden an verschiedenen Positionen innerhalb des Proteinpolymers durchgeführt. Die Bildung eines Mittelwertes würde auf Grund der Streuung der Werte die mechanischen Eigenschaften der Proteine nicht korrekt wiedergeben. Daher wurden die Daten mit einer logarithmischen Normalverteilung (LogNorm) gefittet (rote Linie). Die dabei gemessene Breite der Kurve bei halber Höhe des Maximums, also die Halbwertsbreite (FWHM,

Full Width at Half Maximum) zeigt eine Streuung der Werte an. Das Maximum der Funktion verdeutlicht ein E -Modul von 2,3 MPa für Cnidoin und ein E -Modul von 7,8 MPa für CPP-1. Die Daten zeigen, dass die E -Module für die beiden Proteinpolymere in der gleichen Größenordnung liegen, Cnidoin aber eine höhere Elastizität als CPP-1 besitzt (Abb. 31).

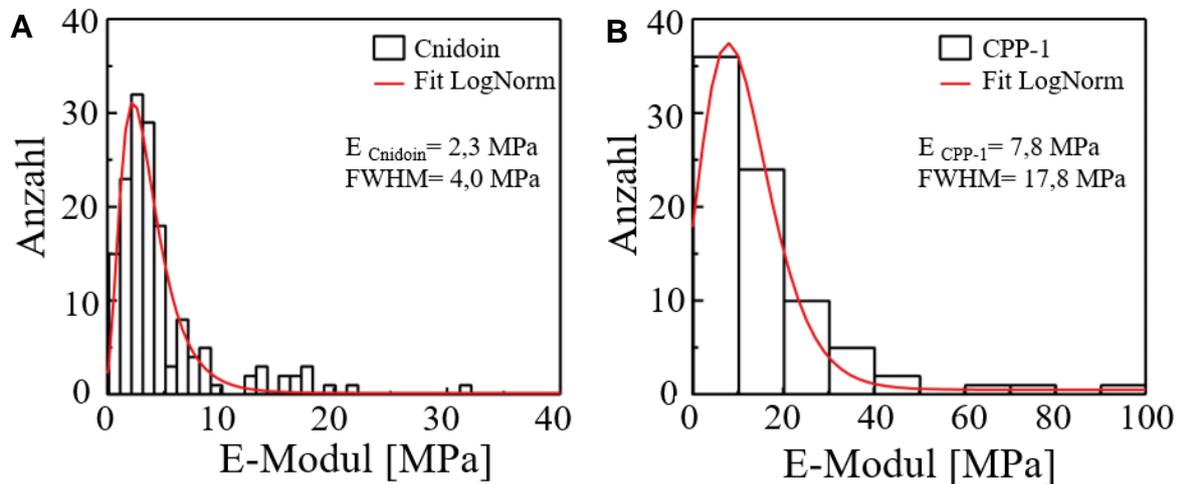


Abb. 31: Histogramme der E -Module von rekombinanten Protein-Polymeren von CPP-1 und Cnidoin in PBS. A) Histogramm der E -Module des bei Raumtemperatur auspolymerisierten Cnidoins (N=173). B) Histogramm der E -Module des bei Raumtemperatur auspolymerisierten CPP-1 (N=92). Es wurde mit einer logarithmischen Normalverteilung angepasst (rote Linie). Die jeweilige Breite der Kurven bei halber maximaler Höhe (Halbwertsbreite, FWHM) verdeutlicht die Streuung der Daten.

5.2.2 Elektrosponning: Vorversuche mit Polyethylenglycol (PEO)

Das Ziel dieses Ansatzes war es, kontinuierliche, definierte Fasern beider Nematocystenproteine herzustellen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Beschaffenheit von Fasern, die durch Elektrosponning erzeugt werden, von vielen Prozessparametern, wie zum Beispiel der Konzentration der Polymerlösung, Leitfähigkeit, Viskosität, der Spannung und der Luftfeuchtigkeit abhängig ist (Haghi and Akbari, 2007).

Um die optimalen Parameter für das Elektrosponning von kontinuierlichen Proteinfasern zu ermitteln, wurden Vorversuche mit PEO durchgeführt. Indem die Elektrosponningapparatur in eine Kammer gestellt wurde, die mit Stickstoff geflutet ist, konnte eine geringe und gleichmäßige Luftfeuchtigkeit gewährleistet werden. Die Versuche wurden mit PEO, welches eine molekulare Masse von (900 000 g/mol) hat, durchgeführt. Wie die Abbildung 32 zeigt, wurde das PEO sowohl in Wasser als auch in dem Elutionspuffer für das Cnidoin gelöst. Die Leitfähigkeit des Lösungsmittels ist ebenfalls ein wichtiger Parameter und hat einen Einfluss auf das Elektrosponning (Sun et al., 2016). Die Nettoladung der Polymerlösung kann dadurch beeinflusst werden. Durch eine höhere Leitfähigkeit der Lösung konnte ein Jet mit einer

vergleichsweise höheren Stabilität und ein geringerer Durchmesser der gesponnenen Fasern beobachtet werden (Haghi and Akbari, 2007; Shin et al., 2001). Um sicher zu gehen, dass die Proteinfasern mit denselben Parametern wie in den Vorversuchen hergestellt werden können, wurde das PEO zusätzlich im Elutionspuffer der Cnidoinaufbereitung gelöst. Dieser enthält zusätzlich Salze, welche zu einer abweichenden Leitfähigkeit im Vergleich zu reinem Wasser führen könnten.

Für die Ermittlung der benötigten Konzentration des PEO wurde ein Bereich zwischen 0-8 w/v% getestet. Je höher die Konzentration des PEO, desto höher ist auch die Viskosität der Polymerlösung. Die Proben mit einer Konzentration von 2 w/v% und darunter lieferten keine kontinuierlichen Fasern. Es waren mindestens 3-4 w/v% nötig, um kontinuierliche Fasern zu erhalten (Abb. 30). Die besten Resultate wurden mit einer Polymerlösung mit 4 w/v% PEO in Lösung erzielt. Diese Daten stimmen mit den publizierten Daten von Doshi und Reneker überein. (Doshi and Reneker, 1995). Die Autoren beschreiben eine Faserproduktion bei einem Viskositätsbereich von 800 bis 4000 mPa*s.

Auch die Spannung, die ein elektrisches Feld erzeugt, ist beim Elektrosponnen entscheidend für die Produktion von kontinuierlichen Fasern. Bei einer zu geringeren Spannung werden keine kontinuierlichen Fasern produziert, da die Polymerlösung ungesponnen aus der Kanüle tropft. Bei dem Prozess des Elektrosponnens muss die Oberflächenspannung überwunden werden, um die notwendige Ladung der Polymerlösung zu induzieren und so den Prozess des Elektrosponnens überhaupt in Gang zu setzen (Bhardwaj and Kundu, 2010; Luzio et al., 2014; Teo et al., 2011). Die richtige Flussgeschwindigkeit ist ebenso entscheidend. Es bestimmt die Geschwindigkeit der Bereitstellung des Materials bzw. der Polymerlösung. Zudem wird damit wird die Geschwindigkeit des Polymerjets bestimmt, was wiederum mit der zur Verfügung stehenden Zeit für die Verdampfung des Lösungsmittels zusammen hängt (Bhardwaj and Kundu, 2010). Nach der Optimierung dieser Prozessparameter wurden bei einer Spannung von 17 Volt und einer Flussrate von 20 µl/min die besten Ergebnisse erzielt. Da an Hand der Polymerlösung (4 w/v % PEO) in Elutionspuffer mit diesen Parametern kontinuierliche Fasern hergestellt werden konnten, wurde für die folgende Produktion der Proteinfasern die hier ermittelten Einstellungen verwendet. Die nachfolgend hergestellten Proteinfasern wurden bei 17 Volt und einer Flussrate von 20 µl/min hergestellt. Der Proteinlösung wurde zur Erhöhung der Viskosität zusätzlich PEO zu 4 w/v % zugegeben.

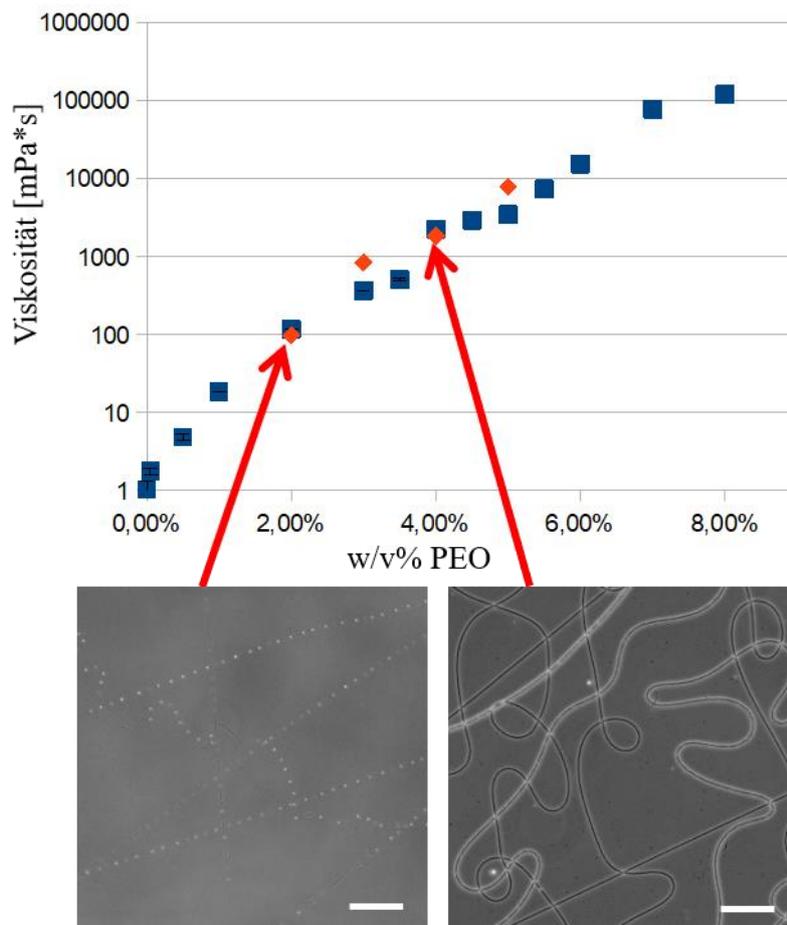


Abb. 32: Elektrosponning von reinen PEO-Fasern mit unterschiedlichen Konzentrationen an PEO. Die Graphik zeigt die Viskosität (Y-Achse) in Abhängigkeit der PEO-Konzentration (X-Achse). Das PEO wurde sowohl in Wasser (blau) als auch in dem Elutionspuffer der Cnidoinaufbereitung (rot) gelöst. Die mikroskopischen Aufnahmen (Hellfeldmikroskopie) zeigen die diskontinuierliche Faserproduktion mit 2 w% PEO (links) und kontinuierliche Fasern bei 4 w% PEO (rechts) (Größenmaßstab jeweils 50 μm).

5.2.3 Elektrosponning von CPP-1- und Cnidoin-Proteinfasern

Ziel war es, die Nematocystenproteine CPP-1 und Cnidoin mittels Elektrosponning zu Fasern zu spinnen. Beide Proteine verfügen über CRD-Motive, die als Linkerdomänen zwischen den einzelnen Molekülen dienen und so zur Polymerisierung beitragen können. Für die Herstellung der Cnidoinfasern wurde eine Lösung mit einer Proteinkonzentration von 40 mg/ml und für die der CPP-1- Fasern eine Konzentration von 47 mg/ml verwendet. Um ein Präzipitieren der Proteine vor dem Elektrosponning zu vermeiden, wurde dem Elutionspuffer Dithiothreitol (DTT) zu 0,25 M zugefügt (Details sind im Kapitel Methoden beschrieben). Unter diesen Bedingungen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit kontinuierliche Cnidoin- und CPP-1-Fasern produziert werden. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen eine ungeordnete Orientierung der Proteinfasern (Abb. 33). Das Cnidoin bzw. CPP-1 in den Fasern wurde anhand von Western Blot-Analysen detektiert. Auf Grund der Polymerbildung zeigen die Fasern

neben den monomeren Hauptbanden (40 kDa und 26 kDa) auch nicht vollständig reduzierte Oligomerfraktionen. Zum Vergleich wurde rekombinantes Protein vor der Faserbildung verwendet. Die Ergebnisse bestätigen, dass die jeweiligen Proteine Bestandteile der Fasern sind und in diesen über Disulfidbrücken vernetzt vorliegen.

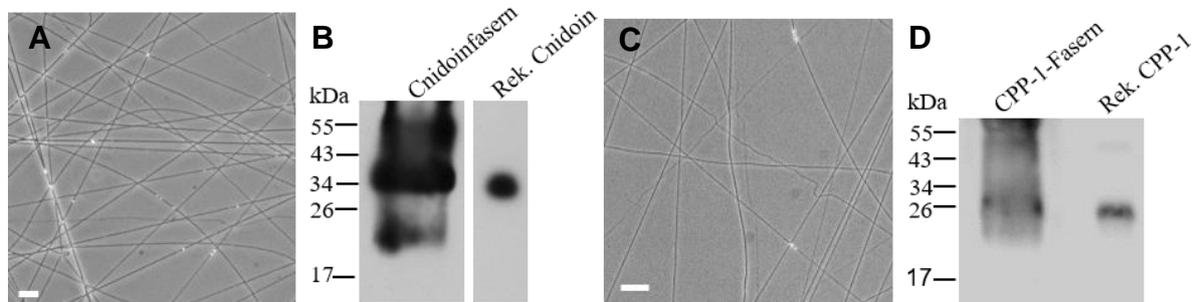


Abb. 33: Proteinfasern und deren Detektion durch Western Blot-Analysen. A) Cnidoinfasern mit PEO (Größenmaßstab 20 μm). B) Western Blot-Analyse von Cnidoinfasern mit PEO und rekombinant exprimiertem Cnidoin. C) CPP-1-Fasern mit PEO (Größenmaßstab 20 μm). D) Western Blot-Analyse von CPP-1-Fasern mit PEO und rekombinant exprimierten CPP-1.

Da für die nachfolgenden Zellexperimente keine Mischfasern aus PEO und Protein verwendet werden sollten, wurde das PEO entfernt. Dafür wurden die Fasern für 10 Minuten unter leichtem Schwenken mit Wasser gewaschen. Es ist bereits gezeigt worden, dass das PEO mit einem Molekulargewicht von 900 000 g/mol vollständig wasserlöslich ist (Doshi and Reneker, 1995; Jin et al., 2002; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2009). Auch die Salze der Pufferlösung und additive Substanzen wie DTT wurden so eliminiert. Abbildung 34 zeigt, dass nach dem Waschschrift kontinuierliche Fasern zurückbleiben. Die Cnidoinfasern sind weiterhin lichtmikroskopisch nachweisbar. Um zu bestätigen, dass nach dem Auswaschen des PEOs Proteinfasern erhalten bleiben, wurden erneut Western Blot Analysen durchgeführt (Abb. 34). Zur Kontrolle wurde rekombinantes CPP-1 bzw. Cnidoin, sowie reine PEO-Fasern auf das SDS-Gel aufgetragen. Das Ergebnis bestätigt auch hier die Anwesenheit beider Proteine in den gewaschenen Fasern und zeigt kein unspezifisches Signal für das PEO. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl CPP-1 wie auch Cnidoin durch Elektrospinning zu kontinuierlichen Proteinfasern verarbeitet werden können.

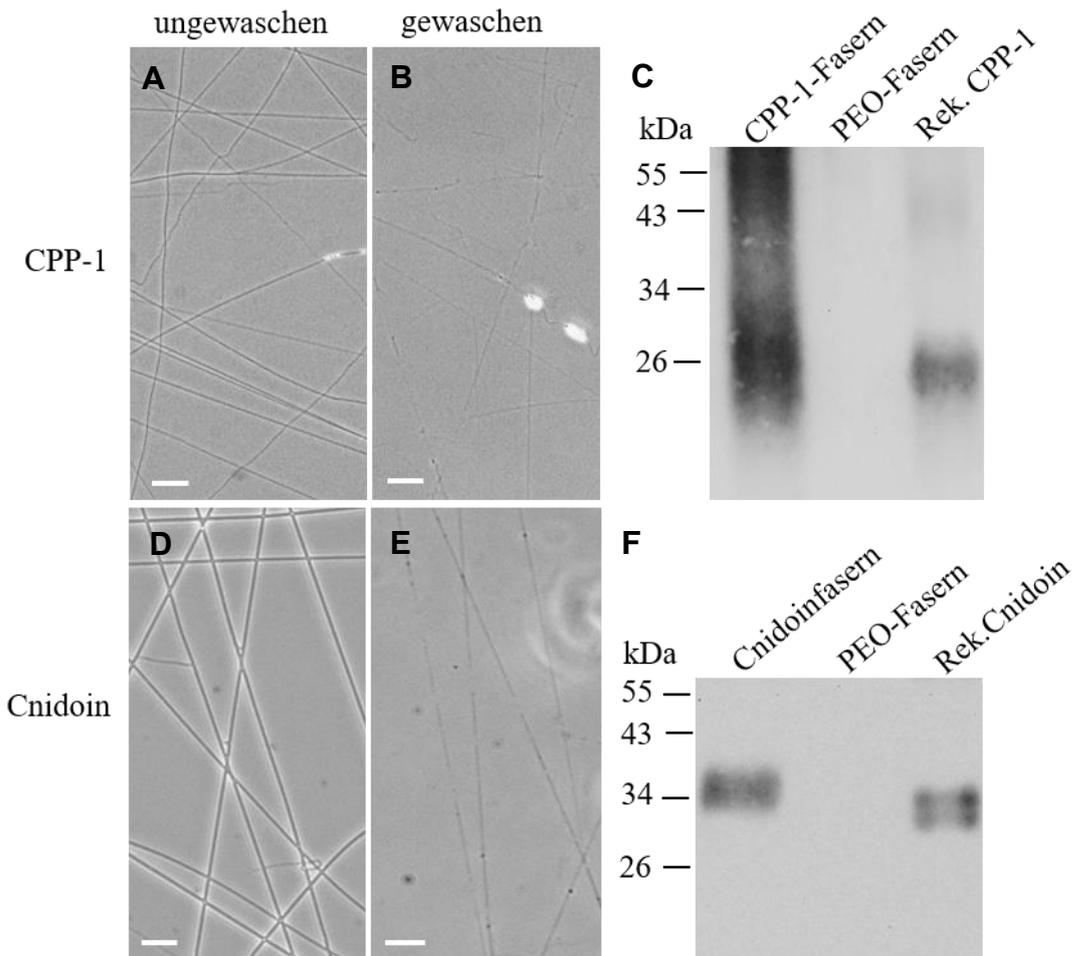


Abb. 34: Western Blot-Nachweis von CPP-1 und Cnidoin in PEO-freien Fasern. A) CPP-1-Fasern ungewaschen. B) Gewaschene CPP-1-Fasern. C) Western Blot von gewaschenen CPP-1-Fasern, PEO-Fasern und rekombinant exprimiertem CPP-1. D) Cnidoinfasern ungewaschen. E) Gewaschene Cnidoinfasern. F) Western Blot von gewaschenen Cnidoinfasern, PEO-Fasern und rekombinant exprimiertem Cnidoin (A-B und D-E Größenmaßstab jeweils 20 μm).

5.2.4 Die Faserbildung wird durch die Anwesenheit freier CRDs inhibiert

Wie oben beschrieben diente das Polymer der Nematocystenwand als Modell für die Herstellung von Biopolymeren. Um zu überprüfen, ob auch das Faserpolymer auf der disulfidabhängigen Vernetzung der CRDs beruht, wurde rekombinant hergestelltes Cnidoin in Anwesenheit eines CRD-Peptids gesponnen. Da die N-CRD lediglich eine einzelne intermolekulare Disulfidverknüpfung eingeht und somit nur lineare Polymere ausbilden kann (Tursch et al., 2016), wurde diese für das Experiment ausgewählt. Jedes Cnidoinmolekül besitzt drei CRDs, die mit dem zugegebenen N-CRD-Peptid interagieren können. Durch den „monovalenten“ Charakter der N-CRD kommt es hierbei zu einem Kettenabbruch bei der Polymerisation (Tursch et al., 2016). Die Fasern wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Tanaka gesponnen und mit dem AFM analysiert. Abbildung 35A zeigt, dass durch die Anwesenheit des CRD-Peptids eine Faserbildung ausbleibt. Statt kontinuierlicher Fasern sind

punktförmige Strukturen zu erkennen. Daraus ist zu schließen, dass die N-CRD mit den CRD-Sequenzen des Cnidoins interagiert und damit kompetitiv die Polymerisierung der Cnidoinmoleküle untereinander inhibiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Cnidoinprobe ohne den Zusatz des CRD-Peptids gesponnen. Aus diesem Ansatz konnten kontinuierliche Cnidoinfasern gesponnen werden (Abb. 35 B). Die Faserbildung beim Cnidoin ist demnach unter den gegebenen Bedingungen auf eine Polymerisierung über die CRD-Motive zurückzuführen.

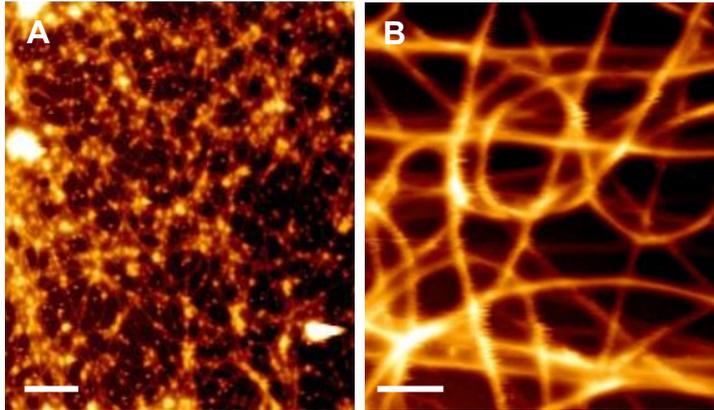


Abb. 35: AFM-Analysen von gesponnenem Cnidoin mit und ohne CRD-Peptid. A) Cnidoin und N-CRD-Peptid wurden im molaren Verhältnis 1:3 gemischt und mit PEO mittels Elektrosponning zu Fasern gesponnen (Größenmaßstab 5 μm). B) Gesponnene Cnidoinfasern mit PEO ohne zusätzliches CRD-Peptid (Größenmaßstab 5 μm).

5.2.5 Charakterisierung der Proteinfasern durch Kraftmikroskopie (AFM)

Die durch Elektrosponning produzierten Fasern von CPP-1 und Cnidoin wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tanaka mittels AFM analysiert. Hierbei wurde ein Bereich von 50 μm^2 gewählt, um daraus ein Höhen - und Breitenprofil der Fasern zu erstellen. Für die Ermittlung der mechanischen Eigenschaften wurden Fasern innerhalb einer Fläche von 9 μm^2 analysiert.

Es wurden trockene Cnidoinfasern mit PEO und nach dem Waschen mit H_2O , sowie Cnidoinfasern in PBS hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften charakterisiert (Abb. 36). Die Breite einzelner Cnidoinfasern unter den verschiedenen Bedingungen lag im Bereich von 400-500 nm. Die Höhe der Cnidoin/PEO-Fasern lag in einer Größenordnung von ca. 100 nm. Die gewaschenen Cnidoinfasern zeigten eine Höhe von bis zu 15 nm an Luft und 24 nm in PBS. An Hand der gemessenen *E*-Module wurden Histogramme angefertigt. Wie zuvor bei den bei Raumtemperatur auspolymerisierten Proteinen wurden die Daten mit einer logarithmischen Normalverteilung (LogNorm) angepasst. Aus dem Maximum der Funktion wurden daraufhin die *E*-Module ermittelt. Die Cnidoinfasern mit PEO wiesen ein *E*-Modul von 3,9 GPa auf, die gewaschenen Cnidoinfasern ein *E*-Modul von 5,7 GPa und die Cnidoinfasern, die in PBS gemessen wurden, ein *E*-Modul von 2,8 MPa.

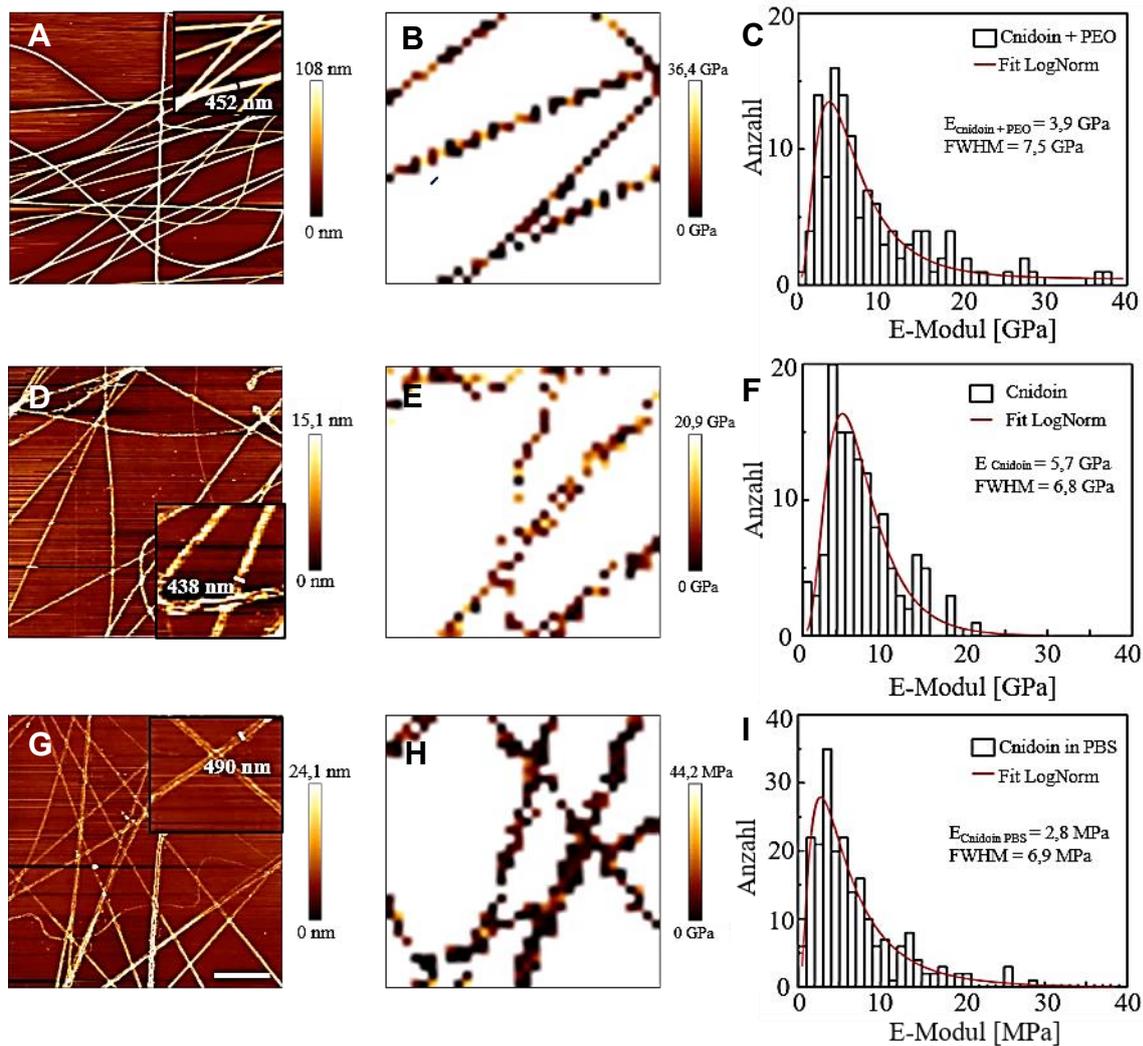


Abb. 36: AFM-Messungen der Cnidoinfasern. A-C) Cnidoinfasern mit PEO an Luft vermessen. D-F) Cnidoinfasern, die 10 Minuten mit Wasser gewaschen wurden. Die mechanischen Eigenschaften wurden an Luft gemessen. G-I) Cnidoinfasern, die in PBS charakterisiert wurden. A, D, G) Höhenprofile der Fasern (Größenmaßstab 10 μm). Die Nahaufnahme zeigt die Breite der jeweiligen Fasern an. B, E, H) Profil der E -Module der Proteinfasern. Je dunkler die Farbe der einzelnen Punkte desto geringer ist der Betrag des E -Moduls (siehe Skala) C, F, I) Histogramme der gemessenen E -Module der Fasern, die jeweils mit einer logarithmischen Normalverteilung (rote Linie) angepasst wurden. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der gemessenen Werte aufgetragen und auf der X-Achse die gemessenen E -Module. Die Halbwertsbreite (FWHM) zeigt die Streuung der Werte an.

CPP-1-Fasern wurden nach demselben Verfahren und unter ähnlichen Bedingungen charakterisiert (Abb. 37).

Die Breite der CPP-1-Fasern mit PEO und der gewaschenen CPP-1-Faser liegt in einer Größenordnung von rund 500 nm. Es konnte jedoch eine Zunahme der Breite bis zu ca. 700 nm bei den Fasern in PBS festgestellt werden. Die Höhe der CPP-1-Fasern mit PEO beträgt 220 nm, für die gewaschenen Fasern wurde eine Höhe von bis zu 87,3 nm ermittelt und die Fasern in PBS wiesen eine maximale Höhe von 92,6 nm auf. Der Abbildung 37 (B, E, H) sind zudem die E -Module der jeweiligen Fasern zu entnehmen. Die Auswertung ist an Hand von

Histogrammen veranschaulicht. Die Daten wurden wie bei den Cnidoinfasern mit einer logarithmischen Normalverteilung angepasst. Das E -Modul der CPP-1-Fasern mit PEO lag bei 4,1 GPa und das E -Modul der gewaschenen CPP-1-Fasern bei 6,6 GPa. Die gewaschenen CPP-1-Fasern in PBS wiesen ein E -Modul von 0,66 MPa auf.

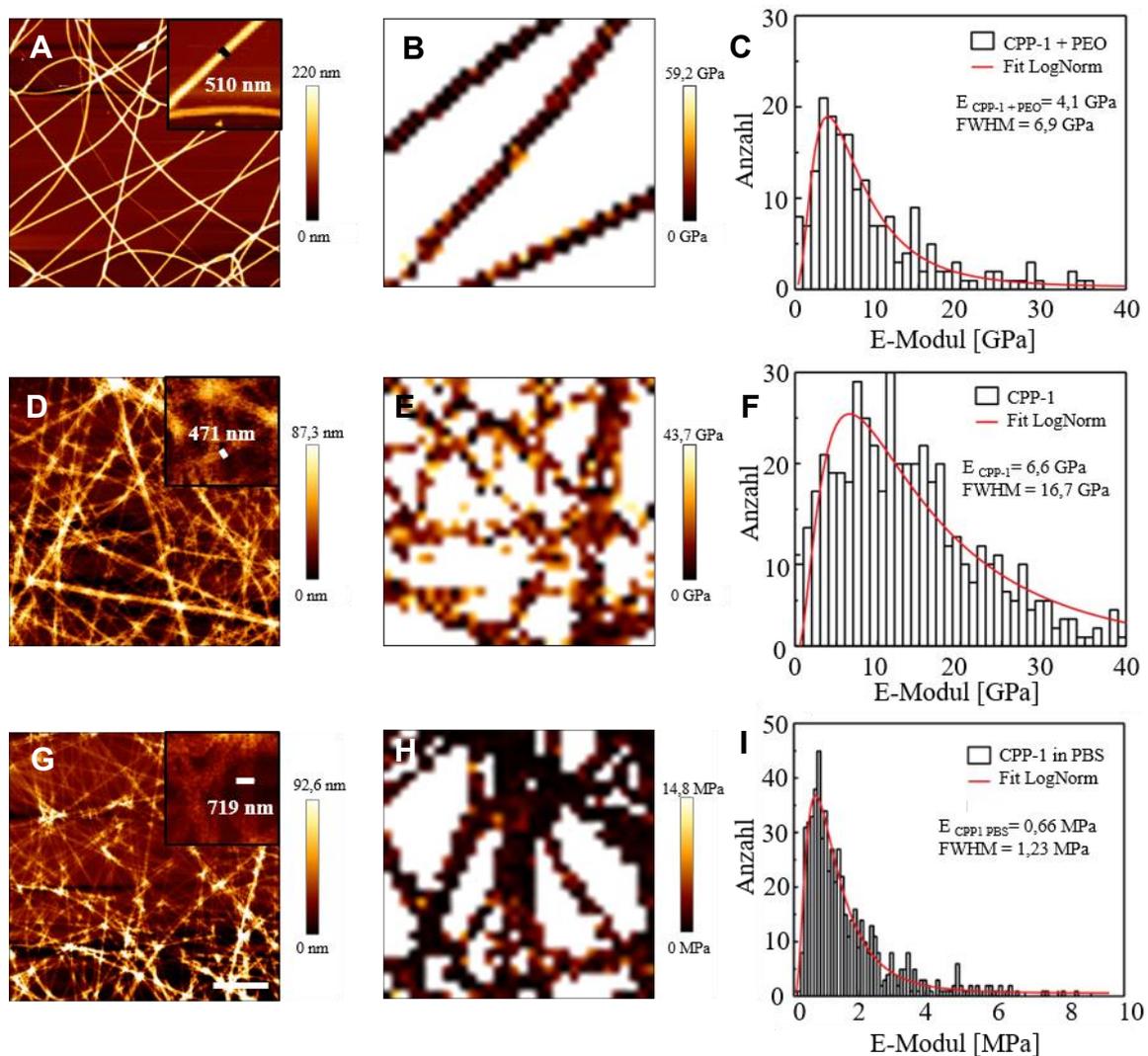


Abb. 37: AFM-Messungen zur Analyse der mechanischen Eigenschaften von CPP-1-Fasern. A-C) Messung von CPP-1-Fasern mit PEO an Luft. D-F) Messung von CPP-1-Fasern an Luft nach Waschen mit H₂O. G-I) Messung von CPP-1-Fasern in PBS. A, D, G) Höhenprofile von CPP-1-Fasern (Größenmaßstab 10 µm) B, E, H) Profil der E -Module von CPP-1-Fasern. Je dunkler die Farbe der einzelnen Punkte desto geringer ist der Betrag des E -Moduls (siehe Skala) C, F, I) Histogramme der gemessenen E -Module von CPP-1-Fasern, die jeweils mit einer logarithmischen Normalverteilung (rote Linie) angepasst wurden. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der gemessenen Werte aufgetragen und auf der X-Achse die gemessenen E -Module. Die Halbwertsbreite (FWHM) zeigt die Streuung der Werte an.

Diese Daten zeigen, dass Proteinfasern von beiden Nematocystenproteinen erfolgreich mittels Elektrosponning hergestellt werden können. Die ermittelten Durchmesser befanden sich im Nanometerbereich. Es handelt sich somit um gesponnene Nanofasern. Zudem zeigte sich, dass beide Proteinfasern nach dem Auswaschen von PEO eine geringere Höhe und Elastizität

aufwiesen. Dies impliziert, dass PEO nicht nur die Faserdicke, sondern auch die mechanischen Eigenschaften der Fasern beeinflusst. Tendenziell ist im trockenen Zustand eine höhere Elastizität bei den Cnidoinfasern im Gegensatz zu den CPP-1-Fasern erkennbar. Das *E*-Modul der Cnidoinfasern weist einen Betrag von 5,7 GPa auf und die CPP-1-Fasern einen Betrag von 6,6 GPa. In beiden Fällen ist die Elastizität bei den in PBS gemessenen Fasern am höchsten, was auf eine Reduktion der Dichte hinweist. Das dabei ermittelte *E*-Modul des Cnidoin ist vergleichbar mit dem des auspolymerisierten, nicht gesponnenen Cnidoin in PBS. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die *E*-Module von CPP-1-Fasern in PBS und dem polymeren, nicht gesponnenen CPP-1 in PBS erheblich. Das *E*-Modul für CPP-1-Fasern in PBS deutet hierbei interessanterweise auf eine höhere Elastizität als bei vergleichbaren Cnidoinfasern. Die ermittelten Werte sind zusammenfassend in der Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Überblick zu Elastizitätsmodulen und Dimensionen der Proteinfasern mit PEO oder nach Waschen mit H₂O in Luft und in PBS.

Protein	Fasern mit PEO			Gewaschene Fasern			Fasern in PBS		
	<i>E</i> -Modul	Höhe	Breite	<i>E</i> -Modul	Höhe	Breite	<i>E</i> -Modul	Höhe	Breite
Cnidoin	3,9 GPa	108	452	5,7 GPa	15,1	438	2,8 MPa	24,1	490
CPP-1	4,1 GPa	220	510	6,6 GPa	87,3	471	0,66 MPa	92,6	719

5.3 Verwendung von synthetischen Fasern aus Nematocystenproteinen als Substrat für Stammzellen

Die innerhalb dieser Arbeit hergestellten Proteinfasern sollten als Substrat für Stammzellen zum Einsatz kommen und als mögliche Alternative zu kommerziellen Substrate wie MatrigelTM dienen. Matrigel ist eine basalmembranartige Matrix, die für die 3D-Kultur beim Gewebedesign verwendet wird (Hughes et al., 2010). Inzwischen ist dessen klinischer Einsatz jedoch kritisch zu betrachten, da bereits bekannt ist, dass Matrigel das Tumorwachstum *in vivo* fördert (Bonfil et al., 1994; Fridman et al., 1991). Um einen sicheren Einsatz *in vivo* zu gewährleisten, besteht somit die Notwendigkeit, neue Zellsubstrate zu entwickeln. Ob die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Nanofasern hierfür verwendet werden können, sollte im Folgenden ermittelt werden. Der wichtigste Parameter dabei war zunächst die Toxizität. Das Experiment wurde in Kooperation mit Mitarbeitern von Prof. Tanaka durchgeführt.

Dafür wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC, *human mesenchymal stem cells*) auf gewaschenen Cnidoin- oder CPP-1-Fasern ausgesät. Die Abbildung 38 zeigt die hMSCs

nach 10 Tagen Kultivierung jeweils auf Cnidoin- oder CPP-1-Fasern. Die Stammzellen auf den Proteinfasern weisen keine Unterschiede bezüglich ihrer Morphologie auf. Die hMSCs konnten auf den Proteinfasern über mehrere Tage kultiviert werden können. Es zeigten sich hierbei keine abgerundeten oder abgestorbenen Zellen, womit eine toxische Wirkung der verwendeten Proteine auf die hMSCs ausgeschlossen werden konnte.

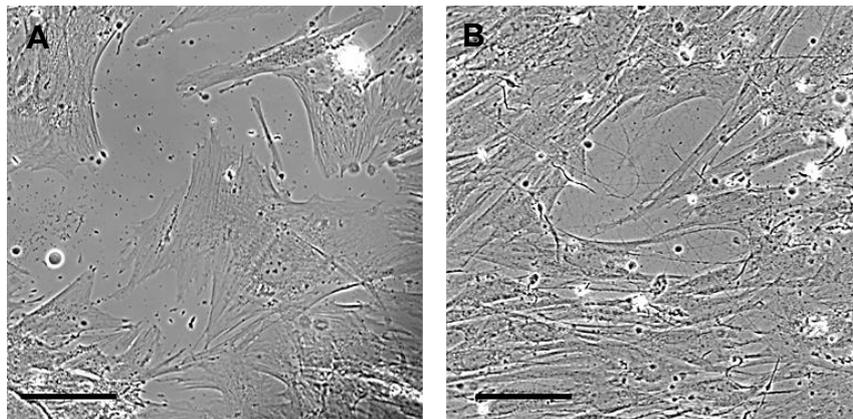


Abb. 38: Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf CPP-1- oder Cnidoinfasern. 1000 Zellen /cm² wurden auf den gewaschenen Nanofasern ausplattiert. Die Abbildung zeigt die Stammzellen 10 Tage nach dem Aussäen. A) Stammzellen auf Cnidoinfasern (Größenmaßstab 100 µm). B) Stammzellen auf CPP-1-Fasern (Größenmaßstab 100 µm).

6 Diskussion

6.1 Prolinreiche Proteine sind ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix

Prolinreiche Proteine sind in der Natur weit verbreitet (Brodsky and Shah, 1995; Ozbek, 2011; Pereira et al., 2011; Ricard-Blum, 2011). Ein Vertreter dieser Proteingruppe sind die Kollagene. Sie sind Teil der extrazellulären Matrix und tragen durch ihre charakteristische tripelhelikale Domäne zur Stabilität des Bindegewebes bei (Hanifi et al., 2013; Ricard-Blum, 2011). Auch die Minikollagene der Cnidarier erfüllen stabilisierende Funktionen. Sie zeichnen sich, wie die Kollagene, durch den Besitz einer Tripelhelix aus (Engel et al., 2001). Die Kollagendomäne der Minikollagene ist allerdings weitaus kürzer als die fibrillärer Kollagene, weshalb sie als „Minikollagene“ bezeichnet werden (Kurz et al., 1991). Die Kollagensequenz der Minikollagene besteht aus 14-16 Gly-X-Y-Triplets (Kurz et al., 1991), während in der Tripelhelix von humanem Kollagen Typ I etwa 338 Gly-X-Y-Triplets vorhanden sind (Brodsky and Ramshaw, 1997; Dolz and Heidemann, 1986). Wie bei fibrillären Kollagenen des interstitiellen Bindegewebes wird auch bei den Minikollagenen die tripelhelikale Struktur durch die Hydroxylierung der Proline stabilisiert. Diese PTM erhöht den Schmelzpunkt der Tripelhelix über die physiologische Temperatur von Säugetieren, was durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erzielt wird (Leikina et al., 2002)

Eine prolinreiche Proteinfamilie bei Pflanzen sind die HRGPs, die in der Pflanzenzellwand lokalisiert sind. Sie sind in Prozesse der Zellwandentwicklung und in Gerüststrukturen involviert. Auch ihre α -helikale Struktur wird durch Hydroxylierung und Glykosylierungen stabilisiert (Cannon et al., 2008; Velasquez et al., 2011a), sie bilden allerdings im Unterschied zu Kollagenen keine Tripelhelix aus.

Im Verlauf von Proteomstudien an Nematocysten in *Hydra* wurde eine neuartige prolinreiche Proteinfamilie entdeckt, die CPPs (Balasubramanian et al., 2012). Allen CPPs sind durch den Besitz von ausgedehnten Polyprolinsequenzen, die häufig mit CRDs kombiniert sind, charakterisiert (Abb. 39). Alle Vertreter der CPPs, mit Ausnahme des CPP-6, besitzen ein Signalpeptid zur Sekretion (Balasubramanian et al., 2012). Auch die HRGPs besitzen Signalpeptide und polyprolinreiche Sequenzen. Jedoch weisen die HRGPs keine

Polyprolinsequenzen in der Größenordnung wie bei den CPPs auf. HRGPs weisen prolinreiche Abschnitte auf, in denen sich kleinere „Polyprolininseln“ (maximal 6 Proline) finden (Showalter et al., 2010).

Das CPP-1 nimmt eine Sonderrolle in der Proteinfamilie ein, da es eine minikollagenähnliche Domänenorganisation besitzt, in der die zentrale Kollagensequenz durch eine durchgehende Polyprolinsequenz ersetzt ist. Die Kollagensequenzen von Minikollagenen sind häufig von kurzen Polyprolinabschnitten flankiert, die vermutlich zu einer besseren Löslichkeit beitragen (Adamczyk et al., 2008; Engel et al., 2001). Die Ausbildung einer Tripelhelix ist bei CPP-1 nicht zu erwarten, der monomere Charakter unter den Bedingungen der SDS-PAGE konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 16). Für Minikollagene wurde bereits gezeigt, dass die Tripelhelix im SDS-Gel bei Raumtemperatur stabil bleibt (Ozbek et al., 2002b). Das CPP-1 wurde in der Nematocystenwand detektiert und bildet dort, zusammen mit den Minikollagenen und Cnidoin eine EZM-ähnliche Matrix aus (Abb. 14 und 15). Die prolinreiche Sequenz des CPP-1 ist von CRDs flankiert (Balasubramanian et al., 2012). Es liegt daher nahe, dass es wie die Minikollagene und die HRGPs strukturelle Funktionen erfüllt.

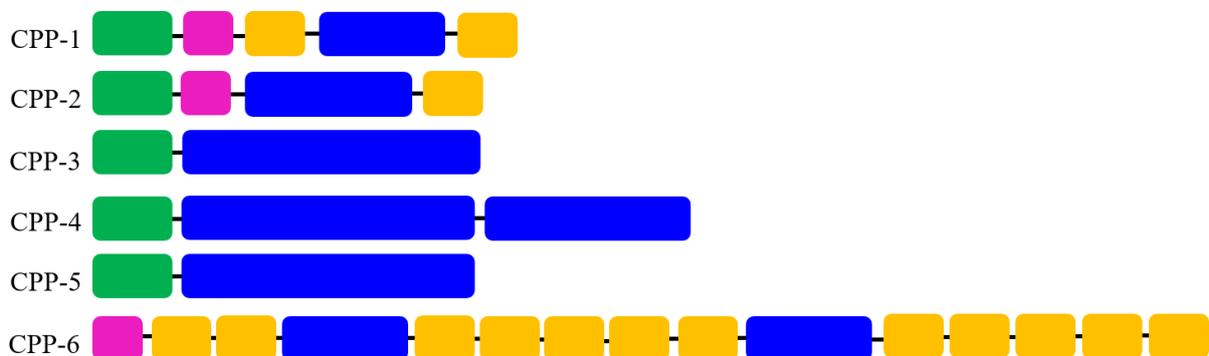


Abb. 39: Domänenschema der CPP-Familie (adaptiert von Balasubramanian et al., 2012). Die Signalpeptide sind in grün dargestellt, die Propeptide in violett, die Polyprolinsequenz in blau und die cystein-reichen Domänen ist gelb markiert.

6.2 CPP-1 ist ein Strukturprotein der Nematocyste

Die Proteomstudien zeigten bereits, dass es sich bei dem CPP-1 um ein Nematocystenprotein handelt (Balasubramanian et al., 2012). Die ISH, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, unterstützt diese Hypothese. Die Detektion der mRNA des *CPP-1* zeigt Zellcluster im Rumpfbereich, die charakteristisch für Kapselproteine sind. Auch die ISHs von *Cnidoin*, *NCol-1* und *NCol-15* zeigen dieses Expressionsmuster (Adamczyk et al., 2008; Beckmann et al., 2015). An Hand der immunohistochemischen Analysen wird dies zusätzlich bestätigt. Das

CPP-1 ließ sich in der Wandstruktur aller Nematocystentypen nachweisen. Es wurde sowohl in sich entwickelnden Nematocyten der Körpersäule, als auch in den reifen Nematocysten der Tentakel detektiert.

Diese Daten weisen auf eine weitere Parallele zu den HRGPs hin, da die HRGPs ebenfalls Strukturkomponenten der Pflanzenzellwand sind (J van Holst and E. Varner, 1984; Pereira et al., 2011). Generell liegt der Funktion und den Eigenschaften von Proteinen zu einem erheblichen Teil deren PTMs zugrunde (Beltrao et al., 2013; Bürkle, 2001; Cabral et al., 2014; Kieliszewski and Lamport, 1994; Pitzschke et al., 2016). Die PTMs beeinflussen die chemischen Eigenschaften, die Interaktion mit anderen Zellwandkomponenten und haben einen Einfluss auf die Konformation und supramolekulare Assemblierung wie bei der Tripelhelix der Kollagene (Fidler et al., 2018; Montgomery et al., 2018; Stafstrom and Staehelin, 1986). Da bereits bei NCol-1 Hydroxylierungen sowie Glykosylierungen nachgewiesen wurden, waren diese posttranslationalen Modifikationen auf bei dem CPP-1 wahrscheinlich (Cannon, 2010; Engel et al., 2001).

Aus den hier gezeigten Western Blot-Analysen geht hervor, dass das CPP-1 der Nematocysten durch Glykosylierung modifiziert ist. Dabei konnten sowohl N- als auch O-glykosidische Modifizierungen detektiert werden (Abb. 20). Die N- und O-gebundenen Zucker des CPP-1 in *Hydra* wurden enzymatisch mit der PNGaseF und chemisch mit dem TFMS-Assay untersucht. Nach der Deglykosylierung verbleibt eine Differenz der apparenten molekularen Masse der CPP-1-Bande aus Hydralysat und der des bakteriell exprimierten Proteins von etwa 9 kDa. Möglicherweise könnte durch eine zusätzliche Behandlung der Nematocysten mit DTT, also DTT-solubilisierte Nematocysten, eine höhere Effektivität der Deglykosylierung mit Hilfe der PNGaseF erzielt werden. Zudem werden, wie im Ergebnisteil aufgeführt, durch das TFMS nicht alle Glykosylierungen erfasst. Die Bindung zwischen dem innersten N-Acetylglucosamin und dem Asparagin wird nicht gespalten (Edge, 2003). Es ist somit davon auszugehen, dass nicht alle Glykosylierungen des CPP-1 durch die Behandlung mit der Glykosidase PNGaseF und dem TFMS-Assay entfernt wurden. Die Differenz der molekularen Masse von deglykosylierten CPP-1 der isolierten Nematocysten und des bakteriellen CPP-1 könnte auf weitere Glykosylierungen hinweisen.

Posttranslationale Modifikationen können die Eigenschaft von Proteinen erheblich beeinflussen. Die Hydroxylierungen und O-Glykosylierungen stabilisieren die helikale Form

der Extensine (Cannon et al., 2008; Velasquez et al., 2011a). Es liegt nahe, dass auch die Glykosylierung des CPP-1 dessen Sekundärstruktur stabilisiert.

In den nicht denaturierten Kopflysaten von *Hydra* wurde zusätzlich nicht modifiziertes CPP-1 detektiert. Möglicherweise ist dies auf Grund der geringeren Löslichkeit durch fehlende PTMs in den denaturierten Proben nicht sichtbar und gibt wiederum ein Indiz dafür, dass die Eigenschaften des CPP-1 durch die PTMs bestimmt wird. Die Western Blot-Analysen deuten darauf hin, dass nicht glykosylierte und glykosylierte Proteine auch in reifen Kapseln vorhanden sind (Abb. 16).

Bei den Kollagen sind besonders die Wasserstoffbrücken, die von Hydroxyprolinen ausgebildet werden, für die Stabilität der Tripelhelix verantwortlich (Brodsky and Ramshaw, 1997; Leikina et al., 2002). Da CPP-1 mit großer Wahrscheinlichkeit keine Tripelhelix ausbildet, würde eine Hydroxylierung hier vermutlich der weiteren Modifikation mit Zuckermolekülen dienen. Wie oben erwähnt, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass das CPP-1 auch durch Hydroxylierungen modifiziert vorliegt. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung von Hydren mit 2,2-Dipyridyl, dem Inhibitor der Prolylhydroxylase, konnte jedoch keine Reduktion der molekularen Masse, die auf Hydroxylierung deuten könnte, erzielt werden. Frühere Studien zeigten eine reduzierte Regeneration von *Hydra vulgaris* durch 2,2-Dipyridyl-Behandlung, vermutlich als Konsequenz der Destabilisierung fibrillärer Kollagene in der neu gebildeten Mesogloa (Sarras et al., 1991). Eine Nematocysten-spezifische Hydroxylase innerhalb der Nematocystenvesickel könnte allerdings schlechter zugänglich sein. Eine Alternative für weitere Experimente wäre der Polylylhydroxylaseinhibitor Ethyl-3,4-Dihydroxybenzoate (Kim et al., 2015; Nimker et al., 2016). Dieser Inhibitor bildet einen Eisen-Chelatkomplex aus und fungiert so als kompetitiver Inhibitor der Fe-abhängigen Prolylhydroxylase (Wang et al., 2002).

Um die biomechanischen Eigenschaften von CPP-1 näher zu untersuchen, wurden AFM-Messungen durchgeführt, wobei die Elastizität im Vergleich zu Cnidoin analysiert wurde. Hierbei wurden zunächst Polymere von Cnidoin, welches ebenfalls in der Kapselwand lokalisiert ist, und von CPP-1 vermessen. Im Vergleich zu dem Cnidoinpolymer mit einem Elastizitätsmodul von 2,3 MPa wies das CPP-1 eine höhere Steifigkeit auf (7,8 MPa). Dies unterstützt die Hypothese, dass das CPP-1 zu den rigideren und strukturgebenden Elementen in der Nematocystenwand zählt.

6.3 Das CPP-1: Ein integraler Bestandteil der Nematocyste

Wie oben dargelegt, ist das CPP-1 eine strukturelle Komponente der Nesselkapsel, die zur Stabilisierung der Wandstruktur beiträgt. Die HRGPs haben jedoch zusätzliche Funktionen, die ebenfalls für das CPP-1 in Frage kommen könnten. Sie werden im frühen Stadium der Zellwand gebildet und sind in Entwicklungsprozesse der Pflanzenzellwand involviert (Cannon et al., 2008; Pereira et al., 2011; Stafstrom and Staehelin, 1986; Velasquez et al., 2011a). Dabei ist die korrekte O-Glykosylierung der Extensine für die Assemblierung der Zellwand essentiell (Velasquez et al., 2015; Velasquez et al., 2011b). Eine abnormale Konformation ist die Folge der Reduktion an Glykosylierungen. Es wurde postuliert, dass dies bei der Interaktion mit anderen Zellwandkomponenten eine Rolle spielt (Velasquez et al., 2011b). Die O-gebundenen Zucker des CPP-1 könnte ebenfalls für die korrekte Assemblierung der Nematocystenproteine entscheidend sein.

Sollte auch das CPP-1 bei der Entwicklung der Nematocyste eine wichtige Rolle spielen, ist eine Expression im Verlauf der Nematocystenmorphogenese unabdingbar. Dies wurde durch die Detektion des CPP-1 in den Nestern sich entwickelnder Nematocyten bestätigt, da diese erst in Spätstadien als Einzelzellen vorliegen, während sie zu den Tentakeln wandern.

Zudem haben Studien gezeigt, dass die Ladung der HRGPs bei der Assemblierung der Pflanzenzellwand von Bedeutung sind. Eine Interaktion der positiv geladenen Extensine mit der Säure des Pektins wurde bereits beschrieben und eine kovalente Bindung von Extensinen und Pektin innerhalb der Zellwandmatrix nachgewiesen (Qi et al., 1995). Dieses Koazervat könnte als Vorlage in der naszierenden Zellwand für deren weitere Ausbildung dienen (Cannon et al., 2008; Kieliszewski Marcia et al., 2010). *In vitro* wurde diese Hypothese bereits bestätigt. Dabei wurde eine mehrschichtige Struktur auf der Basis von Extensin und Pektin geschaffen und so die Zellwand imitiert (Valentin et al., 2010). Besonders die positiv geladenen Lysin- und Histidinreste der Extensine sind potenzielle Kandidaten um mit der negativ geladenen Uronsäure des Pektins interagieren zu können (Showalter, 1993). Auch bei Nematocystenproteinen wurden Sequenzabschnitte, die eine Ladung tragen, identifiziert. Besonders auffallend sind die basischen C-Termini vieler Minikollagene (z.B. PAKRK bei NCol-1) (Kurz et al., 1991). Möglicherweise könnte dies ein zusätzlicher Mechanismus bei der Assemblierung von Proteinen in der Nematocystenwand sein. Es liegt nahe, dass dies auch für einige CPPs zutrifft. CPP-3, CPP-4 und CPP-5 besitzen keine CRD-Motive zur Interaktion mit weiteren Komponenten der Kapselwand (Balasubramanian et al., 2012). Auf Grund der

prolinreichen Sequenz sind Modifikationen wie Glykosylierung zu vermuten. Bei dem CPP-1 wurde der Nachweis dieser Modifikation bereits erbracht. Mit den sauren Zuckereinheiten könnten CPPs generell mit basischen Komponenten, wie den C-terminalen Enden der Minikollagene interagieren.

Um zu erörtern, ob das CPP-1 wie die HRGPs in der Pflanzenzellwand bei der Assemblierung von Nematocystenproteinen eine Rolle spielt, wurden siRNA-Experimente durchgeführt. Der Knockdown der *CPP-1*-Genaktivität gibt Hinweise auf die Funktion des Proteins in *Hydra*. Bei Hydren, die mit siCPP-1 behandelt wurden, war zum Teil ein fragmentiertes Muster der in Kontrolltieren durchgängigen Cnidoinstruktur in den Nematocysten zu beobachten. Es ist daher anzunehmen, dass dieser Effekt auf der deutlichen Reduktion des CPP-1-Proteins beruht, welcher in den CPP-1-gefärbten Tieren nach siRNA-Behandlung nachweisbar war. Diese Daten deuten darauf hin, dass das CPP-1 eine Rolle im geordneten Aufbau der Nematocystenstruktur besitzt und hierbei ein Bindungspartner des Cnidoins sein könnte, das ebenfalls einen basischen C-terminus hat (GKKR).

Beide Proteine sind in der Nematocystenwand lokalisiert und besitzen CRDs, die für die Kreuzvernetzung wichtig sind (Balasubramanian et al., 2012; Tursch et al., 2016). Die Western Blot-Analysen für CPP-1 und Cnidoin in Hydralysaten zeigten, dass in reifen Nesselkapseln ausschließlich unter reduzierenden Bedingungen monomere Proteine nachweisbar sind und über SDS-PAGE aufgetrennt werden können. Dies zeigt, dass die kovalente Vernetzung der analysierten Kapselproteine auf ihren cysteinreichen Domänen beruht. Cnidoin war als Monomer zusätzlich in den sich entwickelnden Nematocysten der Körpersäule unter nicht reduzierenden Bedingungen zu detektieren. Auch bei NCol-1 konnte dies beobachtet werden und wurde dahingehend interpretiert, dass es sich hierbei um lösliche Vorläufer handelt (Engel et al., 2001)

Die Daten von Beckmann et al. weisen auf eine direkte, disulfidabhängige Interaktion von Cnidoin und NCol-1 hin (Beckmann et al., 2015). Da CPP-1 eine minikollagenähnliche Domänenorganisation besitzt, könnte dies auch für eine Interaktion von Cnidoin und CPP-1 sprechen. Zudem konnte innerhalb dieser Arbeit synthetische Proteinfasern bestehend aus CPP-1 und Cnidoin hergestellt werden (nicht gezeigte Daten), was die Hypothese eines Ko-Polymers aus CPP-1 und Cnidoin in der Nematocystenwand unterstützt.

Um eine definitive Aussage treffen zu können, ob der Verlust des CPP-1 eine Misassemblierung der Kapselwand oder der Schlauchstruktur bewirkt, sind weitere Färbungen nötig. Das Cnidoin ist sowohl in der Wandstruktur der Nematocyste als auch im Schlauch lokalisiert (Beckmann

et al., 2015). Für weitere Analysen würden Färbungen von Proteinen in Frage kommen, die ausschließlich in der Kapselwand vorhanden sind. Ein Beispiel hierfür wäre NCol-1 (Ozbek et al., 2002b). Da in den siRNA-behandelten Tieren überwiegend intakte Kapseln, sowohl reife als auch Entwicklungsstadien, detektierbar waren, ist davon auszugehen, dass der Verlust des CPP-1 vermutlich durch andere Mitglieder der CPP-Familie weitgehend kompensiert werden kann.

6.4 Komplementäre mechanischen Eigenschaften der Nematocystenproteine

Die Nematocystenproteine CPP-1 und Cnidoin weisen unterschiedliche Sequenzmerkmale auf, die Einfluss auf ihre mechanischen Eigenschaften haben. Um die biomechanischen Eigenschaften vor allem des bisher nicht charakterisierten CPP-1 näher zu untersuchen, wurden AFM-Messungen durchgeführt, wobei die Elastizität im Vergleich zu Cnidoin analysiert wurde. Hierbei wurden zunächst Polymere von Cnidoin und CPP-1 in PBS vermessen.

Für einzelne Cnidoinmoleküle wurde bereits in einer früheren Studie ein *worm-like chain* (WLC)-Verhalten nachgewiesen, das im relaxierten Zustand auf eine ungeordnete, daher elastische Eigenschaft der zentralen, repetitiven Sequenz deutet (Beckmann et al., 2015). Innerhalb dieser Arbeit wurden Polymere von Cnidoin in PBS charakterisiert. An Hand der AFM-Messungen wurde mit einer logarithmischen Normalverteilung für das Cnidoin ein *E*-Modul von 2,3 MPa ermittelt. Dieses Elastizitätsmodul ist vergleichbar mit dem von anderen Protein-Elastomeren, wie etwa dem Resilin der Insektenflügel. Es fungiert hier als elastische Feder (Mamat et al., 2018) und ermöglicht eine Deformation ohne Energieverlust (van Eldijk et al., 2012). Das Resilin hat ein *E*-Modul von 2 MPa (Gosline et al., 1999; Weis-Fogh, 1961). Das Elastin bei Vertebraten zählt ebenso zu den elastischen Proteinen und weist in wässriger Lösung ein *E*-Modul von 0,81 MPa bis 1,1 MPa auf (Gosline et al., 2002; M. et al., 2003; Muiznieks and Keeley, 2013). Es ist Bestandteil der EZM (Yeo et al., 2015) und ist bei der Entwicklung von neuen Biomaterialien für den Gewebedesign von großer Bedeutung (Daamen et al., 2007). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten für das *E*-Modul ordnen Cnidoin in diese Gruppe von bekannten Protein-Elastomeren ein und weisen somit auf einen möglichen evolutiven Ursprung elastischer Proteine bei Cnidariern hin.

Das Polymer von CPP-1 hat ein höheres *E*-Modul (7,8 MPa). Dies könnte auf Grund der prolinreichen Sequenz durch eine starre, kollagen-ähnliche Polyprolin-II-Helix-Struktur

begründet sein (Mansiaux et al., 2011; Morgan and Rubenstein, 2013). Für aggregierte fibrilläre Kollagene wurden allerdings weitaus höhere Elastizitätsmodule ermittelt. Diesbezüglich sind in der Literatur Elastizitätsmodule für komprimiertes Kollagen von ca. 40 MPa zu finden (Ajallouei et al., 2018). Die erhöhte Steifigkeit der Kollagene liegt vermutlich an deren trippelhelikaler Quartärstruktur, die bei dem CPP-1 nicht ausgebildet ist. CPP-1 nimmt an Hand seinen biomechanischen Eigenschaften daher eine Mittelstellung zwischen dem starren Kollagengerüst und der elastischen Cnidoinmatrix ein. Es könnte daher, ähnlich wie die HRGPs, eine Gerüst-Funktion (Cannon et al., 2008) für den Aufbau der Kapselwand haben und keine tragende strukturelle Rolle wie die Minikollagene (Adamczyk et al., 2008; Engel et al., 2002) (Abb. 40).

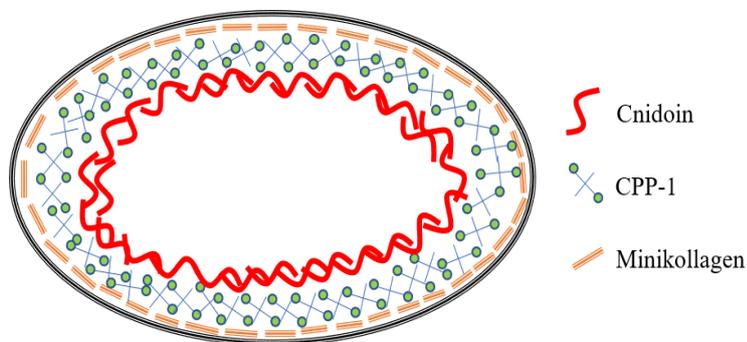


Abb. 40: Modell der Assemblierung der Proteine in der Nematocystenwand. In der Nematocystenwand sind die Minikollagene in der äußeren und das Cnidoin in der inneren Wandstruktur angereichert. Das durch die PTMs negativ geladene CPP-1 dient hierbei Gerüstprotein, das die Assemblierung der anderen Wandstrukturkomponenten über die Interaktion mit deren basischen C-Termini reguliert

6.5 Nematocystenproteine in der Anwendung:

Definierte Proteinfasern durch Elektrospinning

Auf der Basis der unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften von CPP-1 und Cnidoin können aus diesen Biomaterialien mit abweichenden Elastizitäten hergestellt werden. Es wurde bereits beschrieben, dass Zellen auf die mechanischen Eigenschaften der EZM reagieren (Mohammadi et al., 2015). Die durch Elektrospinning hergestellten Proteinfasern sollten als Zellsubstrat mit definierten mechanischen Eigenschaften erprobt werden. Deshalb war besonders die Charakterisierung der Nanofasern in PBS bedeutend, jedoch wurden in dieser Arbeit zusätzlich die Eigenschaften der Proteinfasern im trockenen Zustand und mit der Trägersubstanz PEO analysiert.

Die Elastizität der Cnidoinfasern in PBS ($E= 2,8$ MPa) war nahezu identisch mit dem des aggregierten Cnidoinpolymers ($E= 2,3$ MPa). Daraus ist abzuleiten, dass der Betrag des

E-Modul weitgehend unabhängig von der Form des Polymers ist, was bei dem CPP-1 nicht der Fall ist. Das *E*-Modul der gesponnenen CPP-1-Fasern in PBS ist weitaus geringer als das Elastizitätsmodul der Cnidoinfasern in PBS. Im trockenen Zustand haben die CPP-1-Fasern allerdings eine höhere Steifigkeit als die Cnidoinfasern.

Es liegt nahe, dass der Grund der mechanischen Eigenschaften auf den Sequenzunterschieden der Proteine beruht. Wie oben erläutert, besitzt Cnidoin eine elastische Sequenz, die der des Spidroin-2 der Spinnenseide ähnelt (Beckmann et al., 2015). Fasern, die aus einem Proteingemisch aus Spidroin-1 und Spidroin-2 mittels Elektrosponnen hergestellt wurde, haben ein *E*-Modul von 4,5 GPa (Zhu et al., 2015). Sie sind damit etwas elastischer als die reinen, gewaschenen Cnidoinfasern ($E=5,7$ GPa). Die höhere Elastizität und Höhe der nicht gewaschenen Proteinfasern im Gegensatz zu den gewaschenen, ist auf die Anwesenheit von PEO zurückzuführen.

Die Homologie der elastischen Sequenzen von Cnidoin und Spidroin-2 könnte die Ursache dafür sein, dass die Elastizitätsmodule der Proteine in derselben Größenordnung liegen. Die geringere Elastizität von Cnidoinfasern könnte durch die spezifischen Sequenzeigenschaften begründet sein. Cnidoin besitzt im Unterschied zu Spidroin einen hohen Anteil von Cystein in der elastischen Sequenz. Die Cysteine dienen vermutlich der Kreuzvernetzung lateral assoziierter Cnidoinmoleküle und verringern damit die Elastizität von Fasern ähnlich wie die Hydroxylkruzvernetzungen in Kollagenfibrillen.

Sowohl die CPP-1- als auch die Cnidoinfasern weisen in PBS ein geringeres Elastizitätsmodul auf als im trockenen Zustand. Auch bei den Spinnenfäden, die reich an Spidroin-2 sind, ist ein geringerer Betrag des *E*-Moduls in wässriger Lösung zu beobachten (N Savage and M Gosline, 2008; Savage and Gosline, 2008).

Bei den CPP-1-Fasern ist eine größere Differenz des *E*-Moduls zwischen den im Trockenen gemessenen Fasern und den Fasern in PBS zu verzeichnen als bei den Cnidoinfasern. Das Elastizitätsmodul von CPP-1-Fasern in PBS ($E=0,66$ MPa) ist zudem vergleichbar mit Kollagen, das ebenso einen hohen Prolinanteil hat (Brodsky and Shah, 1995). Nach einer Woche in Zellkulturmedium besitzen Kollagenfasern, die mittels Elektrosponnen produziert wurden, ein *E*-Modul von $0,78 \pm 0,48$ MPa (Baek et al., 2016) bzw. in PBS ein *E*-Modul von 0,07 MPa bis 0,26 MPa (Yang et al., 2008). Im trockenen Zustand weisen auch diese Fasern eine höhere Steifigkeit auf ($E= 1,3$ GPa - 7,5 GPa) (Yang et al., 2008). Das *E*-Modul der

trockenen CPP-1-Fasern von 6,6 GPa ist mit den trockenen Kollagenfasern vergleichbar und ist höher als das der trockenen Cnidoinfasern.

Tabelle 13: Zusammenfassung der mechanischen Eigenschaften von CPP-1- und Cnidoinfasern, sowie von publizierten Spidroin- und Kollagenfasern (Yang et al., 2008; Zhu et al., 2015).

Fasern	Elastizitätsmodul im trockenen Zustand	Elastizitätsmodul in PBS
Kollagenfasern	1,3 GPa – 7,5 GPa	0,07 MPa – 0,26 MPa
CPP-1-Fasern	6,6 GPa	0,66 MPa
Spidroinfasern	4,5 GPa	-
Cnidoinfasern	5,7 GPa	2,8 MPa

Die Unterschiede der Elastizität gehen tendenziell mit den quellenden Eigenschaften der Nanofasern einher. Der Faserdurchmesser der Cnidoinfasern ist im trockenen Zustand und in PBS nahezu gleichbleibend. Ausgeprägte quellende Eigenschaften konnten jedoch bei den prolinreichen CPP-1-Fasern in PBS nachgewiesen werden. Der Durchmesser der CPP-1-Fasern in PBS ist um ca. 30 % größer als im trockenen Zustand. Dies könnte auf Grund der Unterbrechung von Wasserstoffbrücken durch wässriger und salzhaltiger Lösung begründet sein, die mit einer Penetration von Wasser in die Fasern einhergeht (Grant et al., 2009; Quigley et al., 2016). Zudem wurde postuliert, dass der Anteil an Prolinen innerhalb der Proteinsequenz mit dem aufquellen der Fasern in wässriger Lösung korreliert (N Savage and M Gosline, 2008; Savage and Gosline, 2008). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass ein wässriges Milieu bei prolinreichen Proteinen höhere Abweichungen ihrer mechanischen Eigenschaften bewirkt als bei prolinarmen Proteinen. Auch die minikollagenähnliche Struktur des CPP-1 spiegelt sich somit in den mechanischen Eigenschaften der gesponnenen Fasern wieder.

Das CPP-1 könnte durch die strukturellen Parallelen zu Kollagen und der einfachen Produktion in Bakterien ein vielversprechender Rohstoff für die Entwicklung von innovativen Biomaterialien darstellen und ähnlich einsetzbar wie Kollagen sein. Kollagen wird bereits vielseitig bei der Entwicklung von Gerüststrukturen zum Gewebedesign und damit zur Imitierung der extrazellulären Matrix verwendet (Baek et al., 2016; Walters and Stegemann, 2014). Sowohl die CPP-1-Fasern als auch die Cnidoinfasern sollten in dieser Arbeit als Zellsubstrat erprobt werden.

6.6 Nanofasern aus Nematocystenproteine sind biokompatibel

CPP-1 und Cnidoin sind in der Nematocyste Teil einer EZM-ähnlichen Matrix (Balasubramanian et al., 2012). Die hier hergestellten Proteinfasern sollten als eine EZM-ähnliche Gerüststruktur für Stammzellen erprobt werden. Das Verhalten von Stammzellen ist nicht nur abhängig von löslichen und unlöslichen Faktoren der EZM, sondern auch der Elastizität der Substrate (Discher et al., 2005; Engler et al., 2006).

Die *E*-Module der hergestellten Proteinfasern in PBS von 0,66 MPa und 2,1 MPa liegen in derselben Größenordnung von bereits erprobten Zellsubstraten (Xie et al., 2018) und erfüllen hiermit einen wichtigen Parameter für die praktische Anwendung als Zellsubstrat.

Fasern, die beispielsweise aus dem Seidenprotein Fibroin bestehen und mittels Elektrosponning hergestellt wurden, weisen ein Elastizitätsmodul von $2,45 \pm 0,47$ MPa und wurden für die Kultivierung von Muskelzellen eingesetzt (Soffer et al., 2008). Ein geringer Betrag des Elastizitätsmodul von 0,67 MPa von dreidimensionalen Gerüststrukturen fördert osteogene Differenzierungsprozesse der hMSC (Hu et al., 2018). Zudem wurden die hMSC bereits erfolgreich auf Kollagenfasern, die mittels Elektrosponning hergestellt wurde, kultiviert (Shih et al., 2006). Diese Daten weisen darauf hin, dass auch CPP-1- und Cnidoinfasern vielversprechende Kandidaten zur Entwicklung von Zellsubstraten sein könnten.

In der Kultur von hMSCs auf CPP-1- und Cnidoinfasern konnte keine Toxizität der Nanofasern auf die Stammzellen beobachtet werden. Damit erfüllen die Proteinfasern die wichtigste Voraussetzung, um als Zellsubstrat eingesetzt zu werden.

Studien haben bereits gezeigt, dass hMSCs *in vitro* ihre Morphologie in Abhängigkeit der Elastizität des Substrates verändern können (Frank et al., 2016). Allerdings konnten in dieser Arbeit keine morphologischen Veränderungen bei den Stammzellen beobachtet werden. Bei den Zellkulturexperimenten von Frank et al. befinden sich die *E*-Module der Substrate im Bereich 2 - 40 kPa (Frank et al., 2016). Möglicherweise sind die CPP-1- und Cnidoinfasern zu steif um eine Änderung hinsichtlich der Morphologie zu bewirken oder die Dichte der Fasern ist nicht ausreichend. Besonders für die CPP-1-Fasern wurden quellende Eigenschaften beobachtet, was zu einer Reduktion der Faserdichte führt.

Auch eine Ausrichtung der Zellen entlang der Nanofasern ist nicht zu erkennen. Eine bestimmte Wachstumsrichtung der Zellen könnte z.B. mit Hilfe einer Funktionalisierung der Proteinfasern mit Wachstumsfaktoren erzielt werden, z.B. über CRD-Verlinkung. Mesenchymale Stammzellen, die auf Fasern mit dem Wachstumsfaktor CTGF (*connective tissue growth factor*) ausplattiert wurden, orientierten sich entlang der Fasern (Olvera et al., 2017).

Der Grundstein für die Entwicklung von Substraten aus Proteinen der Cnidarier für die Stammzellkultur wurde mit dieser Arbeit gelegt. Um neue medizinische Applikationen zu schaffen, können die Fasern je nach Anwendung modifiziert werden um dann die Wachstumsrichtung als auch eine spezifische Differenzierung von Stammzellen zu erreichen.

6.7 Die CRD: Ein multifunktionelles Werkzeug

Wie bereits erwähnt, stellen die cysteinreichen Domänen der Nematocystenproteine eine Linkerdomäne innerhalb des Polymers in der Nematocystenwand dar (Tursch et al., 2016). Die Synthese von Biokonjugaten und somit die Verknüpfung von synthetischen Molekülen mit Biomolekülen ist ein bedeutender Teil der interdisziplinären Forschung. Durch die Verwendung von Biomolekülen können Parameter wie die Biokompatibilität oder Funktionalität gesteuert werden (Canalle et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit und vorangegangener Studien wurde die CRDs als vielseitige Komponente für die Entwicklung von Biomaterialien eingesetzt. Mit den CRDs der Nematocystenproteine wurden sowohl Hybridpolymere als auch wiederbeschreibbare Oberflächen entwickelt. Das Prinzip der wiederbeschreibbaren Oberflächen beruht auf den Disulfidbrücken, die abhängig von reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen gebildet werden. An die freie CRD wurde eine Bromgruppe gekoppelt, mit der die Kopplung der CRDs detektiert werden konnte (Gegenhuber et al., 2017). Diese Technologie könnte z.B. auch als Biosensor für das Redoxmilieu eingesetzt werden, da hier ein optisches Signal mit dem Redoxzustand der Umgebung gekoppelt ist.

Eine weitere Anwendung wäre der Einsatz von CRDs als Linkerdomäne von Makromolekülen durch intramolekulare Disulfidbrücken wie bei Tursch et al. Für GFP und mCherry gezeigt (Tursch et al., 2016). Dabei liefern die CRDs der Nematocystenproteine die Möglichkeit die verschiedenen Eigenschaften der C-CRD und der N-CRD gezielt einzusetzen. Die vollständige Oxidation der N-CRD dauert um ein Vielfaches länger als die der C-CRD, die in ca. einer Stunde abgeschlossen ist (Boulegue et al., 2006). Zudem bildet die N-CRD lineare Polymere aus, während die C-CRD verzweigte Netzwerke mit mehreren simultanen Verknüpfungen pro CRD bilden kann (Tursch et al., 2016). Die Kinetik und der Grad der Vernetzung kann somit gesteuert werden. Dies bietet die Möglichkeit kontrolliert Peptidpolymere mit komplexen Strukturen, z.B. mit regulierbarer Porengröße, zu erzeugen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von Cnidoinfasern durch Zugabe der N-CRD inhibiert wird.

Dieses Verfahren könnte z.B. durch eine kontrollierte Titration der N-CRD eine Modulation im Vernetzungsgrad der Fasern ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

- Adamczyk, P., S. Meier, T. Gross, B. Hobmayer, S. Grzesiek, H.P. Bachinger, T.W. Holstein, and S. Ozbek. 2008. Minicollagen-15, a novel minicollagen isolated from Hydra, forms tubule structures in nematocysts. *J Mol Biol.* 376:1008-1020.
- Adamczyk, P., C. Zenkert, P.G. Balasubramanian, S. Yamada, S. Murakoshi, K. Sugahara, J.S. Hwang, T. Gojobori, T.W. Holstein, and S. Ozbek. 2010. A non-sulfated chondroitin stabilizes membrane tubulation in cnidarian organelles. *J Biol Chem.* 285:25613-25623.
- Agata, K., Y. Saito, and E. Nakajima. 2007. Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Dev Growth Differ.* 49:73-78.
- Ajallouei, F., N. Nikogeorgos, A. Ajallouei, M. Fossum, S. Lee, and I.S. Chronakis. 2018. Compressed collagen constructs with optimized mechanical properties and cell interactions for tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol.* 108:158-166.
- Alberts, B. 2014. *Molecular Biology of The Cell.* Sixth Edition.
- Aufschnaiter, R., E.A. Zamir, C.D. Little, S. Ozbek, S. Munder, C.N. David, L. Li, M.P. Sarras, Jr., and X. Zhang. 2011. In vivo imaging of basement membrane movement: ECM patterning shapes Hydra polyps. *J Cell Sci.* 124:4027-4038.
- Babitha, S., L. Rachita, K. Karthikeyan, E. Shoba, I. Janani, B. Poornima, and K. Purna Sai. 2017. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *Int J Pharm.* 523:52-90.
- Baek, J., S. Sovani, N.E. Glembotski, J. Du, S. Jin, S.P. Grogan, and D.D. D'Lima. 2016. Repair of Avascular Meniscus Tears with Electrospun Collagen Scaffolds Seeded with Human Cells. *Tissue Eng Part A.* 22:436-448.
- Balasubramanian, P.G., A. Beckmann, U. Warnken, M. Schnolzer, A. Schuler, E. Bornberg-Bauer, T.W. Holstein, and S. Ozbek. 2012. Proteome of Hydra nematocyst. *J Biol Chem.* 287:9672-9681.
- Barbul, A. 2008. Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis. *J Nutr.* 138:2021S-2024S.
- Bathfield, M., F. D'Agosto, R. Spitz, M.T. Charreyre, and T. Delair. 2006. Versatile precursors of functional RAFT agents. Application to the synthesis of bio-related end-functionalized polymers. *J Am Chem Soc.* 128:2546-2547.
- Beckmann, A., and S. Ozbek. 2012. The nematocyst: a molecular map of the cnidarian stinging organelle. *Int J Dev Biol.* 56:577-582.
- Beckmann, A., S. Xiao, J.P. Muller, D. Mercadante, T. Nuchter, N. Kroger, F. Langhojer, W. Petrich, T.W. Holstein, M. Benoit, F. Grater, and S. Ozbek. 2015. A fast recoiling silk-like elastomer facilitates nanosecond nematocyst discharge. *BMC Biol.* 13:3.
- Beltrao, P., P. Bork, N.J. Krogan, and V. van Noort. 2013. Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Mol Syst Biol.* 9:714.
- Berntson, E.A., S.C. France, and L.S. Mullineaux. 1999. Phylogenetic relationships within the class Anthozoa (phylum Cnidaria) based on nuclear 18S rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 13:417-433.
- Bhardwaj, N., and S.C. Kundu. 2010. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv.* 28:325-347.
- Bode, H. 2011. Axis formation in hydra. *Annu Rev Genet.* 45:105-117.
- Bode, H.R. 2012. The head organizer in Hydra. *Int J Dev Biol.* 56:473-478.
- Bode, H.R., and K.M. Flick. 1976. Distribution and dynamics of nematocyte populations in Hydra attenuata. *J Cell Sci.* 21:15-34.
- Bonfil, R.D., A. Vinyals, O.D. Bustuoabad, A. Llorens, F.J. Benavides, M. Gonzalez-Garrigues, and A. Fabra. 1994. Stimulation of angiogenesis as an explanation of Matrigel-enhanced tumorigenicity. *Int J Cancer.* 58:233-239.
- Borzacchiello, A., L. Russo, B.M. Malle, K. Schwach-Abdellaoui, and L. Ambrosio. 2015. Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *Biomed Res Int.* 2015:871218.
- Bosch, T.C. 2007. Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Dev Biol.* 303:421-433.

- Bosch, T.C., R. Augustin, F. Anton-Erxleben, S. Fraune, G. Hemmrich, H. Zill, P. Rosenstiel, G. Jacobs, S. Schreiber, M. Leippe, M. Stanisak, J. Grotzinger, S. Jung, R. Podschun, J. Bartels, J. Harder, and J.M. Schroder. 2009. Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence. *Dev Comp Immunol.* 33:559-569.
- Boulegue, C., A.G. Milbradt, C. Renner, and L. Moroder. 2006. Single proline residues can dictate the oxidative folding pathways of cysteine-rich peptides. *J Mol Biol.* 358:846-856.
- Braghirolli, D.I., F. Zamboni, G.A. Acasigua, and P. Pranke. 2015. Association of electrospinning with electrospraying: a strategy to produce 3D scaffolds with incorporated stem cells for use in tissue engineering. *Int J Nanomedicine.* 10:5159-5169.
- Brodsky, B., and J.A. Ramshaw. 1997. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol.* 15:545-554.
- Brodsky, B., and N.K. Shah. 1995. Protein motifs. 8. The triple-helix motif in proteins. *FASEB J.* 9:1537-1546.
- Bürkle, A. 2001. Posttranslational Modification. In *Encyclopedia of Genetics*. S. Brenner and J.H. Miller, editors. Academic Press, New York. 1533.
- Buttafoco, L., N.G. Kolkman, P. Engbers-Buijtenhuijs, A.A. Poot, P.J. Dijkstra, I. Vermes, and J. Feijen. 2006. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 27:724-734.
- Buzgariu, W., S. Al Haddad, S. Tomczyk, Y. Wenger, and B. Galliot. 2015. Multi-functionality and plasticity characterize epithelial cells in Hydra. *Tissue Barriers.* 3:e1068908.
- Buzgariu, W., M. Crescenzi, and B. Galliot. 2014. Robust G2 pausing of adult stem cells in Hydra. *Differentiation.* 87:83-99.
- Cabral, W.A., I. Perdivara, M. Weis, M. Terajima, A.R. Blissett, W. Chang, J.E. Perosky, E.N. Makareeva, E.L. Mertz, S. Leikin, K.B. Tomer, K.M. Kozloff, D.R. Eyre, M. Yamauchi, and J.C. Marini. 2014. Abnormal Type I Collagen Post-translational Modification and Crosslinking in a Cyclophilin B KO Mouse Model of Recessive Osteogenesis Imperfecta. *PLoS Genetics.* 10:e1004465.
- Campbell, R.D. 1967. Tissue dynamics of steady state growth in Hydra littoralis. II. Patterns of tissue movement. *J Morphol.* 121:19-28.
- Campbell, R.D., and B.A. Marcum. 1980. Nematocyte migration in hydra: evidence for contact guidance in vivo. *J Cell Sci.* 41:33-51.
- Canalle, L.A., D.W. Lowik, and J.C. van Hest. 2010. Polypeptide-polymer bioconjugates. *Chem Soc Rev.* 39:329-353.
- Cannon, M.C., K. Terneus, Q. Hall, L. Tan, Y. Wang, B.L. Wegenhart, L. Chen, D.T.A. Lamport, Y. Chen, and M.J. Kieliszewski. 2008. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105:2226-2231.
- Cannon, M.J.K.D.T.A.L.L.T.M.C. 2010. Hydroxyproline-Rich Glycoproteins: Form and Function. In *Annual Plant Reviews*.
- Chapman, G.B., and L.G. Tilney. 1959a. Cytological studies of the nematocysts of Hydra. I. Desmonemes, isorhizas, cnidocils, and supporting structures. *J Biophys Biochem Cytol.* 5:69-78.
- Chapman, G.B., and L.G. Tilney. 1959b. Cytological studies of the nematocysts of Hydra. II. The stenoteles. *J Biophys Biochem Cytol.* 5:79-84.
- Chen, F.-M., and X. Liu. 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in polymer science.* 53:86-168.
- Chen, H., Y. Peng, S. Wu, and L.P. Tan. 2016. Electrospun 3D Fibrous Scaffolds for Chronic Wound Repair. *Materials.* 9:272.
- Cheng, S., M. Cetinkaya, and F. Gräter. 2010. How Sequence Determines Elasticity of Disordered Proteins. *Biophysical Journal.* 99:3863-3869.
- Chiefari, J., Y.K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T.P.T. Le, R.T.A. Mayadunne, G.F. Meijs, C.L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, and S.H. Thang. 1998. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules.* 31:5559-5562.

- Choi, J.Y., and B.C. Lee. 2015. Click Reaction: An Applicable Radiolabeling Method for Molecular Imaging. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 49:258-267.
- Cooper, J.B., and J.E. Varner. 1984. Cross-linking of soluble extensin in isolated cell walls. *Plant Physiol*. 76:414-417.
- Cormier, S.M., and D.A. Hessinger. 1980. Cnidocil apparatus: sensory receptor of *Physalia* nematocytes. *J Ultrastruct Res*. 72:13-19.
- Cramariuc, B., R. Cramariuc, R. Scarlet, L.R. Manea, I.G. Lupu, and O. Cramariuc. 2013. Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*. 71:189-198.
- Czyz, J., and A.M. Wobus. 2001. Embryonic stem cell differentiation: The role of extracellular factors. *Differentiation*. 68:167-174.
- Daamen, W.F., J.H. Veerkamp, J.C.M. van Hest, and T.H. van Kuppevelt. 2007. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*. 28:4378-4398.
- Daly, M., M. Brugler, P. Cartwright, A. Collins, M. Dawson, D. Fautin, S. France, C. McFadden, D. M. Opresko, E. Rodriguez, S. Romano, and J. L. Stake. 2006. The Phylum Cnidaria: A Review Of Phylogenetic Patterns And Diversity 300 Years After Linnaeus *.
- David, C.N. 2012. Interstitial stem cells in *Hydra*: multipotency and decision-making. *Int J Dev Biol*. 56:489-497.
- David, C.N., S. Ozbek, P. Adamczyk, S. Meier, B. Pauly, J. Chapman, J.S. Hwang, T. Gojobori, and T.W. Holstein. 2008. Evolution of complex structures: minicollagens shape the cnidarian nematocyst. *Trends Genet*. 24:431-438.
- Dickert, F.L. 2014. Biomimetic Receptors and Sensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 14:22525-22531.
- Discher, D.E., P. Janmey, and Y.L. Wang. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*. 310:1139-1143.
- Dolz, R., and E. Heidemann. 1986. Influence of different tripeptides on the stability of the collagen triple helix. I. Analysis of the collagen sequence and identification of typical tripeptides. *Biopolymers*. 25:1069-1080.
- Doshi, J., and D.H. Reneker. 1995. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*. 35:151-160.
- Dubel, S., and H.C. Schaller. 1990. Terminal differentiation of ectodermal epithelial stem cells of *Hydra* can occur in G2 without requiring mitosis or S phase. *J Cell Biol*. 110:939-945.
- Edge, A.S. 2003. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem J*. 376:339-350.
- Engel, U., S. Ozbek, R. Streitwolf-Engel, B. Petri, F. Lottspeich, and T.W. Holstein. 2002. Nowa, a novel protein with minicollagen Cys-rich domains, is involved in nematocyst formation in *Hydra*. *J Cell Sci*. 115:3923-3934.
- Engel, U., O. Pertz, C. Fauser, J. Engel, C.N. David, and T.W. Holstein. 2001. A switch in disulfide linkage during minicollagen assembly in *Hydra* nematocysts. *EMBO J*. 20:3063-3073.
- Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 126:677-689.
- F., E.R., and F.H. Munro. 1947. On the Functions and Mode of Action of the Nematocysts of *Hydra*. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 117:365-376.
- Fakhari, A., Q. Phan, and C. Berkland. 2014. Hyaluronic acid colloidal gels as self-assembling elastic biomaterials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 102:612-618.
- Ferencz, R., J. Sanchez, B. Blümich, and W. Herrmann. 2012. AFM nanoindentation to determine Young's modulus for different EPDM elastomers. *Polymer Testing*. 31:425-432.
- Fernandez, J.M., M. Villalon, and P. Verdugo. 1991. Reversible condensation of mast cell secretory products in vitro. *Biophys J*. 59:1022-1027.
- Fidler, A.L., S.P. Boudko, A. Rokas, and B.G. Hudson. 2018. The triple helix of collagens - an ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution. *J Cell Sci*. 131.
- Fleck, C.A., and R. Simman. 2010. Modern Collagen Wound Dressings: Function and Purpose. *The Journal of the American College of Certified Wound Specialists*. 2:50-54.
- Flowers, G.P., and C.M. Crews. 2018. Regeneration writ large. *Nature*. 554:34-35.
- Frank, V., S. Kaufmann, R. Wright, P. Horn, H.Y. Yoshikawa, P. Wuchter, J. Madsen, A.L. Lewis, S.P. Armes, A.D. Ho, and M. Tanaka. 2016. Frequent mechanical stress suppresses

- proliferation of mesenchymal stem cells from human bone marrow without loss of multipotency. *Sci Rep.* 6:24264.
- Frenot, A., and I.S. Chronakis. 2003. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 8:64-75.
- Fridman, R., M.C. Kibbey, L.S. Royce, M. Zain, M. Sweeney, D.L. Jicha, J.R. Yannelli, G.R. Martin, and H.K. Kleinman. 1991. Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *J Natl Cancer Inst.* 83:769-774.
- Fujisawa, T., and C.N. David. 1981. Commitment during nematocyte differentiation in Hydra. *J Cell Sci.* 48:207-222.
- Galliot, B. 2012. Preface: the hydra model system. *Int J Dev Biol.* 56:407-409.
- Gegenhuber, T., D. Abt, A. Welle, S. Ozbek, A.S. Goldmann, and C. Barner-Kowollik. 2017. Spatially resolved photochemical coding of reversibly anchored cysteine-rich domains. *Journal of Materials Chemistry B.* 5:4993-5000.
- Genikhovich, G., and U. Technau. 2017. On the evolution of bilaterality. *Development.* 144:3392-3404.
- Gierer, A., S. Berking, H. Bode, C.N. David, K. Flick, G. Hansmann, H. Schaller, and E. Trenkner. 1972. Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nat New Biol.* 239:98-101.
- Gierer, A., and H. Meinhardt. 1972. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik.* 12:30-39.
- Gitter, A.H., D. Oliver, and U. Thurm. 1994. Calcium- and voltage-dependence of nematocyst discharge in *Hydra vulgaris*. *Journal of Comparative Physiology A.* 175:115-122.
- Gongora-Benitez, M., J. Tulla-Puche, and F. Albericio. 2014. Multifaceted roles of disulfide bonds. Peptides as therapeutics. *Chem Rev.* 114:901-926.
- Gosline, J., M. Lillie, E. Carrington, P. Guerette, C. Ortlepp, and K. Savage. 2002. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:121-132.
- Gosline, J.M., P.A. Guerette, C.S. Ortlepp, and K.N. Savage. 1999. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol.* 202:3295-3303.
- Grant, C.A., D.J. Brockwell, S.E. Radford, and N.H. Thomson. 2009. Tuning the Elastic Modulus of Hydrated Collagen Fibrils. *Biophysical Journal.* 97:2985-2992.
- Griffith, L.G. 2002. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci.* 961:83-95.
- Grunina, T.M., A.V. Demidenko, A.M. Lyaschuk, M.S. Poponova, Z.M. Galushkina, L.A. Soboleva, S.A. Cherepushkin, N.B. Polyakov, D.A. Grumov, A.I. Solovyev, V.G. Zhukhovitsky, I.S. Boksha, M.E. Subbotina, A.V. Gromov, V.G. Lunin, and A.S. Karyagina. 2017. Recombinant Human Erythropoietin with Additional Processable Protein Domains: Purification of Protein Synthesized in *Escherichia coli* Heterologous Expression System. *Biochemistry (Mosc).* 82:1285-1294.
- Habetha, M., F. Anton-Erxleben, K. Neumann, and T.C.G. Bosch. 2003. The *Hydra viridis* / *Chlorella* symbiosis. Growth and sexual differentiation in polyps without symbionts. *Zoology.* 106:101-108.
- Haghi, A.K., and M. Akbari. 2007. Trends in electrospinning of natural nanofibers. *physica status solidi (a).* 204:1830-1834.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-580.
- Hanifi, A., H. McCarthy, S. Roberts, and N. Pleshko. 2013. Fourier Transform Infrared Imaging and Infrared Fiber Optic Probe Spectroscopy Identify Collagen Type in Connective Tissues. *PLoS ONE.* 8:e64822.
- Harland, R., and J. Gerhart. 1997. Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:611-667.
- Hejnal, A., and M.Q. Martindale. 2008. Acoel development supports a simple planula-like urbilaterian. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363:1493-1501.
- Hemmerich, G., B. Anokhin, H. Zacharias, and T.C. Bosch. 2007. Molecular phylogenetics in Hydra, a classical model in evolutionary developmental biology. *Mol Phylogenet Evol.* 44:281-290.

- Hijazi, M., D. Roujol, H. Nguyen-Kim, L. Del Rocio Cisneros Castillo, E. Saland, E. Jamet, and C. Albenne. 2014. Arabinogalactan protein 31 (AGP31), a putative network-forming protein in *Arabidopsis thaliana* cell walls? *Ann Bot.* 114:1087-1097.
- Hikasa, H., and S.Y. Sokol. 2013. Wnt signaling in vertebrate axis specification. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a007955.
- Hobmayer, B., F. Rentzsch, K. Kuhn, C.M. Happel, C.C. von Laue, P. Snyder, U. Rothbacher, and T.W. Holstein. 2000. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature.* 407:186-189.
- Hoffmann, M., K. Marx, U. Reichl, M. Wuhler, and E. Rapp. 2016. Site-specific O-Glycosylation Analysis of Human Blood Plasma Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP.* 15:624-641.
- Hoffmeister-Ullerich, S.A. 2007. *Hydra*--ancient model with modern outfit. *Cell Mol Life Sci.* 64:3012-3016.
- Holstein, T. 1981. The morphogenesis of nematocytes in *Hydra* and *Forskalia*: an ultrastructural study. *J Ultrastruct Res.* 75:276-290.
- Holstein, T., and P. Tardent. 1984. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science (New York, N.Y.).* 223:830-833.
- Holstein, T.W. 2012a. The evolution of the Wnt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a007922.
- Holstein, T.W. 2012b. A view to kill. *BMC Biol.* 10:18.
- Holstein, T.W., M. Benoit, G.V. Herder, C.N. David, G. Wanner, and H.E. Gaub. 1994. Fibrous mini-collagens in *hydra* nematocysts. *Science (New York, N.Y.).* 265:402-404.
- Holstein, T.W., E. Hobmayer, and U. Technau. 2003. Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Dev Dyn.* 226:257-267.
- Hu, Q., M. Liu, G. Chen, Z. Xu, and Y. Lv. 2018. Demineralized Bone Scaffolds with Tunable Matrix Stiffness for Efficient Bone Integration. *ACS Applied Materials & Interfaces.*
- Hughes, C.S., L.M. Postovit, and G.A. Lajoie. 2010. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics.* 10:1886-1890.
- Hwang, J., Y. Jeong, J.M. Park, K.H. Lee, J.W. Hong, and J. Choi. 2015. Biomimetics: forecasting the future of science, engineering, and medicine. *International Journal of Nanomedicine.* 10:5701-5713.
- J van Holst, G., and J. E. Varner. 1984. Reinforced Polyproline II Conformation in a Hydroxyproline-Rich Cell Wall Glycoprotein from Carrot Root. 247-251 pp.
- Jin, H.-J., S.V. Fridrikh, G.C. Rutledge, and D.L. Kaplan. 2002. Electrospinning *Bombyx mori* Silk with Poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules.* 3:1233-1239.
- Johnson, K.L., A.M. Cassin, A. Lonsdale, A. Bacic, M.S. Doblin, and C.J. Schultz. 2017. Pipeline to Identify Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Plant Physiol.* 174:886-903.
- Kaliszewicz, A. 2011. Interference of asexual and sexual reproduction in the green *hydra*. *Ecological Research.* 26:147-152.
- Kanta, J. 2015. Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior. *Cell Adh Migr.* 9:308-316.
- Kass-Simon, G. 2002. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. 1772-1794 pp.
- Kavi Kishor, P.B., P. Hima Kumari, M.S. Sunita, and N. Sreenivasulu. 2015. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front Plant Sci.* 6:544.
- Kelleher, N.L. 2012. A Cell-Based Approach to the Human Proteome Project. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 23:1617-1624.
- Kieliszewski Marcia, J., T.A. Lamport Derek, L. Tan, and C. Cannon Maura. 2010. Hydroxyproline-Rich Glycoproteins: Form and Function.
- Kieliszewski, M.J., and D.T. Lamport. 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J.* 5:157-172.
- Kim, B.S., K.E. Park, M.H. Kim, H.K. You, J. Lee, and W.H. Park. 2015. Effect of nanofiber content on bone regeneration of silk fibroin/poly(ϵ -caprolactone) nano/microfibrous composite scaffolds. *International Journal of Nanomedicine.* 10:485-502.
- Kim, D.S., and Y. Hahn. 2015. The acquisition of novel N-glycosylation sites in conserved proteins during human evolution. *BMC Bioinformatics.* 16:29.

- Krishna, L., K. Dhamodaran, C. Jayadev, K. Chatterjee, R. Shetty, S.S. Khora, and D. Das. 2016. Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate. *Stem Cell Res Ther.* 7:188.
- Kurz, E.M., T.W. Holstein, B.M. Petri, J. Engel, and C.N. David. 1991. Mini-collagens in hydra nematocytes. *J Cell Biol.* 115:1159-1169.
- Kusserow, A., K. Pang, C. Sturm, M. Hroudá, J. Lentfer, H.A. Schmidt, U. Technau, A. von Haeseler, B. Hobmayer, M.Q. Martindale, and T.W. Holstein. 2005. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature.* 433:156-160.
- Lee, H.-J., S.J. Lee, S. Uthaman, R.G. Thomas, H. Hyun, Y.Y. Jeong, C.-S. Cho, and I.-K. Park. 2015. Biomedical Applications of Magnetically Functionalized Organic/Inorganic Hybrid Nanofibers. *International Journal of Molecular Sciences.* 16:13661-13677.
- Lee, M.J., and M.B. Yaffe. 2016. Protein Regulation in Signal Transduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 8:a005918.
- Leikina, E., M.V. Merts, N. Kuznetsova, and S. Leikin. 2002. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:1314-1318.
- Lengfeld, T., H. Watanabe, O. Simakov, D. Lindgens, L. Gee, L. Law, H.A. Schmidt, S. Ozbek, H. Bode, and T.W. Holstein. 2009. Multiple Wnts are involved in Hydra organizer formation and regeneration. *Dev Biol.* 330:186-199.
- Lin, D.C., E.K. Dimitriadis, and F. Horkay. 2007. Robust strategies for automated AFM force curve analysis--I. Non-adhesive indentation of soft, inhomogeneous materials. *J Biomech Eng.* 129:430-440.
- Liu, H., S. Ravi, D. Kolomenskiy, and H. Tanaka. 2016a. Biomechanics and biomimetics in insect-inspired flight systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 371:20150390.
- Liu, M., X.P. Duan, Y.M. Li, D.P. Yang, and Y.Z. Long. 2017. Electrospun nanofibers for wound healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 76:1413-1423.
- Liu, X., R. Wolfe, L.R. Welch, D.S. Domozych, Z.A. Popper, and A.M. Showalter. 2016b. Bioinformatic Identification and Analysis of Extensins in the Plant Kingdom. *PLoS One.* 11:e0150177.
- Lommel, M., A. Tursch, L. Rustarazo-Calvo, B. Trageser, and T.W. Holstein. 2017. Genetic knockdown and knockout approaches in Hydra. *bioRxiv.*
- Lubbock, R., and W.B. Amos. 1981. Removal of bound calcium from nematocyst contents causes discharge. *Nature.* 290:500-501.
- Lubbock, R., B.L. Gupta, and T.A. Hall. 1981. Novel role of calcium in exocytosis: mechanism of nematocyst discharge as shown by x-ray microanalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:3624-3628.
- Luzio, A., E.V. Canesi, C. Bertarelli, and M. Caironi. 2014. Electrospun Polymer Fibers for Electronic Applications. *Materials.* 7:906-947.
- M., B.C., L.M. A., G.J. M., W.G. M., S.B. C., B.A. J., W.K. A., and K.F. W. 2003. Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties. *Biopolymers.* 70:445-455.
- MacWilliams, H.K. 1983. Hydra transplantation phenomena and the mechanism of hydra head regeneration. I. Properties of the head inhibition. *Dev Biol.* 96:217-238.
- Mamat, N., K. Yazawa, K. Numata, and Y. Norma-Rashid. 2018. Morphological and mechanical properties of flexible resilin joints on damselfly wings (*Rhinocypha* spp.). *PLoS ONE.* 13:e0193147.
- Mamedov, T., and V. Yusibov. 2013. In vivo deglycosylation of recombinant proteins in plants by co-expression with bacterial PNGase F. *Bioengineered.* 4:338-342.
- Mansiaux, Y., A.P. Joseph, J.-C. Gelly, and A.G. de Brevern. 2011. Assignment of PolyProline II Conformation and Analysis of Sequence – Structure Relationship. *PLoS ONE.* 6:e18401.
- MARISCAL, R.N., E.J. CONKLIN, and C.H. BIGGER. 1977a. THE PTYCHOCYST, A MAJOR NEW CATEGORY OF CNIDA USED IN TUBE CONSTRUCTION BY A CERIANTHID ANEMONE. *The Biological Bulletin.* 152:392-405.
- Mariscal, R.N., R.B. McLean, and C. Hand. 1977b. The form and function of cnidarian spirocysts. 3. Ultrastructure of the thread and the function of spirocysts. *Cell and tissue research.* 178:427-433.

- Martinez, D.E. 1998. Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Exp Gerontol.* 33:217-225.
- Martinez, D.E., and D. Bridge. 2012. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging. *Int J Dev Biol.* 56:479-487.
- Matus, D.Q., C. Magie, K. Pang, M.Q. Martindale, and G.H. Thomsen. 2008. The Hedgehog gene family of the cnidarian, *Nematostella vectensis*, and implications for understanding metazoan Hedgehog pathway evolution. *Developmental biology.* 313:501-518.
- McLaughlin, S. 2017. Evidence that polycystins are involved in Hydra cnidocyte discharge. *Invert Neurosci.* 17:1.
- Meier, S., P.R. Jensen, C.N. David, J. Chapman, T.W. Holstein, S. Grzesiek, and S. Ozbek. 2007. Continuous molecular evolution of protein-domain structures by single amino acid changes. *Curr Biol.* 17:173-178.
- Meinhardt, H. 2002. The radial-symmetric hydra and the evolution of the bilateral body plan: an old body became a young brain. *Bioessays.* 24:185-191.
- Meinhardt, H. 2009. Models for the generation and interpretation of gradients. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a001362.
- Milbradt, A.G., C. Boulegue, L. Moroder, and C. Renner. 2005a. The two cysteine-rich head domains of minicollagen from Hydra nematocysts differ in their cystine framework and overall fold despite an identical cysteine sequence pattern. *J Mol Biol.* 354:591-600.
- Milbradt, A.G., C. Boulegue, L. Moroder, and C. Renner. 2005b. The Two Cysteine-rich Head Domains of Minicollagen from Hydra Nematocysts Differ in their Cystine Framework and Overall Fold Despite an Identical Cysteine Sequence Pattern. *Journal of Molecular Biology.* 354:591-600.
- Miljkovic-Licina, M., D. Gauchat, and B. Galliot. 2004. Neuronal evolution: analysis of regulatory genes in a first-evolved nervous system, the hydra nervous system. *Biosystems.* 76:75-87.
- Mir, M., M.N. Ali, A. Barakullah, A. Gulzar, M. Arshad, S. Fatima, and M. Asad. 2018. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Prog Biomater.*
- Mohammadi, H., P.D. Arora, C.A. Simmons, P.A. Janmey, and C.A. McCulloch. 2015. Inelastic behaviour of collagen networks in cell-matrix interactions and mechanosensation. *Journal of the Royal Society Interface.* 12:20141074.
- Mohs, A., T. Silva, T. Yoshida, R. Amin, S. Lukomski, M. Inouye, and B. Brodsky. 2007. Mechanism of stabilization of a bacterial collagen triple helix in the absence of hydroxyproline. *J Biol Chem.* 282:29757-29765.
- Montgomery, N.T., K.D. Zientek, E.N. Pokidysheva, and H.P. Bachinger. 2018. Post-translational modification of type IV collagen with 3-hydroxyproline affects its interactions with glycoprotein VI and nidogens 1 and 2. *J Biol Chem.*
- Morgan, A.A., and E. Rubenstein. 2013. Proline: The Distribution, Frequency, Positioning, and Common Functional Roles of Proline and Polyproline Sequences in the Human Proteome. *PLoS ONE.* 8:e53785.
- Muiznieks, L.D., and F.W. Keeley. 2013. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta.* 1832:866-875.
- N Savage, K., and J. M Gosline. 2008. The effect of proline on the network structure of major ampullate silks as inferred from their mechanical and optical properties. 1937-1947 pp.
- Nam, J., Y. Huang, S. Agarwal, and J. Lannutti. 2007. Improved cellular infiltration in electrospun fiber via engineered porosity. *Tissue Eng.* 13:2249-2257.
- Niehrs, C. 2010. On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development.* 137:845-857.
- Nijenhuis, N., X. Zhao, A. Carisey, C. Ballestrem, and B. Derby. 2014. Combining AFM and Acoustic Probes to Reveal Changes in the Elastic Stiffness Tensor of Living Cells. *Biophysical Journal.* 107:1502-1512.
- Nimker, C., D.P. Singh, D. Saraswat, and A. Bansal. 2016. Preconditioning with ethyl 3,4-dihydroxybenzoate augments aerobic respiration in rat skeletal muscle. *Hypoxia.* 4:109-120.
- Nuchter, T., M. Benoit, U. Engel, S. Ozbek, and T.W. Holstein. 2006. Nanosecond-scale kinetics of nematocyst discharge. *Curr Biol.* 16:R316-318.

- Olvera, D., B.N. Sathy, S.F. Carroll, and D.J. Kelly. 2017. Modulating microfibrillar alignment and growth factor stimulation to regulate mesenchymal stem cell differentiation. *Acta Biomater.* 64:148-160.
- Ozbek, S. 2011. The cnidarian nematocyst: a miniature extracellular matrix within a secretory vesicle. *Protoplasma.* 248:635-640.
- Ozbek, S., P.G. Balasubramanian, and T.W. Holstein. 2009. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon.* 54:1038-1045.
- Ozbek, S., U. Engel, and J. Engel. 2002a. A switch in disulfide linkage during minicollagen assembly in hydra nematocysts or how to assemble a 150-bar-resistant structure. *J Struct Biol.* 137:11-14.
- Ozbek, S., O. Pertz, M. Schwager, A. Lustig, T. Holstein, and J. Engel. 2002b. Structure/function relationships in the minicollagen of Hydra nematocysts. *J Biol Chem.* 277:49200-49204.
- Ozbek, S., E. Pokidysheva, M. Schwager, T. Schulthess, N. Tariq, D. Barth, A.G. Milbradt, L. Moroder, J. Engel, and T.W. Holstein. 2004. The glycoprotein NOWA and minicollagens are part of a disulfide-linked polymer that forms the cnidarian nematocyst wall. *J Biol Chem.* 279:52016-52023.
- Pereira, C.S., J.M. Ribeiro, A.D. Vatulescu, K. Findlay, A.J. MacDougall, and P.A. Jackson. 2011. Extensin network formation in *Vitis vinifera* callus cells is an essential and causal event in rapid and H₂O₂-induced reduction in primary cell wall hydration. *BMC Plant Biol.* 11:106.
- Petersen, H.O., S.K. Hoger, M. Looso, T. Lengfeld, A. Kuhn, U. Warnken, C. Nishimiya-Fujisawa, M. Schnolzer, M. Kruger, S. Ozbek, O. Simakov, and T.W. Holstein. 2015. A Comprehensive Transcriptomic and Proteomic Analysis of Hydra Head Regeneration. *Mol Biol Evol.* 32:1928-1947.
- Petersen, R. 2016. Carbon Fiber Biocompatibility for Implants. *Fibers (Basel).* 4.
- Petty, K.J. 2001. Metal-chelate affinity chromatography. *Current protocols in neuroscience.* Chapter 5:Unit 5.10.
- Phelps, D.S., and J. Floros. 1988. Proline hydroxylation alters the electrophoretic mobility of pulmonary surfactant-associated protein A. *Electrophoresis.* 9:231-233.
- Pitzschke, A., H. Xue, H. Persak, S. Datta, and G.J. Seifert. 2016. Post-Translational Modification and Secretion of Azelaic Acid Induced 1 (AZI1), a Hybrid Proline-Rich Protein from *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci.* 17.
- Pokidysheva, E., A.G. Milbradt, S. Meier, C. Renner, D. Haussinger, H.P. Bachinger, L. Moroder, S. Grzesiek, T.W. Holstein, S. Ozbek, and J. Engel. 2004. The structure of the Cys-rich terminal domain of Hydra minicollagen, which is involved in disulfide networks of the nematocyst wall. *J Biol Chem.* 279:30395-30401.
- Pu, X., G. Li, and H. Huang. 2016. Preparation, anti-biofouling and drag-reduction properties of a biomimetic shark skin surface. *Biology Open.* 5:389-396.
- Qi, X., B.X. Behrens, P.R. West, and A.J. Mort. 1995. Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin. *Plant Physiology.* 108:1691-1701.
- Qiu, Y., and K. Park. 2001. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 53:321-339.
- Quigley, A.S., S.P. Veres, and L. Kreplak. 2016. Bowstring Stretching and Quantitative Imaging of Single Collagen Fibrils via Atomic Force Microscopy. *PLoS ONE.* 11:e0161951.
- Quinn, B., F. Gagne, and C. Blaise. 2012. Hydra, a model system for environmental studies. *Int J Dev Biol.* 56:613-625.
- Radmacher, M. 1997. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine.* 16:47-57.
- Rahaman, M.N., and J.J. Mao. 2005. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng.* 91:261-284.
- Reed, K.L., and T.D. Brown. 2001. Elastic Modulus and Strength of Emu Cortical Bone. *The Iowa Orthopaedic Journal.* 21:53-67.
- Ricard-Blum, S. 2011. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 3:a004978.

- Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, and H.E. Gaub. 1997. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science (New York, N.Y.)*. 276:1109-1112.
- Robson, E.A. 1973. THE DISCHARGE OF NEMATOCYSTS IN RELATION TO PROPERTIES OF THE CAPSULE. PUBLICATIONS OF THE SETO MARINE BIOLOGICAL LABORATORY. 20:653-673.
- Sanchez, C., P. Belleville, M. Popall, and L. Nicole. 2011. ChemInform Abstract: Applications of Advanced Hybrid Organic-Inorganic Nanomaterials: From Laboratory to Market. 696-753 pp.
- Sanchez, C., B. Julian-Lopez, P. Belleville, and M. Popall. 2005. Application of Hybrid Organic–Inorganic Nanocomposites. 3559-3592 pp.
- Sarras, M.P., Jr., D. Meador, and X.M. Zhang. 1991. Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris*. II. Influence of collagen and proteoglycan components on head regeneration. *Dev Biol*. 148:495-500.
- Savage, K.N., and J.M. Gosline. 2008. The role of proline in the elastic mechanism of hydrated spider silks. *J Exp Biol*. 211:1948-1957.
- Scadden, D.T. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 441:1075-1079.
- Scappaticci, A.A., Jr., F. Kahn, and G. Kass-Simon. 2010. Nematocyst discharge in *Hydra vulgaris*: Differential responses of desmonemes and stenoteles to mechanical and chemical stimulation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 157:184-191.
- Schaible, R., F. Ringelhan, B.H. Kramer, and T. Miethke. 2011. Environmental challenges improve resource utilization for asexual reproduction and maintenance in hydra. *Exp Gerontol*. 46:794-802.
- Schaible, R., A. Scheuerlein, M.J. Danko, J. Gampe, D.E. Martinez, and J.W. Vaupel. 2015. Constant mortality and fertility over age in *Hydra*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:15701-15706.
- Schaller, H.C., I. Hermans-Borgmeyer, and S.A. Hoffmeister. 1996. Neuronal control of development in hydra. *Int J Dev Biol*. 40:339-344.
- Schierwater, B., M. Eitel, W. Jakob, H.J. Osigus, H. Hadry, S.L. Dellaporta, S.O. Kolokotronis, and R. Desalle. 2009. Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoon" hypothesis. *PLoS Biol*. 7:e20.
- Schlesinger, A., E. Zlotkin, E. Kramarsky-Winter, and Y. Loya. 2009. Cnidarian internal stinging mechanism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 276:1063-1067.
- Schuler, A., G. Schmitz, A. Reft, S. Özbek, U. Thurm, and E. Bornberg-Bauer. 2015. The Rise and Fall of TRP-N, an Ancient Family of Mechanogated Ion Channels, in Metazoa.
- Shih, Y.R., C.N. Chen, S.W. Tsai, Y.J. Wang, and O.K. Lee. 2006. Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. *Stem Cells*. 24:2391-2397.
- Shin, S.H., O. Purevdorj, O. Castano, J.A. Planell, and H.W. Kim. 2012. A short review: Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration. *J Tissue Eng*. 3:2041731412443530.
- Shin, Y.M., M.M. Hohman, M.P. Brenner, and G.C. Rutledge. 2001. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer*. 42:09955-09967.
- Showalter, A.M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*. 5:9-23.
- Showalter, A.M., B. Keppler, J. Lichtenberg, D. Gu, and L.R. Welch. 2010. A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Plant Physiology*. 153:485-513.
- Siebert, S., F. Anton-Erxleben, and T.C. Bosch. 2008. Cell type complexity in the basal metazoan *Hydra* is maintained by both stem cell based mechanisms and transdifferentiation. *Dev Biol*. 313:13-24.
- Slautterback, D.B., and D.W. Fawcett. 1959. The development of the cnidoblasts of *Hydra*; an electron microscope study of cell differentiation. *J Biophys Biochem Cytol*. 5:441-452.
- Sneddon, I.N. 1965. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*. 3:47-57.
- Soffer, L., X. Wang, X. Zhang, J. Kluge, L. Dorfmann, D.L. Kaplan, and G. Leisk. 2008. Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts. *J Biomater Sci Polym Ed*. 19:653-664.

- Spemann, H., and H. Mangold. 2001. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *Int J Dev Biol.* 45:13-38.
- Stafstrom, J.P., and L.A. Staehelin. 1986. The role of carbohydrate in maintaining extensin in an extended conformation. *Plant Physiol.* 81:242-246.
- Steele, R.E., C.N. David, and U. Technau. 2011. A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution. *Trends Genet.* 27:7-13.
- Stoehr, A., Y. Yang, S. Patel, A.M. Evangelista, A. Aponte, G. Wang, P. Liu, J. Boylston, P.H. Kloner, Y. Lin, M. Gucek, J. Zhu, and E. Murphy. 2016. Prolyl hydroxylation regulates protein degradation, synthesis, and splicing in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 110:346-358.
- Sugiyama, T., and T. Fujisawa. 1977. Genetic analysis of developmental mechanisms in Hydra I. Sexual reproduction of Hydra magnipapillata and isolation of mutants. *Development, Growth & Differentiation.* 19:187-200.
- Sun, G., L. Sun, H. Xie, and J. Liu. 2016. Electrospinning of Nanofibers for Energy Applications. *Nanomaterials.* 6:129.
- T. Lewis, N., M. Hussain, and J. J. Mao. 2008. Investigation of Nano-mechanical properties of Annulus Fibrosus using Atomic Force Microscopy. 1008-1019 pp.
- Tan, L., S. Eberhard, S. Pattathil, C. Warder, J. Glushka, C. Yuan, Z. Hao, X. Zhu, U. Avci, J.S. Miller, D. Baldwin, C. Pham, R. Orlando, A. Darvill, M.G. Hahn, M.J. Kieliszewski, and D. Mohnen. 2013. An Arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *Plant Cell.* 25:270-287.
- Tang, X., Y. Nakata, H.O. Li, M. Zhang, H. Gao, A. Fujita, O. Sakatsume, T. Ohta, and K. Yokoyama. 1994. The optimization of preparations of competent cells for transformation of E. coli. *Nucleic Acids Res.* 22:2857-2858.
- Tardent, P., and T. Holstein. 1982. Morphology and morphodynamics of the stenotele nematocyst of Hydra attenuata Pall. (Hydrozoa, Cnidaria). *Cell and tissue research.* 224:269-290.
- Taylor. 1969. Electrically driven jets. *Proc R Soc London.* 313A:453-475.
- Technau, U., and R.E. Steele. 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development.* 138:1447-1458.
- Teo, W.E., R. Inai, and S. Ramakrishna. 2011. Technological advances in electrospinning of nanofibers. *Sci Technol Adv Mater.* 12:013002.
- Teragawa, C.K., and H.R. Bode. 1995. Migrating interstitial cells differentiate into neurons in hydra. *Dev Biol.* 171:286-293.
- Thorington, G.U., and D.A. Hessinger. 1988. Control of Cnida Discharge: I. Evidence for Two Classes of Chemoreceptor. *The Biological Bulletin.* 174:163-171.
- Todaro, D., and G.M. Watson. 2012. Force-dependent discharge of nematocysts in the sea anemone *Haliplanella luciae* (Verrill). *Biol Open.* 1:582-587.
- Trembley, A. 1744. Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce à bras en forme de cornes. Leide: J. and H. Verbeek.
- Tripathi, N., S. Kannusamy, A. Jana, and P.V.L. Rao. 2009. High Yield Production of Heterologous Proteins with Escherichia coli. 137-146 pp.
- Tursch, A. 2015. Functional Analysis of Cysteine-Rich Domains in Hydra Minicollagen Master Thesis.
- Tursch, A., D. Mercadante, J. Tennigkeit, F. Grater, and S. Ozbek. 2016. Minicollagen cysteine-rich domains encode distinct modes of polymerization to form stable nematocyst capsules. *Sci Rep.* 6:25709.
- Tziveleka, L.-A., E. Ioannou, D. Tsiourvas, P. Berillis, E. Foufa, and V. Roussis. 2017. Collagen from the Marine Sponges *Axinella cannabina* and *Suberites carnosus*: Isolation and Morphological, Biochemical, and Biophysical Characterization. *Marine Drugs.* 15:152.
- Valentin, R., C. Cerclier, N. Geneix, V. Aguié-Beghin, C. Gaillard, M.C. Ralet, and B. Cathala. 2010. Elaboration of extensin-pectin thin film model of primary plant cell wall. *Langmuir.* 26:9891-9898.
- van Beek, J.D., S. Hess, F. Vollrath, and B.H. Meier. 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.

- van Eldijk, M.B., C.L. McGann, K.L. Kiick, and J.C.M. van Hest. 2012. Elastomeric Polypeptides. *Topics in current chemistry*. 310:71-116.
- Velasquez, M., J.S. Salter, J.G. Dorosz, B.L. Petersen, and J.M. Estevez. 2012. Recent Advances on the Posttranslational Modifications of EXTs and Their Roles in Plant Cell Walls. *Frontiers in plant science*. 3:93.
- Velasquez, S.M., N.D. Iusem, and J.M. Estevez. 2011a. Root hair sweet growth. *Plant Signal Behav.* 6:1600-1602.
- Velasquez, S.M., E. Marzol, C. Borassi, L. Pol-Fachin, M.M. Ricardi, S. Mangano, S.P. Juarez, J.D. Salter, J.G. Dorosz, S.E. Marcus, J.P. Knox, J.R. Dinneny, N.D. Iusem, H. Verli, and J.M. Estevez. 2015. Low Sugar Is Not Always Good: Impact of Specific O-Glycan Defects on Tip Growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 168:808-813.
- Velasquez, S.M., M.M. Ricardi, J.G. Dorosz, P.V. Fernandez, A.D. Nadra, L. Pol-Fachin, J. Egelund, S. Gille, J. Harholt, M. Ciancia, H. Verli, M. Pauly, A. Bacic, C.E. Olsen, P. Ulvskov, B.L. Petersen, C. Somerville, N.D. Iusem, and J.M. Estevez. 2011b. O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science (New York, N.Y.)*. 332:1401-1403.
- Vinckier, A., and G. Semenza. 1998. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 430:12-16.
- Vogg, M.C., L. Beccari, L. Iglesias Olle, C. Rampon, S. Vríz, C. Perruchoud, Y. Wenger, and B. Galliot. 2018. An evolutionary-conserved Wnt3/ β -catenin/Sp5 feedback loop restricts head organizer activity in Hydra. *bioRxiv*.
- Walters, B.D., and J.P. Stegemann. 2014. Strategies for Directing the Structure and Function of 3D Collagen Biomaterials across Length Scales. *Acta biomaterialia*. 10:1488-1501.
- Wang, J., J.L. Buss, G. Chen, P. Ponka, and K. Pantopoulos. 2002. The prolyl 4-hydroxylase inhibitor ethyl-3,4-dihydroxybenzoate generates effective iron deficiency in cultured cells. *FEBS Letters*. 529:309-312.
- Wang, J., B. Zhou, X.S. Liu, A.J. Fields, A. Sanyal, X. Shi, M. Adams, T.M. Keaveny, and X.E. Guo. 2015. Trabecular Plates and Rods Determine Elastic Modulus and Yield Strength of Human Trabecular Bone. *Bone*. 0:71-80.
- Watanabe, H., H.A. Schmidt, A. Kuhn, S.K. Hoger, Y. Kocagoz, N. Laumann-Lipp, S. Ozbek, and T.W. Holstein. 2014. Nodal signalling determines biradial asymmetry in Hydra. *Nature*. 515:112-115.
- Watson, G.M., and D.A. Hessinger. 1989. Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movements of swimming prey by chemoreceptors. *Science (New York, N.Y.)*. 243:1589-1591.
- Weber, J. 1989. Nematocysts (stinging capsules of Cnidaria) as Donnan-potential-dominated osmotic systems. 465-476 pp.
- Weber, J. 1990. Poly(γ -glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in Hydra (Hydrozoa, Cnidaria). *J Biol Chem*. 265:9664-9669.
- Weis-Fogh, T. 1961. Molecular interpretation of the elasticity of resilin, a rubber-like protein. *Journal of Molecular Biology*. 3:648-667.
- Westfall, J.A. 1966. The differentiation of nematocysts and associated structures in the cnidaria. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 75:381-403.
- Wilby, O.K., and G. Webster. 1970. Studies on the transmission of hypostome inhibition in hydra. *J Embryol Exp Morphol*. 24:583-593.
- Xia, T., W. Liu, and L. Yang. 2017. A review of gradient stiffness hydrogels used in tissue engineering and regenerative medicine. *J Biomed Mater Res A*. 105:1799-1812.
- Xie, K., Y. Yang, and H. Jiang. 2018. Controlling Cellular Volume via Mechanical and Physical Properties of Substrate. *Biophys J*. 114:675-687.
- Xu, C., M.S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu, J.D. Gold, and M.K. Carpenter. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 19:971-974.
- Yang, L., C.F. Fitie, K.O. van der Werf, M.L. Bennink, P.J. Dijkstra, and J. Feijen. 2008. Mechanical properties of single electrospun collagen type I fibers. *Biomaterials*. 29:955-962.
- Yeo, G.C., B. Aghaei-Ghareh-Bolagh, E.P. Brackenreg, M.A. Hiob, P. Lee, and A.S. Weiss. 2015. Fabricated elastin. *Advanced healthcare materials*. 4:2530-2556.
- Zapata, F., F.E. Goetz, S.A. Smith, M. Howison, S. Siebert, S.H. Church, S.M. Sanders, C.L. Ames, C.S. McFadden, S.C. France, M. Daly, A.G. Collins, S.H. Haddock, C.W. Dunn, and P.

- Cartwright. 2015. Phylogenomic Analyses Support Traditional Relationships within Cnidaria. PLoS One. 10:e0139068.
- Zenkert, C., T. Takahashi, M.-O. Diesner, and S. Özbek. 2011. Morphological and Molecular Analysis of the *Nematostella vectensis* Cnidom. PLoS ONE. 6:e22725.
- Zhang, X., C.B. Baughman, and D.L. Kaplan. 2008. In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth. Biomaterials. 29:2217-2227.
- Zhang, X., M.R. Reagan, and D.L. Kaplan. 2009. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev. 61:988-1006.
- Zhu, B., W. Li, R.V. Lewis, C.U. Segre, and R. Wang. 2015. E-Spun Composite Fibers of Collagen and Dragline Silk Protein: Fiber Mechanics, Biocompatibility, and Application in Stem Cell Differentiation. Biomacromolecules. 16:202-213.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Özbek der mir, trotz meines fachfremden wissenschaftlichen Hintergrunds, die Möglichkeit gegeben hat dieses spannende Thema zu bearbeiten. Ich bedanke mich sehr für den wertvollen, wissenschaftlichen Austausch und die Unterstützung während meiner gesamten Doktorandenzeit.

Weiterhin möchte ich meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Holstein für die interessanten und faszinierenden Diskussionen über Nematocysten danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe Özbek und Holstein danke ich für die freundliche Hilfsbereitschaft und die motivierenden Gespräche. Besonders hervorheben möchte ich Anja Tursch, die mir bei problematischen Fragen stets mit gutem Rat zur Seite stand. Herzlichen Dank!

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Tanaka für die Möglichkeit ein Forschungspraktikum in seiner Arbeitsgruppe an der Universität Kyoto absolvieren zu können und seine wertvolle Unterstützung innerhalb des Kooperationsprojektes. Hiermit möchte ich ebenfalls Federico Amadei, Esther Kimmle und Dr. Mariam Veschgini der Arbeitsgruppe Tanaka nennen. Die gemeinsame Forschung mit euch hat mir sehr gefallen. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und die schöne Zeit.

Bei Prof. Dr. Barner-Kowollik und Dr. Thomas Gegenhuber bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung von Hybridpolymeren.

Meiner Familie und meinem Freund Bernd Schneider danke ich für ihren starken emotionalen Beistand während der gesamten Zeit. Ihr habt mir die Kraft gegeben um diese Arbeit so wie sie vorliegt abschließen zu können.

9 Anhang

Verwendete Antikörper

Tabelle 14: Erstantikörper, die für die immunohistochemischen Analysen verwendet wurden.

Erstantikörper	Fixativ	Dauer	Verdünnung	Spezies
α -CPP-1	Lavdovsky	4 °C über Nacht	1:250	Ratte
α -Cnidoin/ α -CPP-1	Lavdovsky/ 4% PFA	4 °C über Nacht/ 30 Min., RT	1:125	Meerschwein/ Ratte

Tabelle 15: Erstantikörper, die für Western Blot-Analysen verwendet wurden.

Erstantikörper	Verdünnung	Blockierlösung	Spezies
α -CPP-1	1:1000	5 % Milch, 0,1 % Tween, 0,8 % PBS	Ratte
α -Cnidoin	1:1000	5 % Milch, 0,1 % Tween, 0,8 % PBS	Meerschwein
α -Tubulin	1:1000	5 % Milch, 0,1 % Tween, 0,8 % PBS	Maus
N-CRD	1:1000	5 % Milch, 0,1 % Tween, 0,8 % PBS	Meerschwein

Proteinsequenzen

Cnidoin

Folgende Sequenzabschnitte wurden farblich markiert:

Start-bzw. Stopcodon

His₆-Tag

CRD-Sequenz

Elastische Sequenz

```

                                TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTA
GGA TCC ATG GCT GCA CTT CCG GGA GGA GCA ACA TTC TCT GTA CCA CAA GCA GTT
  G  S  M  A  A  L  P  G  G  A  T  F  S  V  P  Q  A  V
AAG CAA TTG AGA TGC CCA GCA CCA TGT TCT CAA TCA TGT GCA TCA TCT GGA TGT
  K  Q  L  R  C  P  A  P  C  S  Q  S  C  A  S  S  G  C

```

TCT CCT AGC TGT TGC ATG AAT AGT ATG CCT CAA ATG CCA GCT TCT CTA TCA CCA
S P S C C M N S M P Q M P A S L S P
ATG ATG GGT GGA TGT GGT AAT CAA ATG CAG GGT TGT GAC CAA CAA TAT ATG ATG
M M G G C G N Q M Q G C D Q Q Y M M
GGG GGT TGC GGT GGA CAA ATG CAA GGT TGT GGA CAA CAA ATG CCT CAA ATG TCA
G G C G G Q M Q G C G Q Q M P Q M S
ATG GGG TGT GGA GGA CAA ATG CAA GGA TGC GGA CAA CAA ATG CCT ATA ATG ATG
M G C G G Q M Q G C G Q Q M P I M M
CCA GGT TGT GGA GCA CAA ATG CAA GGG TGT GGG CAA CAA ATG CCG CCA TTA ATG
P G C G A Q M Q G C G Q Q M P P L M
GGT GGT TGC GGA GGA CAA ATG CAA GGT TGT GGA CAA CAA ATG CCG CAA ATG GTC
G G C G G Q M Q G C G Q Q M P Q M V
GGT GGA TGT TTT GGA CAA ATG GTG GGT TGC GGC ACA CAA ACA TTT CAA AGT TCA
G G C F G Q M V G C G T Q T F Q S S
TTA AAA GCG CCC TGC GCA CCT AAC TCA ATT GGT TGT GGT CAG CAG CTT CGT GCT
L K A P C A P N S I G C G Q Q L R A
CCA ATG GTA TCA ATG ACG CCA GGT TGT GGT GGA CAA ATG CAA GGT TGT GGA CAG
P M V S M T P G C G G Q M Q G C G Q
CAA ATG CCA CCA ATG ATG TCT GGG TGT GGT GGA CAA ATG CAA GGT TGT GGG CAA
Q M P P M M S G C G G Q M Q G C G Q
CAA TCG CCA CCA ATG ATG TCA GGA TGT GTC GGA CAA ATG CAA GGT TGT GGG CAG
Q S P P M M S G C V G Q M Q G C G Q
CAA TTG CCA CTG ATG ATG CCA GGT TGT GTC GGG CAA ATG CAA GGT TGT GGA CAA
Q L P L M M P G C V G Q M Q G C G Q
CAA ATG CCT CCA ATG ATG TCT GGG TGT GGT GGT CAA ATG CAA GGT TGT GGA CAA
Q M P P M M S G C G G Q M Q G C G Q
CAA ATG CCA CCA ATG ATG TCT GGC TGT GGT GGT CAA ATG CAA GGT TGT GGG CAG
Q M P P M M S G C G G Q M Q G C G Q
CAA ATA ATG CCA ATG ATG GCT CCT ATC ATG CCA GGT TGT GGC GGA CAA ATG CAA
Q I M P M M A P I M P G C G G Q M Q

GCT GGC TGT GGT GGA CAG CAA GAA GAA CAA ATG CAG TTT AAA GTA AAA CTC CTT
 A G C G G Q Q E E Q M Q F K V K L L
 CCA CCT CAA ATT TAC TCT ATA CAA CAA CAA CAA CCT CAA CAG CAA TCG CAA TGC
 P P Q I Y S I Q Q Q Q P Q Q Q S Q C
 CCA CCA CAA TGC CAG CCA CAA ACA TGT CAG ATT GGA TGT CCA CAA ACA TGT TGT
 P P Q C Q P Q T C Q I G C P Q T C C
 ATG CAA TCT CAA CCT CAA ACT GCT ATG CAA ATG CCA CAA CCA ATG ATG GTA ATG
 M Q S Q P Q T A M Q M P Q P M M V M
 GGT GGA TGT GCA CCT TCA TGC CAG CAG CAA TGC ATA CCT TCG TGT CCA AGA GGT
 G G C A P S C Q Q Q C I P S C P R G
 TGT TGT GGA GCT TTT GGT AAA AAG AGA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA
 C C G A F G K K R L E H H H H H H *
 GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCAGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATA
 ACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

MAALPGGATFSVPQAVKQLRCPAPCSQSCASSGCSPPSCMNSMPQMPASLSPPMMGGCGNQMQGCDQQYMMGGCGG
 QMQGCGQQMPQMSMGGCGQMCGCGQQMPIMMPGCGAQMQGCGQQMPPMLGGCGGQMCGCGQQMPQMVGGCFGQMV
 GCGTQTFQSSLKAPCAPNSIGCGQQLRAPMVSMTPGCGGQMCGCGQQMPPMMSGCGGQMCGCGQQSPMMSGCVG
 QMQGCGQQQLPLMMPGCVGQMCGCGQQMPPMMSGCGGQMCGCGQQMPPMMSGCGGQMCGCGQQIMPMMAPIMPCCG
 GQMAGCGGQEEQMFKVKLLPPIYSIQQQQPQQQSQCPPQCPQTCCQIGCPQTCCMQSQPQTAMQMPQPMV
 MGGCAPSCQQQCIIPSCPRGCCGAFGKKRLEHHHHHH

pcDNA3.1-CPP-1-His

Folgende Sequenzabschnitte wurden farblich markiert:

Start-bzw. Stopcodon

His₆-Tag

CRD-Sequenz

Polyprolinstretch

Signalpeptid

Propeptid

CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
 ATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAG
 TCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
 ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTA

ACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCT AGC

ATG AAG ATA GCC CTT GCG GCG GGA TTG CTG TTA TTA GCG GTA AAC TCA GTT TAT

M K I A L A A G L L L L A V N S V Y

TCA AAG ACT ACT CCA GTA CCT ACA AAA AGA GGA ACT ACT CAC CCA ACC ACT AAA

S K T T P V P T K R G T T H P T T K

CCA ACA AAA GCA CCC ACA TGT CCA AAA CAA GGC AAA GAC TTT TAC GTC CAA ATT

P T K A P T C P K Q G K D F Y V Q I

AAA GTT TTG GGG CAA GGA GAC TGG TCA TAT GAA ATG ACA AGA GTT GAA ACT CCT

K V L G Q G D W S Y E M T R V E T P

GGC TTT CAA GAC ATG AGA GAA AAA CTT TAT GAC TGC GCT TTA CAA ACA TAT GCA

G F Q D M R E K L Y D C A L Q T Y A

GAT TAC GAT TTT TAC CAA GAT ATG ATT TTG CTA AGC TTG GAT AAC TCA ACT GGT

D Y D F Y Q D M I L L S L D N S T G

GGC TTT TTG GCA TCA TTT GCT ATT CGT TTC ACT AAA GAA GGA GAT GGT CAT TTG

G F L A S F A I R F T K E G D G H L

AAT AGA CTA ACA CAA GCA ATT CAA GCA GGA AAG TTT TGC GAT GTT GAA GTT GCA

N R L T Q A I Q A G K F C D V E V A

CCA AAA TTT GTT CAA TGC GCC GAG CTT GAT CAA ACT ATG CTT TAT CCT ATG GCT

P K F V Q C A E L D Q T M L Y P M A

AAT TGT CCT GCA CCA TGT GGA GGA GAC TTA AAT TGT TGG CCA ACT TGT GAT GCT

N C P A P C G G D L N C W P T C D A

ACT TGT TGT GGA TCC CAA GAG CAA ACA ATA TAC ATA CCT GTT GCC CCA GCA CCG

T C C G S Q E Q T I Y I P V A P A P

CCA CCT CCA CCT CCA CCA CCA CCT CCT CCA CCA CCA CCA CCA CCA ATG ATG TCT

P P P P P P P P P P P P P P P M M S

ATG TGT GCT GCT GGT TGT CCA GAG ACT TGT GCT CCC TCA TGT TCG CCA ACT TGC

M C A A G C P E T C A P S C S P T C

TGC TTT GTA CAA AAA AGA TGG ATA GAG AAA CAA AAA GCC AAG TTT CAA ACC AAA

C F V Q K R W I E K Q K A K F Q T K

CAA CAG CGA TAT ATT GCT CCG AGA CAG AAA **CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA** CTC

Q Q R Y I A P R Q K **H H H H H H ***

GAGTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG

TTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTCTAATAAAAATGAGGAAA

TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATT

GGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCT

CTAGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCG

CTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGCTCCTTTTCGCTTTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTC
CCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCGCT AGC

ATG AAG ATA GCC CTT GCG GCG GGA TTG CTG TTA TTA GCG GTA AAC TCA GTT TAT
TCA AAG ACT ACT CCA GTA CCT ACA AAA AGA GGA ACT ACT CAC CCA ACC ACT AAA
CCA ACA AAA GCA CCC ACA TGT CCA AAA CAA GGC AAA GAC TTT TAC GTC CAA ATT
AAA GTT TTG GGG CAA GGA GAC TGG TCA TAT GAA ATG ACA AGA GTT GAA ACT CCT
GGC TTT CAA GAC ATG AGA GAA AAA CTT TAT GAC TGC GCT TTA CAA ACA TAT GCA
GAT TAC GAT TTT TAC CAA GAT ATG ATT TTG CTA AGC TTG GAT AAC TCA ACT GGT
GGC TTT TTG GCA TCA TTT GCT ATT CGT TTC ACT AAA GAA GGA GAT GGT CAT TTG
AAT AGA CTA ACA CAA GCA ATT CAA GCA GGA AAG TTT TGC GAT GTT GAA GTT GCA
CCA AAA TTT GTT CAA TGC GCC GAG CTT GAT CAA ACT ATG CTT TAT CCT ATG GCT
AAT TGT CCT GCA CCA TGT GGA GGA GAC TTA AAT TGT TGG CCA ACT TGT GAT GCT
ACT TGT TGT GGA TCC CAA GAG CAA ACA ATA TAC ATA CCT GTT GCC CCA GCA CCG
CCA CCT CCA CCT CCA CCA CCA CCT CCT CCA CCA CCA CCA CCA CCA ATG ATG TCT
ATG TGT GCT GCT GGT TGT CCA GAG ACT TGT GCT CCC TCA TGT TCG CCA ACT TGC
TGC TTT GTA CAA AAA AGA TGG ATA GAG AAA CAA AAA GCC AAG TTT CAA ACC AAA
CAA CAG **CGA TAT ATT GCT CCG AGA CAG AAA CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA CTC**

GAG

MKIALAAGLLLLLAVNSVYSK**TPVPT**KRGTTHTPTTKPTKAPTCPKQGKDFYVQIKVLGQGDWSYEMTRVETPGFQ
DMREKLYDCALQTYADYDFYQDMILLSLDNSTGGFLASFAIRFTKEGDGHLNRLTQAIQAGKFCDEVEVAPKQVQC
AELDQTMLYPMAN**CPAPCGGDLNCWPTCDATCCGSQEQTIIYIPVAPAPPPPPPPPPPPPPPPMMSMCAAGCPET**
CAPSCSPTCC FVQKRWIEKQKAKFQTKQQRRIAPRQ**KHHHHHHH**

pET21-CPP-1

Folgende Sequenzabschnitte wurden farblich markiert:

His₆-Tag

Stop-bzw. Startcodon

CRD-Sequenz

Polyprolinsequenz

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA

GCGGATAACAATTCCCCTCTAGGATCC GAA TTC **ATG** GGA ACT ACT CAC CCA ACC ACT AAA
M G T T H P T T K
CCA ACA AAA GCA CCC ACA TGT CCA AAA CAA GGC AAA GAC TTT TAC GTC CAA ATT
P T K A P T C P K Q G K D F Y V Q I

AAA GTT TTG GGG CAA GGA GAC TGG TCA TAT GAA ATG ACA AGA GTT GAA ACT CCT
 K V L G Q G D W S Y E M T R V E T P
 GGC TTT CAA GAC ATG AGA GAA AAA CTT TAT GAC TGC GCT TTA CAA ACA TAT GCA
 G F Q D M R E K L Y D C A L Q T Y A
 GAT TAC GAT TTT TAC CAA GAT ATG ATT TTG CTA AGC TTG GAT AAC TCA ACT GGT
 D Y D F Y Q D M I L L S L D N S T G
 GGC TTT TTG GCA TCA TTT GCT ATT CGT TTC ACT AAA GAA GGA GAT GGT CAT TTG
 G F L A S F A I R F T K E G D G H L
 AAT AGA CTA ACA CAA GCA ATT CAA GCA GGA AAG TTT TGC GAT GTT GAA GTT GCA
 N R L T Q A I Q A G K F C D V E V A
 CCA AAA TTT GTT CAA TGC GCC GAG CTT GAT CAA ACT ATG CTT TAT CCT ATG GCT
 P K F V Q C A E L D Q T M L Y P M A
 AAT TGT CCT GCA CCA TGT GGA GGA GAC TTA AAT TGT TGG CCA ACT TGT GAT GCT
 N C P A P C G G D L N C W P T C D A
 ACT TGT TGT GGA TCC CAA GAG CAA ACA ATA TAC ATA CCT GTT GCC CCA GCA CCG
 T C C G S Q E Q T I Y I P V A P A P
 CCA CCT CCA CCT CCA CCA CCA CCT CCT CCA CCA CCA CCA CCA CCA ATG ATG TCT
 P P P P P P P P P P P P P P P P M M S
 ATG TGT GCT GCT GGT TGT CCA GAG ACT TGT GCT CCC TCA TGT TCG CCA ACT TGC
 M C A A G C P E T C A P S C S P T C
 TGC TTT GTA CAA AAA AGA TGG ATA GAG AAA CAA AAA GCC AAG TTT CAA ACC AAA
 C F V Q K R W I E K Q K A K F Q T K
 CAA CAG CGA TAT ATT GCT CCG AGA CAG AAA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC
 Q Q R Y I A P R Q K L E H H H H H H
TGA GATCCGGCTGCTAACAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAG

*

CATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTG

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA

GCGGATAACAATTCCCCTCTAGGATCC GAA TTC **ATG** GGA ACT ACT CAC CCA ACC ACT AAA
 CCA ACA AAA GCA CCC ACA TGT CCA AAA CAA GGC AAA GAC TTT TAC GTC CAA ATT
 AAA GTT TTG GGG CAA GGA GAC TGG TCA TAT GAA ATG ACA AGA GTT GAA ACT CCT
 GGC TTT CAA GAC ATG AGA GAA AAA CTT TAT GAC TGC GCT TTA CAA ACA TAT GCA
 GAT TAC GAT TTT TAC CAA GAT ATG ATT TTG CTA AGC TTG GAT AAC TCA ACT GGT
 GGC TTT TTG GCA TCA TTT GCT ATT CGT TTC ACT AAA GAA GGA GAT GGT CAT TTG
 AAT AGA CTA ACA CAA GCA ATT CAA GCA GGA AAG TTT TGC GAT GTT GAA GTT GCA

CCA AAA TTT GTT CAA TGC GCC GAG CTT GAT CAA ACT ATG CTT TAT CCT ATG GCT
AAT TGT CCT GCA CCA TGT GGA GGA GAC TTA AAT TGT TGG CCA ACT TGT GAT GCT
ACT TGT TGT GGA TCC CAA GAG CAA ACA ATA TAC ATA CCT GTT GCC CCA GCA CCG
CCA CCT CCA CCT CCA CCA CCA CCT CCT CCA CCA CCA CCA CCA CCA ATG ATG TCT
ATG TGT GCT GCT GGT TGT CCA GAG ACT TGT GCT CCC TCA TGT TCG CCA ACT TGC
TGC TTT GTA CAA AAA AGA TGG ATA GAG AAA CAA AAA GCC AAG TTT CAA ACC AAA
CAA CAG CGA TAT ATT GCT CCG AGA CAG AAA CTC GAG **CAC CAC CAC CAC CAC CAC**
TGA GATCCGGCTGCTAACAAAGCCCAGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAG
CATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTG

MGTTHTTKPTKAPTCPKQKDFYVQIKVLGQGDWSYEMTRVETPGFQDMREKLYDCALQTYADYDFYQDMILLS
LDNSTGGFLASF AIRFTKEGDGHLNRLTQAIQAGKFCDEVPKQCAELDQTM LYPMANCPAP**CGGDLNCWPT**
CDATCCGSQEQTIIYIPVAPAPPPPPPPPPPPPPMMSMCAAGCPETCAPSCSPTCCFVQKRWIEKQKAKFQTK
QORYIAPRQKLEHHHHHHH

GEV2-CRD-Konstrukt

Folgende Sequenzabschnitte wurden farblich markiert:

PreScission Schnittstelle

CRD-Sequenz

NdeI Schnittstelle

GB-1-Protein mit His₆-Tag

Start-bzw. Stopcodon

GS-Überhang

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC
ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTCTCGCCACGTTTCGCCGCTTTCCCGG
TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGA
TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT
CTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGG
GATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTAACAAAAAT
ATTAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCAGCTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAT
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT
GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGA
AACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG
CGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAAC
CATGAGTGATAACACTGCGGCCAECTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCG
TGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC
CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGG
CTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC
TGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
AAAACCTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACG

TGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG
CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
TCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGG
CCACCATTCAAGAAGCTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG
TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTAAC
GGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATG
AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCG
CACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCG
TCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCT
GGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC
CTTTGAGTGAGCTGATAACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGA
GCGCCTGATGCGGTATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACA
ATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCACTGGCTGCGCCCC
GACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGA
CCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGTCACTACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAAGCT
CATCAGCGTGGTCTGAAGCGATTACAGATGTCTGCTGTTTCACTCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAA
GCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCG
TGTAAGGGGATTTCTGTTTCACTGGGGTAATGATAACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTG
ATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAG

GGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAAT
ACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCT
GACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTCACTGTTGTTGCTCAGGTCGAGACGTT
TTGCAGCAGCAGTGCCTTACAGTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCACTTCTGCTAACAGTAAGCAACCCCGCCAG
CCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGC
TTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCA
AGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACC
TGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAG
GAGCTGACTGGGTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTA
ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC
GCGGGGAGAGGGGTTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATT
GCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCGAGCGGCAAAAATCCTG
TTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTCGGTATCGTCGATATCCACTACCAGATATCCGC
ACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGC
AGTGGGAACGATGCCCTCATTACAGCATTGTCATGGTTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCTTCCCG
TTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGA
ACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACC
GTCTTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAAGAGACATCAAGAAAATAACGCCGGAACATTAGT
GCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCCTCCTGGTCACTCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGC
GAGAAGATTGTGACCCGCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTTACCATCGACACCACCAGCTGGCACC
CAGTTGATCGGCGGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAAC
GCCAATCAGCAACGACTGTTTCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGC
CGCTTCCACTTTTTTCCCGCTTTTTCGCAGAAAACGTGGCTGGCCTGGTTACCACGCGGGAAAACGGTCTGATAAGA
GACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGG
GCGCTATCATGCCATAACCGCAAAGGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCG
ACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGAAAGGAATGGTGCATGCA
AGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGCCACGGGGCCTGCCACCATAACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCC
CGAAGTGGCGAGCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGG
TGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG
GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATCGCAC
CACCACCACCACCACAGTACAAGCTTGGCTCTGAACGGTAAAACCTGAAAGGTGAAACCACCACCGAAGCTGTT
GACGCTGCTACCAGCGGAAAAGTTTTCAACAGTACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACCTACGAC
GACGCTACAAAACCTTACGGTAACCGAACTGGAAGTTCTGTTCCAGGGCCCCCTGGGATCCTATGGCGCGGCG
CCGCCGGGTGCGCCGCCGCTTCCCACCAGTTTGCCTGCTCAATGTGTTCCAACATGCCACAATACTGTTGT
CCCGCACCGCCGGGCTATCCGGCGGCCGGTGGCGCCCCGCGTACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGAT
CCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTT
GGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACATATATCCGGAT

GATCAT**ATG**CACCACCACCACCACCACCAGTACAAGCTTGCTCTGAACGGTAAAACCCTGAAAGGTGAAACCACC
 ACCGAAGCTGTTGACGCTGCTACCGCGGAAAAAGTTTTCAAACAGTACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAA
 TGGACCTACGACGACGCTACCAAAACCTTCACGGTAACCGAAGTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCC
 TATGGCGCGCGCCGCCGGGTGCGCCGCCCTGCCACCAGTTTGCCTTGTCAATGTGTTCCAACATGCCCA
 CAATACTGTTGTCCCGCACCGCCGG**GGC**TATCCGGCGGCCGGTGC GGCCCCCGCG**TGA**CTCGAGTCA

M H H H H H H Q Y K L A L N G K T L K G E T T T E A V D A A T A E K V F K Q
 Y A N D N G V D G E W T Y D D A T K T F T V T E **L E V L F Q G P L G S** Y G A
 A P P G A P P P **C P P V C V A Q C V P T C P Q Y C C** P A P P R Y P A A G A A
 P P

GATCAT

ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAG TAC AAG CTT GCT CTG AAC GGT AAA ACC CTG

M H H H H H H Q Y K L A L N G K T L

AAA GGT GAA ACC ACC ACC GAA GCT GTT GAC GCT GCT ACC GCG GAA AAA GTT TTC

K G E T T T E A V D A A T A E K V F

AAA CAG TAC GCT AAC GAC AAC GGT GTT GAC GGT GAA TGG ACC TAC GAC GAC GCT

K Q Y A N D N G V D G E W T Y D D A

ACC AAA ACC TTC ACG GTA ACC GAA CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA

T K T F T V T E **L E V L F Q G P L G**

TCC TAT GGC GCG GCG CCG CCG GGT GCG CCG CCG CCC TGC CCA CCA GTT TGC GTT

S Y G A A P P G A P P P C P P V C V

GCT CAA TGT GTT CCA ACA TGC CCA CAA TAC TGT TGT CCC GCA CCG CCG GGC TAT

A Q C V P T C P Q Y C C P A P P G Y

CCG GCG GCC GGT GCG GCC CCG CCG **TGA** CTCGAGTCA

P A A G A A P P *

Sonde für die *In situ* Hybridisierung

Folgende Sequenzabschnitte wurden farblich markiert:

Signalpeptid

Propeptid

Polyprolinstretch

N-CRD

CDS vollständig:

ATGAAGATAGCCCTTGCGGCGGGATTGCTGTTATTAGCGGTAAACTCAGTTTATTCAAAGAC
 TACTCCAGTACCTACAAAAGAGGAACACTCACCCAACCACTAAACCAACAAAAGCACCCA
 CATGTCCAAAACAAGGCAAAGACTTTTACGTCCAATTAAGTTTTGGGGCAAGGAGACTGG
 TCATATGAAATGACAAGAGTTGAAACTCCTGGCTTTCAAGACATGAGAGAAAACTTTATGA
 CTGCGCTTTACAAACATATGCAGATTACGATTTTACCAAGATATGATTTTGCTAAGCTTGG
 ATAACCTCAACTGGTGGCTTTTTGGCATCATTTGCTATTCGTTTCACTAAAGAAGGAGATGGT

CATTTGAATAGACTAACACAAGCAATTCAAGCAGGAAAGTTTTGCGATGTTGAAGTTGCACC
AAAATTTGTTCAATGCGCCGAGCTTGATCAAACCTATGCTTTATCCTATGGCTAATTGTCTG
CACCATGTGGAGGAGACTTAAATTGTTGGCCAACCTTGTGATGCTACTTGTGTGGATCCCAA
GAGCAAACAATATACATACCTGTTGCCCCAGCACCGCCACCTCCACCTCCACCACCACCTCC
TCCACCACCACCACCACCAATGATGTCTATGTGTGCTGCTGGTTGTCCAGAGACTTGTGCTC
CCTCATGTTCGCCAACCTGCTGCTTTGTACAAAAAAGATGGATAGAGAAACAAAAAGCCAAG
TTTCAAACCAAACAACAGCGATATATTGCTCCGAGACAGAAATAA

MKIALAAGLLLLAVNSVYSK^TTP^VPT^KRGTTHTTKPTKAPTCPKQKDFYVQIKVLGQGDW
SYEMTRVETPGFQDMREKLYDCALQTYADYDFYQDMILLSLDNSTGGFLASFAIRFTKEGDG
HLNRLTQAIQAGKFCDEVPKQCAELDQTMLYPMANCPAPCGGDLNCWPTCDATCCGSQ
EQT^IYIPVAPAPPPPPPPPPPPPPMMSMCAAGCPETCAPSCSPTCCFVQKRWIEKQKAK
FQTKQORYIAPRQK