

Department Chemie
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

Charakterisierung rekombinanter Flagelliform- Spinnenseidenproteine

Christian Ackerschott

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

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Th. Scheibel
2. Univ.-Prof. Dr. M. Rief

Die Dissertation wurde am 16.08.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20.09.2007 angenommen.

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Einführung	1
1.2	Strukturproteine	2
1.2.1	Keratine	2
1.2.2	Kollagen	5
1.2.3	Elastin	7
1.3	Seide	9
1.3.1	Natürliche Spinnenseide	9
1.3.2	Mechanische Eigenschaften der Spinnenseide	10
1.3.3	Assemblierung von Spinnenseide	12
1.3.4	Fangspirale	15
1.3.5	Flagelliform-Spinnenseide	16
1.3.6	Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Spinnenseide	18
1.4	Ziele der Arbeit	20
<u>2</u>	<u>Material & Methoden</u>	22
2.1	verwendete Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide und Proteine	22
2.1.1	Bakterienstämme	22
2.1.2	Plasmide und Bacmide	23
2.1.3	Oligonukleotide	24
2.1.4	Proteine und Antikörper	25
2.2	Chemikalien, Puffer, Medien und Kultivierung von Bakterien	25
2.2.1	Chemikalien	25
2.2.2	Puffer	26
2.2.3	Medien	27
2.2.4	Verwendete Kits	28
2.2.5	Antibiotika	28
2.2.6	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung	28
2.3	Geräte und Hilfsmittel	29
2.3.1	Geräte	29
2.3.2	Computerprogramme und Datenbanken	30
2.4	Molekularbiologische Techniken	30
2.4.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	30
2.4.2	Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.4.3	Präparation, Reinigung und Sequenzierung von DNA	32
2.4.4	Modifikation von DNA durch Restriktionsendonukleasen	32
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	33
2.4.6	Ligation	33
2.4.7	Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.4.8	Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide	35
2.4.9	Klonierung authentischer Seidengene	36
2.4.10	Klonierung synthetischer Seidengene	36
2.5	Expression und Reinigung	37
2.5.1	Expression authentischer Seidengenfragmente in Insektenzellen	37
2.5.2	Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter Proteine nach Synthese in Insektenzellen	39

2.5.3	Kinetik der Genexpression in <i>E. coli</i>	40
2.5.4	Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter Proteine nach Synthese in <i>E. coli</i>	40
2.5.5	Anzucht, Induktion und Ernte der Bakterien	40
2.5.6	Reinigung aus <i>inclusion bodies</i>	41
2.5.7	Reinigung durch Chromatographie	41
2.5.8	Selektive Fällung rekombinanter Proteine	42
2.5.9	Lyophilisation und Lagerung rekombinanter Proteine	43
2.6	Proteinanalytik	43
2.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.6.2	Färbung nach Fairbanks	44
2.6.3	Silberfärbung	45
2.6.4	Immunoblotting (Western Blot)	46
2.6.5	Carboxymethylierung	47
2.6.6	Redoxtitration	47
2.6.7	Löslichkeitsbestimmung	48
2.6.8	Aggregationsassay	48
2.6.9	UV-Absorptionsspektrometrie	49
2.6.10	Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD)	50
2.6.11	Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie	52
2.6.12	Fluoreszenzspektroskopie	52
2.6.13	Kopplung von Farbstoffen	53
2.6.14	Fluoreszenzmikroskopie	54
2.6.15	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	54
2.6.16	Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) und statische Lichtstreuung	54
2.6.17	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	56
2.6.18	Gießen von Proteinfilmen	57
2.6.19	Kopplung an Oberflächen	57
2.6.20	Ellipsometrie	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Expression und Reinigung	59
3.1.1	Rekombinante Produktion in Insektenzellen	59
3.1.2	Rekombinante Produktion in Bakterien	65
3.2	Strukturelle Untersuchungen	72
3.2.1	Sekundärstruktur	72
3.2.2	Tertiärstruktur	79
3.2.3	Quartärstruktur	80
3.2.4	Thermische Stabilität	85
3.2.5	Morphologische Untersuchungen	87
3.3	Assemblierungseigenschaften	88
3.3.1	Einfluss von Kaliumphosphat	89
3.3.2	Einfluss des pH-Werts	95
3.4	Assemblierungsformen rekombinanter Flagelliformseide	98
3.4.1	Gießen von Filmen	98
3.4.2	Sekundärstruktur von Filmen	100
3.4.3	Dickenbestimmung von Proteinschichten mittels Ellipsometrie	103

<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>107</u>
4.1	Rekombinante Herstellung von Flagelliform-Spinnenseide	107
4.2	Strukturuntersuchungen	110
4.3	Einfluss von Phosphat und pH	115
4.4	Proteinassemblee	118
4.5	Fazit	119
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>120</u>
<u>6</u>	<u>Literatur</u>	<u>122</u>
<u>7</u>	<u>Abkürzungen</u>	<u>132</u>
<u>8</u>	<u>Publikationen</u>	<u>134</u>
<u>9</u>	<u>Anhang</u>	<u>135</u>

1 Einleitung

1.1 Einführung

Proteine übernehmen innerhalb und außerhalb von Zellen zahlreiche Funktionen. Auf molekularer Ebene stellen sie die Grundlage sämtlicher biologischer Systeme dar: Als Enzyme katalysieren Proteine chemische Reaktionen in der Zelle, in Zellmembranen dienen sie als Transporter für Ionen oder andere Moleküle (Trötschel *et al.*, 2005; Krämer, 1998). In Signalkaskaden aktivieren sie Prozesse, die zur Zellvitalität beitragen, gleichermaßen können sie den programmierten Zelltod, die Apoptose, induzieren (Bras *et al.*, 2004; Werlen *et al.*, 2003). An der Zelloberfläche, sowie auf Phagen oder Viren bilden sie Rezeptoren zur Erkennung bestimmter bindender Liganden oder werden zum Andocken an diese Rezeptoren benötigt (Gauld *et al.*, 2002). Proteine nehmen jedoch nicht nur aktiv an der Steuerung solcher Abläufe teil, sondern dienen als Strukturproteine auch der Formgebung und Stabilisierung von Zellen (Cowin, 1999).

Für die Funktion von Proteinen ist deren korrekte Faltung essentiell. Die Raumstruktur wird durch die Abfolge der einzelnen Aminosäuren im Protein, die Primärstruktur, bestimmt. Durch Interaktionen, die auf elektrostatischen, van der Waals, hydrophoben oder kovalenten Wechselwirkungen beruhen können, entstehen lokale Strukturen, die Sekundärstruktur eines Proteins. Die übergeordnete räumliche Anordnung einzelner Sekundärstrukturelemente in einem monomeren Protein wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Die Entstehung eines Proteinkomplexes, eines Oligomers oder fibrillären Assemblats führen zur Quartärstruktur des Proteins. Diese Strukturen bevorzugen aus thermodynamischer Sicht immer einen Zustand möglichst geringer freier Energie, den thermodynamisch stabilsten Zustand. Steht jedoch genug Energie zur Verfügung, gewinnt die Kinetik der Faltung an Bedeutung. Für ein Protein gibt es meistens eine Struktur, die ein absolutes energetisches Minimum darstellt. Jedoch existieren unzählige weitere Konformationen, deren Änderung nur über eine Energiebarriere erfolgen kann. Die Struktur, die ein Protein tatsächlich einnimmt, ist nicht nur durch seine intrinsischen Eigenschaften zur Selbstorganisation, sondern auch durch die direkte chemische Umgebung beeinflusst (Jaenicke, 2005; Baldwin, 2005).

1.2 Strukturproteine

Strukturproteine besitzen aufgrund ihrer Primärstruktur die Fähigkeit, in höher geordnete Proteinkomplexe zu assemblieren. Dabei entsteht durch Anlagerung mehrerer gleichartiger Proteinmoleküle ein Material mit definierten mechanischen Eigenschaften (siehe 1.3.2). Strukturproteine existieren nicht nur innerhalb von Zellen (MacPhee, 2004), sie können auch extrazellulär assemblieren, wie beispielsweise die Seiden (siehe 1.3), welche von verschiedenen Tierarten gesponnen werden (Fischer, 1907). Der Assemblierungsmechanismus von Seiden ist auf molekularer Ebene bisher nicht vollständig verstanden. Daher werden hier zunächst genau solche Strukturproteine beispielhaft vorgestellt, deren Assemblierung weitgehend aufgeklärt werden konnte und die zudem Strukturen besitzen, die auch für bestimmte Seiden beschrieben wurden. Nach Röntgenbeugungsanalyse wurden Seiden aufgrund ihrer Strukturen in verschiedene Gruppen eingeteilt (Warwicker, 1960). Unter den Insekten produzieren beispielsweise Faltenwespen (*Vespidae*) eine Seide, deren Sequenz viele geladene Aminosäuren beinhaltet und deren Assemblierung der von Keratinen (siehe 1.2.1) gleicht (Rudall & Kenchington, 1971). Seiden von Nematiden, einer Unterfamilie der Blattwespen, werden zum Bau von Kokons verwendet und enthalten ein Drittel Glycin und ein Zehntel Prolin, womit die Assemblierung der von Kollagen (siehe 1.2.2) sehr nahe kommt (Rudall, 1962). Umgekehrt gibt es auch kollagenartige Proteine, die ihrerseits Seidensequenzen beinhalten (siehe 1.2.2). Eine besonders elastische Seide ist die Flagelliform-Spinnenseide, welche die Fangspirale im Spinnennetz bildet und die Grundlage dieser Arbeit darstellt, (siehe 1.3.4). Seiden dieses Typs besitzen Struktur motive, die im Elastin (siehe 1.2.3) vorhanden sind, welches für Elastizität in Gewebe sorgt.

1.2.1 Keratine

Die Molekülklasse der Keratine beinhaltet Struktur motive, die in den bereits erwähnten Seiden der Faltenwespen und einiger anderer Insekten vorkommen. Die Betrachtung ihrer Assemblierung soll verdeutlichen, dass es zwischen Primärstruktur und Assemblierung der Quartärstruktur einen direkten Zusammenhang gibt. Auch für die Seiden lassen sich dadurch Rückschlüsse auf den Charakter ihrer Struktur ziehen.

Keratine finden sich im Zytoskelett mehrzelliger Lebewesen, welches aus drei proteinogenen Filamentsystemen besteht: den Mikrofilamenten, den Mikotubuli und den intermediären Filamenten. Zu letzteren zählen die Keratine, die außerhalb des Zytoskeletts zusätzlich in

Haaren und im Horn vorkommen. Aufgrund ihrer Sekundärstruktur lassen sich Keratine in drei Domänen teilen. Sie bestehen aus einer α -helikalen stabförmigen Mitteldomäne und nicht-helikalen terminalen Domänen (Fuchs & Weber, 1994). Erste Untersuchungen mit Röntgenbeugung an α -Keratin ließen bereits vermuten, es handle sich dabei um eine sogenannte *coiled coil* Struktur (Crick, 1952).

Um die Primärstruktur aufzuschlüsseln, wurden alle Aminosäuren in Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe beinhaltet hydrophobe (H), eine zweite polare (P) Aminosäuren und zur dritte Gruppe gehören spezielle Aminosäuren wie Cystein, Glycin und Prolin. Cystein ist in der Lage kovalente Disulfidbrücken auszubilden, Glycin ist die einzige nicht-chirale Aminosäure und Prolin, dessen zyklische Seitenkette die Aminogruppe fixiert, verleiht einer Polypeptidkette eine starre Konformation.

Die Mitteldomäne von Keratin besteht hauptsächlich aus der siebenzähligen Wiederholungseinheit mit dem Schema HPPHPPP. Die daraus entstandene α -helikale Sekundärstruktur bildet in der Quartärstruktur umeinandergewundene Helices, sogenannte *supercoils*. Bei den Keratinen handelt es sich immer um Heterodimere, die aus α -Helices bestehen und in einen linksgängigen *supercoil* assemblieren. Dabei hat eins der beiden Monomere stets einen neutralen bis basischen isoelektrischen Punkt (pI) zwischen 6,1 und 7,8 und das andere Monomer einen sauren pI zwischen 4,9 und 5,7 (Strelkov *et al.*, 2003).

Eine *coiled coil* Struktur konnte auch bei zahlreichen anderen Proteinen oder Peptiden, wie den bereits erwähnten Insektenseiden, nachgewiesen werden. Im Allgemeinen falten diese erst in helikale Strukturen, um dann mit anderen Strängen zu *supercoils* zu assemblieren. Diese können aus Dimeren, Trimeren oder Tetrameren bestehen und sind meist, aber nicht zwangsläufig, linksgängig gewunden. Es werden zudem kanonische und nicht-kanonische *coiled coils* unterschieden, wobei die kanonischen aus einer Wiederholungssequenz von sieben Aminosäuren bestehen, was für die Keratine zutrifft. Diese falten zunächst in eine rechtsgängige α -Helix, die dann in linksgängige Bündel von *supercoils* assembliert (Abb. 1-1). Eine α -Helix enthält pro Windung 3,6 Aminosäuren. Um amphipathische Strukturen zu erhalten, muss jede dritte oder vierte Aminosäure hydrophob sein, wofür in globulären Proteinen zahlreiche verschiedene Kombinationen bekannt sind (Chothia *et al.*, 1981). Die kanonische siebenzählige Wiederholungseinheit HPPHPPP stellt wahrscheinlich die einfachste Möglichkeit dar, nach der Bildung der α -Helix in höher geordnete Strukturen zu assemblieren. Im Mittel ist jede 3,5te Position hydrophob, wodurch ein Bereich entsteht, der sich um die α -Helix (mit 3,6 Resten pro Drehung) herum windet. Abb. 1-1 zeigt die

Assemblierung in eine *supercoil*-Struktur: Aus einem Dimer lagern sich die beiden Helices nicht linear sondern in leicht verschlungener Form aneinander (Woolfson, 2005).

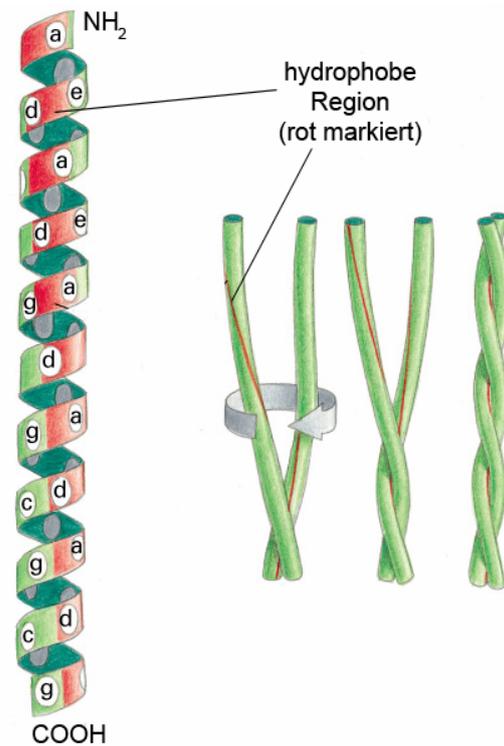


Abb. 1-1 – Schematische Darstellung der Struktur und Assemblierung von Keratin. Durch α -helikale Sekundärstruktur entsteht an der Oberfläche ein hydrophober Streifen, der bei der Assemblierung die Kontaktstelle zwischen zwei Helices bildet. Durch die Windung dieses Streifens bilden sich vorrangig linksgängige *supercoils*. Beim Keratin ist der *supercoil* aus einem Heterodimer aufgebaut (Alberts *et al.*, 2001)

Als nicht-kanonisch werden alle Wiederholungssequenzen bezeichnet, die von der Anzahl sieben abweichen. Diese bilden dann auch nicht notwendigerweise links-, sondern auch rechtsgängige *supercoils*. Ein Schlüssel zum Aufbau solcher Quartärstrukturen liegt in der Primärstruktur des Proteins oder Peptids.

An der Entstehung und Stabilisierung der *supercoil*-Strukturen sollen auch elektrostatische Wechselwirkungen und vor allem Salzbrücken verantwortlich sein (Steinmetz *et al.*, 2007; Lavigne *et al.*, 1996), wobei dieser Punkt kontrovers diskutiert wurde (Lumb & Kim, 1995). Strittig ist vor allem die Frage, ob Salzbrücken zwischen gegensätzlich geladenen Aminosäuren die Struktur stabilisieren und sogar ausbilden können oder ob lediglich die Orientierung der Helix oder die Wahl des Assemblierungspartners bei heteromultimeren *supercoils* festgelegt wird.

Mit diesen Erkenntnissen lassen sich auch Proteine oder Peptide generieren, die in genau vorhersehbare Strukturen assemblieren können. Auf diesem Prinzip basieren so genannte

selbst-assemblierende Fibrillen (SAF). Bei den SAF handelt es sich um designte Peptide die in der Primärstruktur die beschriebenen Muster des Keratins imitieren, um in *supercoils* assemblieren zu können (Woolfson & Ryadnov, 2006). Im Umkehrschluss lassen sich nun auch die Seiden, die in *coiled coils* assemblieren, bereits an ihrer Primärstruktur erkennen.

1.2.2 Kollagen

Die erwähnten Seiden einiger Blattwespen besitzen kollagenartige Strukturen. Auch bei diesen Seiden liegt die Information für die spätere Assemblierung in der Primärstruktur. Üblicherweise befinden sich Kollagene vor allem in Knochen, Knorpel, Sehnen, Bändern, Blutgefäßen und in der Haut. Dabei bestehen beispielsweise Sehnen fast ausschließlich aus Kollagen, während Elastin im Knorpel die Matrix für Kalziumhydroxyapatit bildet. Aus dem Primärstrukturmotiv $(GX_1X_2)_n$ assemblieren Tripel-Helices, die in der Struktur dem Typ poly(Pro)II und poly(Gly)II ähnlich sind und deren Aufbau in Abb. 1-2 exemplarisch dargestellt ist. Glycin sorgt an jeder dritten Position der Primärstruktur dafür, dass sich die drei umeinander gewundenen Stränge sehr nah kommen können, was durch die sterisch relativ anspruchslose Seitenkette des Glycins ermöglicht wird. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Aminogruppe des Glycins und der Carboxylgruppe von X_1 stabilisiert die Struktur zusätzlich. Die Steifigkeit der Struktur wird jedoch hauptsächlich durch Prolin auf Position X_1 und Hydroxyprolin auf X_2 erreicht. Letzteres bildet zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen aus, die sich ergänzend auf die Stabilisierung des Assemblats auswirken. Zurzeit sind 28 verschiedene Typen des Kollagens bekannt, die in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können. Kollagene vom Typ I, II, III, V und XI zählen zu den fibrillären Kollagenen (Silver & Christiansen, 1999). Typ I kommt in allen Geweben vor, am häufigsten in Knochen und Haut, und besteht aus zwei identischen Helices α_1 und einer weiteren Helix α_2 . Kollagenfibrillen erreichen eine Länge von bis zu 2,8 μm bei einem mittleren Durchmesser von 14 \AA . Die Denaturierung kann bei relativ hohen Temperaturen erfolgen. Dissoziierte Helices sind als Gelatine bekannt. Die Regenerierung in die Tripel-Helix erfolgt zumeist vollständig reversibel.

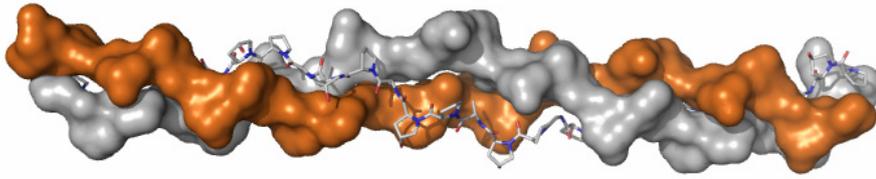


Abb. 1-2 – Kollagen Tripel-Helix. Drei Polypeptidketten sind linksgängig umeinander gewunden. Dabei sorgen Glycin für die räumliche Nähe und Prolin und Hydroxyprolin für die Stabilisierung der Struktur.

Neben den reinen Kollagenen existieren kollagenartige Proteine, die elastin- (siehe 1.2.3) oder siedenartige (siehe 1.3) Domänen beinhalten. Als Beispiel lassen sich die Proteine im Muschelbyssus, dem Faden, mit dem sich Muscheln am Untergrund festhalten, anführen. Während der kollagene Anteil mit dem typischen Primärstrukturmotiv $(GX_1X_2)_n$ das Grundgerüst der Byssusstruktur darstellt, verleihen die übrigen Domänen vermutlich ganz bestimmte mechanische Eigenschaften (siehe 1.3.2), die über die ganze Länge des Byssusfadens variieren. Im proximalen, der Muschel zugewandten Teil ist der Faden sehr fest, während er im distalen Teil sehr elastisch ist. Dies verhindert, dass sich die Muschel bei starkem Wellengang vom Untergrund löst oder darauf geschleudert wird (Waite *et al.*, 1998).

Neben ihrer Struktur und Assemblierung ist auch die Prozessierung von Kollagenen beschrieben, während sie für Seiden weitgehend unbekannt ist. Bekannt ist für letztere nur, dass Seiden über Vesikel aus den Epithelzellen transportiert werden (Plazaola & Candelas, 1991). Im Verlauf der Prozessierung von Kollagenen werden zunächst Präprokollagene im Zytoplasma der Zelle synthetisiert. Deren Translation erfolgt ins Endoplasmatische Retikulum (ER), wobei die Signalsequenz des noch einzelsträngigen Prokollagens abgespalten wird. Dort erfolgt die posttranslationale Modifizierung der Prokollagene, welche die Glycosylierung und Hydroxylierung durch die Prolyl-4-hydroxylase und die Lysylhydroxylase beinhaltet. Durch die Anlagerung der carboxyterminalen Domänen, die teilweise durch Disulfidbrücken stabilisiert werden, wird die Bildung der Tripel-Helix initiiert. Daraufhin verdrillen sich jeweils drei Proteinstränge wie bei einem Leucin-Zipper, wobei die cis-trans-Isomerisierung der Proline den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Creighton, 1993). Die Propeptide steuern die Assemblierung, die entweder extrazellulär oder bereits in Vesikeln erfolgt. Auf diese Weise werden die Kollagene vom Golgiapparat nach außen transportiert (Trelstad & Hayashi, 1979). Dabei sind die C-Propeptide für das laterale, die N-Propeptide für das lineare Fibrillenwachstum verantwortlich (Fleishmajer *et al.*, 1983). Anschließend werden die Propeptide abgespalten. Im Fall der

Seiden wurde bisher angenommen, dass aminoternale Signalsequenzen für die Sekretion aus den Epithelzellen verantwortlich sind (Bendtsen *et al.*, 2004; Rising *et al.*, 2006).

1.2.3 Elastin

Die Peptidmotive einiger Spinnenseiden, vor allem die von extrem elastischen Seiden (siehe 1.3.4), sind auch im Elastin vorhanden. Dieses sorgt vor allem in Arterien, in der Haut, im Lungen- und im Bindegewebe aufgrund seiner Elastizität für mechanische Belastbarkeit. Elastin besteht aus etwa 36 Domänen mit alternierenden hydrophoben und quervernetzenden Einheiten. Die hydrophoben Domänen enthalten hauptsächlich Glycin, Prolin, Leucin und Valin. Elastin wird als monomeres Tropoelastin synthetisiert und assembliert extrazellulär in polymere Strukturen (Mecham & Davis, 1994; Vrhovski & Weiss, 1998), die durch Vernetzung über Lysine stabilisiert werden. Das Enzym Lysyloxidase desaminiert dabei die Lysin-Seitenkette oxidativ und ermöglicht auf diese Weise die kovalente Quervernetzung. Die Selbstassemblierung von Elastin basiert wahrscheinlich auf mehreren Mechanismen. Tropoelastin besitzt die Tendenz, bei Temperaturen ab etwa 30 °C zu koazervieren, das bedeutet eine zuvor monodisperse oder kolloidale Lösung in zwei Phasen zu trennen. Dabei hängt die Temperatur der Phasenseparation von der Kettenlänge des Polypeptids und der Ionenstärke ab. In der öligen Phase, in welcher die Proteinkonzentration sehr hoch sein kann, können sich nun sowohl die hydrophoben Bereiche der einzelnen Tropoelastine, sowie auch die oxidierten Lysine aneinanderlagern und die Struktur des Elastins ausbilden (Keeley *et al.*, 2002). Ähnlich wie beim Kollagen tragen zusätzlich stereoelektronische Effekte zur Stabilität bei (DeRider *et al.*, 2002), was mit Fluor-substituierten Derivaten nachgewiesen werden konnte (Kim *et al.*, 2005). Anders als beim Kollagen sind hier Elastin-bindende Proteine notwendig, die den Transport durch die Zelle an die Oberfläche und die Löslichkeit in der Zelle regulieren (Hinek & Rabinovitch, 1994). Auch die Assemblierung verläuft ohne carboxy- oder aminoternale Propeptide, was die Anlagerung neu synthetisierten Elastins an ein bestehendes Netz von Fibrillen belegt (Ross *et al.*, 1977).

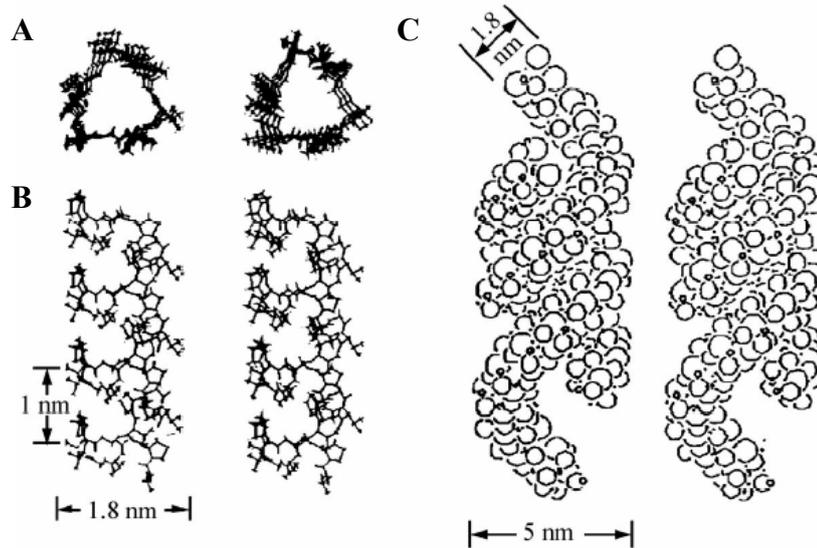


Abb. 1-3 – Vorgeschlagene molekulare Struktur des Motivs poly(GVGVP). Die β -Spiralen sind jeweils paarweise in ihrer atomaren Zusammensetzung in der Aufsicht (A) und Seitenansicht (B) dargestellt. Dargestellt sind außerdem assoziierte β -Spiralen, die mehrsträngige verdrehte Filamente ergeben (C) (nach Urry *et al.*, 2002)

In der Reihenfolge ihrer Häufigkeit finden sich folgende Wiederholungssequenzen im Elastin: Das Pentapeptid VPGVG, das Hexapeptid APGVGV, das Nonapeptid VPGFGVGAG und das Tetrapeptid VPGG (Sandberg *et al.*, 1985; Yeh *et al.*, 1987), von denen das Pentapeptid bis zu 50 Mal im Protein vorkommt. Polymere dieses Peptids sind, bis zu einer Kettenlänge von 150 Wiederholungen, in Wasser löslich und koazervieren bei 25 °C, wobei sie eine viskoelastische Phase bilden, die zu etwa 50 % (w/w) aus Protein besteht. Während das Polypeptid bei niedrigeren Temperaturen ausgedehnt und unstrukturiert ist, bildet es bei höheren Temperaturen Typ II β -Turns, die sogenannte β -Spiralen ausbilden, bei denen jede Windung drei Pentapeptide (VPGVG) enthält. Diese Struktur konnte durch NMR, Röntgenstrukturanalyse und CD nachgewiesen werden (Reiersen *et al.*, 1998). Dabei wird der Übergang vermutlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonyl des ersten Valins mit der Aminogruppe des vierten Valins unterstützt (Abb. 1-3).

Auch in anderen Elastin-Motiven wie VGVAPG oder GXXP konnten Turn-Strukturen in Abhängigkeit von cis- oder trans-Konformation des Prolins berechnet und detektiert werden (Floquet *et al.*, 2004). Die Elastizität der β -Spirale, die aus sehr flexiblen β -Turns aufgebaut ist, wird zudem entropisch begünstigt (Urry *et al.*, 2002). Die Übergangstemperatur, bei der diese β -Spiralen entstehen, wird durch den pH-Wert, die Ionenstärke, den Druck und posttranslationale Modifizierung beeinflusst (Urry *et al.*, 1993).

1.3 Seide

Seide wird als faserartiges Material für Kleidung verwendet und ist daher allgemein bekannt. Vor 5000 Jahren wurde in China erstmals Seide verarbeitet und bis heute für kommerzielle Zwecke genutzt, da sie kaum an Wert verloren hat. Dabei entstammt der Textilrohstoff Seide dem Kokon der Raupe des Seidenspinners *Bombyx mori*. Doch nicht nur Raupen können Seide spinnen. Innerhalb des Stamms der Gliederfüßer (*Arthropoda*) produzieren neben Insekten und Tausendfüßlern auch Spinnentiere (*Arachnida*) Seiden. Spinnenseiden besitzen sehr vielseitige Eigenschaften, die dem Netzbau und anderen Anwendungen zugute kommen. Im Allgemeinen bestehen Seiden aus Proteinfasern, deren Proteine repetitive Aminosäuresequenzen enthalten und im Tier in gelöster Form gespeichert werden. Die Fasern entstehen anschließend durch Scherung oder Verspinnen (Craig, 1997).

1.3.1 Natürliche Spinnenseide

Spinnenseide existiert bereits seit über 400 Millionen Jahren. Im Erdzeitalter des mittleren Devon gab es die ersten Spinnen, die ihre Beute mit Seidenfäden fingen (Zschokke, 2003). Aus der damals verwendeten Seide entwickelten sich die heute bekannten Seiden. Dabei gab es zunächst Spinnen, die ihre Beute mit einzelnen Fäden fingen. Andere hingegen bauten primitive dreieckförmige Netze. Später in der Evolution vorkommende Radnetzspinnen konstruieren hauptsächlich runde Netze, in denen unterschiedliche Seidenarten bestimmte Funktionen übernehmen. Insgesamt können weibliche Radnetzspinnen bis zu sieben verschiedene Seiden für unterschiedliche Anwendungen produzieren. Neben dem Netzbau dienen Seiden auch der Verpackung frisch gefangener Beute (*Aciniform*), als Schutz der gelegten Eier (*Cylindrical*), als Klebepunkt zwischen Seide und anderen Materialien (*Piriform*), als klebriger Mantel für den Faden selbst (*Aggregate*) oder auch als Hilfsspirale (*Minor Ampullate*) (Vollrath, 2000). Die beiden wichtigsten Fäden im Netz sind die Fäden für den Rahmen und die Speichen (*Major Ampullate*) sowie die Fangspirale (*Flagelliform*). Die so genannte Dragline-Seide wird in der *Major Ampullate*-Drüse produziert und ist der Haltefaden der Spinne. An ihm seilt sie sich ab und flieht vor Fressfeinden. Er wird im Netz als Stabilisator gebraucht und ist in den Speichen und im Rahmen der Konstruktion zu finden. Flagelliform-Seide bildet die Fangspirale, die zwischen den Radien des Netzes gespannt wird. Die Beute wird mit diesen Fäden in vollem Flug aus der Luft gefangen. Beide Seidenarten werden dabei nach Bedarf (beispielsweise zur Befestigung des Netzes) von den anderen genannten Seiden unterstützt.

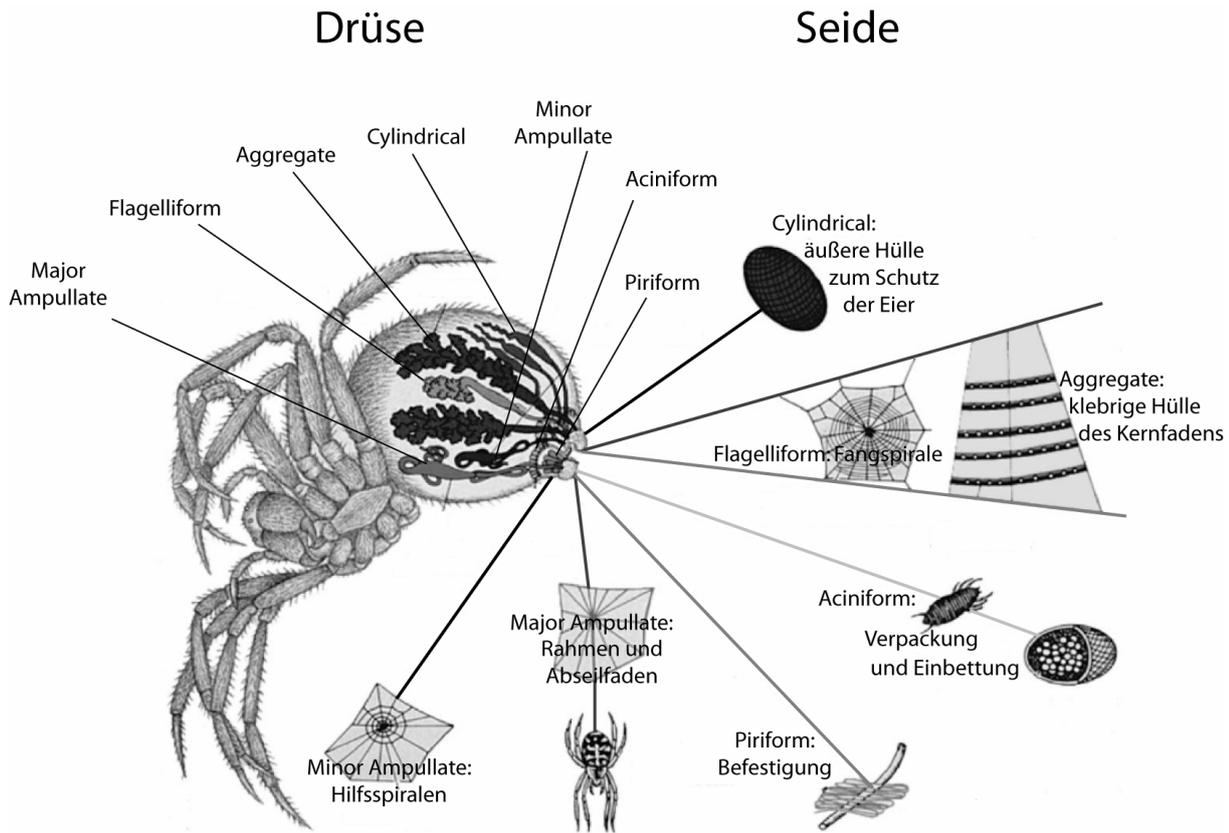


Abb. 1-4 – Spinnen können bis zu sieben verschiedene Seiden für unterschiedliche Anwendungen produzieren. Die Seiden unterscheiden sich nicht nur in ihrer Struktur und den mechanischen Eigenschaften, sie werden auch in separaten Drüsen produziert und im zugehörigen Spinnkanal assembliert (nach Vollrath, 2000).

1.3.2 Mechanische Eigenschaften der Spinnenseide

Interessant sind Spinnenseiden vor allem wegen ihrer mechanischen Eigenschaften, in denen sie vielen anderen synthetischen und biologischen Fasermaterialien überlegen sind. Mechanische Belastungen können in fünf Kategorien unterteilt werden: Zug, Druck, Torsion, Scherung und Biegung. Bei Seidenfäden ist vor allem ihre Zugbelastbarkeit entscheidend. Wirkt eine Kraft auf den Faden, reagiert das Material mit Spannung (σ) und Dehnung (ϵ). Beide Größen können graphisch in Beziehung gesetzt werden und führen zur so genannten Spannungs-Dehnungs-Kurve, die idealerweise als Gerade beginnt (Abb. 1-5). Dies deutet auf ein zunächst elastisches Verhalten hin, bei der sich das Material nach Entlastung sofort in seinen Ausgangszustand begibt und somit dem Hookeschen Gesetz folgt:

$$\sigma = E \cdot \epsilon$$

Die dabei auftretende Steigung der Geraden beschreibt den Elastizitätsmodul (E) oder auch Young Modul. Ein großer E -Modul bedeutet eine große Steifigkeit des Materials. Weiterhin lassen sich aus der Auftragung die maximale Spannung (σ_{\max}) und die maximale Dehnung (ε_{\max}) ermitteln, die das Material unter der größtmöglichen Belastung zeigt. Die Zugfestigkeit wird auch durch die Zähigkeit beschrieben, die der Energie entspricht, die benötigt wird um das Material zu zerreißen.

Ein Abflachen der Kurve im Spannungs-Dehnungs-Diagramm deutet auf ein nicht-konstantes E -Modul hin. Damit ist das Verhalten des Materials nicht mehr ideal elastisch. Aus diesem Grund wird bei solchen Materialien die Initialsteigung der Kurve (E_{init}) angegeben. Es werden außer der elastischen noch zwei weitere Phasen beschrieben. In der letzten Phase, kurz vor dem Zerreißen, reagieren die meisten Materialien plastisch. Nach der Entlastung ändern sie ihre Form nicht mehr. Zwischen der elastischen und plastischen Phase existiert meistens eine viskoelastische Phase, in der das Material zwar wieder relaxieren kann, jedoch nicht mehr ideal elastisch. Der Energieverlust kann dabei durch die sogenannte Hysterese bestimmt werden, die im Diagramm der Fläche, die zwischen der Zug- und der Entlastungskurve entsteht, entspricht.

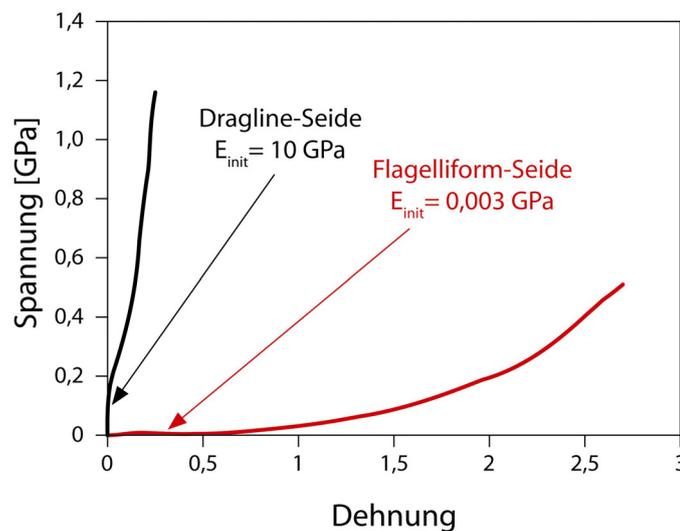


Abb. 1-5 – Spannungs-Dehnungs-Diagramm für Dragline- und Flagelliform-Seide. An beiden Seiden wurde bis zum Reißen des Materials gezogen. Daraus ergeben sich die Werte für die maximale Spannung (σ_{\max}), für die maximale Dehnung (ε_{\max}), sowie aus der Initialsteigung die Steifigkeit (nach Gosline *et al.*, 1999).

Die bereits erwähnte Dragline-Seide besitzt eine vergleichsweise hohe Steifigkeit und eine hohe maximale Spannung, vergleichbar mit der maximalen Spannung von hochfestem Stahl. Gleichzeitig aber ist Dragline-Seide dehnbarer als Stahl, womit die Seide auch zäher ist. Die maximale Spannung der Flagelliform-Seide ist nur etwa halb so groß wie die der Dragline-Seide, dafür beträgt ihre maximale Dehnung 2,7, was nur noch von Gummi mit einer

8,5fachen Dehnung übertroffen wird (vgl. Abb. 1-5). Gummi jedoch ist kaum spannbar und damit übertrifft die Zähigkeit der Flagelliform-Seide mit 150 MJ m^{-3} die von Gummi (100 MJ m^{-3}). Repräsentative mechanische Parameter verschiedener natürlicher sowie synthetischer Materialien sind in Tab. 1.1 zusammengefasst.

Material	Elastizitätsmodul, E_{init} [GPa]	Spannung, σ_{max} [GPa]	Dehnung, ϵ_{max}	Zähigkeit [MJ m ⁻³]
<i>Araneus diadematus</i> (Dragline-Seide)	10	1,1	0,27	160
<i>Araneus diadematus</i> (Flagelliform-Seide)	0,003	0,5	2,7	150
Kollagen (Sehne)	1,5	0,15	0,12	7,5
Knochen	20	0,16	0,03	4
Elastin	0,001	0,002	1,5	2
Gummi (synthetisch)	0,001	0,05	8,5	100
Kevlar 49 [®]	130	3,6	0,027	50
Hochfester Stahl	200	1,5	0,008	6

Tab. 1.1 – Mechanische Eigenschaften von Spinnenseiden sowie verschiedener natürlicher oder synthetischer Materialien (nach Gosline *et al.*, 1999).

1.3.3 Assemblierung von Spinnenseide

Jede einzelne Seide wird in der Spinne in paarweise angelegten separaten Drüsen produziert. Dabei variiert die Zusammensetzung der einzelnen Proteinreservoirlösungen. So besteht die Dragline-Seide aus zwei Proteinkomponenten (MaSp1 und MaSp2), während beispielsweise die Flagelliform-Seide (Flag) nur aus einer einzigen besteht.

Die Spinndrüse kann je nach Funktion in verschiedene Bereiche unterteilt werden (Abb. 1-6). Im proximalen, der Spinne zugewandten Teil befinden sich die sekretorischen Zellen der Drüse. Morphologisch existieren in diesem Teil die beiden Zonen A und B. Während in Zone A große zylinderförmige Epithelzellen sitzen, ist die Wand der Drüse in Zone B mit ähnlichen Zellen, die jedoch größere sekretorische Granula beinhalten, ausgestattet (Vollrath & Knight, 2001). In distaler Richtung schließt sich ein kurzer trichterförmiger Teil an, der in den eigentlichen Spinnkanal führt. Dieser ist S-förmig angelegt, führt also nicht auf direktem Weg zum Austrittsort des Seidenfadens, was für zur Assemblierung beitragende Prozesse essentiell ist. Auf seiner ganzen Länge wirkt die Wand des Spinnkanals wie eine Dialysemembran, über

die der Seidenlösung Wasser entzogen wird. Kurz vor dem Ende des Spinnkanals befindet sich ein Muskel, der nicht nur den Austritt des Fadens kontrolliert, sondern auch als Mechanismus dient, der nach Abreißen des Fadens diesen wieder nachführt (Vollrath & Knight, 1999).

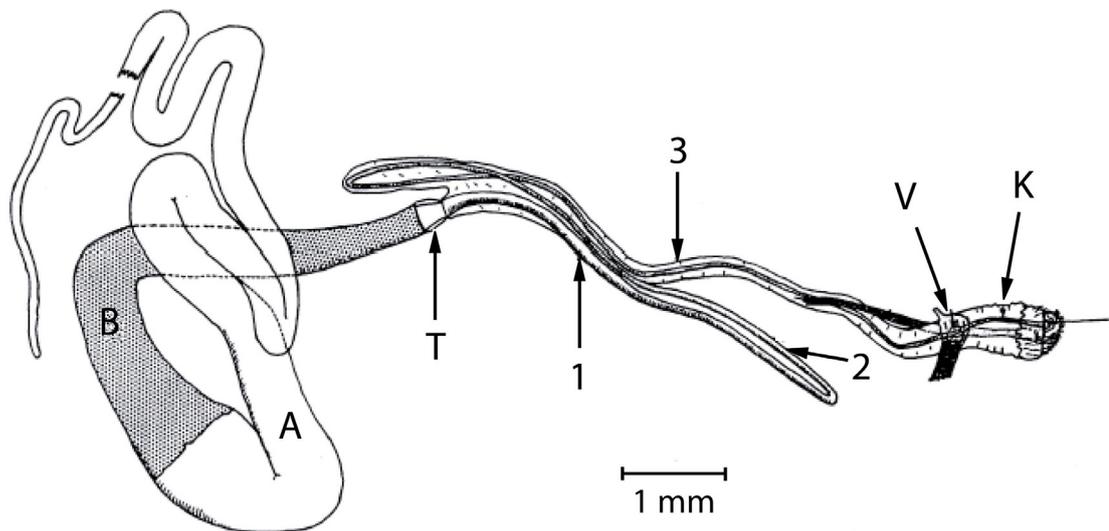


Abb. 1-6 – Zeichnung des Spinnapparats nach einer lichtmikroskopischen Aufnahme der *major ampullate* Drüse aus *Nephila edulis*. Die Spinndrüse setzt sich aus der A-Zone (A) und der B-Zone (B) zusammen, deren Ende sich trichterförmig verjüngt (T). Der sich anschließende Spinnkanal wird in einen proximalen (1), mittleren (2) und distalen (3) Bereich untergliedert. Bevor der fertig assemblierte Faden den Kanal verlässt, passiert er ein Ventil (V), welches durch einen Muskel geschlossen werden kann, und den terminalen Kanal (K), der zum Austrittsort des Fadens führt (Vollrath & Knight, 1999).

Nach ihrer Sekretion ins Lumen der Spinndrüse werden die Seidenproteine dort gespeichert, bis der Spinnvorgang beginnt. Dabei werden Proteinkonzentrationen von bis zu 50 % (w/v) in wässriger Lösung erreicht (Hijirida, 1996). Der Spinnvorgang wird durch den mechanischen Zug gesteuert, mit dem die Spinne den Faden aus der Drüsenöffnung zieht. Dadurch wird ein Laminarfluss der Proteinlösung in den Spinnkanal initiiert, in dem die chemische Prozessierung stattfindet, zu der verschiedene Faktoren beitragen (Rammensee *et al.*, 2007). Eine Änderung des pH-Werts ergibt sich durch eine Erhöhung der Protonenkonzentration. Ein Nachweis für die Existenz von Protonenpumpen in der Kanalwand wurde bereits erbracht (Vollrath *et al.*, 1998). Der pH-Wert sinkt dabei von 6,9 auf 6,3 (Vollrath & Knight, 2001), in der Literatur finden sich jedoch auch pH-Werte zwischen 7,3 und 6,3 (Dicko *et al.*, 2004), wodurch der durch Zug induzierte Übergang von gelöstem Protein in einen festen Faden beschleunigt wird (Knight *et al.*, 2000). Auch die Konzentration diverser Ionen, wie Natrium, Kalium, Phosphat, Sulfat und Chlorid konnte an verschiedenen Stellen im Kanal bestimmt

werden. Während die Konzentrationen von Natrium und Chlorid in distaler Richtung sinken, steigen die der übrigen Ionen (Vollrath & Knight, 2001), wie Abb. 1-7 zeigt. Dabei werden vor allem chaotrope Ionen gegen lyotrope ausgetauscht. Nach der Hofmeister-Serie führen diese zu verstärkten Interaktionen mit der Hydrathülle des Proteins, dessen hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt werden. Damit ist bei lyotropen Ionen ein Aussalzeffekt zu beobachten, der gleichzeitig mehr Struktur im Protein hervorruft (Baldwin, 1996).

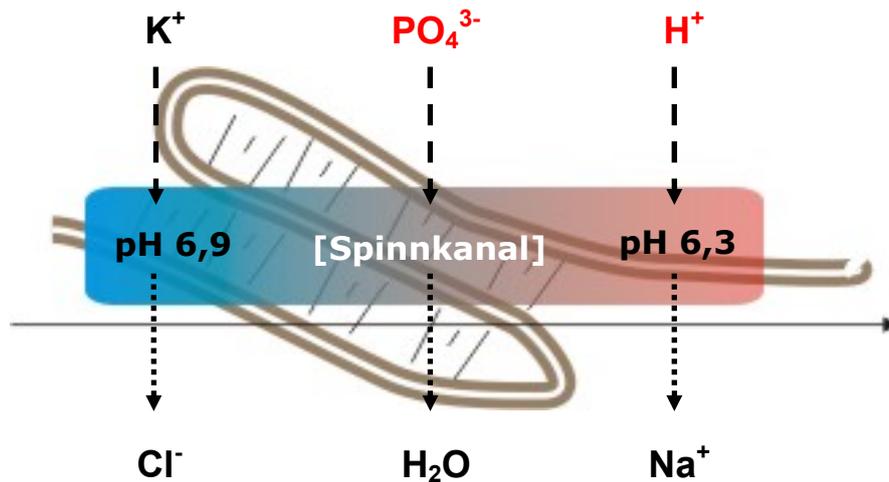


Abb. 1-7 – Änderung chemischer Parameter während der Assemblierung der Spinnenseide. Die Prozessierung zum Faden durch Änderung der Konzentration einiger Ionen und einer leichten Ansäuerung der Lösung. Der fertige Faden verlässt den Spinnkanal unter mechanischem Zug, während hoch konzentrierte Proteinlösung nachfließt (Schmidt, Diplomarbeit, 2006).

Der genaue Assemblierungsvorgang kann durch verschiedene Modelle beschrieben werden und startet immer mit dem unstrukturierten gelösten Protein (Hronska, 2004; Kenney, 2002). Bei einigen Seiden konnten aufgrund ihres amphiphilen Charakters bei hohen Konzentrationen im Spinnkanal Mizellen nachgewiesen werden, die nach außen hydrophil bleiben und ihre Löslichkeit somit erhalten. Durch physikalische Scherkräfte werden diese Mizellen entlang einer Zugachse gestreckt und erhalten dadurch eine längliche Morphologie, bevor sie schließlich zu einem Faden assemblieren (Jin *et al.*, 2003). Bei den meisten Spinnenseiden wird jedoch von der Bildung einer flüssigkristallinen Phase ausgegangen, in der die Proteine für die finale Fadenassemblierung durch Laminarfluss vororientiert werden. Mithilfe mikroskopischer Methoden konnten im Drüsensekret nematische, isotrope Phasen nachgewiesen werden (Kerkam *et al.*, 1991). Dafür sprechen auch die Bedingungen unter denen der Faden gesponnen wird, was unter Normaldruck und gewöhnlichen Außentemperaturen aus einer konzentrierten Proteinlösung geschieht. Die optische Doppelbrechung des Drüseninhalts stellt dabei den Anhaltspunkt für die Existenz nematischer Phasen dar.

Hingegen konnten im Spinnkanal der *Major Ampullate*-Drüse von *Nephila senegalensis* Fibrillen nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2002), was jedoch nicht grundsätzlich der Existenz einer zuvor flüssigkristallinen Phase, die durch Separation in eine proteinarme und proteinreiche Phase entstehen (Exler *et al.*, 2007), widersprechen würde.

Es wird außerdem vermutet, dass der Assemblierungsmechanismus von der Bildung von Keimen (*nuclei*) abhängig ist, die das Protein dazu bringen aus dem thermodynamisch günstigeren unstrukturierten Zustand in β -Faltblätter zu bilden (Li *et al.*, 2001). In fibrillären Assemblierungsformen rekombinanter Spinnenseiden konnten Ähnlichkeiten zur *cross- β* Struktur von amyloiden Fibrillen gezeigt werden (Slota *et al.*, 2007).

1.3.4 Fangspirale

Im Lauf der Zeit konnten Spinnen verschiedene Mechanismen zum Fangen von Beute etablieren (Vollrath, 2006). Der Faden der Fangspirale ist meist von einem Mantel umgeben, der die Adhäsion der Beute ermöglicht und zum Teil die mechanischen Eigenschaften der Fangspirale, dessen zentraler Faden aus Flagelliform-Seide besteht, verstärkt. Aufgrund der verschiedenen Adhäsionsmechanismen werden die Spinnen in *ecribellate* und *cribellate* unterschieden. *Cribellate* Seide ist trocken und beinhaltet einen starken Kernfaden, der von weiteren Proteinfäden umgeben ist. Gekräuselte Fäden dienen als eine Art Feder, um die Elastizität zu erhöhen, die anderen dienen als Fangwolle. Durch Reibung können sich die Fäden elektrostatisch aufladen. An diesen feinen Fäden entstehen große Kontaktflächen zum Beutetier, wodurch elektrostatische und van der Waals-Kräfte einen großen Anteil am Zurückhalten der Beute bekommen (Vollrath & Edmonds, 1989). Dieses Prinzip nutzen u. a. auch Geckos, um an Oberflächen unterschiedlicher Beschaffenheit haften zu bleiben (Lee *et al.*, 2007).

Ecribellate Seide ist mit einem wässrigen Film benetzt, aus dem an einigen Stellen tropfenförmige Gebilde entstehen. Diese Seide funktioniert nach einer Art Windenmechanismus, bei dem lose Kernfibrillen sich in diesen Tropfen aufrollen und bei mechanischer Belastung wieder abgewickelt werden können. Die den Faden umhüllende Flüssigkeit wird in zusätzlichen Drüsen (*Aggregate*) gebildet und besteht aus Glykoproteinen, Fetten, Salzen und zu 80 % aus Wasser (Tillinghast *et al.*, 1987; Vollrath, 1990). Wasser ist dabei von entscheidender Bedeutung. Zum einen unterstützt es die reversible Elastizität und die Superkontraktion, zum anderen sorgt es mit seiner Oberflächenspannung für die nötige Straffung des Fadens (Gosline, 1984).

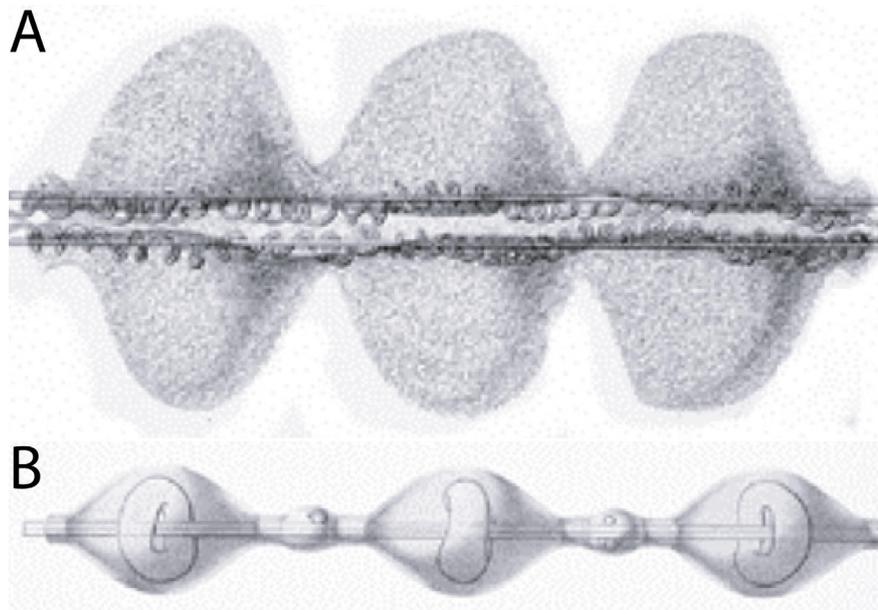


Abb. 1-8 – Der Unterschied zwischen cribellater (A) und ecribellater (B) Seide. Cribellate Seide besteht aus trockenen Fäden und Fibrillen, während sich ecribellate Seide aus einem zentralen Faden und einer benetzenden Flüssigkeit zusammensetzt. Dabei unterscheiden sich sowohl die Mechanismen zum Fangen von Beutetieren, wie auch die Klebrigkeit der Seiden.

1.3.5 Flagelliform-Spinnenseide

Der zentrale Faden der Fangspirale besteht aus dem Protein, welches in der Flagelliform-Drüse gebildet wird. Im Gegensatz zur Dragline-Seide besteht Flagelliform-Seide (Flag) aus nur einer einzigen Proteinkomponente. Wie andere Seidenproteine ist Flag aus einer langen repetitiven Sequenz aufgebaut, die von vergleichsweise kurzen nicht-repetitiven amino- und carboxyterminalen Sequenzen flankiert wird. Am besten untersucht ist die Sequenz der Flag-Seide der Spinne *Nephila clavipes*. Bei dieser Spinne handelt es sich um eine der größten Nord- und Mittelamerikas, die aufgrund der Reflexion ihres Netzes Goldene Radnetzspinne genannt wird. Die Größe von *Nephila clavipes* erleichterte die Präparation der Flagelliform-Drüse, woraufhin die Analyse der mRNA der Flagelliform-Seide erfolgte. Eine Abschätzung ihrer Länge lieferte unterschiedliche Werte zwischen 7,5 und 15,5 kb (Colgin & Lewis, 1998; Hayashi & Lewis, 1998). Eine genaue Sequenzanalyse wurde aufgrund der Guanin- und Cytosin-reichen DNA-Sequenz, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Sekundärstruktur in der mRNA sehr hoch ist, war nur partiell möglich (Hayashi & Lewis, 2001). Zusätzlich erschweren die ständig wiederholten Motive die Sequenzanalyse. Es wird von insgesamt 11 Gesamtwiederholungseinheiten im ganzen Protein ausgegangen, welche den mittleren Teil des Flag-Seidenproteins ausmachen. Das gesamte Protein besitzt eine Länge von etwa 360 kDa, wobei diese Abschätzung auf der mRNA-Analyse von Cheryl Hayashi (1998) basiert, zu der entsprechende Genbank-Einträge veröffentlicht sind

(AF027972, AF027973). Daneben wurden die Gensequenzen von Flag-Seide aus den Spinnen *Nephila madagascariensis* (AF218623, AF218624) (Hayashi & Lewis, 2000) sowie *Argiope trifasciata* (AF350264, AF350265) (Gatesy *et al.*, 2001) veröffentlicht, die zum Teil sehr hohe Homologie zu der Sequenz aus *N. clavipes* zeigen.

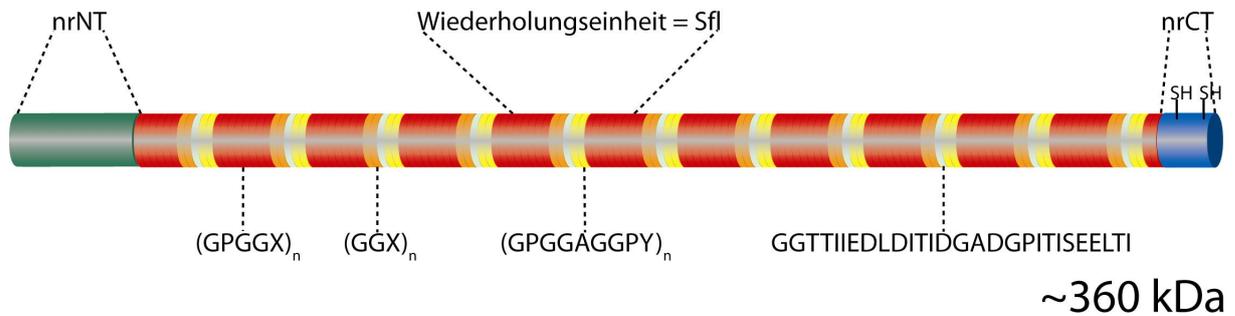


Abb. 1-9 – Schematische Darstellung des Flagelliform-Spinnenseidenproteins aus *Nephila clavipes*. Die amino- (nrNT) und carboxyterminalen (nrCT) Domänen bestehen aus nicht-repetitiven Sequenzen, während die mittlere Domäne sehr groß und hoch repetitiv ist. Sie ist aus 11 Wiederholungseinheiten (entspricht dem in dieser Arbeit eingeführten SfI) aufgebaut, in denen die einzelnen Motive ebenfalls repetitiv sind.

In der Proteinsequenz der Flag-Seide aus *N. clavipes* treten vier verschiedene Motive in immer gleicher Abfolge auf: ein Tri-, ein Penta- und ein Nonapeptid sowie ein Spacer. Das erste beinhaltet die Sequenz GGX, wobei X hauptsächlich für Serin, Tyrosin und Alanin steht. Das Motiv bildet im assemblierten Faden vermutlich eine 3_{10} -Helix. Das zweite Motiv besteht aus GPGGX, wobei mit X Serin, Tyrosin und Alanin gemeint sind. Durch dieses Motiv werden wahrscheinlich, wie auch beim Nonapeptid GPGGSGGPY, vorwiegend β -Turns im fertigen Faden gebildet. Diese Turns bilden β -Spiralen aus, die für die Elastizität des Fadens verantwortlich sind (Hayashi *et al.*, 1999) (Abb. 1-9). Diese Spiralen wirken vermutlich als molekulare Federn, wonach sich der Faden nach dem Hookeschen Gesetz verhält (Becker *et al.*, 2003). Ein hierarchisches Kettenmodell wurde der Wirkungsweise zugrunde gelegt. Es erklärt, wie einzelne Elemente der Proteinkette, nacheinander von der gestauchten in die gestreckte Form des Fadens übergehen und wieder relaxieren können (Zhou *et al.*, 2005). Das vierte Motiv der Mitteldomäne von Flag ist ein Spacer mit insgesamt 28 Aminosäuren. Dieser beinhaltet im Gegensatz zu den übrigen Motiven der Mitteldomäne sieben negativ geladene Aminosäure-Seitenketten. Eine spezielle Struktur ist für den Spacer bisher nicht bekannt; mit seinen Ladungen spielt er sehr wahrscheinlich eine Rolle während des Assemblierungsvorgangs der Seide. Insgesamt kommt er elf Mal im Protein vor, wobei das

Motiv mit Ausnahme von drei Positionen, an denen hydrophobe Aminosäuren sitzen, konserviert bleibt.

Die nicht-repetitive aminoternale Domäne ist bisher nicht gut charakterisiert. Mehrere mögliche Startkodons lassen vor allem bei den Dragline-Seiden vermuten, dass lange und kurze Isoformen nebeneinander existieren. Bei der Flagelliform-Seide scheint es nur eine Sequenz zu geben, die als Exon transkribiert wird. Diese entspricht mit einer hohen Ähnlichkeit der kurzen Isoform der aminoterminalen Dragline-Sequenz (Motriuk-Smith *et al.*, 2005). Eine kurze Peptidsequenz dient vermutlich als Signalsequenz für den Transport des Seidenproteins ins ER und weiter über den Golgiapparat in sekretorische Vesikeln aus der Zelle. Vermehrte und vergrößerte Golgi-Vesikel konnten während der Proteinsynthese bereits nachgewiesen werden (Plazaola & Candelas, 1991). Die hoch konservierte aminoternale Domäne nimmt nach Ergebnissen der Strukturvorhersage aufgrund ihrer hydrophoben Muster eine Helix-Turn-Helix-Konformation ein (Rising *et al.*, 2006; Motriuk-Smith *et al.*, 2005).

Ähnliche hydrophobe Muster treten in der carboxyterminalen Domäne auf, die in allen Seidenarten die gleiche Funktion haben soll, obwohl die Homologie der Sequenz nicht so hoch ist wie bei den aminoterminalen Domänen (Challis, 2006). In der carboxyterminalen Domäne befinden sich die beiden einzigen Cysteine im gesamten Flagelliform-Protein aus *Nephila clavipes*. Diese Domäne spielt wahrscheinlich bei der Assemblierung eine wichtige Rolle. Sie kann im assemblierten Faden immer noch detektiert werden und wird nicht – wie beispielsweise beim Kollagen – abgespalten (Spohner, 2004).

1.3.6 Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Spinnenseide

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Materialeigenschaften besteht großes Interesse an einem technischen Einsatz und somit an der großtechnischen Produktion von Spinnenseide. Diese direkt aus der Spinne zu ziehen ist prinzipiell möglich, jedoch nicht geeignet, wenn größere Mengen benötigt werden. Durch ihr kannibalistisches Verhalten lassen sich Spinnen nur unter großem Aufwand auf Farmen züchten. Zudem handelt es sich bei aus der Spinne gezogenen Fäden in den meisten Fällen um Dragline-Seide, da die anderen Seidenarten von der Spinne nur bei Bedarf produziert werden.

Verschiedene Versuche wurden unternommen, um Gene der Spinnenseide rekombinant zu exprimieren. Die Suche nach einem geeigneten Produktionsorganismus gestaltet sich aufgrund der spezifischen Verwendung von Kodons (*codon usage*) der DNA, die durch die RNase in mRNA transkribiert und später durch das Ribosom in die Aminosäuresequenz translatiert wird, nicht immer einfach. Beispielsweise können zur Übersetzung in ein Glycin

vier verschiedene Kodons verwendet werden (Tab. 1.2). Diese werden je nach Organismus unterschiedlich häufig verwendet.

Kodons für Glycin	prozentuale Verwendung der Kodons bei Genen der Klasse...		
	I	II	III
ggt	33	51	32
ggc	43	43	24
gga	9	2	25
ggg	15	4	19

Tab. 1.2 – Häufigkeit der Verwendung von Kodons für Glycin in *E. coli*. Dabei werden die Gene von *E. coli* in drei Klassen unterteilt: Die Klasse I beinhaltet Gene, die ein konstant niedriges bis mittleres Level der Expression zeigen, die Klasse II solche, die in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien stark exprimiert werden, und die Klasse III Gene, die für den horizontalen Gentransfer benötigt werden. Die Zahlen geben Prozentwerte an (nach Guerdoux-Jamet *et al.*, 1997).

Bei der Wahl des Organismus ist außerdem entscheidend, ob posttranslationale Modifizierungen die Assemblierung der Spinnenseide beeinflussen, was bisher jedoch nicht abschließend geklärt werden konnte.

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, Dragline-Seide rekombinant zu produzieren. Die kanadische Firma Nexia versuchte beispielsweise Seidengene in den Milchdrüsen von Ziegen zu exprimieren. Das Protein sollte nachher aus der Milch gereinigt werden. Zu diesem Zweck wurde ein *breed early lactate early (BELE)* Ziegenstamm aufgezogen (www.nexia.com). Bisher ist jedoch kein kommerzielles Produkt erhältlich (Williams, 2003).

In eukaryotischen Zelllinien wurden bereits erfolgreich Dragline-Seideproteine rekombinant synthetisiert. Dabei wurden vorwiegend Epithelzellen aus Rindereuter sowie eine Zelllinie aus Hamsternieren verwendet. Die zugrunde gelegten Gensequenzen stammen dabei aus *Araneus diadematus* oder *Nephila clavipes* und führten zu Proteinausbeuten von bis zu 37 mg/L Zellkultur (Lazaris *et al.*, 2002). Auch in Insektenzellen konnten mit 30 mg/L ähnliche Ausbeuten erreicht werden (Hümmerich *et al.*, 2004b).

Daneben konnte auch in Bakterien und Hefen rekombinantes Dragline-Seidenprotein produziert werden. Hier konnte die Ausbeute durch entsprechende Fermentationstechniken oder die erforderliche Anpassung der Kodons auf bis zu 1000 mg/L Kultur erhöht werden (Vendrely & Scheibel, 2007). Für die Anpassung der Kodons wurde ein Klonierungssystem etabliert, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde (siehe 2.4.10; Hümmerich *et al.*, 2004a; Scheibel, 2004).

Für die Flagelliform-Seide sind bisher nur zwei Versuche publiziert, bei denen eine erfolgreiche rekombinante Produktion möglich war. In beiden wurde die einzig gut bekannte Gensequenz der Flagelliform-Seide aus *Nephila clavipes* zugrunde gelegt. Die Genexpression in einer *Bombxy mori*-Zelllinie lieferte bis zu 13 mg Protein pro Liter Zellkultur (Miao *et al.*, 2006). Weiterhin konnte eine synthetische Sequenz in *E. coli* produziert werden. Diese beinhaltete jedoch nur ein einziges Motiv der Seide. Auch hier war die Anpassung der Kodons an das bakterielle System erforderlich (Zhou *et al.*, 2001).

Zur Strukturuntersuchung hingegen werden auch oft synthetische Peptidmotive herangezogen. Diese sind jedoch zu kurz um die entsprechenden Assemblierungseigenschaften zu zeigen (Ohgo *et al.*, 2006).

1.4 Ziele der Arbeit

Der Faden der Flagelliform-Spinnenseide aus der amerikanischen Goldenen Radnetzspinne *Nephila clavipes* weist eine extreme Elastizität und Zähigkeit auf und besteht aus nur einer einzigen Proteinkomponente (Flag). Die mechanischen und physikalischen Eigenschaften des Fadens hängen somit vom Aufbau, der Struktur und der Assemblierung dieses Proteins ab. Flagelliform-Seide lässt sich nur unter großem Aufwand direkt aus dem Netz der Spinne präparieren. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung und Optimierung biotechnologischer Verfahren zur rekombinanten Herstellung verschiedener Varianten des Proteins. Zunächst sollte dafür ein geeignetes System zur Expression der authentischen Gensequenzen gefunden und etabliert werden. Zusätzlich mussten die Gensequenzen an die Verwendung der Kodons in *Escherichia coli* angepasst werden, um auch hier eine optimale Genexpression zu ermöglichen. Für die synthetisierten Proteine sollte ein möglichst effizientes Reinigungsverfahren entwickelt werden.

Diese Arbeit diene dem Erwerb grundlegender Kenntnisse über das Verhalten von Flag vor, während und nach der Assemblierung. Dabei sollten gezielt einzelne Domänen von Flag synthetisiert werden, die jeden einzelnen Bereich des natürlichen Proteins nachahmen. Auf diese Weise konnte die Rolle jeder dieser Domänen im Hinblick auf ihre Aufgabe im gesamten Protein genau untersucht werden. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sollten im Hinblick auf die Strukturvorhersagen einzelner Motive verglichen, aber auch in Bezug auf komplexere Zusammenhänge interpretiert werden. Hier waren insbesondere chemische Faktoren zu untersuchen, die während der Assemblierung Einfluss auf das Protein haben. Ergänzend zu Experimenten mit den Einzeldomänen war es erforderlich die

Untersuchungen auch an Konstrukten durchzuführen, die aus mehreren Domänen bestehen, um den Einfluss der Domänen untereinander aufzudecken und die Frage zu klären, welche spezifischen Funktionen und Eigenschaften von Flag für die Seidenassemblierung essentiell sind.

Die biochemische Charakterisierung der rekombinanten Flag-Proteine sollte daher sowohl Struktur und Stabilität einzelner Konstrukte aber auch ihre Löslichkeit und ihr Verhalten unter dem Einfluss von Faktoren, die bei der natürlichen Seidenassemblierung eine Rolle spielen, umfassen. Darüber hinaus sollte das Potential der rekombinanten Flag-Proteine ausgeschöpft werden künstliche Assemblate, wie Filme, herzustellen. So sollten Erkenntnisse über den Aufbau und die Beziehung zwischen Struktur und Funktion innerhalb des Einkomponentensystems Flag gewonnen werden, die nicht nur für das wissenschaftliche Verständnis sondern auch für eventuelle Anwendungen von Bedeutung sind.

2 Material & Methoden

2.1 verwendete Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide und Proteine

2.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 2.1 – Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Firma
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F ⁻ <i>araD</i> 139Δ(<i>ara leu</i>) 7697 Δ <i>lacX74 galU galK mcrA</i> Δ(<i>mrr⁻ hsdRMS-mcrBC</i>) <i>rpsL decR</i> 380 Δ <i>lacZ</i> ΔM15 <i>endA1 nupG recA1</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>E. coli</i> DH10Bac	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr⁻ hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL nupG</i> /pMON14272 / pMON7124	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>E. coli</i> BLR (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) <i>recA⁻</i>	Novagen, Madison, WI, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) „Codon plus“	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>E. coli</i> Rosetta-Blue™ (DE3) pLacI	<i>endA1 hsdR17</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proA+B+</i> Δ <i>lacI^qZM15::Tn10</i> (tet ^R)] (DE3) pLacIRARE (Cm ^R)	Novagen, Madison, WI, USA

2.1.2 Plasmide und Bacmide

Zum Klonieren und für die Expression in Bakterien wurden folgende Plasmide verwendet:

Tab. 2.2 – Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Quelle
pGEM 3Zf(+)	Amp ^R , f1 ori, <i>lacZ</i>	Promega
pFastbac1	Amp ^R , Gen ^R , pUC ori, f1 ori, P _{PH} , Tn7, SV40	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pAZL	Amp ^R , pFastbac1 <i>mit zusätzlicher Klonierungskassette</i>	Hümmerich, 2004
pET21a	Amp ^R , T7, His-Tag (N), T7-Tag (N), f1 ori, <i>lacI</i>	Novagen, Madison, WI, USA
pET28a	Kan ^R , T7, His-Tag (N,C), T7-Tag (N), f1 ori, <i>lacI</i>	Novagen, Madison, WI, USA
pQE30	Amp ^R , PT5, lac O, His-Tag (N), Col E1	QIAGEN, Hilden
pQE60	Amp ^R , PT5, lac O, His-Tag (C), Col E1	QIAGEN, Hilden

Amp^R Resistenz gegen Ampicillin
 Kan^R Resistenz gegen Kanamycin
 Gen^R Resistenz gegen Gentamicin

Die jeweiligen Vektoren trugen entsprechende transgene Inserts, die kloniert und/oder exprimiert werden sollten.

Nach Transformation des Stamms *E. coli* DH10Bac mit dem Vektor pFastbac1 wurden entsprechende Inserts in Bacmid-DNA transponiert, die anschließend für die Transfektion von Insektenzellen präpariert werden konnte.

2.1.3 Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden synthetische Oligonukleotide verwendet, die sowohl als Matrizen zum Assemblieren eines DNA-Doppelstrangs als auch in der Polymerasekettenreaktion (PCR, von *polymerase chain reaction*) eingesetzt wurden. Für die Sequenzierung wurden, soweit nicht anders angegeben, Standardprimer eingesetzt (GATC, Konstanz).

Tab. 2.3 – Verwendete Oligonukleotide

Primer	Basensequenz (5'-3')
chr1-(GPGGX)-ds	TCCGGGCGGTGCGGGCCCAGGTGGCTATGGTCCGGGCGGTTC TGGGCCGGGTGGCTACGGTCCTGGCGGTTCCGGCCCCGGGTGG CTACGG
chr1-(GPGGX)-cs	GTAGCCACCCGGGCCCAGAACCGCCAGGACCGTAGCCACCCG GCCCAGAACCGCCCCGACCATAGCCACCTGGGCCCGCACCG CCCGGACC
chr2-(spacer)-ds	TGGCACCACCATCATTGAAGATCTGGACATCACTATTGATGG TGCGGACGGCCCCGATCACGATCTCTGAAGAGCTGACCATCGG
chr2-(spacer)-cs	GATGGTCAGCTCTTCAGAGATCGTGATCGGGCCGTCCGCACC ATCAATAGTGATGTCCAGATCTTCAATGATGGTGGTGCCACC
chr3- (GPGGAGGPY)-ds	TCCGGGCGGTGCTGGCGGTCCGTACGGCCCTGGTGGCGCAGG TGGGCCATATGGTCCGGGCGGTGCGGGCGGTCCGTACGG
chr3- (GPGGAGGPY)-cs	GTACGGACCGCCCCGCACCGCCCCGGACCATATGGCCCACCTGC GCCACCAGGGCCGTACGGACCGCCAGCACCGCCCCGGACC
chr4-(GGX)-ds	TGGCGCTGGTGGCGCCGGTGGCGCAGGTGGCTCTGGCGGTGC GGGCGGTTCCGG
chr4-(GGX)-cs	GGAACCGCCCCGCACCGCCAGAGCCACCTGCGCCACCGGCGC CACCAGCGCCACC
FLAG-N-chr-sense	GAAAAACCATGGGCGAAAGCAGCGGAGGCGAT
FLAG-N-chr-anti	GAAAAGAAGCTTTCATTAGCCTGGGCTGTATGGTCC
FLAG-C-chr-sense	GAAAAACCATGGGTGCTTATTATCCTAGCTCGC
FLAG-C-chr-anti	GAAAAGAAGCTTTCATTAGCCATAAGCGAACATTCTTCCTAC

2.1.4 Proteine und Antikörper

Protein	Firma
monoklonales α -Maus-IgG-POD Konjugat	Sigma, St. Louis, USA
monoklonaler α -His ₆ Antikörper (Maus)	Sigma, St. Louis, USA
monoklonaler α -T7-Tag Antikörper (Maus)	Novagen, Madison, WI, USA
Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche, Mannheim, Deutschland
DNaseI recombinant, RNase-free	Roche, Mannheim, Deutschland
Lysozym (Hühnereiweiß)	Sigma, St. Louis, USA
Pwo-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, USA
S-Protein-POD-Konjugat	Novagen, Madison, WI, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, USA

2.2 Chemikalien, Puffer, Medien und Kultivierung von Bakterien

2.2.1 Chemikalien

Substanz	Firma
1,4-Dithiothreitol (DTT), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol, zur Synthese	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz, >99%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Agar	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chelating Sepharose fast flow	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
D(+)-Glucose-Monohydrat, f. biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), >98%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Titriplex III	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 37%, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin, 99%	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Guanidiniumhydrochlorid, >99%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Guanidiniumthiocyanat, zur Synthese	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff, f. biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt, f. die Biotechnologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Imidazol, p.a.	Fluka, Buchs, Schweiz
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Isopropylthiogalactosid (IPTG), >99%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS), >85%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Serva Blue R	Serva, Heidelberg, Deutschland
SP Sepharose fast flow	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Superdex 200	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian (oxidiertes DTT)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrat (Rubpy)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (TCEP-HCl)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20, molecular biology grade	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol, f. die Elektrophorese	Serva, Heidelberg, Deutschland

Anorganische Salze, Säuren und Basen sowie organische Lösungsmittel wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und hatten, falls nicht eigens erwähnt, den Reinheitsgrad p.a..

2.2.2 Puffer

Soweit nicht anders angegeben wurden für jeweilige pH-Bereiche entsprechende Puffersubstanzen verwendet. Entsprechend ihrer Verwendung wurden die Puffer optional mit Salzen, denaturierenden (z.B. Harnstoff) oder reduzierenden Verbindungen (z.B. TCEP oder β -Mecaptoethanol) versetzt. Die Einstellung des pH-Werts erfolgte nach Möglichkeit nach Zugabe aller Substanzen.

Puffer	Zusammensetzung
IB1	100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7 alternativ: 20 mM HEPES, 5 mM NaCl, pH 7,5
IB2	60 mM EDTA, 2-3 % Triton X-100 (v/v), 1,5 M NaCl, pH 7
IB3	100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 7
IB4	20 mM HEPES, 5 mM NaCl, 1-2 M Harnstoff, pH 7,5
QA	8 M Harnstoff, 20 mM HEPES, 5 mM NaCl, pH 7,5
QB	8 M Harnstoff, 20 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7,5
HA	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5
HB	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,5
Stock für pH 1-2	0,2 M HCl/KCl
Stock für pH 3-6	0,1 M Natriumcitrat/HCl
Stock für pH 7	0,1 M MOPS
Stock für pH 7-8	0,1 M HEPES
Stock für pH 8-9	0,1 M Tris/HCl
Stock für pH 9	0,1 M Ethanolamin
Stock für pH 10-12	0,1 M Glycin/NaOH

Für die Aggregationsassays wurde zur genauen pH-Titration mit Intervallen von 0,1 pH-Einheiten im Bereich zwischen pH 5,5 und pH 7,5 das StockOptions™ *Bis-Tris Buffer Kit* (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) verwendet.

Pufferlösungen, die bei bestimmten Detektionsverfahren von Proteinen benötigt wurden, sind unter der jeweiligen Methode angegeben.

2.2.3 Medien

LB (lysogenic broth):

10 g Trypton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

ad 1 L H₂O

(nach Sambrook *et al.*, 1989)

LB-Medium wurde zur Kultivierung von *E. coli* verwendet. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 15 g/L Bacto-Agar (BD/Difco, Sparks, MD, USA) zugesetzt. Durch entsprechenden Zusatz von Antibiotika als Selektionsmarker konnten Plasmid-tragende *E. coli*-Stämme auch selektiv kultiviert werden.

2.2.4 Verwendete Kits

<i>Wizard Plus SV Miniprep Kit</i>	Promega, Madison, Wisconsin, USA
<i>Wizard SV Gel and PCR clean-up System</i>	Promega, Madison, Wisconsin, USA

2.2.5 Antibiotika

Wenn nicht anders beschrieben, kamen folgende Antibiotika in den jeweils angegebenen Endkonzentrationen zur Anwendung:

Ampicillin	100 µg/mL
Gentamicin	10 µg/mL
Kanamycin	35 µg/mL
Tetracyclin	12,5 µg/mL

Die Stammlösungen der Antibiotika in Wasser wurden so konzentriert, daß sie 1:1000 verdünnt eingesetzt werden konnten. Nach dem Lösen wurde sterilfiltriert. Die zu 1 mL aliquotierten Lösungen lagerten bei -20 °C.

2.2.6 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C. Flüssigkulturen wurden bei ~130 UpM geschüttelt, um eine gute Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Die Zelldichte konnte durch die Extinktion von Licht bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe eines UV/VIS-Photometers bestimmt werden.

Bakterienstämme konnten für die Zeit von etwa einem Monat auf den entsprechenden Agar-Platten bei 4 °C gelagert werden. Für die längerfristige Lagerung wurde eine Flüssigkultur angeimpft, und 600 µL davon mit 300 µL 50 %iger Glycerinlösung versetzt. Nach dem Aliquotieren wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Anwendung bei -80 °C gelagert.

2.3 Geräte und Hilfsmittel

2.3.1 Geräte

Gerät	Modell	Firma
UV/VIS-Absorptionsspektrophotometer	Cary 50 Bio	Varian, Darmstadt, Deutschland
Analysenwaage	BP 121 S	Satorius, Göttingen, Deutschland
Blottingapparatur	Fast Blot B34	Biometra, Göttingen, Deutschland
Brechungsindexdetektor	RI-71	Shodex, Tokyo, Japan
<i>Cell Disruptor</i>	GAULIN-Labor-Homogenisator	APV Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland
Chromatographieanlage	ÄktaFPLC UPC900 + P920	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Circulardichroismus-Spektropolarimeter	Jasco J-715 mit PTC 343 Peltier Temperatureinheit	Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japan
Dynamische Lichtstreuung	Axios-150	Hellas-Triton (Eigenumbau)
Fluss-Feldflussfraktionierung	Eclipse F	Waytt Technology, Santa Barbara, CA, USA
Filmentwickler	Optimax Typ MR	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenz-Spektrophotometer	Spex FluoroMax-3	Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA
Geldokumentationssystem	BiodocII	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur (für Agarosegele)	HU10	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur (für SDS-PAGE)	Hoefer SE250 Mighty Small II	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Halbmikrowaage	BL 310	Satorius, Göttingen, Deutschland
Kühlzentrifuge	Avanti J-25 Rotoren: JA10 + JA25.50	Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA
Lichtmikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Lichtstreuendetektor	DawnEOS	Waytt Technology, Santa Barbara, CA, USA
Lyophilie	Unikat	Med. Techn. Laborgeräte, J.H. Schrader, Friedland, Deutschland
pH-Meter	pH 538	WTW Weilheim Deutschland
Rasterkraftmikroskop	Multimode SPM	Veeco Instruments Inc., Woodbury NY, USA
Thermocycler	Primus	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Ultraschallgenerator	HD/UW2200 Sonde KE76	Bandelin, Berlin, Germany
Ultrazentrifuge	Optima MAX-E Rotor: TLA-45	Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA

2.3.2 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramm	Firma
Adobe Acrobat 7.0 Professional	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Adobe Illustrator 11	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Adobe Reader 7.0	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Chromas	Technelysium, Helensvale, Queensland, Australia
CDNN	Universität Halle-Wittenberg
Microsoft Office 2003	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
OriginPro 7.5	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
UltraScan 9.0	University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA
Vector NTI Advance 10	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Datenbank	Website
Expasy	http://www.expasy.org
Kegg	http://www.genome.jp/kegg
NetPhos 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos
ProtParam	http://www.expasy.org/tools/protparam.html
PubMed	http://www.pubmed.com
Scholar Google	http://scholar.google.de
YinOYang 1.2	http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang

2.4 Molekularbiologische Techniken

2.4.1 Anzucht von *E. coli*

Ausstrichkulturen von *E. coli* auf Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C oder mehrere Tage bei RT inkubiert und zur Lagerung im Kühlschrank unter Luftabschluss aufbewahrt. Die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen in LB-Medium erfolgte wahlweise unter Zugabe entsprechender Antibiotika. Einzelkolonien wurden zur Überimpfung von 4 mL Kulturen

verwendet. Größere Volumina wurden mit entsprechenden Vorkulturen überimpft. Die Bakterien aus den entsprechenden Vorkulturen wurden vor der Überimpfung 5 Min. bei 4 °C und 5000 x g sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert um in das Medium sezernierte β -Lactamase zu entfernen und dem vorzeitigen Abbau des Ampicillins vorzubeugen. Volumina bis zu 4 mL wurden im Reagenzglasroller inkubiert, Kulturen über 10 mL im Umluftschüttelinkubator. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei 600 nm beobachtet. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa $2,5 \times 10^8$ Zellen/mL (Sambrook & Russell, 2001).

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 600 μ L einer exponentiell wachsenden Kultur mit 300 μ L 50 %igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden die zu transformierenden Stämme nach Sambrook & Russell (2001) kompetent gemacht. Dazu wurde eine frische 100 mL *E. coli*-Flüssigkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 mit 2 mL 1 M MgCl₂ versetzt und 10 Min. weiter bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 60 Min. auf Eis gekühlt, 5 Min. bei 4 °C und 5000 x g abzentrifugiert, das Sediment in 20 mL Lösung A resuspendiert und weitere 60 Min. auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C wurde das Sediment in 2 mL Lösung A + Glycerin aufgenommen und die Zellen in Aliquots zu je 100 μ L aliquotiert. Diese Aliquots wurden entweder direkt mit Plasmid-DNA transformiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden je 100 μ L kompetente Zellen mit maximal 10 % (v/v) der zu transformierenden DNA vermischt und 15 Min. auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend einem einminütigen Hitzeschritt bei 42 °C unterzogen, wieder auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 500 μ L LB₀ 40 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden ca. 100 μ L der Bakteriensuspension auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und diese bei 37 °C üN bebrütet.

Lösung

Lösung A

Lösung A + Glycerin

Zusammensetzung

3 M Natriumacetat (CH₃COONa) (pH 5,5)
 1 M Kalziumchlorid (CaCl₂)
 2,8 M Manganchlorid (MnCl₂)
 sterilfiltriert

83 % (v/v) Lösung A
 17 % (v/v) Glycerin (87 %)

2.4.3 Präparation, Reinigung und Sequenzierung von DNA

Die Präparation und Reinigung von Plasmiden wurde nach Vervielfältigung im *E. coli* Stamm DH10B mit dem *Wizard Plus SV Miniprep Kit* gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Die Reinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *Wizard SV Gel and PCR clean-up System* und wurde ebenfalls laut Herstellerangaben durchgeführt.

Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC (Konstanz, Deutschland) durchgeführt und mit den Programmen Chromas und Vector NTI überprüft. Soweit nicht anders beschrieben, wurden Standardprimer der Firma verwendet. Die gewünschte Sequenz wurde dabei auf Mutationen und Deletionen, wodurch Verschiebungen des Leserasters auftreten würden, untersucht. Traten diese nicht auf, wurde das entsprechende Plasmid für weitere Schritte verwendet.

2.4.4 Modifikation von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind in der Lage doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und die DNA-Phosphodiesterbindung zu spalten. Die Fragmente haben dann durch die Lage der Spaltstellen eine definierte Länge und können durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden.

Für analytische Restriktionen wurden Ansätze mit einem Volumen von 10 µL mit 100-500 ng Plasmid-DNA verwendet. Es wurden 2 U des jeweiligen Restriktionsenzym zugesetzt. Die Inkubation dauerte in der Regel 1 h unter den für das Enzym optimalen Bedingungen. Für präparative Ansätze wurden 10-20 U Enzym in einem Volumen von 10 µL eingesetzt. Das Endvolumen betrug 50 µL.

Alle Ansätze wurden mit H₂O_{dd} auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt. Ein gleichzeitiger Verdau mit zwei Enzymen ist möglich, wenn deren katalytischer Umsatz unter gleichen Bedingungen effizient verläuft.

Nach der nötigen Inkubationsdauer wurden die Restriktionsansätze auf Agarosegelen überprüft. Bei präparativen Ansätzen erfolgte anschließend eine Gelextraktion.

Um eine Religierung eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurde alkalische Phosphatase zugegeben. Sie weist eine Spezifität für ortho-Phosphomonoester auf, die sich am 5'-Ende von geschnittener DNA befinden und dephosphoryliert den Vektor an diesen Stellen.

Pro µg Plasmid-DNA wurde 0,1 U alkalische Phosphatase und 10 % (v/v) des Endvolumens eines 10 x Phosphatasepuffers zugegeben. Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C wurde

das Restriktionsenzym durch Erhitzen auf 65 °C für 5 Min. inaktiviert. Danach wurde der Ansatz mittels *High Pure PCR Product Purification Kit* gereinigt.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Analyse und Präparation von DNA. Deren Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ist abhängig von der Masse und der Form der DNA. Ein Standard, der lineare doppelsträngige DNA-Fragmente enthält, kann zur relativ genauen Größenbestimmung verwendet werden.

Für die Herstellung der 1 %igen Gele wurde TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose aufgekocht. Wenn die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,04 % (w/v) zugesetzt. Auf analytische Gele wurde eine DNA-Menge von bis zu 500 ng aufgetragen. Für präparative Ansätze konnten auch größere Mengen aufgetragen werden.

Die Proben wurden mit 5 x Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem Standard (λ /BstEII oder 1 kb-DNA-Leiter) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x TAE. Die Proben wurden bei einer Spannung von 120 V für 30-45 Min. elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der Banden wurde das Gel mit UV-Licht (254 nm) beleuchtet. Die Nachweisgrenze liegt bei der Färbung mit Ethidiumbromid bei 10 ng doppelsträngiger DNA.

Lösung	Zusammensetzung
50 x TAE	2 M Tris/Acetat, pH 8,0 50 mM EDTA
10 x Auftragspuffer	50 % (v/v) Glycerin 10 mM EDTA 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol

2.4.6 Ligation

Durch Ligation sollen zwei doppelsträngige DNA-Fragmente mit komplementären Nukleotidüberhängen kovalent verknüpft werden. Ligationen wurden mit 50-300 ng Vektor und dem 5 bis 10-fachen Überschuss des einzufügenden Fragments angesetzt. Ligationen, bei denen zwei gleichwertige Teile des Vektors zusammengefügt wurden (siehe Klonierung synthetischer Seidengene), wurden im gleichen Verhältnis angesetzt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug immer 20 μ l. Pro μ l DNA wurde 1 U DNA-T4-Ligase und 2 μ l 10 x T4 Ligasepuffer zugesetzt. Dieser Ansatz wurde entweder für 2 h bei

Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm DH10B. Hierzu wurden zwischen 10 und 20 µl des Ansatzes verwendet. Für eine schnellere Ligation wurde 2 x Quick Ligasepuffer verwendet. Der Ansatz konnte nach 15 Min. Inkubation für eine Transformation verwendet werden.

2.4.7 Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) amplifiziert gezielt Bereiche aus doppelsträngiger DNA. Diese werden durch sogenannte Primer, einzelsträngige Nukleotidsequenzen, begrenzt, welche nach Länge und Schmelztemperatur ausgewählt werden können. In dieser Arbeit wurden gezielt DNA-Bereiche aus cDNA-Plasmiden der Flagelliform Spinnenseide aus *Nephila clavipes* vervielfältigt. Um Fehler beim Ablesen der Sequenz zu minimieren, wurden ausschließlich Polymerasen mit 3'-5' Exonukleaseaktivität (*proof reading*-Aktivität), wie beispielsweise Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*, verwendet. Die Anlagerungstemperatur für die Oligonukleotide ergab sich aus der Sequenz der jeweiligen Primer. Von der finalen Schmelztemperatur, bei der jeweils für ein Adenin oder Thymin 2 °C und für ein Cytosin oder Guanin 4 °C berechnet wurden, wurden 4 bis 6 °C subtrahiert. Im Thermocycler wurde ein entsprechendes Amplifikationsprogramm gestartet, welches folgende Schritte umfasste: Eine initiale Denaturierung der Matrizen-DNA, worauf ein Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und DNA-Synthese folgte, der ca. 30 Mal wiederholt wurde. Zum Abschluss wurde eine verlängerte Synthesephase angefügt, um unvollständige Amplifikate zu komplettieren. Danach wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

Folgender Ansatz wurde standardmäßig verwendet, konnte aber auch nach Bedarf variiert werden:

1 μL	forward-Primer (10 pmol)
1 μL	reverse-Primer (10 pmol)
1 μL	Template-DNA (20 ng)
2 μL	dNTP-Mix (10 mM pro Nukleotid)
10 μL	10x Reaktionspuffer (inkl. 2 mM MgCl_2)
0,5 μL	Pwo-Polymerase (2,5 U)
ad 100 μL	H_2O

Auch das Temperaturprogramm wurde, um möglichst gute Ausbeute zu erhalten, verändert. Ein Standardprogramm ist in Abb. 2-1 exemplarisch dargestellt.

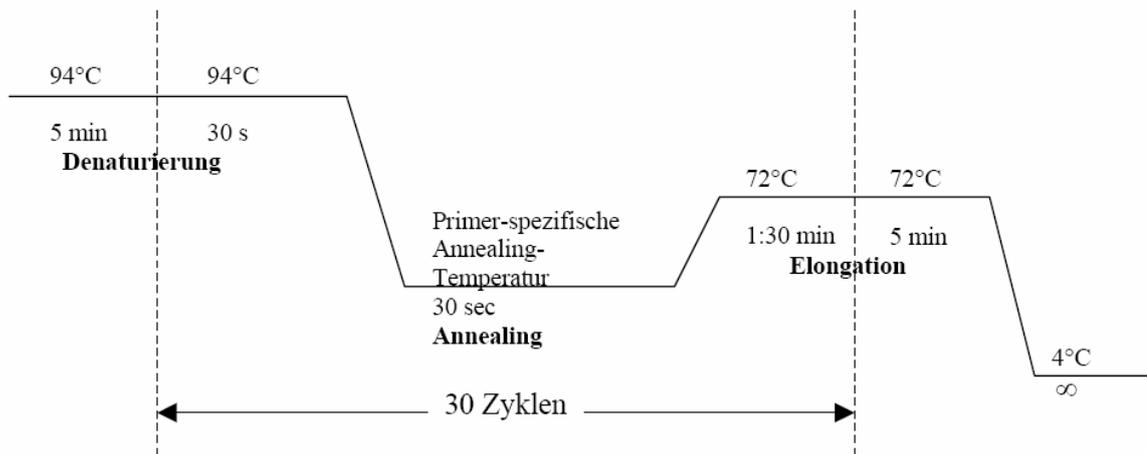


Abb. 2-1 – Temperaturprogramm der PCR

2.4.8 Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide

Für die Generierung kurzer doppelsträngiger DNA-Sequenzen wurden zwei komplementäre synthetisch hergestellte Oligonukleotide hybridisiert. Dazu wurde eine Lösung mit je 50 pmol/ μL der Oligonukleotide in 10 mM Tris pH 8,0 von 95 °C mit einer Kühlrate von 0,1 °C/s auf 20 °C abgekühlt. Um fehlgepaarte DNA-Doppelstränge wieder zu denaturieren wurde die Lösung auf 70 °C erwärmt und wieder auf 20 °C abgekühlt. Dieser Zyklus wurde jeweils 10 Mal mit einer Denaturierungstemperatur von 70 °C bzw. 65 °C wiederholt.

2.4.9 Klonierung authentischer Seidengene

Für die Expression authentischer Fragmente von Flagelliform Spinnenseidengenen in *E.coli* und Insektenzellen wurden die folgenden Plasmide konstruiert:

pET28a-FLAG-nrNT	pET28a: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III; pAZL-nrNT: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pET28a-FLAG-nrCT	pET28a: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III; pAZL-nrCT: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pET21a-FLAG	pET21a: <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I; pGEM-3Zf(+)-FLAG: <i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I
pFB1-FLAG	pFB1: <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I; pET21a-FLAG: <i>Bgl</i> II/ <i>Xho</i> I
pFBHTa-FLAG	pFBHTa: <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I; pBS-FLAG: <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I
pGEM-3Zf(+)-5'3'FLAG	pGEM-3Zf(+)-5'FLAG: <i>Eco</i> RI/ <i>Nae</i> I; pGEM-3Zf(+)-FLAG: <i>Eco</i> RI/ <i>Hinc</i> II
pET21a-5'3'FLAG	pET21a: <i>Hind</i> III; pGEM-3Zf(+)-5'3'FLAG: <i>Hind</i> III
pFB1-5'3'FLAG	pFB1: <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I; pET21a-5'3'FLAG: <i>Bgl</i> II/ <i>Xho</i> I

Das Klonierungsschema gibt den Zielvektor und den inserttragenden Donorvektor an, die jeweils in der angegebenen Reihenfolge mit den aufgelisteten Enzymen behandelt wurden. Abkürzungen: BS: BluescriptSK(+); FB: FastBac.

2.4.10 Klonierung synthetischer Seidengene

Vier von den Sequenzen des Flagelliform Seidenproteins aus *Nephila clavipes* abgeleitete Aminosäuremodule wurden unter Berücksichtigung der bakteriellen *codon usage* (Medigue *et al.*, 1991) als Konsensussequenzen in DNA-Sequenzen rückübersetzt. Durch Hybridisierung der jeweiligen mit ds (Code-Strang; engl. *direct strand*) und cs (codogener Strang; engl. *complementary strand*) bezeichneten Oligonukleotide (siehe 2.1.3) wurden die doppelsträngigen DNA-Module K, X, Y und sp generiert und anschließend in den mit *Bsg*I und *Bse*RI geschnittenen Vektor pAZL eingefügt. Die nicht-repetitiven (NR) Regionen am 3'- und 5'-Ende von *flag* wurden durch PCR mit den Primerpaaren FLAG-N-chr-sense/FLAG-N-chr-anti und FLAG-C-chr-sense/FLAG-C-chr-anti (siehe 2.1.3) amplifiziert und mit *Nco*I und *Hind*III in den Vektor pAZL kloniert. Für die Verknüpfung zweier Genbausteine wie z.B. Module, Modulmultimere oder NR-Regionen wurde der pAZL-Vektor, der den designierten 5'-Baustein enthielt mit *Alw*NI and *Bsg*I geschnitten, während der Vektor mit dem späteren 3'-Baustein entsprechend mit *Bse*RI und *Alw*NI verdaut wurde (siehe auch 3.1.2). Die Ligation der richtigen Fragmente führte zur Wiederherstellung des Replikationsursprungs im Plasmid und vereinfachte damit die Identifizierung der korrekt ligierten Konstrukte. Die synthetischen Seidengene wurden durch die sequentielle Multimerisierung der Module aufgebaut und wahlweise durch die NR-Regionen ergänzt. Die fertigen Gene wurden

anschließend mit *Bam*HI and *Hind*III aus dem Vektor pAZL herausgeschnitten und in einen gleichermaßen behandelten Vektor pET21a eingefügt. Den Genen wurde dadurch eine für den T7-Peptidtag (MASMTGGQQMGR) kodierende Sequenz angehängt (Kroll *et al.*, 1993).

Im Rahmen der Gensynthese wurden dabei folgende Plasmide generiert:

pAZL-X	pAZL: <i>Bse</i> RI/ <i>Bsg</i> I; Kasette für (GGX) ₆
pAZL-Y	pAZL: <i>Bse</i> RI/ <i>Bsg</i> I; Kasette für (GPGGX) ₆
pAZL-K	pAZL: <i>Bse</i> RI/ <i>Bsg</i> I; Kasette für (GPGGAGGPY) ₃
pAZL-sp	pAZL: <i>Bse</i> RI/ <i>Bsg</i> I; Kasette für GGTTIIEDLDITIDGADGPITISEELTI
pAZL-nrNT	pAZL: <i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III; PCR auf pGEM 3Zf(+)-5'FLAG
pAZL-nrCT	pAZL: <i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III; PCR auf PGEM 3Zf(+)-FLAG
pET21-sfl	pET21: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III; pAZL-sfl: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pET21-sfl3	pET21: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III; pAZL-sfl3: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pET21-sflCT	pET21: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III; pAZL-sflCT: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pET21-sfl3CT	pET21: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III; pAZL-sfl3CT: <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III
pET28-NTsfl	pET28: <i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III; pAZL-NTsfl: <i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III
pET28-NTsflCT	pET28: <i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III; pAZL-NTsflCT: <i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III

Im Rahmen der Gensynthese entstanden weitere Konstrukte im Vektor pAZL, in welchen die Kassetten für Y, X und K bis zu 16 Mal vervielfältigt wurden. Sfl besteht hingegen aus Y₆X₂spK₂Y₂. Entsprechend enthält Sfl₃ diese Sequenz drei Mal. Die jeweiligen Kombinationen mit originalen amino- oder carboxyterminalen Domänen sind entsprechend mit NT oder CT gekennzeichnet. Im Vektor pAZL existieren zudem sämtliche Zwischenstufen der Klonierung, z.B. pAZL-X₂, pAZL-X₄ etc., die nicht extra aufgeführt sind.

2.5 Expression und Reinigung

2.5.1 Expression authentischer Seidengenfragmente in Insektenzellen

Um ein rekombinantes Baculovirus, das die genetische Information zur Synthese des Flagelliform Seidenproteins enthält, herzustellen, wurde das Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expressionssystem von Invitrogen verwendet. Hierbei wird die Gensequenz des gewünschten Proteins zuerst in den Vektor pFastbac kloniert. Mit diesem Konstrukt wurde der chemisch kompetente Bakterienstamm *E.coli* DH10Bac[™] transformiert. Dieser besitzt bereits einen

Baculovirus Shuttle-Vektor („Bacmid“), welcher das gesamte Baculovirusgenom (außer dem Gen für Polyhedrin) umfasst. Zusätzlich in den Bakterien enthalten ist ein Helferplasmid, welches durch die Bereitstellung einer Transposase die Sequenz-spezifische Transposition des pFastBac Vektors über eine Tn7-Transpositionssequenz in das Bacmid erlaubt. Zur Identifizierung der Kolonien, in denen die Transposition stattgefunden hat, enthält das Bacmid die Sequenz, die für das *lacZα*-Fragment codiert. Daraus werden die ersten 146 Aminosäuren der β -Galaktosidase gebildet. *LacZα* ermöglicht eine Komplementation der Deletion im Chromosom des Bakterienstammes. Zusammen mit dem dort codierten Ω -Fragment kann eine aktive β -Galaktosidase gebildet werden, die nach Induktion mit IPTG unter anderem auch X-Gal spaltet. Der daraus entstehende Farbstoff färbt die jeweiligen Kolonien blau. Die attachment-Stelle für die Transposition liegt innerhalb der *lacZα*-Sequenz. Während diese Insertion die Funktionsfähigkeit des Peptids nicht beeinträchtigt, wird sie durch das Einfügen der neuen Sequenz über Transposition zerstört. Somit kann nach erfolgter Transposition kein funktionsfähiges Enzym gebildet werden, und die Kolonien erscheinen nach Zugabe von IPTG und X-Gal weiß.

Die so identifizierten positiven Klone, in denen die Transposition stattgefunden hat, wurden nochmals auf LB_{Genta/Kana/Tetra}/IPTG/X-Gal Platten ausgestrichen und \bar{u} N bei 37 °C inkubiert. Aus einer verifiziert weißen Kolonie wurde anschließend eine 4 mL \bar{u} N-Kultur in LB_{Genta/Kana/Tetra} angeimpft. Am nächsten Tag wurde daraus das modifizierte Bacmid gereinigt und mittels PCR abermals auf die Anwesenheit der eingefügten Flag-Gensequenz geprüft. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration kam das gereinigte Konstrukt zur Transfektion von Sf9-Zellen zum Einsatz. Die Präparation der Bacmid-DNA erfolgte dabei nach den Angaben im Handbuch des Bac-to-Bac[®] Systems (Invitrogen).

Zur Transfektion der Sf9 Zellen wurde das Cellfectin[®] Reagenz von Invitrogen verwendet. Dabei handelt es sich um eine Mischung aus dem kationischen Lipid N,N^I,N^{II},N^{III}-Tetramethyl-N,N^I,N^{II},N^{III}-Tetrapalmitylspermin und Dioleyl-Phosphatidylethanolamin in Wasser. Die Transfektion erfolgt also über Liposomen.

In eine Zellkulturflasche mit 25 cm² Bodenfläche wurden 1×10^6 Sf9 Zellen ausgesät. Nach 1h hatten sie sich abgesetzt, so dass das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit Insect Xpress[™] (ohne Zusätze) gewaschen werden konnten. In der Zwischenzeit wurden 2,2 μ g der Bacmid-DNA und 12 μ L des Cellfectin[®] Reagenz (nachdem dieses gründlich aufgeschüttelt worden war) getrennt in je 100 μ L Insect Xpress[™] verdünnt. Anschließend wurden beide Verdünnungen gemischt und 25 Min. bei Raumtemperatur belassen. Während dieser Zeit sollten sich DNA-Lipid-Komplexe ausbilden. Durch Zugabe von weiteren 800 μ L

Insect Xpress™ wurde das Volumen auf etwas über 1 mL erhöht. Diese Mischung wurde zu den gewaschenen Zellen gegeben, diese dann 5 h bei 28 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand mit den übrigen DNA-Lipid-Komplexen abgenommen und durch 5 mL Kulturmedium ersetzt. Die weitere Inkubation erfolgte wie üblich zur Kultivierung bei 28 °C im Inkubatorschrank.

Nach 4 d wurde der Überstand abgenommen, bei 1500 UpM für 10 Min. von darin schwimmenden Zellen befreit und bei 4 °C aufbewahrt. Dieser Virusstock weist noch einen relativ geringen Virustiter auf.

Um daraus einen Stock mit höherem Titer zu gewinnen, wurde eine Infektion zur Stockgewinnung durchgeführt. Allerdings wurden aufgrund des niedrigeren Titers 1×10^7 Zellen mit 1 mL Viruslösung, bestehend aus 500 µL Virusstock verdünnt in 500 µL Insect Xpress™, infiziert.

Eine Viruslösung mit dem passenden Titer wurde schließlich zur Infektion frisch ausgesäeter Sf9-Zellen verwendet, um die rekombinante Genexpression zu initiieren. Idealerweise sollte dabei eine Viruslösung mit einer MOI (engl. *multiplicity of infection*), die die Anzahl Viren pro Zelle angibt, zwischen 5 und 10 auf $1-2 \times 10^6$ Zellen pro mL gegeben werden. Die Expression unter dem Polyhedrin-Promotor wird nach etwa 18 h nach der Infektion der Zelle gestartet. Eine Expressionskinetik wurde über 4 d aufgenommen und die täglich abgenommenen Fraktionen infizierter Zellen aufgeschlossen und mittels SDS-Gel und Immunoblot auf das rekombinante Protein untersucht.

2.5.2 Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter Proteine nach Synthese in Insektenzellen

Für die Bestimmung der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen nach der Synthese im Cytosol von Insektenzellen wurden 16×10^7 Zellen in 4 mL 20 mM HEPES pH 7,5 resuspendiert und anschließend durch Ultraschall zerstört (3×15 s bei 20 % Leistung mit dem Ultraschallgenerator HD/UW2200; Sonde: KE76). Anschließend wurden lösliche und unlösliche Zellbestandteile durch Sedimentation bei $100000 \times g$ und 4 °C für 30 Min. getrennt. Um auch chemisch stabile Aggregate für die Analyse durch SDS-Page zugänglich zu machen, wurden unlösliche Bestandteile in 6 M GdmSCN aufgenommen und gegen 8 M Harnstoff dialysiert. Anschließend wurden die unlösliche und lösliche Fraktion mit $1 \times$ Auftragspuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

2.5.3 Kinetik der Genexpression in *E. coli*

Eine Expressionskinetik kann wichtige Hinweise zur Optimierung der Kulturbedingungen für größere Produktionsansätze liefern. Hierzu wurden 200 mL LB (siehe 2.2.1), mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einer in stationärer Phase befindlichen üN-Kultur auf eine optische Dichte OD_{600} von ca. 0,05 eingestellt und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Als weitere Parameter wurden sowohl die Zelldichte als auch die Konzentration von IPTG bei Induktion variiert. Anschließend wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben genommen und die OD_{600} bestimmt. Zur Analyse mittels SDS-PAGE wurde das Pellet von 1 mL Bakterienkultur mit 160 μ L 1 \times Auftragspuffer (siehe 2.1.2) je OD_{600} von 1 aufgenommen.

2.5.4 Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter Proteine nach Synthese in *E. coli*

Für die Bestimmung der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen nach der Synthese im Cytosol von *E. coli* wurden die Zellen einer 100 mL Kultur geerntet, in 10 mL 20 mM HEPES pH 7,5, 5 mM NaCl resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend durch Ultraschall zerstört (5 \times 15 s bei 60 % Leistung mit dem Ultraschall-generator HD/UW2200; Sonde: KE76). Anschließend wurden lösliche und unlösliche Zellbestandteile durch Sedimentation bei 50000 \times g und 4 °C für 30 Min. getrennt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

2.5.5 Anzucht, Induktion und Ernte der Bakterien

Nachdem mit Hilfe der Expressionsanalyse optimale Bedingungen zur Produktion von rekombinantem Protein gefunden wurden, wurde die Großanzucht mit bis zu 10 L LB-Medium (siehe 2.2.3) in Schüttelkolben (2 L pro Kolben) durchgeführt. LB-Medien mit den entsprechenden Antibiotika wurden mit üN-Kulturen angeimpft. Die Kulturen wuchsen bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5. Dann wurde die Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert, und die Kulturen je nach zu synthetisierendem Protein für 3 bis 4 h bei 25 °C-30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 \times g, 10 min, 4 °C) geerntet. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte mittels Ultraschall oder *French Press*.

2.5.6 Reinigung aus *inclusion bodies*

Rekombinante Flagelliform-Seidenproteine, welche die Sfl Domäne enthalten, wurden zumeist unlöslich in der Zelle angereichert. Abzentrifugierte *E. coli* Zellen wurden in Puffer IB1 (ca. 5 mL pro g Zellrockenmasse) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2 mg/mL Lysozym, um die Zellwände porös werden zu lassen, wurde die Suspension bei 4 °C inkubiert bis sie viskos war. Optional wurde Proteaseinhibitor nach Herstellerangaben zugegeben und die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zugabe 10 µg/mL proteasefreier DNase und 3 mM MgCl₂ stand die Suspension 30 Min. bei RT. Nach Zugabe von 0,5 Volumen Puffer IB2 stand die Suspension weitere 30 Min. bei 4 °C und wurde daraufhin bei 20000 UpM abzentrifugiert. Dieser Waschschrift konnte optional wiederholt werden. Resuspension erfolgte in Puffer IB3 mit Hilfe des Ultraturax. Dieser Waschschrift wurde bis zu 2 Mal wiederholt. Optional konnte mit niedrigen Harnstoffkonzentrationen (1 bis 2 M) gewaschen werden (Puffer IB4). Zum Schluß wurde das Pellet im Equilibrierungspuffer für die chromatographische Reinigung aufgenommen.

2.5.7 Reinigung durch Chromatographie

Zur Reinigung der rekombinant synthetisierten Proteine wurden zusätzlich chromatographische Verfahren verwendet. Rekombinante Proteine der Flagelliform-Spinnenseide wurden nach der *inclusion body* Reinigung über Anionenaustausch-Chromatographie von noch vorhandenen Verunreinigungen getrennt. Bei chromatographischen Trennmethode wird allgemein eine mobile Phase, in der sich das zu trennende Gemisch befindet, über eine stationäre Matrix, von der bestimmte Bestandteile der mobilen Phase gebunden oder zurückgehalten werden können, geleitet.

Bei der Anionenaustauschchromatographie besteht die stationäre Phase aus einer positiv geladenen Matrix und kann somit alle Proteine binden, die negative Ladungen tragen. Der Ladungszustand eines Proteins hängt von seiner Primärstruktur und vom pH-Wert der Lösung ab. Für Proteine mit geladenen Aminosäureseitenketten kann ein isoelektrischer Punkt (pI) bestimmt werden, der dem pH-Wert entspricht, bei dem das Protein effektiv keine Nettoladung besitzt. Um eine negative Nettoladung während der Chromatographie zu gewährleisten, sollte der pH-Wert der mobilen Phase um mindestens 0,5 Einheiten über dem pI liegen (Lottspeich, 1998).

An einer Äkta-FPLC erfolgte die Equilibrierung der Säule, deren Matrix aus Q-Sepharose *fast flow* bestand und die ein Ausschlussvolumen von 60 mL besaß, mit Puffer QA. Im gleichen Puffer wurden die *inclusion bodies* gelöst. Die Elution erfolgte über einen

Natriumchloridgradienten, wobei die Erhöhung der Ionenstärke im Puffer zunächst Proteine mit niedriger und dann immer größer werdender Affinität zur Säulenmatrix eluiert. Rekombinante Flagelliform Seidenproteine eluieren bei etwa 200 mM NaCl. Der Gradient verlief über 3 Säulenvolumina bis 50 % Puffer QB, währenddessen wurden Fraktionen von jeweils 5 mL gesammelt. Der gesamte Lauf wurde bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt.

Proteine mit His-Tag wurden über eine Ni-Sepharose fast flow (5 mL) von Verunreinigungen getrennt. Hierbei interagieren Stickstoffatome von sechs aminoterminal angehängten Histidinen mit an der Säulenmatrix komplexierten Nickelatomen. Bei einer Flussrate von 1 bis 2 mL/min wurde mit Puffer HA equilibriert und die Säule beladen. Ein Gradient von 5 Säulenvolumina bis 50 % Puffer HB eluierte die Proteine. Hier wirkt die Erhöhung der Imidazolkonzentration im Puffer in gleicher Weise wie der zuvor beschriebene NaCl-Gradient.

2.5.8 Selektive Fällung rekombinanter Proteine

Die Ionen einzelner Salze können Proteine in Lösung stabilisieren oder ausfällen. Dabei wird zwischen chaotrop, für Ionen die ein Protein in Lösung halten, und lyotrop, bei denen die Ionen mit dem Protein um Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen konkurrieren, unterschieden. Die Zugabe lyotroper Salze zu einer Proteinlösung bewirkt durch den Entzug der Hydrathülle die Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen im Protein und führt schließlich zum Ausfallen des Proteins. Eine Einteilung von Anionen und Kationen bezüglich ihres Einflusses auf gelöste Proteine ist durch die Hofmeister Serie beschrieben.

Im Ammoniumsulfat wirken beide Ionen eher lyotrop. Dabei präzipitiert jedes Protein aufgrund seiner Struktur und Zusammensetzung bei unterschiedlich hohen Konzentrationen des Salzes. Dieser Effekt wird bei der selektiven Fällung von Proteinen mit Salzen ausgenutzt. Das rekombinante Flagelliform Seidenprotein Sfl wurde bei einer Konzentration von 1,2 M Ammoniumsulfat aus 8 M Harnstoff gefällt. Verunreinigungen wurden zuvor nach Zugabe von 0,8 bis 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt oder verblieben nachher im Überstand. Jeder Ansatz wurde zunächst 1 h bei RT oder $\bar{u}N$ bei 4 °C stehen gelassen und schließlich bei 4000 x g abzentrifugiert. Für andere rekombinante Flagelliform Seidenproteine wurde die Ammoniumsulfatkonzentration angepasst, so fällt Sfl₃ bereits bei 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.5.9 Lyophilisation und Lagerung rekombinanter Proteine

Die Gefriertrocknung der gereinigten Proteine dient der leichteren Aufbewahrung und schützt die Proteine vor dem Abbau. Dabei geht das Lösungsmittel aufgrund des niedrigen Drucks direkt von der festen in die Gasphase über und das reine Protein bleibt zurück. Zuvor wurde das jeweilige Protein gegen 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert. Nach der Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorption wurde die Proteinlösung zu bestimmten Proteinmengen, meist 1 mg, aliquotiert. Mit einer Kanüle wurden Löcher in die Deckel der Aufbewahrungsgefäße gestochen. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin in einem Rundkolben an die Lyophile angeschlossen. Das Lösungsmittel wurde $\bar{u}N$ bei Drücken von unter 5 mbar abgezogen. Das Protein wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6 Proteinanalytik

2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die analytische Trennung von Biomolekülen mittels Gelelektrophorese basiert auf der unterschiedlich schnellen Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Die entscheidende Rolle für die Beweglichkeit durch die Polyacrylamid-Matrix spielen Ladung, Größe und Form der Moleküle. Daraus resultiert ein Reibungswiderstand, der die Auftrennung ermöglicht.

Bei der SDS-PAGE dient das amphiphatische Reagenz Natriumdodecylsulfat (SDS) als Detergenz. Durch eine Anlagerung der anionischen SDS-Moleküle an ein Protein werden denaturierende Bedingungen geschaffen und darüber hinaus Eigenladungen maskiert. Dadurch wird, abgesehen von Ausnahmefällen, eine Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse erzielt. Die zurückgelegte Strecke ist dabei proportional zum Logarithmus des Molekulargewicht (Andrews, 1986).

Die Analyse der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Page. Es wurden 3 %ige Sammelgele sowie 10 bis 12,5 %ige Trenngele verwendet. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese mit 5 x Lämmli-Auftragspuffer versetzt. Das darin enthaltene β -Mercaptoethanol dient zur Reduktion von Disulfidbrücken. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben vor dem Auftragen 5 Min. auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt (Laemmli, 1970). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA je Gel für 45 bis 60 Min.

Die normale SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli trennt Proteine, die kleiner als 10 kDa sind, jedoch nur unzureichend auf. Unter Verwendung von Tricin/SDS anstelle von Glycin/SDS konnten Schägger und Jagow Proteine bis zu einem Molekulargewicht von ca. 2 kDa trennen. Dieses Trennverfahren wurde für Proteine kleiner als 20 kDa angewendet.

2.6.2 Färbung nach Fairbanks

Für die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit dem Farbstoff Coomassie Blau wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese in Fairbanks A in der Mikrowelle aufgeköcht und 5 Min. darin geschwenkt. Nichtgebundener Farbstoff wurde durch anschließendes, mehrmaliges Aufkochen in Fairbanks D entfernt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 50 ng des betreffenden Proteins (Fairbanks *et al.*, 1971).

Lösung

Fairbanks A

Zusammensetzung

25 % (v/v) Isopropanol
10 % (v/v) Essigsäure (technisch)
0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R

Fairbanks D

10 % (v/v) Essigsäure (technisch)

2.6.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde nach der Vorschrift von Heukeshoven und Dernick (1988) durchgeführt. Sie repräsentiert eine sehr empfindliche Färbemethode mit einer Nachweisgrenze von 10 ng Protein.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Gele unter leichtem Schwenken für 20 Min. in Fix I inkubiert. Anschließend wurden die Gele für mindestens 30 Min. in Fix II geschwenkt, wobei zur eigentlichen Fix II Stammlösung vor Verwendung jedes Mal 0,1 % (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat und 2 % (v/v) Glutaraldehyd frisch zugegeben wurden. Die Inkubation in Fix II kann wahlweise auch \ddot{u} N erfolgen. Danach wurden die Gele zuerst 3 Mal 10 Min. in H_2O_{dd} gewaschen und dann 30 Min. lang unter Lichtausschluss in der Färbelösung gefärbt. Die Entwicklung der Gele erfolgte durch Zugabe von ca. 30 mL Entwicklerlösung, die stets frisch hergestellt wurde. Durch das darin enthaltene Formaldehyd werden Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Zuerst wurden ca. 5 mL Entwicklerlösung zugegeben, um unspezifisch gebundene Silberionen auszufällen. Nach dem Abkippen des gefällten Silbers wurde weitere Entwicklerlösung zugegeben, womit das Gel je nach gewünschter Färbintensität wenige Sekunden bis Minuten geschwenkt wurde. Die Färbung wurde schließlich durch Zugabe einer 50 mM EDTA-Lösung, pH 7,5 gestoppt.

Lösung	Zusammensetzung
Fix I	30 % (v/v) Ethanol (technisch) 10 % (v/v) Essigsäure (technisch)
Fix II- Stammlösung	0,4 M Natriumacetat 0,5 % (v/v) Eisessig (technisch) 30 % (v/v) Ethanol (technisch) pH 6,0
Färbelösung	6 mM Silbernitrat 0,025 % (v/v) Formaldehyd (37 %) in H_2O_{dd}
Entwicklerlösung	0,35 M Natriumcarbonat 0,04 % (v/v) Formaldehyd (37 %) in H_2O_{dd}

2.6.4 Immunoblotting (Western Blot)

Der spezifische Nachweis einiger Proteine erfolgte durch Immunoblotting. Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zunächst auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurden das Polyacrylamidgel und eine entsprechend den Herstellerangaben vorbereitete PVDF Membran für 10 Min. in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde eine Sandwich-Anordnung bestehend aus drei Lagen Whatman[®]-Papier (in Transferpuffer getränkt), der Membran, dem Gel und drei weiteren getränkten Lagen Whatman[®]-Papier zwischen zwei Elektroden angebracht. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 75 mA in 90 Min. auf die Membran übertragen. Nachzuweisende Proteine besaßen einen aminoterminalen T7- oder His-Tag. Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die PVDF Membran wurde diese 1h bei 4 °C in blocking-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 Mal 10 Min. in PBS-Tween gewaschen. Der jeweilige primäre Antikörper wurde 1:10000 in PBS-Tween mit 5 % Milchpulver verdünnt und die Membran 1,5 h lang unter Schwenken bei RT inkubiert. Nach 3 Mal 10 Min. waschen in PBS-Tween wurde die Membran für 45 Min. mit dem sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Dieser war 1:5000 in PBS-Tween mit 5 % Milchpulver verdünnt. Der sekundäre Antikörper war mit dem Enzym Peroxidase konjugiert, das über eine lichtemittierende Reaktion mit dem *ECL western blot detection kit* entsprechend den Herstellerangaben detektiert wurde. Vor Detektion wurde die Membran gründlich 3 Mal 10 Min. in PBS-Tween gewaschen und durch Abtropfenlassen des Wassers etwas getrocknet, wobei sie nicht austrocknen durfte.

Puffer	Zusammensetzung
WB-Transferpuffer	50 mM Tris, pH 8,0 105 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % (v/v) Methanol (technisch)
10 x PBS	40 mM Kaliumdihydrogenphosphat 160 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,15 M Natriumchlorid
PBS-Tween	1 x PBS 0,3 % Tween
Blocking-Puffer	1 x PBS 5 % (w/v) Milchpulver (blotting grade) 0,05 % (v/v) Tween

2.6.5 Carboxymethylierung

Um Cysteine in Proteinen dauerhaft und unabhängig vom Redoxpotential des Puffers an der Ausbildung von Disulfidbrücken zu hindern, kann die Thiolgruppe des Cysteins carboxymethyliert werden. Ein dazu häufig verwendetes Reagenz ist Iodacetamid (Gurd, 1972). Durch eine nukleophile Substitution wird das Iod des Iodacetamids durch das Thiolation eines deprotonierten Cysteins ersetzt, was zur Bildung eines unter neutralen Bedingungen stabilen Thioethers führt. Dazu wurde 1 mg/mL Protein in 8 M Harnstoff gelöst und gegen 10 mM Tris/HCl pH 8 und 2 mM TCEP dialysiert. Anschließend wurden 100 mM Iodacetamid zugegeben. Nach weiteren 30 Min. bei 40 °C im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 % β -Mercaptoethanol gestoppt. Präzipitiertes Protein wurde durch Zugabe von 6 M Guanidiniumhydrochlorid wieder in Lösung gebracht. Zur Analyse des carboxymethylierten Proteins wurden die zugegebenen Agenzien durch Dialyse entfernt.

2.6.6 Redoxtitration

Mit Hilfe einer Redoxtitration wurden die Redoxpotentiale der Cystine bestimmt. Da vermutet wurde, dass das Redoxpotential der Flag-Proteine relative niedrig lag, wurde DTT als Puffersubstanz gewählt, das bei pH 7 ein Standardpotential von $E_0' = -332$ mV aufweist (Cleland, 1964). Bei der Reduktion eines Cystins mit thiolhaltigen Reduktionsmitteln wird zunächst ein Cystein reduziert, während das andere ein gemischtes Disulfid ausbildet. Erst in einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des zweiten Cysteins durch eine weitere Thiolgruppe. Im Falle des DTT liegt die Gleichgewichtskonstante des zweiten Reaktionsschrittes um den Faktor 10^4 höher als die des ersten (Cleland, 1964). Dazu wurden proteinhaltige Titrationslösungen mit DTT_{red} (Dithiothretiol) bzw. DTT_{ox} (trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian) aus entgasten Lösungen hergestellt und in den unten aufgeführten, nach der Nerstschen Gleichung errechneten Verhältnissen gemischt.

$$E' = E_0' - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[\text{red}]}{[\text{ox}]}$$

mit: E' : Redoxpotential bei pH 7
 E_0' : Standardpotential bei pH 7
 R: Gaskonstante
 T: absolute Temperatur
 n: Anzahl der Elektronen
 F: Faraday-Konstante
 [red], [ox]: Konz. der reduzierten bzw. oxidierten Spezies

Die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden freie Thiolgruppen durch Zugabe von 100 mM Iodacetamid carboxymethyliert und die Proteine mit einem 4-20 %igen Tricine Gel (Invitrogen) den Herstellerangaben entsprechend bzw.

12 %igen Tris/Tricin-Gelen aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Silberfärbung. Im Fall von nrCT mittels Coomassie-Färbung.

Titrationlösung:

0,3 mg/ml Protein

100 mM Kaliumphosphat pH 7,0

1 mM EDTA

20 mM DTT (oxidiert bzw. reduziert)

Redoxpotential [mV]	DTT _{red} [Mol-%]	DTT _{ox} [Mol-%]
-250	0,18	99,82
-260	0,39	99,61
-270	0,86	99,14
-280	1,87	98,13
-290	4,04	95,96
-300	8,51	91,49
-310	17,03	82,97
-320	31,18	68,82
-330	50,00	50,00
-340	68,82	31,18

2.6.7 Löslichkeitsbestimmung

Für die *in vitro* Bestimmung der maximalen Löslichkeit der Seidenproteine wurden 1 mg/mL Proteinlösungen in 10 mM Tris pH 8,0 durch Ultrafiltration mit einer 10000 MWCO Polyethersulfonmembran (Vivaspin 500) aufkonzentriert. In regelmäßigen Intervallen wurden der Lösung Aliquots entnommen und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.4.9). Die Aufkonzentrierung wurde bis zur Ausbildung sichtbarer Aggregate fortgesetzt.

2.6.8 Aggregationsassay

Verschiedene Faktoren tragen im Spinnkanal zur Assemblierung des löslichen Proteins zum Faden bei. Im Verlauf des Spinnkanals in Richtung Ausgang erhöhen sich die Konzentrationen von Ionen wie Phosphat und Kalium, hingegen verringern sich die Konzentrationen von Natrium und Chlorid, außerdem wird Wasser dem Kanal entzogen. Gleichzeitig sinkt der pH-Wert von 6,9 auf 6,3 (Vollrath & Knight, 2001). Mit dem Aggregationsassay sollte überprüft werden wie sich die rekombinanten Flagelliform

Seidenproteine unter dem Einfluss von verschiedenen Salzen, insbesondere Kaliumphosphat, und bei Änderung des pH-Werts verhalten.

Dazu wurden die jeweiligen Proteine in 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GuaHCl) gelöst. Im Fall einer Dreifachbestimmung werden pro Messpunkt 300 µg Protein benötigt. Das gelöste Protein wurde gegen 10 mM Tris/HCl, pH 8 üN bei 4 °C dialysiert. Dann wurde eventuell aggregiertes Protein 30 Min. bei 150000 x g in der Ultrazentrifuge (Rotor Beckman TLA-45) abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde spektrophotometrisch über die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Das lösliche Protein wurde daraufhin mit dem zuvor verwendeten Dialysepuffer auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt. 100 µL (bzw. 50 µL) des verdünnten Proteins wurden zu 400 µL (200 µL) des entsprechenden pH-Puffers bzw. des Puffers mit der jeweiligen Phosphatkonzentration titriert, wobei die Probe weder gevortext noch oder extrem stark geschüttelt werden durfte. Die verwendeten Puffer sind in 2.2.2 aufgeführt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 25 °C bevorzugt im Brutschrank inkubiert und dann 30 Min. bei 150000 x g in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die verbleibende Konzentration an löslichem Protein spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Zur Kontrolle wurde das nach der Ultrazentrifugation verbliebene Pellet in 500 µL 6 M GuaHCl gelöst und die Proteinmenge im Pellet auf gleiche Weise ermittelt.

Die Stocklösungen der verwendeten Puffer sind im Abschnitt 2.2.2 aufgeführt. Außer bei den Lösungen für pH 1 und pH 2 wurden pro 500 µL Ansatz 200 µL des 0,1 M Puffers mit 200 µL Wasser zu verdünnen.

2.6.9 UV-Absorptionsspektrometrie

Um die Konzentration von Protein in Lösung zu bestimmen, wurde UV-Absorptionsspektroskopie angewendet. Die Grundlage für solche Messungen bildet das Lambert-Beersche Gesetz. Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten wird bei gegebener Schichtdicke die Absorption bei der Wellenlänge bestimmt.

$$c = \frac{E_{\lambda}}{e_{\lambda} \cdot d}$$

Der Extinktionskoeffizient ergibt sich rechnerisch aus der Primärstruktur des entsprechenden Proteins. Das Programm ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) berechnet diesen nach der Methode von Gill und Hippel (1989) aus den bekannten

Extinktionskoeffizienten von Typtophan, Tyrosin und Cystin nach deren Vorkommen im Protein nach der Formel:

$$\varepsilon_{\lambda}(\text{protein}) = \varepsilon_{\lambda}(\text{Trp}) \cdot n(\text{Trp}) + \varepsilon_{\lambda}(\text{Tyr}) \cdot n(\text{Tyr}) + \varepsilon_{\lambda}(\text{Cystin}) \cdot n(\text{Cystin})$$

Tab. 2.4 zeigt Extinktionskoeffizienten und Extinktionen bei Proteinkonzentrationen von 1 mg/mL für die rekombinanten Seidenproteine.

Protein	Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	Absorption bei 1 mg/mL
nrCT	9065 (SH); 8940 (S-S)	0,665 (SH); 0,656 (S-S)
nrNT	10430	0,440
Sfl	37120	1,278
Sfl ₃	129630	1,541
SflCT	52275 (SH); 52150 (S-S)	1,348 (SH); 1,344 (S-S)
Sfl ₃ CT	138695 (SH); 138570 (S-S)	1,478 (SH); 1,477 (S-S)
NTSfl	46080	0,971
NTSflCT	62705 (SH); 62580 (S-S)	1,096 (SH); 1,094 (S-S)

Tab. 2.4 – Extinktionskoeffizienten rekombinanter Flagelliform Seidenproteine bei 280 nm

2.6.10 Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD)

Unter Zirkulardichroismus (CD) versteht man die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle, links- bzw. rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Die Grundlage hierfür liefert die Kopplung von Chromophoren in einer asymmetrischen Konformation. Je nach Wellenlänge des eingestrahnten Lichts unterscheidet man zwischen Nah-UV CD (320-250 nm, aromatische Region) und Fern-UV CD (250-170 nm, Amid-Region). Im Nah-UV Bereich sind aromatische Aminosäuren in asymmetrischer Umgebung für das Signal verantwortlich. Nah-UV CD-Spektren vermitteln einen für jedes Protein charakteristischen, abstrakten Gesamteindruck. Die Fern-UV CD-Spektroskopie wird dazu verwendet, um Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen zu erhalten. Im Fern-UV erzeugt die Polypeptidkette ein CD-Signal, das von der Sekundärstruktur des Proteins abhängig ist. α -Helices erzeugen zwei benachbarte Minima hoher Intensität bei 208 nm und 222 nm, wohingegen β -Faltblätter zu einem weniger ausgeprägten Minimum bei 218 nm führen. Unstrukturierte Proteine (*random coil*) weisen ein Spektrum mit einem ausgeprägten Minimum bei 198 nm auf.

Für Sekundärstrukturuntersuchungen rekombinanter Flagelliform Seidenproteine im Fern-UV CD wurden Küvetten mit Schichtdicken von 0,1 cm, für Tertiärstrukturuntersuchungen im Nah-UV CD Küvetten mit Schichtdicken von 0,5 cm verwendet. Als Messgerät diente ein Jasco 715 Spectropolarimeter mit folgenden Geräteeinstellungen:

Wellenlängenbereich	190 nm-250 nm bzw. 250 nm-320 nm
Auflösung	0,1 nm
Geschwindigkeit	20 nm/min
Response	1,0 s
Bandbreite	1,0 nm
Akkumulation	4

Aus der gemessenen Elliptizität Θ wurde die molare Elliptizität Θ_{MRW} (in grad cm² dmol⁻¹), d.h. die auf den durchschnittlichen Beitrag einer Peptidbindung bezogene Elliptizität mit Hilfe der Formel

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 0,1 \cdot MW}{c \cdot d \cdot N_{AS}}$$

(Schmid, 1997) berechnet. Dabei ist Θ die gemessene Elliptizität (in mgrad), MW das Molekulargewicht des Proteins (in g mol⁻¹), c die Proteinkonzentration (in mg ml⁻¹), d die Schichtdicke der Küvette in Zentimetern und N_{AS} die Anzahl der Aminosäuren im Protein.

Die Messungen wurden standardmäßig bei 20 °C durchgeführt. Zusätzlich wurde auch bei 70 °C gemessen, um Hinweise auf strukturelle Änderungen durch den Einfluss der Temperatur zu finden. Traten diese Änderungen auf, wurden Temperaturübergänge bei der Wellenlänge bestimmt, bei welcher die Differenz der berechneten molaren Elliptizität am größten war. Die Messungen erfolgten nach folgenden Parametern:

Wellenlänge	größte Differenz
Auflösung	0,1 nm
Geschwindigkeit	30 °C/h
Response	1,0 s
Bandbreite	1,0 nm
Temperaturbereich	10 °C-70 °C (Aufheizen und Kühlen)

Eine Übergangstemperatur wurde anhand der Daten als Wendepunkt der Steigung im Übergangsbereich bestimmt.

2.6.11 Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie

Neben der CD-Spektroskopie kann auch die Fourier-transformierte Infrarot (FTIR) Spektroskopie zur Sekundärstrukturanalyse von Proteinen verwendet werden. Proteine weisen mehrere charakteristische IR-Absorptionsbanden auf. Diese stellen vor allem Schwingungen des Polypeptidrückgrats dar. Die aussagekräftigste und am besten untersuchte Bande ist die Amid I Bande zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} , der im Wesentlichen die C=O Streckschwingung zugrunde liegt. Da die C=O- und N-H-Gruppen der Proteine an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken innerhalb von Sekundärstrukturen beteiligt sind, hängen Frequenzlage und Form der IR-Banden empfindlich von der Sekundärstruktur des Proteins ab. α -Helices erzeugen dabei Maxima zwischen 1648 und 1660 cm^{-1} , β -Faltblätter zwischen 1625 und 1640 cm^{-1} , β -Turns zwischen 1660 und 1685 cm^{-1} , und unstrukturierte Bereiche liefern Maxima zwischen 1652 und 1660 cm^{-1} (Tamm & Tatulian, 1997).

Die zu untersuchenden Proben wurden auf Kalziumfluoridplättchen präpariert und luftgetrocknet. Bei Bedarf wurden die Proben vorher in Mini-Slide-A-Lyzern dialysiert, um das enthaltene GdmCl zu entfernen. Die Analyse erfolgte an einem IR-Mikroskop (IRscope), das an ein IR-Spektrometer (IFS 66/s) gekoppelt war. Es wurden polarisierte Absorptionsspektren im Bereich von 700 - 6000 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Die Sekundärstrukturanteile wurden durch Gauss'sche Dekonvolution der Amid I Bande bestimmt (OriginPro 7.5). Die Messungen wurden freundlicherweise von Sebastian Rammensee (Lehrstuhl für Physik, TU München) durchgeführt.

2.6.12 Fluoreszenzspektroskopie

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind für die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen verantwortlich. Dabei wird das Fluoreszenz-verhalten von Proteinen, die alle drei aromatischen Aminosäuren enthalten, von Tryptophan dominiert. Zwei Gründe sind für die intensive Fluoreszenz von Tryptophan verantwortlich: Zum einen weist Tryptophan von den drei aromatischen Aminosäuren die höchste molare Absorption auf. Zusätzlich ist es möglich, dass von Tyrosinen und Phenylalaninen absorbierte Energie durch *fluorescence resonance energy transfer* auf Tryptophan übertragen wird und so zur Tryptophanfluoreszenz beiträgt (Cantor & Schimmel, 1980; Schmid, 1997). Daher ergeben sich relative Empfindlichkeiten für die Fluoreszenz zu etwa:

$$\text{Trp} : \text{Tyr} : \text{Phe} = 1100 : 200 : 8 \text{ (Schmid, 1997)}$$

Die intrinsische Fluoreszenz wurde für die Überprüfung der Reinheit der rekombinanten Seidenproteine verwendet. Da diese im Gegensatz zu den meisten *E. coli*-Proteinen kein Tryptophan enthalten, sollte bei einer Probe ohne Verunreinigungen nur das Emissionsspektrum von Tyrosin mit einem Maximum bei ca. 305 nm gemessen werden können.

Alle Messungen wurden in 50 µl Quarzglas Suprasil Fluoreszenzküvetten durchgeführt.

	Tyrosin / Tryptophan	Tryptophan
Anregungswellenlänge	275 nm	295 nm
Aufnahme der Emission	290-400 nm	300-400 nm
Spaltbreiten	5 nm / 5 nm	5 nm / 5 nm
Integrationszeit	0,5 s	0,5 s
Temperatur	25 °C	25 °C

2.6.13 Kopplung von Farbstoffen

Das Protein Sfl wurde aminoterminal mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gelabelt. Dabei reagiert das Isothiocyanat mit freien Aminogruppen, die im Fall von Sfl nur am Aminoterminus und nicht in den Seitenketten der Aminosäuren vorkommen. Sfl wurde dabei gegen 10 mM $K_xH_{3-x}PO_4$ pH 8 dialysiert. Aufgrund der Kopplungsreaktion sind aminhaltige Puffer, wie Tris, zu vermeiden. FITC wurde im gleichen Puffer gelöst und im molaren Überschuss von 1:10 zur Proteinlösung gegeben. Nach 1 h wurde das gelabelte Protein über eine Entsalzungssäule (Flussrate: 10 mL/min; maximaler Druck: 0,5 MPa; GE healthcare, München) vom restlichen freien Farbstoff separiert. Nach der Elution des Proteins wurden dessen Konzentration und die Effizienz der Markierung mit dem Farbstoff photometrisch bestimmt. Die Anzahl von Farbstoffmolekülen pro Proteinmolekül und damit das Verhältnis von markiertem zu nicht markiertem Protein wurde mit der folgenden Formel berechnet, wobei das Absorptionsmaximum von FITC bei 494 nm liegt:

$$\frac{n_F}{n_P} = \frac{A_{494} \cdot V}{68000 \cdot c}$$

wobei:

- n_F/n_P : Farbstoff pro Protein
- A_{494} : Absorption bei 494 nm
- V : Verdünnungsfaktor
- c : Proteinkonzentration [mg/mL]

2.6.14 Fluoreszenzmikroskopie

Mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert, Zeiss, Jena, Germany) konnte das Verhalten fluoreszenzmarkierter Proteine in Lösung nachgewiesen werden. Mit FITC markiertes Sfl wurde bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen unter dem Mikroskop betrachtet, um Hinweise auf die äußere Form und mögliche Aggregate zu finden.

2.6.15 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Bei der Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*) wird ein Bild von der Oberfläche einer Probe durch das mechanische Abtasten derselben mit einer feinen Nadel erhalten. Die Bewegung der Probe in den drei Raumkoordinaten wird dabei durch Piezokristalle vermittelt. Während des Scannens über die Probe wird die Auslenkung der Nadel durch die Reflektion eines Laserstrahls detektiert und in ein Auslenkungssignal verwandelt. Dieses Signal wird wiederum verwendet um den Abstand der Probenoberfläche zur Nullposition der Spitze mit Hilfe des so genannten Z-Piezokristalles zu korrigieren. Das berechnete Signal für den Z-Piezoo (Höhe) kann wie die Auslenkung abgebildet werden und vermittelt so einen optischen Eindruck von der Probe.

Für die Probenpräparationen wurden rekombinante Flagelliform Seidenproteine bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen und pH-Werten auf frisch gespaltene Glimmerplättchen aufgetragen und für 5 Min. inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden die Proben noch drei Mal mit Millipore-Wasser gewaschen, üN luftgetrocknet und anschließend in einem Multimode SPM Rasterkraftmikroskop im Kontakt-Modus vermessen. Die feine Nadel an der Spitze des *cantilever* tastet in diesem Modus die Probenoberfläche kontinuierlich ab und erstellt auf diese Weise ein Höhenprofil, welches anschließend in ein Bild umgewandelt wird.

2.6.16 Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) und statische Lichtstreuung

Um das Oligomerisierungsverhalten von rekombinanten Flagelliform Seidenproteinen zu untersuchen, wurden die Proteinpartikel mittels asymmetrischer Flussfeldflussfraktionierung (AF4) getrennt und mittels statischer Lichtstreuung detektiert. Die AF4 ist eine matrixfreie Chromatographiemethode, bei der Partikel in einem Feld aufgetrennt und durch einen parabolischen Fluss im Trennkanal sukzessiv eluiert werden (Colfen & Antonietti, 2000). Während eines Experiments wird zunächst die Probe in den Trennkanal injiziert. Durch ein

Flussfeld werden die in der Probe enthaltenen Partikel aufgetrennt. Dabei wird ein Fluss durch die porösen Kanalwände senkrecht zum Kanal von der Decke zum Kanalboden angelegt (*cross flow*). Eine Membran am Kanalboden erlaubt dabei den Durchtritt des Puffers, nicht aber der zu analysierenden Partikel. Diesem Flussfeld wirkt die Diffusion der Probenpartikel entgegen. Dadurch entsteht eine, mit zunehmender Höhe über dem Kanalboden exponentiell abnehmende Verteilung der Teilchen. Die durchschnittliche Aufenthaltshöhe hängt dabei neben dem *cross flow* und der Viskosität des Lösungsmittels von dem Stokesradius der Teilchen ab. Kleine Partikel halten sich durchschnittlich weiter in der Kanalmitte auf als größere. Anschließend wird ein laminarer Fluss längs des Kanals angelegt, der ein parabolisches Flussprofil ausbildet (*channel flow*). Dadurch erfahren die Partikel abhängig von der durchschnittlichen Aufenthaltshöhe über dem Kanalboden eine unterschiedliche Flussrate in Richtung des Kanalausgangs was zu verschiedenen Retentionszeiten der einzelnen Partikelspezies führt.

Die Untersuchung von Sfl und SflCT mittels AF4 wurde unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen durchgeführt. Außerdem wurde in einigen Experimenten die Phosphatkonzentration variiert. Die Messparameter werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Messung	Kapitel 3.3.1		Kapitel 3.2.3
Protein	1 mg/ml Sfl		1 mg/ml SflCT
Membran	Zellulose		
Kanalhöhe	490 μm		
Laufpuffer	10 mM $\text{K}_x\text{H}_{3-x}\text{PO}_4$ pH 8	100 mM $\text{K}_x\text{H}_{3-x}\text{PO}_4$ pH 8	10 mM Tris/HCl pH 8
Fokussierung	3 Min.		
Flussrate	1,0 mL/Min.		
Querfluss	1,5 bis 0 mL/Min. als Gradient über 50 Min.		0,5 mL/Min.

Die Bestimmung der molaren Masse der aufgetrennten Proteine erfolgte durch den an den Kanalausgang angeschlossenen Lichtstredetektor DawnEOS. Durch statische Lichtstreuung kann die molare Masse eines Partikels direkt bestimmt werden, weshalb auf einen Proteinstandard verzichtet werden kann (Zimm, 1948). Die für die Berechnung der molaren Masse eines Proteins aus der statischen Lichtstreuung benötigte Proteinkonzentration wurde durch die Messung des Brechungsindex der Proteinlösung mit Hilfe des RI-Detektors 71 bestimmt. Alternativ wurde bei einigen Messungen die Proteinkonzentration über die UV-

Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Astra. Dafür war die Kenntnis des Brechungsindexinkrements dn/dc notwendig. Dies wurde mit der Formel

$$\frac{dn}{dc} = \frac{n_p - n_s}{\rho_p}$$

unter Verwendung folgender Parameter berechnet.

Brechungsindex	Protein	$n_p = 1,585$
	nativer Puffer	$n_s = 1,330$
Dichte	Protein	$\rho_p = 1,380$
Brechungsindexinkrement	in nativem Puffer	$dn/dc = 0,185$

2.6.17 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung ist eine Methode bei der das Streulicht eines Lasers verwendet wird, um den hydrodynamischen Radius von Makromolekülen in Lösung zu bestimmen. Im Unterschied zur statischen Lichtstreuung, bei der das Streulicht unter einem bestimmten Winkel betrachtet wird und zur Bestimmung der molaren Masse herangezogen wird, berücksichtigt die dynamische Lichtstreuung die Bewegung der Teilchen im Rahmen der Braunschen Molekularbewegung und misst Unterschiede in der Intensität des Streulichts. Diese ergeben sich aus den Wellenlängenverschiebungen nach der Streuung, die wiederum von der Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen abhängig sind. Daraus lässt sich unter Kenntnis der Viskosität des Lösungsmittels der hydrodynamische Radius bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der hydrodynamische Radius von Sfl bei verschiedenen Protein- und Salzkonzentrationen bestimmt.

Stokes-Einstein-Gleichung:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a}$$

mit: D: Diffusionskoeffizient
 k: Boltzmann-Konstante
 T: absolute Temperatur
 η : Viskosität der Lösung
 a: hydrodynamischer Radius des gelösten Partikels

Die Messungen erfolgten mit dem Instrument Axios-150 (Hellas-Triton) im Winkel von 90° zum einstrahlenden Laser mit 370 mW maximaler Leistung (Laser Technologies, Kleinostheim, Deutschland). Die Spektren wurde alle 30 s über 2 h bei einer Wellenlänge von 658 nm aufgezeichnet. Die Auswertung der Partikelverteilung erfolgte mit dem nach Provencher standardisiertem Laplace-Inversions CONTIN Algorithmus für die

Autokorrelationsfunktion. Die Viskosität der Lösung wurde mit dem Programm UltraScan 9.0 berechnet.

2.6.18 Gießen von Proteinfilmen

Zum Gießen von Proteinfilmen, die robust genug waren, um von der glatten Oberfläche einer transparenten Polystyrol-Petrischale abgezogen werden zu können, wurde lyophilisiertes in einer Konzentration von 2 % (w/v) vollständig in HFIP bei RT in einem Glasgefäß (!) gelöst. Dies entsprach einer Proteinkonzentration von. Für Proteinfilme, deren Sekundärstruktur per CD-Spektroskopie untersucht wurde, wurden weniger konzentrierte Lösungen von 0,3 % (w/v) in HFIP verwendet. Nachdem sich das Protein vollständig gelöst hatte, wurden die entsprechenden Lösungen in die Petrischale bzw. auf entsprechende Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 10 µm pipettiert. Anschließend ließ man das Lösungsmittel unter dem Abzug bei 4 °C vollständig abdampfen. Danach blieb ein transparenter Proteinfilm zurück. Dieser konnte vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen bzw. mittels CD-Spektroskopie auf Sekundärstrukturmerkmale der zugrunde liegenden Proteine untersucht werden. Mittels Ellipsometrie konnte auch die Höhe solcher Proteinfilme bestimmt werden.

2.6.19 Kopplung an Oberflächen

Um eine Glasoberfläche mit einer möglichst dünnen Proteinschicht zu benetzen, wurde das Protein über einen Crosslinker, in diesem Fall Phenylendiisothiocyanat (PDITC), direkt an die Oberfläche gekoppelt. Hierzu musste zunächst die Oberfläche mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES) silanisiert werden, wodurch eine Aminogruppe kovalent mit der Oberfläche verbunden wurde. An diese Aminogruppe wurde der homo-bifunktionelle Crosslinker PDITC gekoppelt. Dabei wird das Kohlenstoffatom im Isothiocyanat vom freien Elektronenpaar der Aminogruppe nukleophil angegriffen. Die gleiche Reaktion findet bei der Überschichtung mit Proteinlösung statt. Aminogruppen im Protein werden dabei mit dem zweiten Isothiocyanat des PDITC kovalent verknüpft. Die Reaktion fand jeweils in folgender Aktivierungslösung statt:

0,2 % 1,4 Phenylendiisothiocyanat (PDITC)
10 % Pyridin
N,N-Dimethylformamid (DMF)

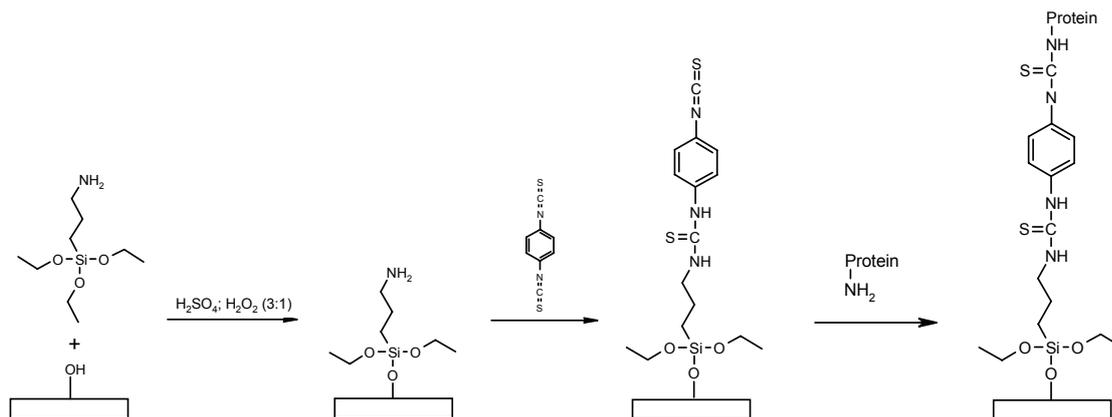


Abb. 2-2 – Schematische Darstellung der Kopplung mit Phenylendiisothiocyanat (PDITC). Der erste Schritt beinhaltet die Silanisierung der Oberfläche mit APTES, der zweite die kovalente Verknüpfung mit PDITC und der dritte die Kopplung des Proteins.

2.6.20 Ellipsometrie

Durch Ellipsometrie lassen sich mit dem Real- und Imaginärteil der komplexen Dielektrischen Funktion Schichtdicken sehr dünner Schichten bestimmen. Dabei wird linear oder zirkular polarisiertes Licht auf die zu bestimmende Schicht gelenkt. Aus der Änderung des Polarisationszustands, der durch die Fresnel-Reflexionskoeffizienten R_s und R_p bestimmt wird, wobei R_s für senkrecht und R_p für parallel zur Einfallsebene polarisiertes Licht steht, lässt sich die Höhe einer lichtdurchlässigen Schicht bestimmen. Da in der Ellipsometrie nur Intensitätsverhältnisse bestimmt werden, sind keine Referenzmessungen notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Schichtdicken von Proteinfilmen aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen auf silanisierten oder nicht silanisierten Glasoberflächen bestimmt. Die Messungen wurden freundlicherweise von Petra Neff (Lehrstuhl für Physik, TU München) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Reinigung

Um die Eigenschaften und Funktionen einzelner Domänen im Flagelliform-Spinnenseidenprotein (Flag) aus *Nephila clavipes* untersuchen zu können, wurden authentische und synthetische Proteine, die bestimmten Bereichen von Flag entsprachen, rekombinant produziert. Dafür wurden zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet. Eines der Systeme sollte den Epithelzellen der Spinne möglichst verwandt sein, um authentische Gene zu exprimieren. Daher wurden Insektenzellen des Heerwurms *Spodoptera frugiperda* (Sf9) gewählt. Weitere Proteine wurden rekombinant in *E. coli* synthetisiert. So konnten die Vorteile beider Expressionssysteme genutzt werden, um später möglichst umfangreiche Untersuchungen mit unterschiedlichen Fragestellungen an rekombinanten Flag-Proteinen durchführen zu können.

3.1.1 Rekombinante Produktion in Insektenzellen

Um die Synthese von rekombinanten Flag-Proteinen in Insektenzellen zu etablieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Bac-to-Bac[®] Baculovirus-Expressionssystem von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) verwendet. Zwei in den Vektor pGEM-3Zf(+) klonierte cDNA-Sequenzen wurden freundlicherweise von Cheryl Hayshi (University of California, Riverside, USA) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Sequenzen handelt es sich um das 5'-Ende und das 3'-Ende des Flag-Gens (Genbank Einträge: AF027972 für 5' und AF027973 für 3').

Sequenzierung der cDNA

Um die vorliegende cDNA des 5'- und 3'-Endes des Flag-Gens in dem Klonierungsvektor zu überprüfen, wurden die Plasmide pGEM-3Zf(+)-5'FLAG und pGEM-3Zf(+)-FLAG sequenziert. Aufgrund der Länge der Konstrukte von 2613 kb für 5' und 2721 kb für 3' sowie mangels geeigneter Primerbindestellen, wurden die Konstrukte durch Restriktion mit *Bam*HI fragmentiert. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach dem Einfügen in einen Klonierungsvektor mit im Vektor bindenden Primern. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde anschließend mit den oben genannten Genbank Einträgen verglichen und ist in Tab. 3.1 dargestellt.

Position	Mutation der DNA	Kodon- verschiebung	Mutation der Aminosäure
(3')FLAG: 501	T → C	CCT → CCC	Pro (stille Mutation)
(3')FLAG: 522	A → T	GGA → GGT	Gly (stille Mutation)
(3')FLAG: 1956	A → T	GGA → GGT	Gly (stille Mutation)
(3')FLAG: 1958	T → C	GTA → GCA	Val → Ala
5'FLAG: 1730	T → C	GAT → GAC	Asp (stille Mutation)
5'FLAG: 2091	A → G	AGT → GGT	Ser → Gly

Tab. 3.1 – Übersicht der gefundenen Mutationen in den Genen, die für das 5'- und das 3'-Ende von Flag kodieren und in den Plasmiden pGEM-3Zf(+)-5'FLAG und pGEM-3Zf(+)-FLAG vorlagen. Vier der Mutationen sind still, durch zwei weitere wird die Aminosäuresequenz in FLAG-N (cDNA = 5'FLAG) und FLAG-C (cDNA = FLAG) beeinträchtigt. Die zugehörige Gensequenz befindet sich im Anhang.

Die Aminosäuresequenz ändert sich durch Mutationen in der cDNA an jeweils einer Stelle in der amino- und carboxyterminalen verglichen mit den genannten Genbankeinträgen. In FLAG-C werden zwei hydrophobe Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht, während in FLAG-N das am häufigsten vorkommende Glycin ein hydrophiles Serin ersetzt. Beide Mutationen werden auf das Verhalten des Proteins im Hinblick auf seine Länge wahrscheinlich keinen nennenswerten Einfluss haben. Verschiebungen des Leserasters wurden nicht detektiert. Die Gensequenzen konnten somit wie geplant zur Klonierung und Expression verwendet werden.

Klonierungssystem

Zur Etablierung der Expression wurde das 5'-FLAG-Gen aus dem Plasmid pGEM-3Zf(+)-FLAG verwendet. Dieses wurde durch Klonierung in den Vektor pET21a (Novagen) mit einem aminoterminalen T7-Tag zum immunospezifischen Nachweis des Proteins fusioniert. Das Fragment wurde anschließend ausgeschnitten (siehe 2.4.9) und in den Vektor pFastbac1 (Invitrogen) ligiert. Dieser enthält die nötigen Gensequenzen, um die Rekombination des Gens in ein Bacmid zu ermöglichen. Die Bacmid-DNA lag im *E. coli*-Stamm DH10Bac vor, der mit dem Plasmid pFastbac1-FLAG transformiert wurde. Eine erfolgreiche Rekombination des Gens in das Bacmid konnte mit einem Blau-Weiß-Test (siehe 2.5.1) überprüft werden. Das Verhältnis blauer zu nicht gefärbten Zellen betrug bei den durchgeführten Transformationen etwa 1:1. Das erhaltene rekombinante Gen kodiert für das Protein FLAG-C mit einem Molekulargewicht von 66 kDa (Abb. 3.3-1).

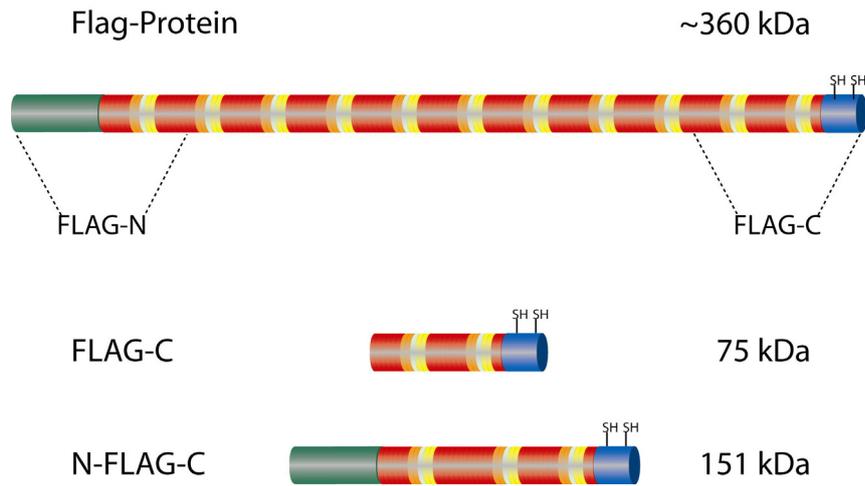


Abb. 3.3-1 – Konstrukte für die Synthese in Sf9-Zellen im Vergleich zum authentischen Flag-Protein.

Für die Synthese des Fusionsproteins N-FLAG-C aus dem 5'- und 3'-Ende des Flag-Gens wurde ein Konstrukt aus den Plasmiden pGEM-3Zf(+)-FLAG und pGEM-3Zf(+)-5'FLAG generiert. Die Gensequenzen wurden in dem Klonierungsvektor pGEM-3Zf(+) zusammengefügt und ebenfalls mit einem T7-Tag versehen bevor sie in den Vektor pFastbac1 ligiert wurden (siehe 2.4.9). Nachdem die Klonierung abgeschlossen war, wurde das Konstrukt an Markus Heim übergeben. Seine Arbeit wird die Synthese von N-FLAG-C in Insektenzellen und die anschließende Reinigung sowie Charakterisierung des Proteins beinhalten. Das rekombinante N-FLAG-C ist dem authentischen Flagelliform-Seidenprotein sehr ähnlich, da es alle Flag-Domänen enthält. Zwischen den beiden vollständigen nicht-repetitiven terminalen Domänen befindet sich ein großer Teil der repetitiven Domäne, der in der Länge etwa drei von insgesamt elf Wiederholungseinheiten entspricht. Das Molekulargewicht des Proteins N-FLAG-C beträgt 151 kDa (Abb. 3.3-1). Da in Insektenzellen ähnliche postranslationale Modifizierungen erwartet werden, wie in den Epithelzellen der Spinndrüse, sollen Untersuchungen dieses Konstrukts helfen, den natürlichen Assemblierungsmechanismus genauer zu analysieren. Die hier durchgeführte Klonierung bildet somit die Grundlage für die spätere Charakterisierung von N-FLAG-C.

Präparation von Bacmiden und Transfektion von Insektenzellen

Um Sf9-Zellen transfizieren zu können, wurde das rekombinante Bacmid aus DH10Bac präpariert. Anhand einer Agarosegelelektrophorese konnte das erfolgreich klonierte Bacmid für die spätere Synthese von FLAG-C nachgewiesen werden (Abb. 3.3-2) und somit für die Transfektion der Insektenzellen verwendet werden. Als Positivkontrolle wurde ein Bacmid zur späteren Synthese eines Proteins der Dragline-Spinnenseide ADF-4 (*Araneus diadematus*

fibroin präpariert. Die Produktion von ADF-4 in Insektenzellen konnte bereits gezeigt werden (Hümmerich *et al.*, 2004) und eignet sich daher als Kontrolle.

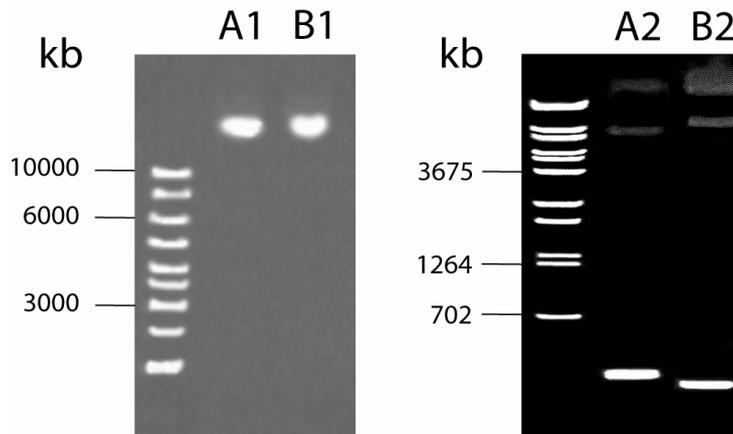


Abb. 3.3-2 – Agarosegele zur Analyse des aus *E. coli* DH10Bac präparierten, rekombinanten Bacmids. Dieses wird zur Transfektion der Insektenzellen verwendet. Aufgetragen sind die Bacmide und PCR-Reaktionen auf die Bacmid-DNA mit Insert-spezifischen Primern. A1: Bacmid-DNA mit Gen für ADF-4; B1: Bacmid-DNA mit Gen für FLAG-C; A2: PCR auf Bacmid mit Gen für ADF-4; B2: PCR auf Bacmid mit Gen für FLAG-C.

Neben der Kontrolle der unbehandelten Bacmid-DNA wurde eine PCR auf die Bacmide mit Primern (siehe 2.1.3 und Hümmerich, Doktorarbeit, 2004), die nur auf den jeweiligen Inserts annealen, durchgeführt. In der Kontrolle konnten die erwarteten Banden bei 333 bp (ADF-4) und 285 bp (FLAG-C) detektiert werden (Abb. 3.3-2). Nach der positiven Kontrolle der Bacmid-DNA beider Konstrukte mittels Agarosegel wurde mit der Transfektion der Insektenzellen begonnen, um für die Expression eine Virenstammlösung herzustellen. In einem Plaque-Assay (siehe 2.5.1 und Handbuch Bac-to-Bac[®]) wurde die Anzahl der Baculoviren überprüft und auf 10^7 Viren pro mL optimiert (Yamagishi *et al.*, 2003).

Kultivierung der Insektenzellen (Sf9) und rekombinante Synthese von FLAG-C

Als Insektenzellstamm wurde die Zelllinie Sf9 aus *Spodoptera frugiperda* gewählt, einer Mottenart aus der Familie der Eulenfalter, die zur Ordnung der Schmetterlinge zählt. Sf9-Zellen bieten den Vorteil robust und unempfindlich gegenüber Scherstress zu sein. Sie können adhärent (Abb. 3.3-3A) oder in Suspension wachsen, wodurch eine einfache Steigerung der Zelldichte und damit der rekombinanten Genexpression erreicht werden kann (Altmann *et al.*, 1999). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 28 °C und einem optimalen pH-Wert von 6,2 in serumfreiem Medium.

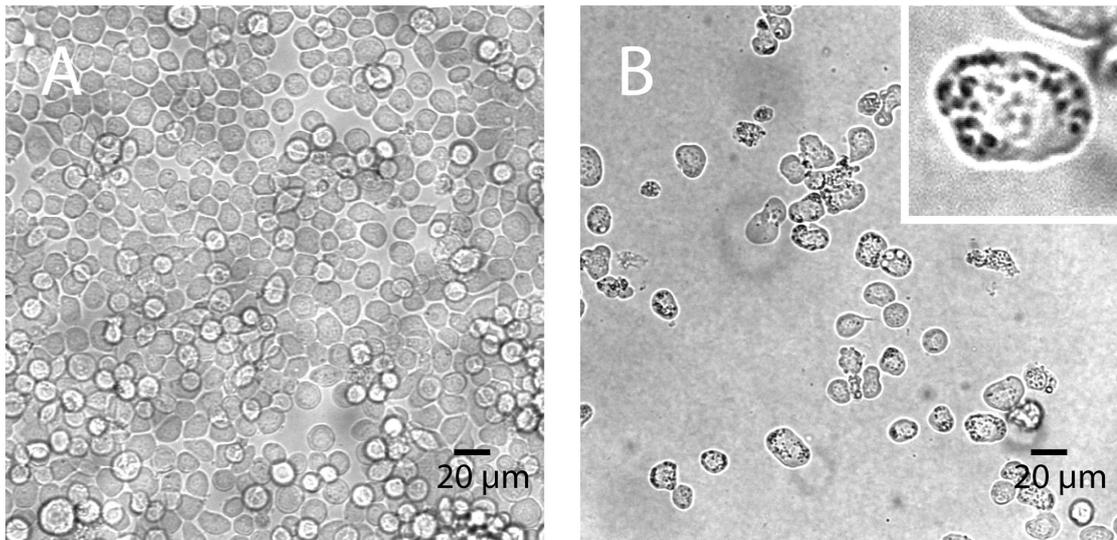


Abb. 3.3-3 – Lichtmikroskopische Aufnahmen von Insektenzellen aus *Spodoptera frugiperda* (Sf9). A: Konfluent wachsende Zellen haben sich als Monoschicht am Boden der Zellkulturflasche angelagert. B: Sf9-Zellen 3 Tage nach der Infektion mit rekombinantem Baculovirus. Deutlich zu erkennen sind die sogenannten Polyhedra, die sich in der Zelle bilden und in diesem Fall rekombinantes FLAG-C Protein enthalten. Das Protein wurde dabei unter Kontrolle des Polyhedrin-Promotors gebildet.

Für eine effiziente Infektion zur Expression ist es sinnvoll eine MOI (*multiplicity of infection*) zwischen 5 und 10 zu wählen. Die MOI gibt dabei das Verhältnis Viruspartikel zur Anzahl von Zellen an. Nach der Zugabe der Viren zu den Zellen startet die Endocytose, bei der DNA aus dem Viruskapsid in den Zellkern geschleust wird, um dort zu replizieren. Im rekombinanten Virus steht das Gen von FLAG-C unter Kontrolle des Polyhedrin-Promotors. Polyhedrin ist ein Matrixprotein, in dem die Virionen beim Verlassen der Zelle eingebettet werden. Daher wird Polyhedrin erst in der sehr späten Phase der Infektion, ab 18 h p.i. (*post infection*), gebildet (Lin *et al.*, 2000).

Bei Infektion mit dem Wildtyp-Virus bilden sich nach spätestens 3 Tagen in der Zelle die sogenannten Polyhedra, die aus Polyhedrin aufgebaut sind. Bei rekombinantem Virus hingegen können diese aus dem entsprechenden Protein bestehen (Abb. 3.3-3B). Für nicht sekretierte rekombinante Proteine ist das Maximum der Genexpression in der Regel zwischen 48 und 96 h p.i. erreicht. Eine Expressionskinetik für rekombinante Gene, die für FLAG-C oder ADF-4 (Kontrolle) kodieren, umfasste 4 Tage, wobei jeweils nach 24, 48, 72 und 96 h Proben entnommen wurden.

Die Genexpression wurde mittels Western Blot analysiert. Sf9-Zellen wurden nach entsprechender Zeit entnommen und im Auftragspuffer (Lämmli) für die SDS-Gelelektrophorese aufgenommen. Die Detektion des Proteins wurde über den T7-Tag mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt.

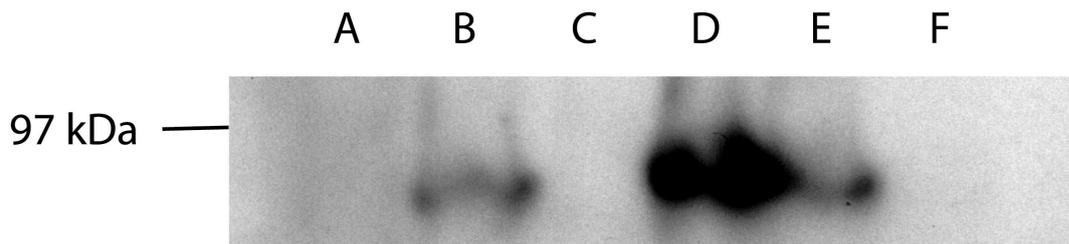


Abb. 3.3-4 – Western Blot der Expressionskinetik von FLAG-C aus Sf9. Aufgetragen sind Proben der mit rekombinantem Baculovirus infizierten Zellen nach 1 d (A), nach 2 d (B), nach 3 d (D), sowie nach 4 d (E). Als Kontrollen wurden Sf9-Zellen aufgetragen, die 2 d mit Wildtyp-Baculovirus infiziert waren (C) bzw. nicht infiziert waren (F). Zur Detektion wurde ein primärer Antikörper gegen den T7-Tag (1:10000) und ein sekundärer POD-konjugierter anti-Maus-Antikörper (1:5000) verwendet.

Anhand des Western Blots zeigt sich, dass das Maximum der Genexpression nach 3 Tagen erreicht wurde (Abb. 3.3-4D). Am vierten Tag konnte bereits weniger Protein detektiert werden (Abb. 3.3-4E), was für einen proteolytischen Abbau des rekombinanten FLAG-C in den Zellen spricht. Entsprechende Kontrollen von nicht-infizierten beziehungsweise mit Wildtyp-Baculovirus infizierten Sf9-Zellen nach 2 Tagen zeigten keine spezifische Proteinbande (Abb. 3.3-4C, F).

FLAG-C besitzt ein Molekulargewicht von 75 kDa und konnte zwischen den Markerbanden von 66 und 97 kDa detektiert werden. Die Laufhöhe des Proteins auf dem Gel lässt hingegen keine Rückschlüsse auf posttranslationale Modifizierung zu.

Analyse von möglichen postrationalen Modifikationsstellen

Mit dem Programm YinOYang 1.2 (www.expasy.org) konnten für die Aminosäuresequenz vier mögliche Stellen für eine o-Glykosylierung gefunden werden. Dabei handelte es sich um drei Serine und ein Threonin, die sich alle in der nicht repetitiven Domäne befinden. Mit dem Programm NetPhos 2.0 (www.expasy.org) wurde für insgesamt 20 Aminosäureseitenketten von FLAG-C Phosphorylierung vorhergesagt. Darunter waren neun Seitenketten von Serin, sechs von Threonin und fünf von Tyrosin. Der Großteil der möglichen Stellen für Phosphorylierung befindet sich fast ausschließlich in der nicht-repetitiven carboxyterminalen Domäne. Eine Analyse der tatsächlich modifizierten Stellen war durch die SDS-PAGE zur Analyse der Expression und Reinigung nicht möglich.

Reinigung von FLAG-C aus Insektenzellen (Sf9)

Zur Reinigung wurden Insektenzellen 3 Tage nach ihrer Infektion in 20 mM HEPES, 5 mM NaCl, pH 7,5 aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurden

Proben entnommen und die Anwesenheit von FLAG-C untersucht. Sowohl im Pellet als auch im Überstand konnte FLAG-C nachgewiesen werden (Abb. 3.3-5A, B), daher sollten die Pufferbedingungen nach der Zellernte weiter optimiert werden, um eine Reinigung entweder aus dem Überstand oder dem Pellet zu forcieren.

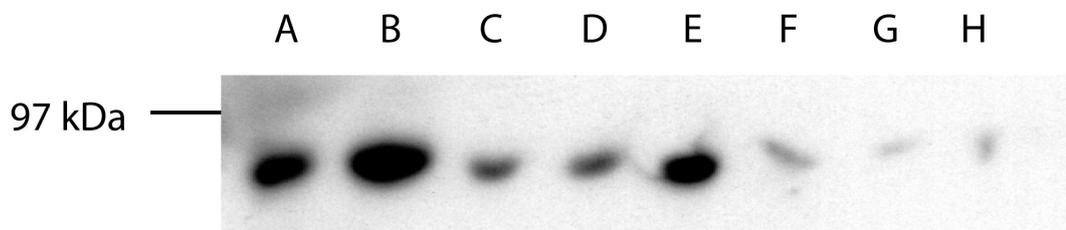


Abb. 3.3-5 – Western Blot der Reinigung von FLAG-C aus Sf9. Nach Aufnahme der Sf9-Zellen in 20 mM HEPES, 5 mM NaCl, pH 7,5 erfolgte der Aufschluss mit Ultraschall. Nach Zentrifugation wurden Pellet (A) und Überstand (B) aufgetragen. Der Überstand wurde daraufhin mit einem 20 minütigen Hitzeschritt bei unterschiedlichen Temperaturen behandelt. Aufgetragen sind: Pellet nach 60 °C (C), nach 70 °C (D) und nach 80 °C (E), Überstand nach 60 °C (F), nach 70 °C (G) und nach 80 °C (H).

Zur Optimierung der Reinigung von FLAG-C wurden verschiedene Reinigungsschritte durchgeführt, um ein effizientes Reinigungsschema zu entwickeln. Zunächst wurde FLAG-C in einem 20 minütigen Hitzeschritt bei Temperaturen von 60, 70 und 80 °C inkubiert. Danach wurden Proben aus dem Pellet und dem Überstand nach Zentrifugation entnommen und ebenfalls analysiert (Abb. 3.3-5C-H). Bei 80 °C findet sich das Protein hauptsächlich im Pellet, aber auch nach Behandlung bei 70 oder 60 °C konnte FLAG-C im Pellet gefunden werden.

Weitere Reinigungsschritte wurden mit der löslichen Fraktion nach dem Hitzeschritt bei 60 °C durchgeführt. Die Proteine wurden mit 20 % Ammoniumsulfat gefällt. Eine genaue Analyse der löslichen Fraktion und des Pellet nach Zentrifugation zeigte kein detektierbares FLAG-C. Demnach muss bei der Reinigung der Flag-Proteine auf den Hitzeschritt verzichtet werden (siehe 4.1).

Da in dieser Arbeit zur Untersuchung der einzelnen Flag-Domänen das bakterielle System die Möglichkeit bot die Expression und Reinigung mehrerer Konstrukte gleichzeitig zu optimieren, wurde das Expressionssystem Insektenzellen an Markus Heim übergeben.

3.1.2 Rekombinante Produktion in Bakterien

Für die rekombinante Produktion von Proteinen bieten sich weitere, kostengünstigere Expressionssysteme an. Bakterielle Systeme sind relativ einfach in der Handhabung,

außerdem existieren eine Fülle von Klonierungs- und Expressionsvektoren. Die Wahl des Klonierungsvektors richtet sich nach dem Selektionsmarker, den Schnittstellen für Restriktionsenzyme oder dem Replikationsursprung, welcher u. a. für die Anzahl der Kopien des Vektors in der Zelle verantwortlich ist. Die effiziente rekombinante Produktion von Spinnenseidenproteinen wurde in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt (Hümmerich, Doktorarbeit, 2004). Aus diesem Grund sollte das bakterielle Expressionssystem für die rekombinante Produktion von Flag-Proteinen adaptiert und optimiert werden.

Klonierungssystem

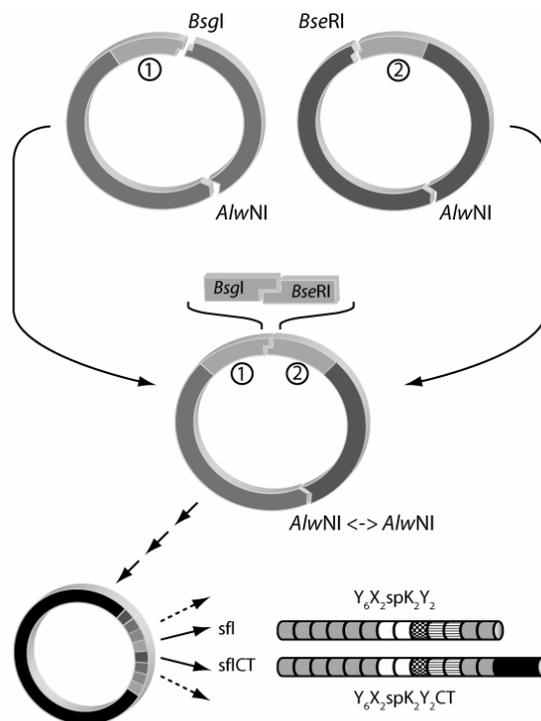


Abb. 3.3-6 – Funktionsweise des Klonierungssystems für die Konstrukte der Flag-Seide. In den Klonierungsvektor pAZL wurden die DNA-Fragmente K, X, Y, sp, nrCT sowie nrNT jeweils einzeln eingefügt. Zur Klonierung wurde das spätere 5'-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *BsgI* und *AlwNI*, das designierte 3'-Fragment mit *BseRI* und *AlwNI* geschnitten. Eine Ligation der beiden Fragment enthaltenden DNA-Stücke ergab wieder den vollständigen Vektor, der dann beide Fragmente enthielt. Da die Erkennungssequenzen für *BsgI* bzw. *BseRI* 14 bzw. 8 Basen vor der Schnittstelle liegen, entfielen die Schnittstellen der Enzyme zwischen den beiden Fragmenten. Nur am 3'- und 5'-Ende des neuen Fragments blieben die Erkennungssequenzen für *BsgI* und *BseRI* erhalten, womit ggf. ein neuer Klonierungsschritt eingeleitet werden konnte. Die Schnittstelle für *AlwNI* befindet sich im Replikationsursprung von pAZL und erleichtert damit die Selektion der korrekt ligierten Plasmide. Auf diese Weise wurden sämtliche Konstrukte für die bakterielle Expression erstellt. Als Beispiel sind die Gensequenzen angefügt, die für Sfl und SflCT kodieren (Hümmerich *et al.*, 2004; Vendrely *et al.*, 2007).

Aufgrund ihrer Wiederholungssequenzen mussten die rekombinanten Flag-Gene mit einem modularen Klonierungssystem generiert werden. Dabei konnten die einzelnen DNA-Fragmente in beliebiger Reihenfolge angeordnet werden. Der Vektor pAZL diente als Klonierungsvektor (Hümmerich, Doktorarbeit, 2004) und ermöglichte über die eingefügten Schnittstellen *BsgI* und *BseRI* eine nahtlose Klonierungstechnik (Padgett & Sorge, 1996), bei der DNA-Fragmente direkt aneinander ligiert werden können, ohne dass zwischen ihnen Schnittstellen oder fremde Basen zurückbleiben. Die beschriebene Funktionsweise des Klonierungssystems ist in Abb. 3.3-6 dargestellt.

Fertig zusammengestellte Flag-Gene konnten über die Schnittstellen *BamHI*, *NcoI* und *HindIII* in die Expressionsvektoren des pET-Systems (Novagen) oder des pQE-Systems (Qiagen) kloniert werden. Dadurch konnte der Promotor (T7 oder T5) sowie angehängte Peptidsequenzen zur anschließenden Detektion durch Antikörper (T7-Tag, His₆-Tag, beide Tags oder kein Tag) frei gewählt werden.

Konstruktion eines rekombinanten Flag-Gens

Flag lässt sich in drei Bereiche gliedern: Die aminoternale Domäne, den großen repetitiven Mittelteil und die carboxyterminale Domäne. Für die Synthese rekombinanter Spinnenseidenproteine in *E. coli* musste die Gensequenz an die Kodonbenutzung der Bakterien angepasst werden. Aufgrund der im Klonierungssystem gewählten Überhängen an den Schnittstellen wurden die Fragmente so gewählt, dass sie an ihrem 3'-Ende GG bzw. CC als ungepaarte Basen besitzen. Die Nukleotide (GGN) kodieren immer für ein Glycin, welches in Flag mit knapp 50 % als häufigste Aminosäure vorkommt. Daher wurden alle Fragmente der natürlichen und synthetischen Fragmente so gewählt, dass sie mit einem Glycin beginnen. Hierfür wurden die vier in der repetitiven Mitteldomäne vorkommenden Motive, die für (GPGGAGGPY)₃, (GGX)₆, (GPGGX)₆ und GGTTHIEDLDITIDGADGPITISEELTI (K, X, Y und sp genannt) kodieren, als kodonoptimierte einzelsträngige Oligonukleotide synthetisiert. Diese wurden anschließend zu zweisträngigen DNA-Fragmenten hybridisiert und in den Klonierungsvektor pAZL ligiert. Die nicht-repetitiven terminalen Domänen konnten hingegen mittels PCR aus der entsprechenden cDNA (pGEM-3Zf(+)-FLAG und pGEM-3Zf(+)-5'FLAG) amplifiziert und ligiert werden (Abb. 3.3-7).

aminoterminaler Proteinsequenz von Flag

MGKGRHDTKAKAKAMQVALASSIAELVIA**ESSGGDVQRKTNVISNALRNALMSTTGSPNEEF**
VHEVQDLIQMLSQEQINEVDTSGPQYYRSSSSGGGGGGQGGPVVTE^TLT^VTVVGGSSGGGQPS
GAGPSGTGGYAPTGYAPSGSGAGGVRPSASGSPSGSPSGSRPSSSGPSGTRPSPNGASGSS
PGGIAPGGSNSGGAGVSGATGPASSGSYGPSTGGTYGPSGGSEPFPGPVAGGPYSPGGAG
PGGAGGAYGPGGVGTGGAGPGGYGPGGAGPGGYGPGGAGPGGYGPGGAGPGGYGPGGAGPGG
YPGGAGPGGYGPGGAGPGGYGPGGTGPGGYGPGGTGPGGVGPGGAGPGGYGPGGAGPGGAG
PGGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGYGPGGSGPGGAGPSGAGLGGAGPGGAGLGGAGPGGAGTS
GAGPGGAGPGGAGQGDAGPGGAGRGGAGRGGVGRGGAGRGGAGRGGARGAGGAGGAGGAGGS
GGTTIVEDLDITIDGADGPITISEELTIGGAGAGGS**GP**GGAGPGNVGPGRS**GP**GGVGPGGSG
PGGVGPGSF**GP**GGVGPGGSGPGGVSGSGQGGVVRPSGS**GP**GGVGTGGVGPGGAGGPY**GP**GG
SGPGSAGSAGGTY**GP**GGF**GP**GGF**GP**GGAGGPYGPGGAGGPYGPGGAGGPYGPGGAGGPY
PGGAGGPY**GP**GGAGGSYGLGGAGGS**GP**GGSGPGGYGPGGAGPGGYGPGGSGPGGYGPGG
SSGGGY**GP**GGSGPGGSGPGGYGPGGTGPGGSESGGY**GP**GGSGPGGSGPGGSGPGGSGPGGY
PGGSGPSSFVP**GP**GGSGPGGSGPGGAGPGGAGPGGVGLGGAGRGGAGRGGAGSVGAGRGGAGR
 GTG

carboxyterminale Proteinsequenz von Flag

GPGGVGPGGSGPGGYGPGGAGPGGYGPGGSGPGGYGPGGSGPGGYGPGGSGPGGYGPGGSGP
GGYGPGGSGPGGYGPGGYGPGGSGPGGYGPGGTGPGGSGPGGYGPGGSGPGGSGPGGYGPGG
SGPGGF**GP**GGSGPGGYGPGGSGPGGAGPGGVGPGGF**GP**GGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGAG
PGGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGAGP**GGAGGAGGAGGSGGAGGS**GGTTI**IEDLDITIDG**
ADGPITISEELTISGAGGS**GP**GGAGPGGVGPGGSGPGGVGPGGSGPGGVGPGGSGPGGV**GP**
GAGGPY**GP**GGSGPGGAGGAGGPGGAY**GP**GGSY**GP**GGSGPGGAGGPY**GP**GGEGPGGAGGPY
PGGAGGPYGPGGAGGPY**GP**GGEGGPY**GP**GGSYGPGGAGGPY**GP**GGPY**GP**GGEGPGGAGGPY
PGGVGPGGSGPGGYGPGGSGPGGYGPGGAGPGGYGPGGSGPGGYGPGGSGPGGYGPGGSGP
GYGPGGSGPGGYGS**GP**GGAGPGGYGPGGSGPGGYGPGGSGPGGYGPGGTGPGGTGPGGSGP
GPGGSGPGGSGPGGSGPGGYGPSSSGPGGYGPSSSGPGGYGPGGSGPGGYGPGGSGAGGT**GP**
GGAGGAGGAGGSGGAGGSGGAGGSGGAGGSGGVGGSGGTT**ITIEDLDITIDGADGPITISEEL**
TISGAGGS**GP**GGAGPGGVGPGGSGPGGVGPVSGPGGVGPGGSGPGGVGS**GGSGP**GGVGPGG
YGPGGSGSGGV**GP**GGYGPGGSGGFY**GP**GGSEGPYGPSTYGS**GGY**GPGGAGGPYGPSSPGG
 AYGPSP**GP**GAYYPSSRVPDMVNGIMSAMQSGFN**YQ**MFN**ML**SQYSSSG**SGTC**NPNNV**NV**LM**D**
ALLAALHCLSNHGSSSFAPSPTPAAMSAYSNSVGRMFAY

Code	Motiv	Konsensusmotive
XXX	(GPGGX) _n	Y  (GPGGX) ₆
<u>XXX</u>	(GGX) _n	X  (GGX) ₆
XXX	(GPGGAGGPY) _n	K  (GPGGAGGPY) ₃
XXX	Spacer	sp  GGTTI IEDLDITIDGADGPITISEELTI
XXX	nrNT	
XXX	nrCT	

Abb. 3.3-7 – Aminosäuresequenz des amino- und carboxyterminalen Teils von Flag. Die Sequenz wurde aus den bekannten Gensequenzen für Flag an die *E. coli* Kodonverwendung angepasst (Genbank Einträge: AF027972 für 5' und AF027973 für 3', siehe Anhang). Aus den Sequenzen wurden die Konsensusmotive für die Synthese von entsprechenden Oligonukleotiden bestimmt. nrCT und nrNT wurden als authentische Sequenzen mittels PCR amplifiziert.

Jedes einzelne Modul konnte nun beliebig mit anderen kombiniert werden. Bei der Klonierung wurde versucht, ein möglichst vorbildnahes Konstrukt zu bauen. Die mittlere Domäne des natürlichen Flag besteht aus elf Wiederholungseinheiten, die jeweils alle Motive in etwa gleicher Länge enthalten. Die Sequenz von sp kann dabei an drei Stellen variieren und auch die übrigen Motive sind in der Originalsequenz nicht vollständig konserviert. Dennoch konnte eins der Wiederholungsmotive mit der Sequenz $Y_6X_2spK_2Y_2$ nachgebaut werden und wurde Sfl (synthetisches Flag) genannt. Ausgehend von diesem Grundbaustein, der als Protein ein Molekulargewicht von 29 kDa besitzt, konnten nun verschiedene Konstrukte erstellt werden. Da in *E. coli* Proteine nur bis zu einer Länge von etwa 150 kDa effizient produziert werden können, wurde auf den Nachbau der gesamten repetitiven Domäne verzichtet. Stattdessen wurde neben Sfl auch Sfl₃ mit einem Molekulargewicht von 84 kDa produziert. Eine Kombination der Konstrukte mit den nicht-repetitiven Domänen war im Klonierungssystem ebenfalls möglich. Kombinationen mit nrCT waren für spätere Experimente besonders interessant, da in dieser Domäne die beiden einzigen Cysteine in der Sequenz von Flag auftreten. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte zeigt Abb. 3.3-8.

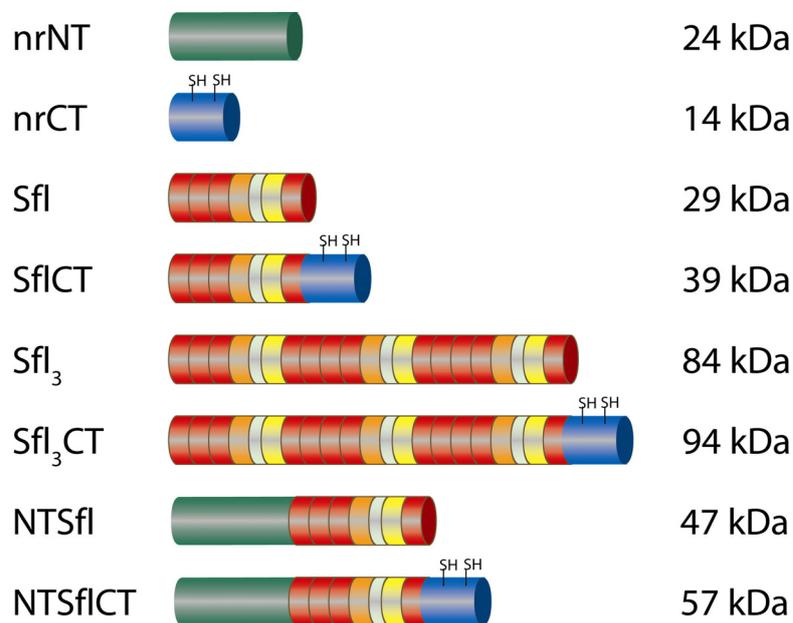


Abb. 3.3-8 – Konstrukte der Flag-Seide zur bakteriellen Synthese. Angegeben sind jeweils der Name, die Zusammensetzung und die molekulare Masse in kDa des jeweiligen Konstrukts.

Rekombinante Expression in E. coli

Zur Expression der Genkonstrukte wurden sowohl Vektoren aus dem pET-System (pET21a und pET28a) als auch Vektoren aus dem pQE-System (pQE30) verwendet. Gute Expressionkinetiken konnten im Stamm *E. coli* BLR (DE3) erzielt werden (Schmidt *et al.*,

2007). Dieser Stamm wurde explizit gewählt, weil ihm das Gen *recA* für die homologe Rekombination von Genen fehlt, was für die Expression von repetitiven Spinnenseidenproteinen essentiell ist (Hümmerich *et al.*, 2004).

Die Expression erfolgte für alle Konstrukte über 3 h bei 30 °C nach Zugabe von 1 mM IPTG. Zur qualitativen Auswertung der Expression wurden größere Konstrukte mittels 10-15 %iger SDS-Gele, kleinere Konstrukte mittels 12 %iger Schägger-Gele aufgetrennt und analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte wahlweise mit Silber- oder Coomassie-Färbung und zusätzlich durch Immunoblotting, sobald die Konstrukte über entsprechende Tags verfügten. Erfahrungsgemäß lassen sich Konstrukte mit carboxyterminaler Domäne (nrCT) besser mit Coomassie färben als die übrigen. Für alle Proteine wurde nach den angegebenen 3 h das Maximum der Genexpression erreicht.

Reinigung der rekombinanten Flag-Proteine

Da sämtliche Sfl-enthaltende Konstrukte bei den genannten Expressionsbedingungen nach der Zellernte und Zentrifugation im Pellet detektiert werden konnten, wurde ein Verfahren zur Reinigung aus *inclusion bodies* entwickelt (siehe 2.5.6). Weiterhin wurden die Proteine durch Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) von Verunreinigungen getrennt. Da alle rekombinanten Flag-Proteine einen sauren pI besitzen, konnte bei pH-Werten um 7,5 bis 8,0 eine gute Affinität zur Matrix der Säule erzielt werden. Alle Proteine eluierten bei Salzkonzentrationen von etwa 200 mM, wobei NaCl als Salz verwendet wurde. Fraktionen, die Flag-Proteine enthielten, wurden nach der Säule vereinigt. Sofern noch starke Verunreinigungen vorhanden waren, wurde eine fraktionierte Fällung mit 0,8 M Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) durchgeführt, da die meisten Flag-Proteine unter diesen Bedingungen in Lösung blieben. Nach Zentrifugation wurde die Salzkonzentration auf 1,2 M (NH₄)₂SO₄ erhöht, wodurch die rekombinanten Flag-Proteine präzipitierten, während alle noch verbliebenen Verunreinigungen nach erneuter Zentrifugation mit dem Überstand entfernt werden konnten.

Die beiden terminalen Domänen nrNT und nrCT wurden löslich im Cytosol synthetisiert und durch Affinitätschromatographie gereinigt. Die Affinität des His₆-Tags zur Ni-Sepharose (GE healthcare) war für beide Proteine etwa gleich, was zu einer Elution bei 100 mM Imidazol führte. Auch hier wurde ein weiterer Reinigungsschritt durch Zugaben von bis zu 1,2 M Ammoniumsulfat durchgeführt. Anschließend wurden alle Proteine nach Dialyse gegen 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

Eine Überprüfung der Reinheit sämtlicher rekombinanter Flag-Proteine war mittels Fluoreszenzspektroskopie möglich, da diese kein Tryptophan enthalten. Im Gegensatz dazu enthalten Proteine aus *E. coli* durchschnittlich 1,5 % Tryptophan (Blattner *et al.*, 1997). Bei Tryptophan handelt es sich um diejenige der drei natürlichen aromatischen Aminosäuren, deren intrinsische Fluoreszenzeigenschaften am stärksten ausgeprägt sind. Während Licht der Wellenlänge 295 nm nur Tryptophane anregt, absorbieren bei 275 nm sowohl Tryptophan als auch Tyrosin. Von Tryptophan emittiertes Licht zeigt ein Maximum zwischen 340 und 360 nm, bei Tyrosin liegt dieses Maximum bei 305 nm. Abb. 3.3-9 zeigt beispielhaft Fluoreszenzspektren von Sfl zur Überprüfung der Reinheit. Es konnte nur ein Signal für Tyrosin detektiert werden. Das Protein liegt demnach ohne Verunreinigungen in Lösung vor.

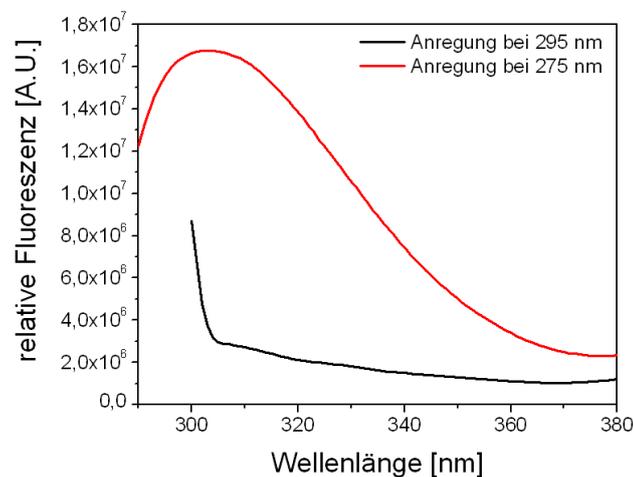


Abb. 3.3-9 – Fluoreszenzspektrum von Sfl zur Überprüfung der Reinheit. Dargestellt sind die Emissionsspektren bei Anregungswellenlängen von 275 nm (Tryptophan, Tyrosin) sowie von 295 nm (nur Tryptophan). Bei gereinigten rekombinanten Flag-Proteinen ist lediglich das Signal für die Emission von Tyrosin mit einem Maximum bei 305 nm detektierbar. Wäre Tryptophan im Protein enthalten, würde es aufgrund seines stärkeren Beitrags zur Fluoreszenz das Tyrosin-Signal überdecken.

Gereinigte rekombinante Flag-Proteine wurden in Ausbeuten zwischen 5 und 12 mg pro L Bakterienkultur erhalten (Induktion bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,8$).

Alle lyophilisierten Flag-Proteine waren in 8 M Harnstoff, 6 M GdmCl sowie 6 M GdmSCN löslich und konnten nach dem Lösen in den genannten Denaturierungsmitteln gegen entsprechende Messpuffer dialysiert werden.

3.2 Strukturelle Untersuchungen

Die Struktur des Flag-Proteins ist für sein Verhalten in der Spinnndrüse, aber auch seine Eigenschaften im assemblierten Faden verantwortlich. Die rekombinanten Flag-Proteine sollten auf ihre speziellen strukturellen Eigenschaften untersucht werden, um Aussagen über die Aufgabe einzelner Domänen in Flag machen zu können.

3.2.1 Sekundärstruktur

CD-Spektroskopie

In der Spinnndrüse liegen frisch sekretierte Spinnenseidenproteine in einer hochkonzentrierten wässrigen Lösung vor (Hijirida *et al.*, 1996). Vor ihrer Assemblierung bleiben diese größtenteils unstrukturiert (Keeley *et al.*, 2002; Dicko *et al.*, 2004). Um die Struktur der rekombinanten Proteine in Lösung zu untersuchen, wurden diese zunächst in 8 M Harnstoff aufgenommen und gegen 10 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert. Die Analyse der Sekundärstruktur erfolgte mittels Zirkulardichroismus im fern-UV Bereich bei Wellenlängen zwischen 190 und 250 nm und einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/mL. Dabei wurde jede Domäne einzeln, aber auch Kombinationen der mittleren Domäne mit der carboxyterminalen gemessen. Somit konnten neben der Sekundärstruktur jeder Domäne auch mögliche gegenseitige Einflüsse der einzelnen Domänen untersucht werden.

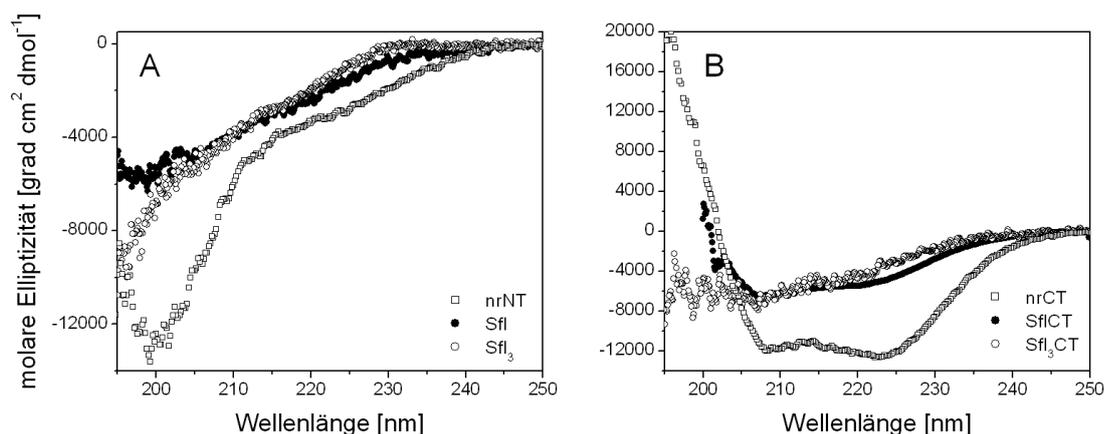


Abb. 3.3-10 – CD-Spektren im fern-UV von nrNT, Sfl und Sfl₃ (A), sowie von nrCT, SflCT und Sfl₃CT (B). Deutlich erkennbar ist der Unterschied zwischen den Spektren der aminoterminalen oder der mittleren Domäne, die vorwiegend unstrukturiert sind, und den Spektren, die von Konstrukten mit der carboxyterminalen Domäne aufgenommen wurden. Letztere zeigen deutlich den α -helikalen Strukturanteil von nrCT. Alle Spektren wurden in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm und bei einer Proteinkonzentration von 200 μ g/ml in 10 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen.

Das Protein Sfl, welches einer Gesamtwiederholungseinheit der repetitiven Sequenz von Flag nachempfunden ist und die Masse von 29 kDa besitzt, zeigt bei 20 °C in Lösung ein für unstrukturierte Proteine typisches Spektrum (Abb. 3.3-10A). Ein Anteil strukturierter Bereiche kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da das Spektrum bereits ab etwa 230 nm deutlich negative Werte annimmt. Eine Temperaturerhöhung von 20 °C auf 70 °C hat – bis auf geringe Abweichungen – keinen Einfluss auf das CD-Signal (Abb. 3.3-11). Das Protein bleibt auch bei höheren Temperaturen in Lösung und unstrukturiert.

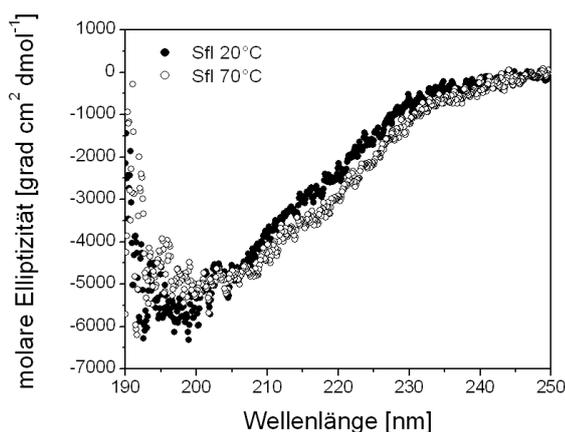


Abb. 3.3-11 – CD-Spektren im fern-UV von Sfl bei 20 °C und 70 °C. Beide Spektren wurden in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm und bei einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml in 10 mM K_xH_{3-x}PO₄ pH 6 aufgenommen.

Sfl₃ zeigt ein sehr ähnliches Spektrum. Auch durch Dekonvolution der Spektren von Sfl und Sfl₃ wurden identische Sekundärstrukturanteile berechnet (Tab. 3.2). Aus dem Spektrum wurde neben einem 35 %igen nicht-strukturierten Anteil im Protein ein sehr großer Anteil von β -Faltblatt-Struktur berechnet, der nicht auf den ersten Blick aus dem Spektrum ersichtlich ist. Die in Sfl vorkommenden Motive sollten laut Strukturvorhersage nicht an der Bildung von β -Faltblättern beteiligt sein. Stattdessen sind die Motive K und Y für die Bildung von β -Turns vorgeschlagen (Hayashi & Lewis, 2001), in die laut Berechnung 21 % des Proteins falten. Auch die aminoterminalen Domäne zeigte ein CD-Spektrum, welches für ein hauptsächlich unstrukturiertes Protein in Lösung spricht. Ein großer Anteil von *random coil* konnte durch Dekonvolution bestätigt werden. Da die aminoterminalen Domäne in der Flag-Seide, aber auch in weiteren Spinnenseiden, für den Vesikeltransport während der Proteinsekretion verantwortlich sein soll, ist eine Helix-Turn-Helix Konformation vorgeschlagen (Rising *et al.*, 2006). Diese Struktur konnte hier nicht bestätigt werden. Das Protein nrNT beinhaltet jedoch nicht die eigentliche Signalsequenz, sondern nur den Teil, der vermutlich im assemblierten Faden noch vorkommt.

Protein	Strukturanteil in [%]			
	α -Helix	β -Faltblatt	β -Turn	<i>random coil</i>
Sfl	5	39	21	35
Sfl ₃	5	39	21	35
SflCT	12	32	21	35
Sfl ₃ CT	9	33	23	35
nrCT	39	15	16	30
nrNT	8	34	23	35

Tab. 3.2 – Dekonvolution der CD-Spektren im fern-UV von Sfl, Sfl₃, SflCT, Sfl₃CT, nrCT und nrNT. Angegeben ist dabei der Anteil der jeweiligen Struktur an der Sekundärstruktur des entsprechenden Proteins in 10 mM Tris/HCl pH 8. Die Dekonvolution wurde mit dem Programm CDNN (Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Im Gegensatz dazu enthalten die Spektren der Konstrukte mit carboxyterminaler Domäne einen gewissen α -helikalen Anteil. Sehr deutlich ist dieser α -helikale Strukturanteil bei nrCT zu erkennen. Laut Dekonvolution liegt dieses Protein zu 39 % α -helikal vor. Auch SflCT und Sfl₃CT besitzen einen deutlichen Anteil α -helikaler Struktur. Dieser Strukturanteil muss folglich in der carboxyterminalen Region lokalisiert sein.

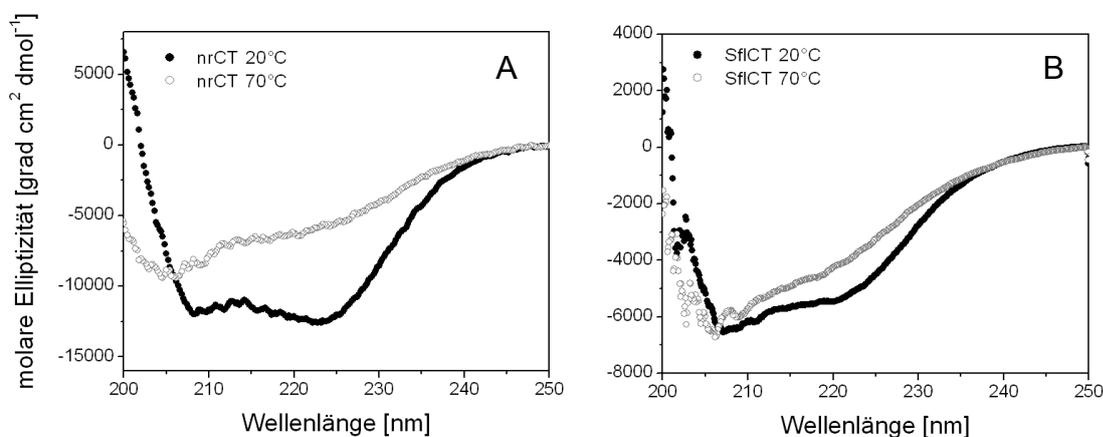


Abb. 3.3-12 – CD-Spektren im fern-UV von nrCT (A) und SflCT (B) bei 20 °C und 70 °C. Alle Spektren wurden in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm und bei einer Proteinkonzentration von 200 μ g/ml in 10 mM $K_xH_{3-x}PO_4$ pH 8 aufgenommen.

In Spektren, die bei 70 °C gemessen wurden, verschwindet dieser Strukturanteil (Abb. 3.3-12). Die thermisch bedingte Änderung der Struktur ist reversibel, was durch eine Messung nach Abkühlen auf 20 °C nachgewiesen werden konnte. Die Entfaltung der helikalen Struktur wird unter 3.2.4 genauer untersucht.

FTIR-Spektroskopie

Um die Verteilung der Sekundärstruktur bei den rekombinanten Flag-Proteinen genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich fouriertransformierte Infrarotspektroskopie (FTIR) angewendet. Im FTIR-Spektrum zeigen Proteine charakteristische Banden. Insgesamt neun verschiedene infrarot aktive Schwingungen sind auf das Proteinrückgrat zurückzuführen (Krimm & Bandekar, 1986). In der Reihenfolge abnehmender Wellenzahlen werden diese Banden Amid A und B sowie I bis VII genannt. Die Amid I Bande ist dabei diejenige, die die meisten Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins enthält und deshalb zur Auswertung herangezogen wird. Sie entsteht hauptsächlich durch die Streckschwingung des Carbonyls (C=O) am Peptidrückgrat. Diese Gruppe ist an Wasserstoffbrücken zu benachbarten Aminogruppen (N-H) beteiligt, die je nach Sekundärstruktur des Proteins unterschiedliche Bindungsstärken haben und somit spezifische Signale geben.

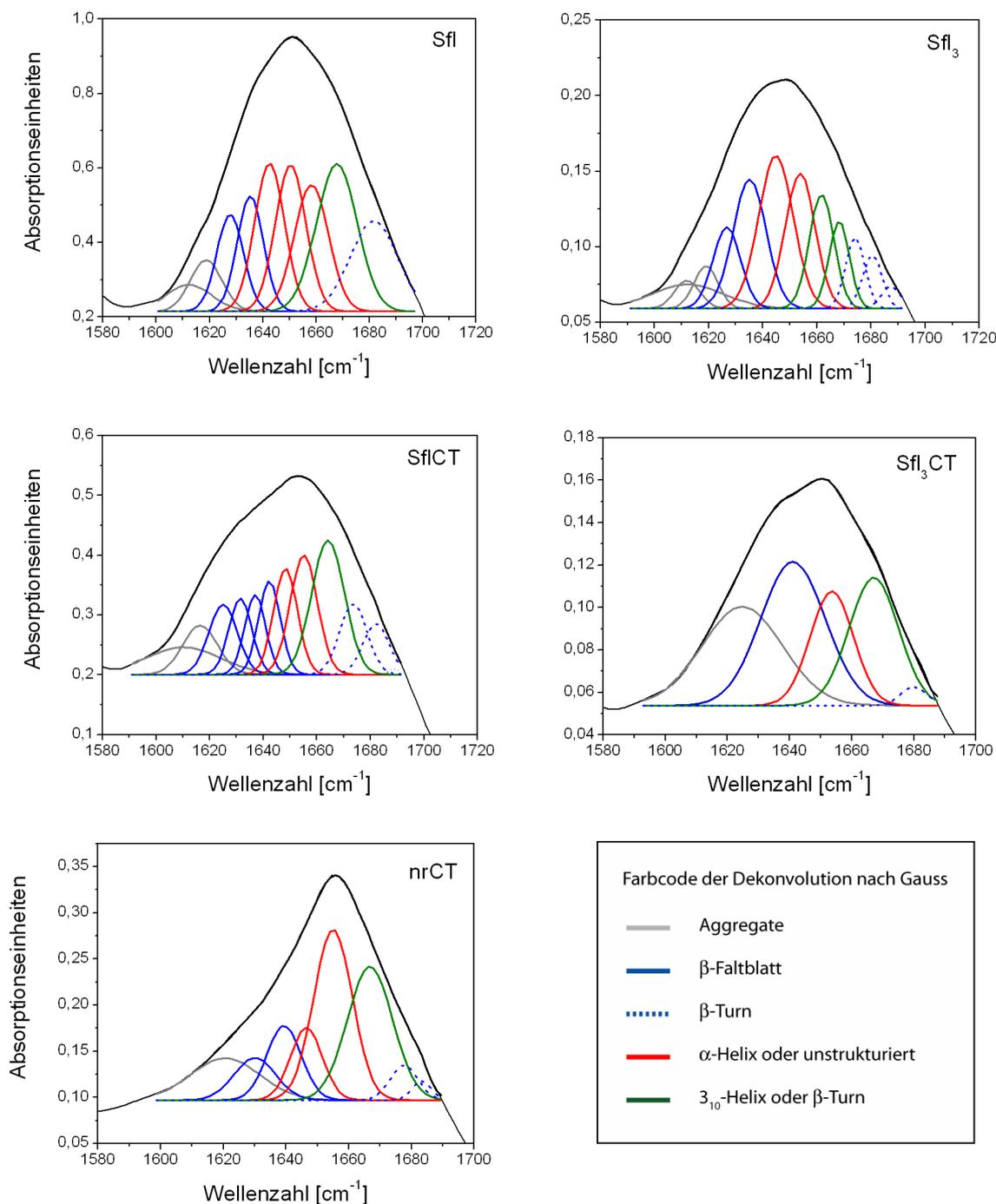


Abb. 3.3-13 – FTIR-Spektren von Sfl, Sfl₃, SflCT, Sfl₃CT und nrCT. Dargestellt sind die jeweiligen Amid-I-Banden (1600-1700 cm⁻¹). Dabei wurden die Proben getrocknet auf einer KBr-Oberfläche gemessen. Nach Dekonvolution durch Gauss Oszillatoren (Tamm & Tatulian, 1997) lassen sich die jeweiligen Sekundärstrukturanteile berechnen, die hier farblich dargestellt sind: Aggregate (grau), β-Faltblatt (blau), α-Helix oder unstrukturiert (rot), 3₁₀-Helix oder β-Turn (grün) und β-Turn (blau gestrichelt).

Durch Referenzmessungen an Modellpeptiden oder -proteinen konnten innerhalb der Amid I Bande zwischen 1600 und 1700 cm⁻¹ genaue Bereiche für β-Faltblätter (1625-1640 cm⁻¹), α-Helices (1648-1660 cm⁻¹), *random coil* (1652-1660 cm⁻¹), 3₁₀-Helices (1660-1670 cm⁻¹) und

β -Turns ($1660\text{-}1685\text{ cm}^{-1}$) definiert werden (Tamm & Tatulian, 1997). Die Form der Amid I Bande entsteht durch die Addition einzelner sich überlagernder Banden der verschiedenen Sekundärstrukturanteile. Die Anteile wurden durch die Auflösung der Amid I Bande durch Gauss-Oszillatoren berechnet, deren Lage aus den Nullstellen der zweiten Ableitung ermittelt wurden. Die integrative Addition der Oszillatoren ergab einen neuen Graphen, dessen Deckungsgleichheit mit dem ursprünglichen Spektrum eine Aussage über die Qualität der Dekonvolution zuließ. Die Fläche unter den einzelnen Gauss-Funktionen wurde in den prozentualen Anteil der jeweiligen Sekundärstruktur umgerechnet, in dessen Absorptionsbereich das Maximum der Funktion fiel.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sekundärstruktur von Sfl, Sfl₃, SflCT, Sfl₃CT und nrCT mit dieser Methode bestimmt (siehe 2.6.11). Dazu wurden die Proteine, die zuvor gegen D₂O dialysiert worden waren, getrocknet auf einem Objektträger aus nicht infrarot aktivem Kaliumbromid gemessen. Alle fünf Proben erzeugen ein Maximum der Amid I Bande bei fast identischer Wellenzahl zwischen 1650 und 1656 cm^{-1} und damit im Bereich der Absorption α -helikaler Strukturen und nicht-strukturierter Proteine. Dabei liegt das Maximum von nrCT mit 1656 cm^{-1} zwar am höchsten, charakteristischer jedoch ist der steile Abfall der Absorption hin zu kleineren Wellenzahlen. Bei allen anderen Proben ist die Bande an dieser Stelle ein wenig breiter, SflCT und Sfl₃CT besitzen sogar ausgeprägte Schultern bei 1625 bzw. 1637 cm^{-1} , beide im Bereich der Absorption von β -Faltblättern.

Für weitere Details ist die Berechnung der Strukturanteile notwendig. Aus den Daten werden Tendenzen deutlich, die aus den reinen Spektren nur schwer oder gar nicht zu interpretieren sind. Dazu wurde die Dekonvolution der Spektren, wie oben beschrieben, mit Gauss'schen Oszillatoren durchgeführt. Laut den Berechnungen ergeben sich für die Proteine Sfl, Sfl₃ und nrCT Anteile für α -helikale Struktur oder *random coil* zwischen 35 und 41 % (Tab. 3.3). Leider ist eine genaue Unterscheidung zwischen helikaler Struktur und *random coil* im FTIR nicht ohne weiteres möglich. Durch die Messungen mittels CD-Spektroskopie lässt sich folgern, dass diese großen Anteile nur bei nrCT auf einem Beitrag α -helikaler Struktur beruhen, während Sfl_x unstrukturiert ist. Zwar könnte eine Auswertung der Amid II Bande weitere Erkenntnisse bringen, jedoch korreliert dort die Absorption nichtstrukturierter Proteine mit der Absorption von β -Faltblättern. Eine deutliche Tendenz zeigt die Auswertung hingegen im β -Faltblatt-Anteil der Proteine. So besitzt Sfl₃ im Gegensatz zu Sfl einen höheren Anteil β -Faltblätter und neigt etwas mehr zur Aggregatbildung. Dieser Trend setzt sich ebenfalls von Sfl und Sfl₃ über SflCT zum Sfl₃CT fort (Tab. 3.3). Es sieht auf den ersten Blick so aus, als können längere repetitive Domänen sowie die Anwesenheit der

carboxyterminalen Domäne die Bildung von β -Faltblättern fördern oder zumindest ein wenig stabilisieren. Eine Tendenz zur vermehrten Ausbildung von β -Turns bei längeren Polypeptidketten oder bei Anwesenheit von nrCT konnte mit diesen Messungen nicht bestätigt werden. Diese Konformation wurde für die Motive K ((GPGGAGGPY)_n) und Y ((GPGGX)_n) in der repetitiven Domäne vorgeschlagen (Hayshi & Lewis, 2001).

Protein	Strukturanteil in [%]			
	α -Helix/ <i>random coil</i>	β -Faltblatt	β -Turn	Aggregate
Sfl	41	18	32	9
Sfl ₃	35	24	28	13
SflCT	24	30	31	15
Sfl ₃ CT	17	32	24	27
nrCT	38	19	31	12

Tab. 3.3 – Die Dekonvolution der FTIR-Spektren von Sfl, Sfl₃, SflCT, Sfl₃CT und nrCT führte zu den angegebenen Anteilen der Sekundärstruktur. Die Proteine wurden zuvor gegen D₂O dialysiert und im getrockneten Zustand gemessen. Die Dekonvolution wurde mittels Oszillatoren nach Gauss berechnet. Die Fläche unter den einzelnen Graphen gibt dabei den Anteil der zugeordneten Struktur wieder (Slota *et al.*, 2007; Tamm & Tatulian, 1997).

Die Ergebnisse aus den Messungen und Berechnungen der Sekundärstruktur weisen eindeutig darauf hin, dass die Proteine in Lösung hauptsächlich unstrukturiert vorliegen. Das gilt für die aminoterminalen und die mittlere Domäne, deren Länge in Bezug auf ihre Sekundärstruktur keine Rolle spielt. Getrocknet scheinen jedoch gerade Flag-Proteine mit fusionierter carboxyterminaler Domäne eher zur β -Faltblatt- oder Aggregatbildung zu neigen. Nur die carboxyterminale Domäne bildet hauptsächlich α -helikale Struktur aus. Das gilt auch, wenn längere oder kürzere Sequenzen der mittleren Domäne angehängt werden. Weiterhin beinhaltet nrCT die beiden einzigen Cysteine des ganzen Proteins, wodurch wahrscheinlich gerade diesem Teil des Proteins wichtige Funktionen während der Assemblierung des Proteins zukommen. Es gab in den durchgeführten Messungen keinen Hinweis auf einen Einfluss dieser beiden Cysteine auf die Sekundärstruktur von nrCT, SflCT oder Sfl₃CT. Dazu wurden Spektren mit nativem Puffer, in denen die Cysteine als Cystin oxidiert vorlagen, als auch Spektren in Anwesenheit des Reduktionsmittels TCEP aufgenommen. Die Spektren waren für die jeweiligen Proteine vollkommen identisch (siehe auch Abb. 3.3-10).

3.2.2 Tertiärstruktur

Die Ergebnisse der Berechnungen der Sekundärstruktur zeigen nur für die Proteine Sf1CT, Sf₃CT und nrCT eine eindeutige Sekundärstruktur. Daher wurden diese Proteine bezüglich ihrer Tertiärstruktur analysiert. In dieser Arbeit wurde mittels CD-Spektroskopie im nah-UV Bereich zwischen 250 und 320 nm ein sogenannter spezieller Fingerabdruck der Proteine nrCT und Sf1CT aufgenommen. Eine detaillierte Darstellung der Tertiärstruktur kann dadurch zwar nicht gegeben werden, jedoch können Änderungen in der Konformation oder der chemischen Umgebung einer in diesem Bereich absorbierenden Aminosäure ein völlig verändertes Spektrum erzeugen. Im Einzelnen tragen zumeist aromatische Aminosäuren aber auch Cystein, sobald es disulfidverbrückt ist, zum Signal im Nah-UV-Bereich bei. Tryptophane haben normalerweise den größten Anteil an der Absorption zwischen 275 und 290 nm und leisten daher den größten Beitrag zum Signal. Im Flag-Protein existiert jedoch kein Tryptophan, womit das Signal der unterschiedlichen Absorption zirkular polarisierten Lichts auf anderen Aminosäureseitenketten beruht. In Tyrosinen können π - π^* -Elektronenübergänge erzeugt werden, die im Bereich um 280 nm absorbieren.

Den Tertiärstrukturuntersuchungen lagen drei Fragen zugrunde. Zunächst sollte geklärt werden, ob grundsätzlich Tertiärstruktur vorhanden ist. Sofern das zutrifft, lautet die zweite Frage, ob Cysteine im reduzierten oder oxidierten Zustand die Tertiärstruktur beeinflussen. Als dritter Punkt sollte der Einfluss der Temperatur auf die Tertiärstruktur untersucht werden, um Aussagen über die Stabilität der Proteine treffen zu können.

Für das Protein nrCT sind Spektren gezeigt, die sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Reduktionsmittels TCEP, aufgenommen wurden. Dabei konnten durch Zugabe von 2 mM TCEP die Disulfidbrücken reduziert werden, so dass nur noch freie Thiole zurückblieben (siehe 3.2.3). Ein Unterschied zwischen beiden Spektren ist nicht zu erkennen, was auf einen nicht detektierbaren Einfluss der Disulfidbrücken auf die Struktur von nrCT schließen lässt (Abb. 3.3-14A). Ein entsprechendes Ergebnis lieferte die Messung von Sf1CT mit und ohne TCEP. Auch hier konnte kein Hinweis auf eine Stabilisierung oder Destabilisierung der Struktur durch Disulfidbrücken gefunden werden.

Einen deutlichen Unterschied lassen hingegen die beiden Spektren von Sf1CT, aufgenommen bei 20°C und 70°C, erkennen (Abb. 3.3-14B). Die Änderungen im Spektrum liegen im Bereich zwischen 275 und 295 nm, wofür die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der insgesamt sechs in der carboxyterminalen Domäne vorkommenden Tyrosine verantwortlich sind. Bei 70 °C muss sich demnach die Umgebung der Tyrosine, die im nrCT über das gesamte Protein verteilt vorkommen, drastisch ändern. Ungewöhnlich ist vor allem die

Absorption im Bereich um 290 nm. Diese Wellenlänge wäre eher für Tryptophane charakteristisch, die im Protein nicht vorkommen.

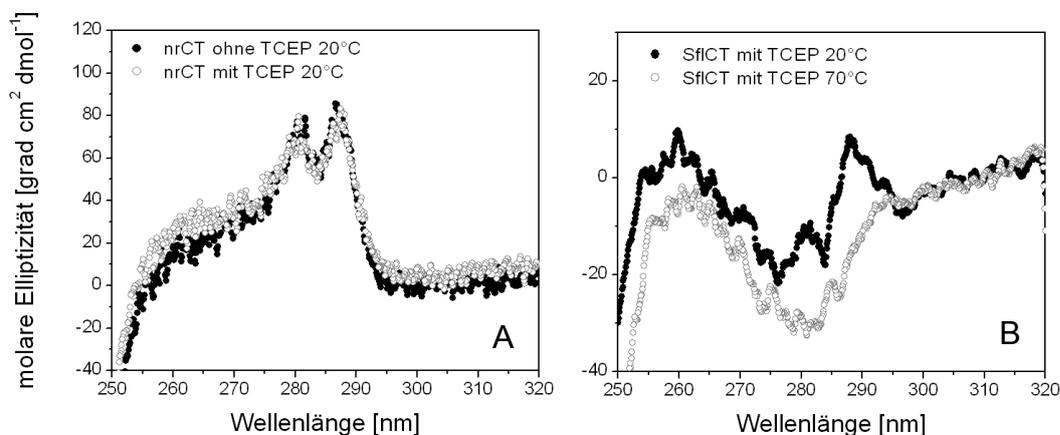


Abb. 3.3-14 – CD-Spektren im nah-UV von nrCT mit und ohne TCEP (A) und SfICT mit TCEP (B). Alle Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/mL und einer Schichtdicke der Küvette von 0,5 cm bestimmt.

Es ist davon auszugehen, dass Strukturänderung hauptsächlich im carboxyterminalen Bereich des Proteins passiert. Bisher konnten verschiedene thermische Effekte auf die Sekundär- und Tertiärstruktur gezeigt werden. Eine Auswirkung der Disulfidbrücken konnte nicht gezeigt werden. Die Untersuchung der Quartärstruktur sollte weitere Einblicke in die Aufgabe der Disulfidbrücken geben.

3.2.3 Quartärstruktur

Interaktionen zwischen mehreren Proteinmolekülen führen zur sogenannten Quartärstruktur des Proteins. Diese Interaktionen können elektrostatisch sein, durch Wasserstoffbrücken, durch van der Waals Wechselwirkungen oder durch kovalente Bindungen entstehen. Cysteine bilden meist die Voraussetzung für solche kovalenten Bindungen. Grundsätzlich gibt es für ein Cystein-haltiges Protein zwei Zustände: Den oxidierten, in dem die Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen vorhanden ist, und den reduzierten, in dem die Bindung fehlt und nur freie Thiolgruppen vorliegen. Beinhaltet das Protein nur ein einziges Cystein, können nur intermolekulare Bindungen entstehen, die zu einem Dimer führen. Existieren zwei oder mehr Cysteine gibt es zusätzlich die Möglichkeit intramolekulare Bindungen auszubilden. Werden intermolekulare Disulfide bevorzugt gebildet, so muss nicht unbedingt nur ein Dimer entstehen. Ein gutes Beispiel für eine Mischung aus intra- und intermolekularen Disulfiden ist Insulin. Die Sequenz beinhaltet insgesamt sechs Cysteine, was im Protein zu zwei inter- und einer intramolekularen Disulfidbrücke führt (Clark & Steiner, 1969).

SDS-PAGE

Im Flag-Protein sind zwei Cysteine in der carboxyterminalen Domäne positioniert. Ob solche Disulfidbrücken in diesem Fall auch Dimere oder gar Oligomere stabilisieren können, sollte in einigen Versuchen herausgefunden werden. Zunächst fiel direkt nach der Reinigung der Proteine Sfl und SflCT auf, dass SflCT bei der Dialyse gegen unterschiedliche Puffer aggregierte. Für alle nachfolgenden Versuche war es essentiell, ob SflCT in Lösung blieb oder zum größten Teil ausfiel. Mittels SDS-Gelelektrophorese konnte ein erster Eindruck in die Natur von SflCT gegeben werden. Zum Vergleich ist auch Sfl aufgetragen, was sich durch Silber nicht in gleicher Qualität wie SflCT färben ließ (Abb. 3.3-15).

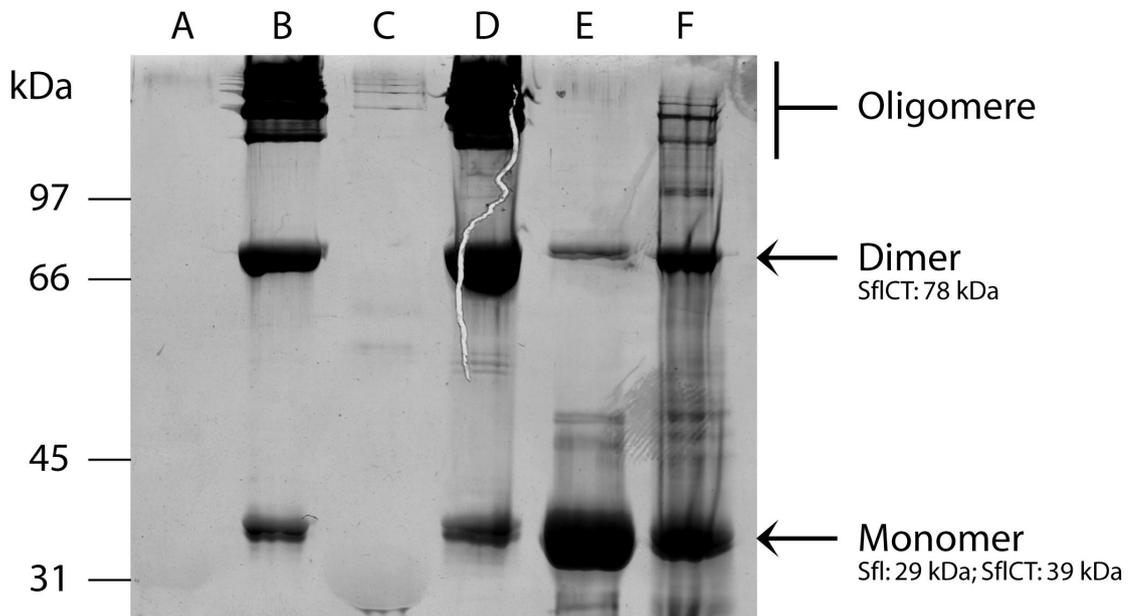


Abb. 3.3-15 – SDS-PAGE (10 %) nach Silberfärbung mit folgenden Proben: Sfl in 8 M Harnstoff (A), SflCT in 8 M Harnstoff (B), Sfl in 10 mM $K_xH_{3-x}PO_4$ pH 8 (C), SflCT in 10 mM $K_xH_{3-x}PO_4$ pH 8 (D), SflCT in 10 mM Tris/HCl pH 8 mit 2 % β -Mercaptoethanol (E) und SflCT in Tris/HCl pH 8 mit 2 % Glycerin.

Beide Proteine, Sfl und SflCT, wurden jeweils in 8 M Harnstoff aufgenommen. Die Spuren auf dem SDS-Gel zeigen das Monomer von Sfl. SflCT hingegen wurde als Monomer sowie auch als Dimer und höheres Oligomer detektiert (Abb. 3.3-15A, B). Das gleiche Laufverhalten ergibt sich nach der Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl pH 8, in dem Sfl wahrscheinlich etwas stabiler in Lösung bleibt als SflCT, was durch UV-Spektroskopie am jeweiligen Überstand nach Zentrifugation nachgewiesen werden konnte. Auch hier bleibt Sfl Monomer, während SflCT vorwiegend als Dimer und Oligomer vorliegt (Abb. 3.3-15C, D). Der Zusatz des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol bewirkt eine Spaltung der Disulfidbrücke und führt zur beinahe vollständigen Detektion des Monomers von SflCT

(Abb. 3.3-15E). Ein kleiner Rest an Dimer konnte jedoch mit 2 % β -Mercaptoethanol nicht mehr reduziert werden. Ein Zusatz von 2 % Glycerin erhöht die Viskosität im Puffer. Zudem entstehen Wechselwirkungen zwischen Glycerin und dem Puffer, wodurch ein anderes Löslichkeitsverhalten von SfICT erwartet werden kann. Tatsächlich sind bei der Analyse fast keine Oligomere mehr zu sehen, das Dimer bleibt jedoch detektierbar (Abb. 3.3-15F). Das Signal für das Monomer ist etwas stärker, als zuvor in Tris-Puffer. Damit ist SfICT wahrscheinlich weniger anfällig für Aggregation. Die Analytik mittels SDS-Gel lässt jedoch nur Aussagen über kovalente Wechselwirkungen zu. Alle anderen Interaktionen, bei denen Multimere entstehen können, werden durch das SDS unterbunden.

AF4 (asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung)

Eine Methode, bei der sämtliche existierende Interaktion unter nativen Bedingungen bestehen bleiben, wurde angewendet, um die Frage zu klären, ob allein die Disulfide die Quartärstruktur von SfICT stabilisieren können. Hier bietet sich die asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) an. Bei dieser Methode werden Moleküle nach ihrer Größe in einem matrixfreien Kanal getrennt. Vor Beginn der Trennung wird die Probe an einer bestimmten Stelle im Kanal fokussiert, dann sorgt ein laminarer Fluss für die Fortbewegung der Partikel über die Trennstrecke. Gleichzeitig wird ein Querfluss angelegt, der die Moleküle in Richtung der unteren Kanalwand zieht. Damit wirkt dieser der Diffusion der Partikel entgegen. Die Höhe im Kanal, in der die einzelnen Moleküle akkumulieren, ist damit abhängig von ihrer Größe. Durch die unterschiedliche Geschwindigkeit des laminaren Flusses, die durch die jeweilige Entfernung zur Kanalwand zustande kommt, entsteht ein parabolisches Flussprofil, welches nun die Trennwirkung unterschiedlich großer Moleküle hervorruft.

SfICT wurde vor der Analyse reduziert, um eine Kopplung von Iodacetamid an die freien Thiolgruppen zu ermöglichen. Dadurch wurde die Bildung von Disulfiden dauerhaft verhindert. (siehe 2.6.5). Zum Vergleich wurde SfICT nicht reduziert – also unbehandelt – in 10 mM Tris/HCl mittels AF4 analysiert. Bei dieser Probe wurden, wie bei der Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese, Dimere und höhere Oligomere erwartet.

Die Analyse von SfICT erfolgte nach Auftrennung durch die AF4 über Bestimmung der UV-Absorption bei 280 nm, die Bestimmung des Brechungsindex und die statische Lichtstreuung unter mehreren Winkeln. In der Darstellung ist das UV-Signal auf der rechten Y-Achse und die berechnete molare Masse auf der linken Y-Achse gegen die Retentionszeit aufgetragen.

Die Berechnung der molaren Masse erfolgte mit dem Programm Astra (Wyatt Technology Europe, Dernbach).

Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden beide unter identischen Bedingungen gemessen. Als Laufpuffer wurden 10 mM Tris/HCl pH 8 bei einem Kanalfloss von 1,0 mL/Min. verwendet. Der Querfluss wurde initial auf einen Wert von 1,5 mL/Min. eingestellt und dann als linearer Gradient über 50 Min. auf 0 gesenkt. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 3.3-16 dargestellt.

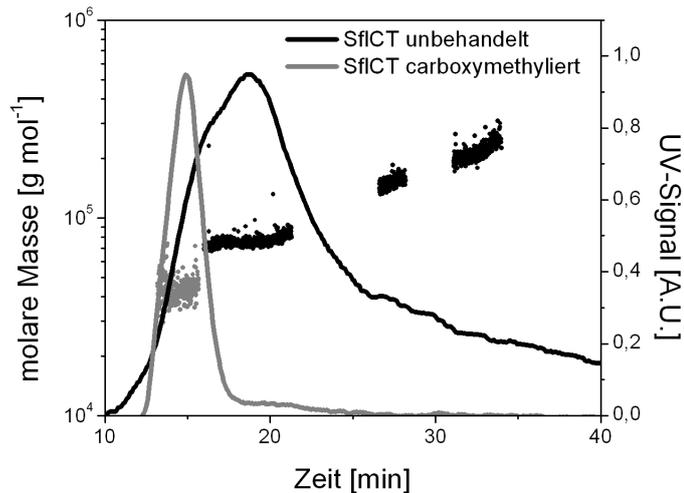


Abb. 3.3-16 – Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) von SflCT. Das Protein wurde unbehandelt (schwarz) und carboxymethyliert (grau) in der AF4 aufgetrennt. Das carboxymethylierte SflCT wurde gegen 10 mM Tris/HCl pH 8 mit 2 mM TCEP dialysiert. Anschließend wurden alle freien Thiolgruppen mit 100 mM Iodacetamid geblockt. Beide Proben wurden unter gleichen Bedingungen analysiert. Laufpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8; Membran: Zellulose; Kanalhöhe: 490 μm ; 3 Min. Fokussierung; 1,0 mL/Min. Kanalfloss; 1,5 bis 0,0 mL/Min. Querfluss als Gradient über 50 Min.

Die Messung von oxidiertem SflCT liefert im UV-Signal einen Peak, der bei der Retentionszeit von etwa 20 Min. sein Maximum erreicht, dann aber nur sehr langsam wieder abflacht. Erwartungsgemäß konnte unter dem Hauptpeak die molare Masse eines Dimers (78 kDa) von SflCT berechnet werden. Im weiteren Verlauf der Retentionszeit steigt die berechnete molare Masse, so wurden nach etwa 28 Min. die molare Masse des Tetramers (155 kDa) und nach etwa 33 Min. die Masse des Hexamers (233 kDa) gefunden. Die molare Masse des Monomers hingegen wurde auch zu Beginn der Elution nicht detektiert.

Carboxymethyliertes SflCT konnte bei einer früheren Retentionszeit von 15 Min. bei einem vergleichsweise scharfen UV-Peak ausschließlich als Monomer (39 kDa) detektiert werden. Demnach entstehen, ohne die Möglichkeit entsprechende Disulfidbrücken auszubilden, keine Dimere oder gar höhere Oligomere. Zwar können andere Interaktionen zwischen zwei

Proteinmonomeren nicht kategorisch ausgeschlossen werden, jedoch beruht die Entstehung und Stabilisierung der Dimere im SflCT hauptsächlich auf kovalenten Bindungen.

Bestimmung des Redoxpotentials der Disulfidbrücken

Um Aussagen über die Stärke einer Disulfidbrücke zu machen, kann deren Redoxpotential bestimmt werden. Dabei gilt: Wenn eine Disulfidbrückenbindung noch bei niedrigen Redoxpotentialen besteht, wird ein sehr starkes Reduktionsmittel benötigt, um diese aufzubrechen. Sämtliche Proteine, die die carboxyterminale Domäne beinhalten, wurden auf ihr Redoxpotential untersucht. Dabei wurden die Proteine nrCT, SflCT und Sfl₃CT 1 h in Kaliumphosphat-Puffer bei pH 7 mit einem entsprechend mit DTT_{red}/DTT_{ox} eingestellten Redoxpotential inkubiert (Cleland, 1964). Die Analyse der Proben erfolgt über SDS-PAGE und anschließende Silber- oder Coomassiefärbung. Das Redoxpotential liegt genau dort, wo monomere und dimere Spezies im gleichen Verhältnis vorliegen.

Bei allen Proteinen lag das Redoxpotential der Disulfidbrücken bei etwa -280 mV (Abb. 3.3-17). Eine geringfügige Abweichung war für das Protein nrCT detektierbar, bei dem das Redoxpotential eher in Richtung -270 mV tendiert. Damit sind die Thiole der Cysteine leicht oxidierbar und bilden sehr starke Disulfidbrücken. Im Vergleich dazu hat beispielsweise das Cytosol von *E. coli* ein Redoxpotential von etwa -260 mV (Gilbert, 1990). Aufgrund der gleichen Werte für die Redoxpotentiale von nrCT, SflCT und Sfl₃CT, hat die Länge der repetitiven Region offensichtlich keinen Einfluss auf die Bildung der Disulfide. Basierend auf diesen Daten spielt der carboxyterminale Bereich des Proteins damit sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Assemblierung des Fadens aus dem Protein.

Im Fall von SflCT und Sfl₃CT entstehen aber nicht nur Dimere sondern auch Oligomere, da in jeder carboxyterminalen Region zwei Cysteine vorkommen, die jeweils mit Cysteinen zweier verschiedener carboxyterminaler Regionen Disulfide ausbilden. Während der Fadenassemblierung könnte durch Verknüpfung mehrerer Proteine über ihre carboxyterminalen Bereiche auf diese Weise schon eine Vorgabe für die Anlagerung anderer Bereiche des Proteins gegeben sein. Überraschenderweise zeigt das Protein nrCT keine weitere Oligomerisierung. Nur Monomere und Dimere konnten bei entsprechenden Redoxpotentialen gefunden werden. Demnach haben die repetitiven Domänen eher keinen oder nur geringen Einfluss auf das Redoxpotential, dennoch scheinen sie für die Multimerisierung wichtig zu sein, da ohne die mittlere Domäne nur Dimere gebildet werden können.

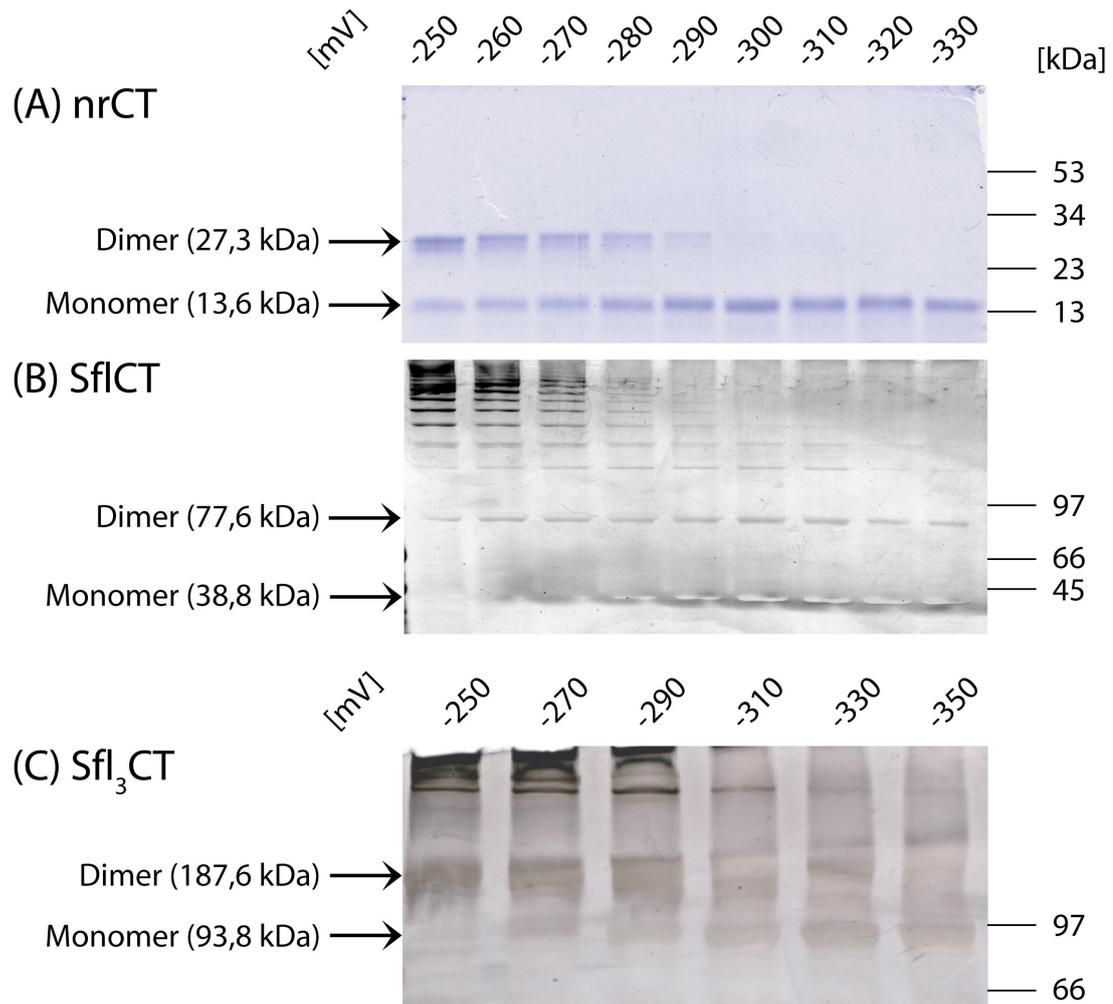


Abb. 3.3-17 – Redox titration von nrCT (A), SflCT (B) und Sfl₃CT (C). Alle Proteine wurden zuvor in 100 mM Kaliumphosphat pH 7, 1 mM EDTA und 20 mM DTT (oxidiert und reduziert im jeweiligen Verhältnis) 1 h bei 25 °C inkubiert. Der Auftrag zur Analyse per SDS-Gelelektrophorese erfolgte mit Lämmli-Auftragspuffer ohne β-Mercaptoethanol. Die Proteine wurden je nach Molekulargewicht auf 4-20 %igen Gradientengelen oder 12 %igen Tris/Tricin-Gelen aufgetrennt und entweder mit Silber (SflCT und Sfl₃CT) oder Coomassie (nrCT) gefärbt. Die Referenzbanden der Marker sowie die Monomere und Dimere der Proteine sind entsprechend kenntlich gemacht. Für alle Proteine ergibt sich ein Redoxpotential von -280 mV (nrCT tendiert etwas mehr zu -270 mV).

3.2.4 Thermische Stabilität

Neben der Stabilität der rekombinanten Flag-Proteine durch Quervernetzung über Cysteine ist auch deren thermische Stabilität interessant. Physiologisch betrachtet müssen Netze von Spinnen bei Normaldruck und im jeweiligen Lebensraum üblichen Temperaturen stabil bleiben. Die thermische Stabilität von Spinnenseiden konnte bereits am natürlichen Fadenmaterial bestimmt werden, wobei für Flagelliform-Seide der Übergangspunkt bei 44 °C lag (Dicko *et al.*, 2004).

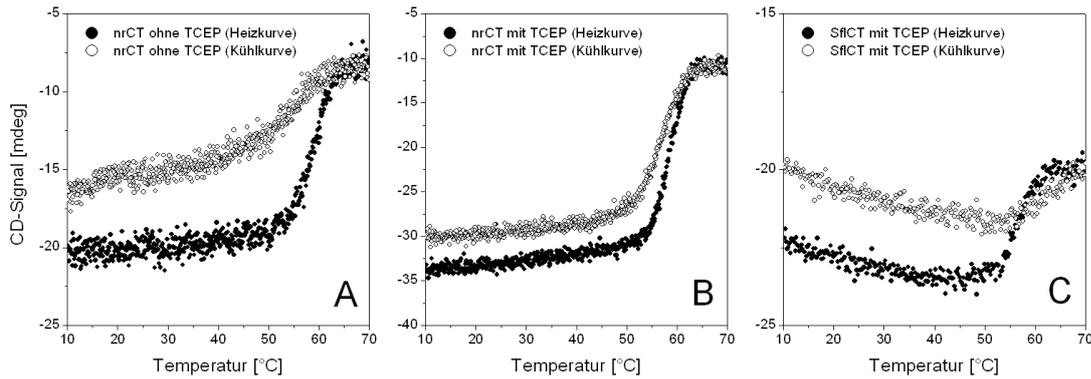


Abb. 3.3-18 – Thermoübergänge von nrCT ohne TCEP (A), nrCT mit TCEP (B) und SfICT mit TCEP (C) bestimmt mit Zirkulardichroismus in 10 mM Kaliumphosphat pH 8. Alle Übergänge wurden während des Heiz- und des Kühlvorgangs mit einem linearen Temperaturgradienten von 0,2 K/Min. bei einer Wellenlänge von 223 nm aufgenommen. Die Proteinkonzentration kann in solchen Versuchen variieren, daher wurde auf eine Umrechnung des CD-Signals in molare Größen verzichtet. Initial betrug sie 200 µg/mL.

Mittels CD-Spektroskopie wurden für rekombinante Flag-Proteine mit ausgeprägten α -helikalen Strukturen, deren Spektren bei 70 °C auf den Verlust dieser Struktur hinwiesen, Temperaturübergänge gemessen. Dabei wurde diejenige Wellenlänge gewählt, bei der die Differenz zwischen den Spektren bei 20 °C und bei 70 °C am größten war. Es wurde bereits gezeigt, dass Disulfidbrücken die Quartärstruktur in der carboxyterminalen Domäne stabilisieren können. Ob dies auch für die thermische Stabilität der Proteine gilt, sollte dieser Versuch zeigen. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die Anwesenheit der mittleren Domäne stabilisierend auf die Gesamtstruktur auswirkt.

Beide Proteine, nrCT und SfICT, wurden zuvor gegen 10 mM Kaliumphosphat pH 8 dialysiert und auf eine Konzentration von 200 µg/mL eingestellt. nrCT wurde zunächst ohne TCEP gemessen. Die Übergangstemperatur lag genau bei 57 °C (Abb. 3.3-18A). Die Aufnahme der Kühlkurve zeigt, dass der Übergang nur partiell reversibel ist. Ein Teil der Strukturinformation geht demnach verloren oder braucht mehr Zeit für die Rückfaltung. Das gleiche Ergebnis lieferte die Messung für nrCT, welches diesmal durch TCEP reduziert vorlag. Auch hier lag der Thermoübergang bei genau 57 °C (Abb. 3.3-18B). Die Kurve, die während des Kühlvorgangs aufgenommen wurde, schien zwar anzuzeigen, dass reduziertes nrCT schneller rückfaltet, jedoch handelt es sich auch hier um eine nur partielle spontane Rückfaltung. Für SfICT änderte sich die Lage des Temperaturübergangs nicht. Ebenfalls bei 57 °C konnte dieser detektiert werden (Abb. 3.3-18C). Auch hier zeigt sich eine nicht vollständig reversible Rückfaltung.

Weder die Stabilisierung durch Disulfide noch die Anwesenheit der repetitiven Domäne scheint einen Einfluss auf die thermische Stabilität der rekombinanten Flag-Proteine zu haben.

3.2.5 Morphologische Untersuchungen

Neben den Untersuchungen zur Stabilität und Struktur wurde auch die Morphologie rekombinanter Flag-Proteine untersucht. Hierfür wurde Sfl gegen 10 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert und dann in Puffern mit unterschiedlichem pH-Wert mindestens 1 h inkubiert. Die Proben wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL angesetzt und in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 auf eine Glimmroberfläche aufgetragen, dreimal mit Millipore®-Wasser gewaschen und getrocknet.

Im Rasterkraftmikroskop wurden die Proben anschließend analysiert. Dabei wurde die Oberfläche der Probe mit einer sehr feinen Spitze im Kontaktmodus abgetastet. Die resultierenden Bilder zeigen die gemessene Höhe der Probenoberfläche. Durch Berechnung der Auslenkung der Spitze wurde ein Bild erstellt, welches einen dreidimensionalen Eindruck der Oberfläche vermittelt. Exemplarisch sind in Abb. 3.3-19 die Bilder für die Rohdaten und die 3D-Struktur für Sfl bei pH 2 und pH 8 gezeigt.

Für Proben, bei denen 0,01 mg/mL Sfl zuvor bei pH 2 inkubiert wurde, konnten fibrillenähnliche Strukturen nachgewiesen werden, die jedoch nur vereinzelt auftraten und einen maximalen Durchmesser von nur 1,4 nm aufwiesen. Auch in Proben mit höheren Proteinkonzentrationen bis zu 1 mg/mL Sfl wurden diese Strukturen mit der gleichen Häufigkeit detektiert, so dass nicht von einer Assemblierung von Fibrillen ausgegangen werden konnte (Abb. 3.3-19).

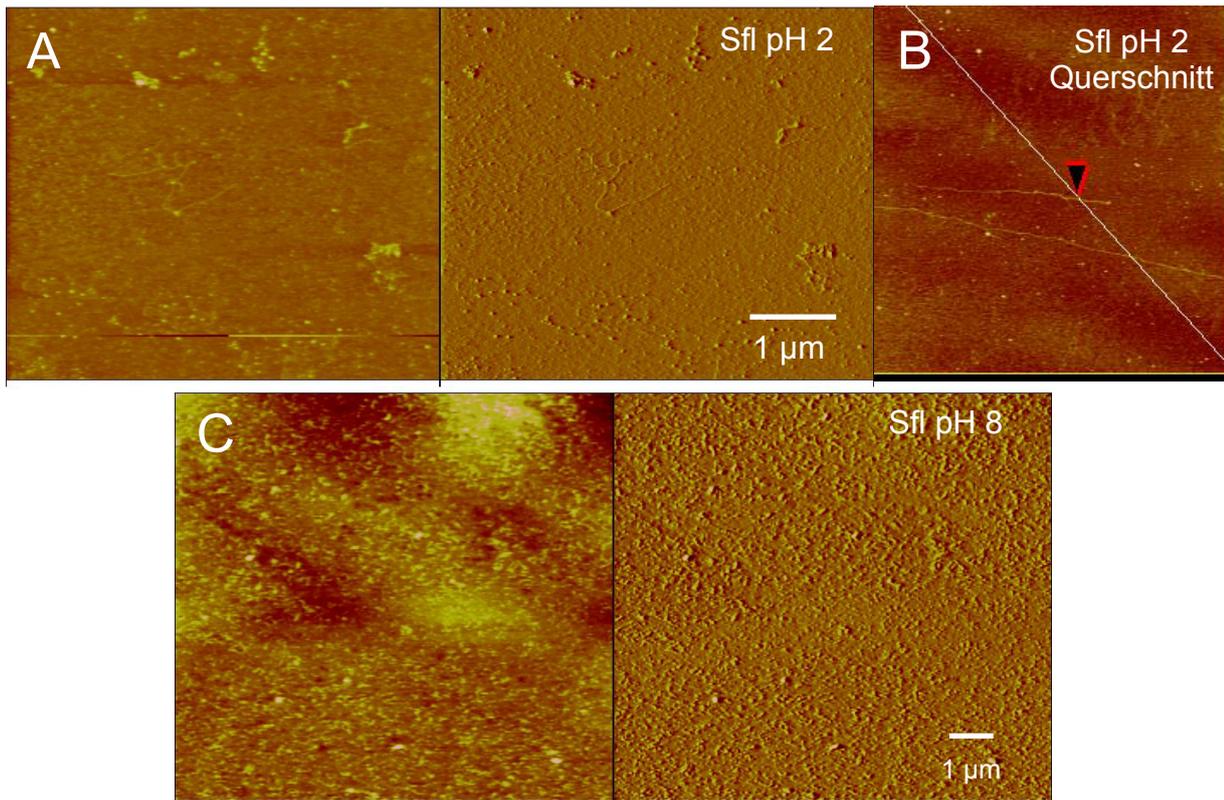


Abb. 3.3-19 – Aufnahmen von Sfl am Rasterkraftmikroskop (AFM). Sfl wurde mit einer Proteinkonzentration von 0,01 mg/mL bei pH 2 (A), sowie Sfl mit einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/mL bei pH 8 (C) auf eine Glimmeroberfläche aufgetragen, dreimal gewaschen, dann getrocknet und im Rasterkraftmikroskop analysiert. Im linken Teil ist jeweils die Auflösung der Höhe, im rechten Teil die Ablenkung dargestellt. Die Abbildung zeigt außerdem exemplarisch für die Daten bei pH 2 eine Querschnittsanalyse (B). Der Maßstab zeigt jeweils die Länge von 1 μm . Die aufgelöste Höhe betrug 20 nm.

Die Untersuchung des Einflusses des pH-Werts zeigte, dass bei pH 8 nur amorphe Strukturen auftraten. Ein ähnliches Bild zeigten Proben bei pH 4 und pH 6. Generell konnten keine Hinweise auf Assemblierung von Fibrillen des Proteins Sfl gefunden werden.

3.3 Assemblierungseigenschaften

Im Spinnkanal führen mehrere Faktoren zur Assemblierung des fertigen Fadens. Neben der trichterförmigen Geometrie und dem mechanischen Zug (Vollrath & Knight, 1999) ändert sich die Ionenkonzentration von Natrium, Kalium, Chlorid, Phosphat und Sulfat. Außerdem wird die Fadenassemblierung sowohl von kontinuierlichem Wasserentzug, als auch von einem leichten Absinken des pH-Werts von 6,9 auf 6,3 begleitet (Vollrath & Knight, 2001). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Phosphatkonzentration und des pH-Werts auf die rekombinanten Flag-Proteine genauer untersucht.

3.3.1 Einfluss von Kaliumphosphat

Im Allgemeinen ist Phosphat in der Hofmeister-Serie als kosmotrop oder anti-chaotrop eingestuft. Das bedeutet, es fällt Proteine aus der Lösung und erhöht hydrophobe Wechselwirkungen im Protein. In dieser Arbeit sollte das Aggregationsverhalten rekombinanter Flag-Proteine nach Zugabe von Kaliumphosphat zur Lösung genauer untersucht werden.

Einfluss auf die repetitive Domäne

Hierfür wurden die Proteine Sfl, Sfl₃ und SflCT in 8 M Harnstoff gelöst und gegen 10 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert. Nach Zugabe einer entsprechenden Menge Phosphat wurden alle Proben 1 h bei 25 °C inkubiert. Die Ausgangskonzentration des jeweiligen Proteins betrug nach Zugabe von Phosphat 0,3 mg/mL. Durch Zentrifugation wurde aggregiertes Protein von löslichem getrennt und der Überstand UV-spektrometrisch analysiert. Zur Kontrolle wurde das Pellet in Harnstoff gelöst und ebenfalls auf seine Proteinkonzentration untersucht.

Dieses Experiment wurde in Bezug auf die Länge des Proteins sowie auf die Anwesenheit der carboxyterminalen Domäne und deren Einfluss auf das Protein durchgeführt (Abb. 3.3-20). Zur Auswertung wurde eine sigmoidale Funktion an die Messpunkte der Löslichkeit der einzelnen Proteine angepasst.

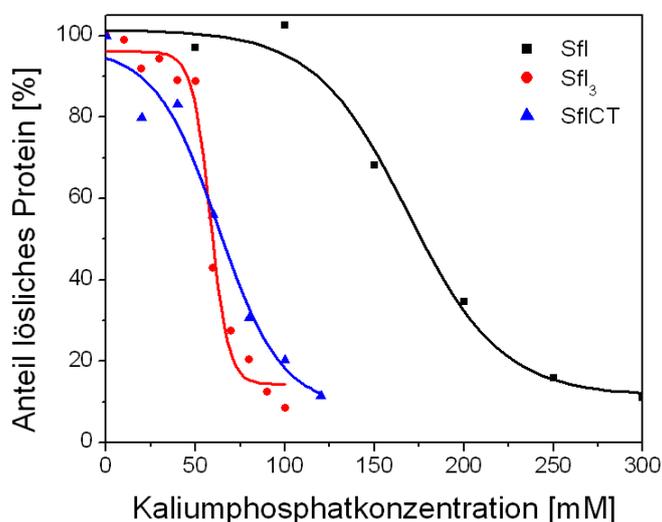


Abb. 3.3-20 – Aggregationsverhalten rekombinanter Flag-Proteine in Abhängigkeit der Phosphatkonzentration. Die Ausgangskonzentration betrug nach Zugabe von Phosphat 0,3 mg/mL Protein. Nach 1 h Inkubation bei 25 °C wurde abzentrifugiert und die verbleibende Proteinkonzentration in Lösung für Sfl (schwarz), Sfl₃ (rot) und SflCT (blau) bestimmt. Aufgetragen ist die Phosphatkonzentration gegen den Anteil des löslichen Proteins am Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe.

Während Sfl bei einer Phosphatkonzentration von etwa 175 mM zur Hälfte aggregiert und zur Hälfte in Lösung vorliegt, sind sowohl Sfl₃ als auch SflCT unter diesen Bedingungen bereits vollständig präzipitiert. Der Übergang für Sfl₃ und SflCT liegt etwa bei 60 bis 70 mM Phosphat. Damit ist Sfl in Lösung stabiler gegenüber Phosphat als das dreimal längere Sfl₃. Auch durch Fusion der carboxyterminalen Domäne reagiert das Protein schon bei geringeren Phosphatkonzentrationen. Demnach wird der Aussalzeffekt von Phosphat einerseits durch die Länge des repetitiven Teils verstärkt, aber auch durch nicht-repetitiven Teil von Flag beeinflusst. Der Übergang von SflCT, der im Bereich des Übergangs von Sfl₃ liegt, verläuft jedoch weniger kooperativ als der von Sfl₃. Für dieses Verhalten bei pH 8 sind sehr wahrscheinlich positiv geladene Aminosäureseitenketten verantwortlich, die sich nur in der carboxyterminalen Domäne befinden, wohingegen im repetitiven Teil des Proteins nur negativ geladene Seitenketten vorkommen (siehe 4.3).

Einfluss auf die terminalen Domänen

Nach diesen Versuchen bei Anwesenheit der repetitiven Domäne sollte auch der Einfluss von Phosphat auf die nicht-repetitiven terminalen Domänen untersucht werden. nrCT und nrNT wurden unter genau gleichen Bedingungen auf ihr Aggregationsverhalten getestet.

Entgegen der Erwartung zeigt sich bei den terminalen Proteinen nrCT und nrNT keinerlei Aggregation. Selbst bei 500 mM (nrNT) bzw. 450 mM (nrCT) Phosphat bleiben die Proteine vollständig in Lösung (Abb. 3.3-21).

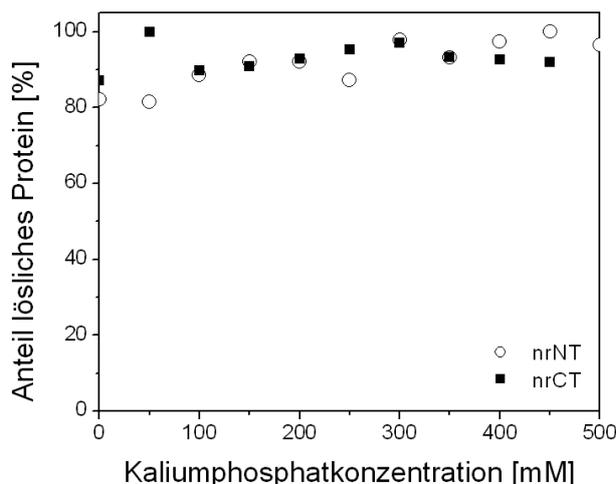


Abb. 3.3-21 – Aggregationsverhalten von nrCT und nrNT in Abhängigkeit der Phosphatkonzentration. Die Ausgangskonzentration der Proteine betrug nach Zugabe von Phosphat 0,1 mg/mL. Nach 1 h Inkubation bei 25 °C wurde abzentrifugiert und die verbleibende Protein-konzentration in Lösung für nrNT (offene Kreise) und nrCT (schwarze Quadrate) bestimmt und in den Anteil des löslichen Proteins am Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe umgerechnet.

Die Messung zeigt, dass der chaotrope Effekt von Phosphat auf die beiden terminalen Proteine kaum Einfluss hat. Für das Protein nrNT, welches eine putative Rolle während der Sekretion von Flag aus den Epithelzellen spielt, besteht hier ein Hinweis auf die Funktion der aminoterminalen Domäne als der Teil von Flag, der das Protein in Lösung hält. Das Protein nrCT bleibt ebenfalls in Lösung, obwohl es in Kombination mit der repetitiven Domäne bereits aggregiert wäre. Diese Beobachtung ist vor dem Hintergrund, dass nrCT zuvor die repetitive Domäne zur Aggregation veranlasst hat, umso erstaunlicher. Zudem liegt nrCT in den Versuchen unter nicht reduzierenden Bedingungen wahrscheinlich als Dimer vor. Es gab bereits Hinweise auf Multimere bei erhöhter Phosphatkonzentration (Heim, mündliche Mitteilung), dennoch bleibt nrCT in diesem Experiment löslich und zeigt keine Aggregation.

Einfluss auf die Oligomerisierung

Jedoch ist nicht nur die Aggregation der Proteine entscheidend. Es ist auch denkbar, dass sich die rekombinanten Flag-Proteine bei erhöhter Phosphatkonzentration, bei der noch keine Aggregation stattfindet, zu Oligomeren anlagern. Da die Bildung der Disulfide und die damit zusammenhängende Oligomerisierung bereits untersucht wurde, sollte der Einfluss von Phosphat auf eine eventuelle Oligomerisierung der Proteine mit repetitiver Domäne näher untersucht werden.

Das Protein Sfl wurde zunächst als Modell für diese Domäne verwendet und daher mit der bereits vorgestellten Methode AF4 analysiert (siehe 2.6.16). Als Puffer für diese Messungen wurden 10 mM und 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8 verwendet. Um das Protein möglichst gut unter beiden Bedingungen zu detektieren, wurden die Laufbedingungen vereinheitlicht und entsprechend optimiert. Nach einer 3 minütigen Fokussierung der Probe wurden ein Kanalfluss von 1,0 mL/Min. und ein konstanter Querfluss von 0,5 mL/Min. angelegt. Das Maximum der Elution von Sfl liegt in beiden Puffern bei 9,5 Min. Die Analyse der molaren Masse der Proteine ergibt in beiden Fällen nur die Masse des Sfl-Monomers von 29 kDa (Abb. 3.3-22).

Phosphat hat demnach bis zur Konzentration von 100 mM keinen oder nur wenig Einfluss auf Sfl. Das Protein bleibt bis dahin löslich und bildet keine Aggregate oder Oligomere. Jedoch ist der Peak von Sfl in der AF4 bei höherer Phosphatkonzentration deutlich verbreitert.

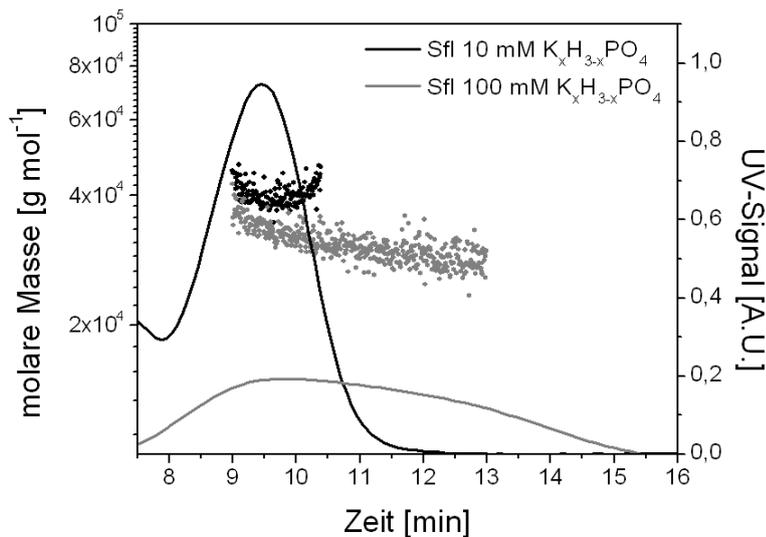


Abb. 3.3-22 – Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung Sfl in unterschiedlich konzentrierten Phosphatpuffern. Sfl wurde in 10 mM (schwarz) und 100 mM (grau) Kaliumphosphat pH 8 in der AF4 aufgetrennt. Beide Proben wurden unter gleichen Bedingungen analysiert. Membran: Zellulose; Kanalhöhe: 490 μm ; 3 Min. Fokussierung; 1,0 mL/Min. Kanalfluss; 0,5 mL/Min. Querfluss.

Die einfachste Erklärung wäre eine verstärkte Interaktion des Proteins mit der Membran, die aber wegen der eher hydrophilen Eigenschaften der Zellulose unwahrscheinlich sind. Möglich wäre auch eine Änderung des hydrodynamischen Radius des Proteins durch den Einfluss des Phosphats auf die Hydrathülle des Proteins und eine dadurch auftretende Änderung im Laufverhalten. Bei weiterführenden Versuchen sollte auch eine höhere Phosphatkonzentration, bei denen die Aggregation von Sfl nachgewiesen werden konnte, in die Messung einbezogen werden.

Einfluss auf den hydrodynamischen Radius

Zur weiteren Untersuchung entstehender Proteinaggregate wurden Messungen mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) durchgeführt. Diese Methode ermittelt den Diffusionskoeffizienten in Lösung befindlicher Teilchen durch Intensitätsschwankungen des gestreuten Lichts. Bei bekannter Viskosität der Lösung kann aus der Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius der Teilchen berechnet werden. Sfl wurde in unterschiedlichen Phosphat- und Proteinkonzentrationen mit dieser Methode bei einer Wellenlänge von 658 nm analysiert (siehe 2.6.17), um zu untersuchen, ob unter bestimmten Bedingung die Voraussetzungen für eine Assemblierung, wie sie im Spinnkanal stattfindet, erfüllt sind.

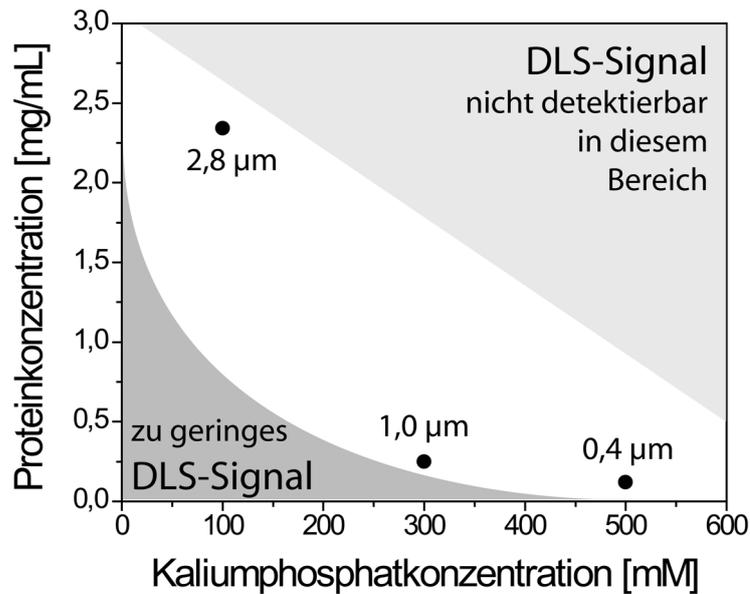


Abb. 3.3-23 - Partikelgröße von Sfl in Abhängigkeit von Phosphat- und Proteinkonzentration nach Bestimmung mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS). Die Datenpunkte entsprechen den Bedingungen zu Beginn des Experiments, während der jeweils angegebene Wert die Größe der Partikel in der jeweiligen Lösung angibt. Messungen konnten nur bei bestimmten Salz- und Proteinkonzentrationen durchgeführt werden. Nimmt die Aggregation durch Erhöhung einer oder beider Konzentrationen zu, so liefert die DLS kein detektierbares Signal. In Lösungen mit zu wenig streuenden Partikeln ist das Signal wiederum zu gering.

Mittels DLS konnte gezeigt werden, dass Sfl kugelförmige Partikel oder Phasen ausbildet, sobald die Phosphatkonzentration in Lösung steigt. Es konnten klar definierte Partikelgrößen bestimmt werden, wie in Abb. 3.3-23 zu jedem Messpunkt angegeben. Dabei hängt der Durchmesser der Partikel nicht nur von der Phosphatkonzentration, sondern auch von der Proteinkonzentration ab. Datenpunkte bei fixer Phosphat- und variabler Proteinkonzentration oder umgekehrt konnten in dieser Messreihe nicht bestimmt werden, wären aber für eine abschließende Aussage unerlässlich. Im Bereich niedriger Protein- und Phosphatkonzentrationen war das Signal aufgrund fehlender oder zu kleiner Partikel zu schwach. Im Bereich hoher Protein- und Phosphatkonzentrationen waren schon mit bloßem Auge Proteinaggregate zu sehen, jedoch war die Absorption größer als die Streuung des Lichts, so dass kein Signal detektiert werden konnte. Daraus kann zumindest geschlossen werden, dass Sfl Partikel mit einheitlicher Größenverteilung in Abhängigkeit der Protein- und Phosphatkonzentration bildet. Dabei ist der Partikeldurchmesser im hier messbaren Bereich variabel.

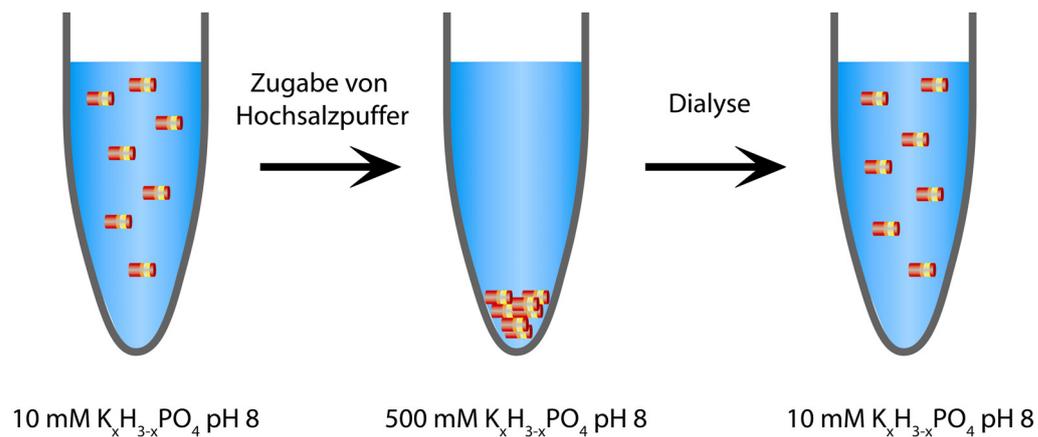


Abb. 3.3-24 – Schematische Darstellung des Verhaltens von Sfl in Phosphat. In 10 mM Phosphatpuffer bei pH 8 ist Sfl vollständig löslich im Überstand detektierbar. Nach Einstellen der Lösung auf 500 mM Kaliumphosphat pH 8 lässt sich Sfl abzentrifugieren und ist im Überstand nicht mehr vorhanden. Nach Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphat pH 8 löst sich das Protein wieder und ist wieder vollständig im Überstand detektierbar. Der Versuch wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml durchgeführt.

Reversibilität der Aggregatbildung

Nach dem Experiment mit der DLS sollte geprüft werden, ob Sfl in Phosphat reversibel Aggregate bildet oder diese unlöslich bleiben. Zu diesem Zweck wurde Sfl gegen 10 mM Kaliumphosphat pH 8 dialysiert und dessen Konzentration UV-spektrometrisch bestimmt. Durch Zugabe des gleichen Volumens 1 M Kaliumphosphat pH 8 aggregiert Sfl vollständig. Nach Abzentrifugieren war im Überstand kein Protein detektierbar. Nach einer weiteren Dialyse gegen 10 mM Kaliumphosphat pH 8 ist das Protein wieder weitgehend im Überstand nachweisbar (Abb. 3.3-24). Bei hoher Phosphatkonzentration bildet Sfl demnach Aggregate, Phasen oder gar Mizellen aus, die sich wieder auflösen, sobald das Kaliumphosphat der Lösung entzogen wird. Es handelt sich um einen reversiblen Prozess.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde der Versuch mit gelabeltem Sfl wiederholt. Als Label wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet. Dieser Farbstoff ist fluoreszenzaktiv und besitzt ein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 495 nm. Sein Emissionsmaximum liegt bei 519 nm. Es wurden Bilder von gelabeltem Sfl in 10 mM Kaliumphosphat pH 8 und 500 mM Kaliumphosphat aufgenommen (siehe Abb. 3.3-25). Bei niedriger Phosphatkonzentration ist eine gleichmäßige Verteilung des Fluoresceins zu sehen, bei hoher Phosphatkonzentration entstehen runde Fokusse. Da das Fluoreszenzlabel kovalent mit dem Protein verbunden ist, bedeutet ein erhöhtes lokales Signal gleichermaßen eine erhöhte lokale Proteinkonzentration. Es bilden sich demnach wahrscheinlich kugelförmige Proteinaggregate oder Phasen mit erhöhter Proteinkonzentration, die, wie oben gezeigt wurde, sich wieder auflösen sobald die Phosphatkonzentration gesenkt wird. Aufgrund des

reversiblen Verhaltens könnte es sich entweder um eine Phasenseparation oder eine Mizellenbildung handeln. Eine gleichzeitige Änderung der Sekundärstruktur konnte bislang nicht bestätigt werden, kann jedoch aufgrund des reversiblen Charakters dieser Kugelbildung zunächst ausgeschlossen werden.

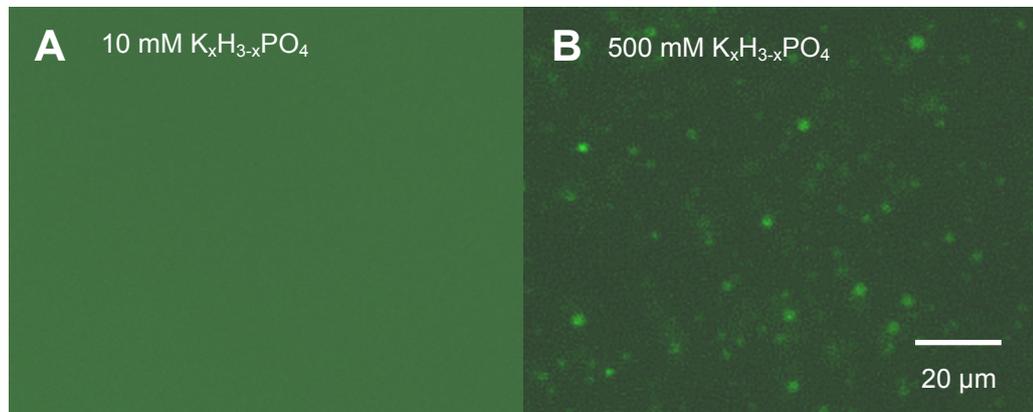


Abb. 3.3-25 - Fluorescein-gelabeltes Sfl unter dem Fluoreszenzmikroskop. Im Vergleich ist die homogene Verteilung des gelabelten Proteins bei 10 mM Kaliumphosphat pH 8 (A) und die Bildung von fokussierbaren kugelförmigen Proteinaggregaten in 500 mM Kaliumphosphat pH 8 (B) gezeigt.

Mit diesen Experimenten konnte der Einfluss von Phosphat auf die rekombinanten Flag-Proteine gezeigt werden. Im Spinnkanal spielt nicht nur dieser Effekt eine Rolle bei der Assemblierung des Fadens. Eine Änderung des pH-Werts ist ebenfalls entscheidend dafür und wurde in dieser Arbeit entsprechend untersucht.

3.3.2 Einfluss des pH-Werts

Die Assemblierung der Spinnenseidenproteine im Spinnkanal wird neben den bereits genannten Faktoren zusätzlich durch den pH-Wert gesteuert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der pH-Wert während des Assemblierungsvorgangs von Spinnenseiden leicht abnimmt. Der physiologische Bereich im Spinnkanal liegt zwischen pH 6,9 und 6,3 (Vollrath & Knight, 2001). In dieser Arbeit wurde die Wirkung dieses Faktors auf rekombinante Flag-Proteine näher untersucht. Die Messungen sollten, ebenso wie bei den Aggregationsassays mit Phosphat, Aussagen über das Verhalten einzelner Domänen bei unterschiedlichen pH-Werten gestatten. Somit sollten Erkenntnisse über die Bedeutung der carboxyterminalen Domäne sowie der Länge der repetitiven Domäne gewonnen werden. Auch hier wurden die Aggregationsassays unter gleichen Bedingungen wie bei den Tests mit Phosphat durchgeführt.

Einfluss auf die Länge der repetitiven Domänen

Die Proteine wurden zuvor gegen 10 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert und anschließend in 100 mM Puffer des jeweiligen pH-Werts überführt. Dabei wurde die Proteinkonzentration auf 0,3 mg/mL eingestellt. Vor Zentrifugation wurden alle Proben 1 h bei 25 °C inkubiert und anschließend die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. Zum Vergleich wurde auch der Proteingehalt des Pellets nach Aufnahme in Harnstoff detektiert.

Um eine Aussage über den Einfluss der Länge der mittleren Domäne zu treffen, wurden sowohl Sfl als auch Sfl₃ dem Assay unterzogen. Zur Einstellung des pH-Werts wurden stets Puffer verwendet, deren Pufferbereich für den jeweiligen pH-Wert optimal war. Die Puffer sind unter 2.2.2 aufgeführt.

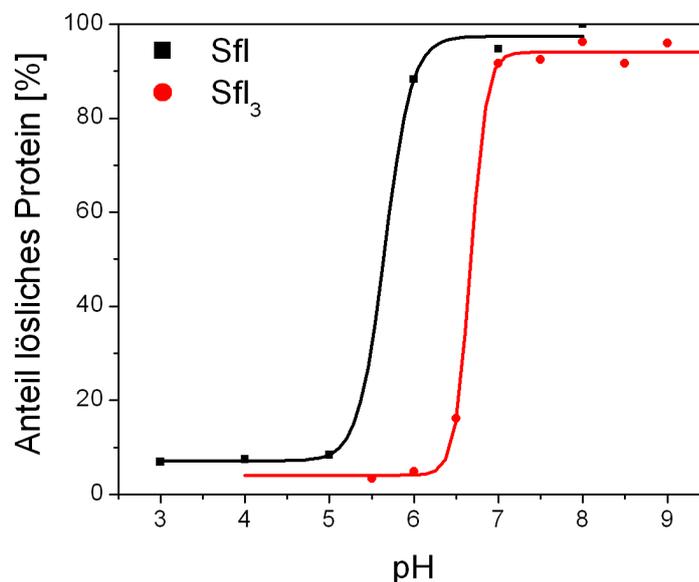


Abb. 3.3-26 – Aggregationsverhalten rekombinanter Flagelliform-Seidenproteine in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Die Proteine Sfl (schwarz) und Sfl₃ (rot) wurden bei einer Ausgangskonzentration von 0,3 mg/ml bei 25 °C und unterschiedlichen pH-Werten der Lösung 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das verbleibende lösliche Protein im Überstand bestimmt und der Anteil dessen am Gesamtproteingehalt der Probe berechnet.

Die Proteine Sfl und Sfl₃ sind beide bei basischem und neutralem pH-Wert löslich, während sie bei saurem pH aggregieren. Der Übergangspunkt liegt für Sfl bei pH 5,5 und für Sfl₃ bei pH 6,5. Damit ändert sich das Löslichkeitsverhalten des längeren Sfl₃ im pH-Bereich, der auch im Spinnkanal relevant ist. Im Gegensatz zu Sfl beinhaltet Sfl₃ die Spacer-Region mit insgesamt 7 negativ geladenen Aminosäureseitenketten dreimal. In der repetitiven Domäne ist dies die einzige Stelle, an der geladene Aminosäuren auftreten. Die negativ geladenen Seitenketten werden bei saurem pH protoniert und damit neutral. Das Protein Sfl₃ reagiert deshalb sensitiver auf eine pH-Änderung in den sauren Bereich. Die Spacer-Region ist

demnach nicht nur wichtig zur Stabilisierung von Strukturen, sondern bestimmt auch im repetitiven Teil des Proteins das Löslichkeitsverhalten.

Einfluss auf die fusionierte carboxyterminale Domäne

Zur weiteren Analyse des Einflusses der carboxyterminalen Domäne wurden vergleichende Messungen mit den Proteinen Sfl₃ und Sfl₃CT durchgeführt. Für Sfl₃ konnte bereits ein Übergang bei physiologisch relevanten pH-Werten gezeigt werden. Da der Übergang für Sfl₃CT etwa im gleichen pH-Bereich lag, wurde ein Bis-Tris-Puffersystem verwendet, welches genau diesen pH-Bereich abdeckt. Dieses kommerziell erhältliche Puffersystem bot den Vorteil, dass alle 0,1 pH-Einheiten eine Messung erfolgen konnte und im pH-Bereich von 5,5 bis 7,5 kein Wechsel des Puffersystems erfolgen musste.

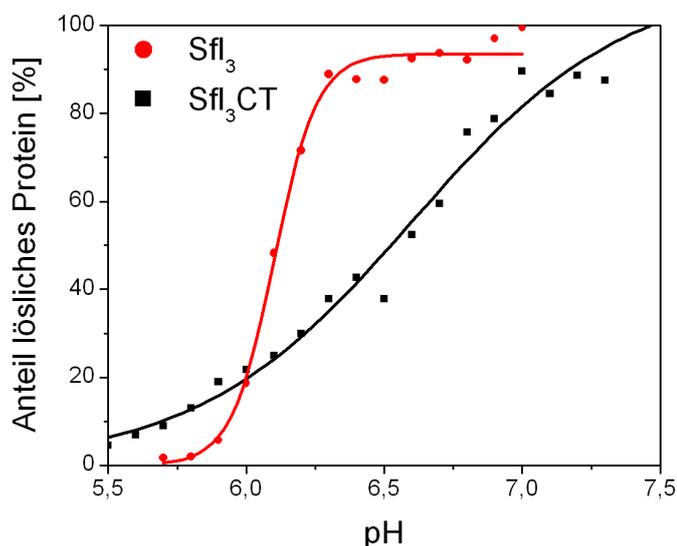


Abb. 3.3-27 – Aggregationsverhalten rekombinanter Flagelliform-Seidenproteine in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Die Proteine Sfl (schwarz) und Sfl₃ (rot) wurden bei einer Ausgangskonzentration von 0,3 mg/ml bei 25 °C und unterschiedlichen pH-Werten der Lösung 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das verbleibende lösliche Protein im Überstand bestimmt und der Anteil dessen am Gesamtproteingehalt der Probe berechnet.

Sfl₃ und Sfl₃CT sind bei pH 7,5 vollständig löslich, während sie bei pH 5,5 ausschließlich aggregiert vorliegen. Der Übergang von löslichem zu unlöslichem Zustand von Sfl₃CT erstreckt sich von pH 5,5 bis 7,0 und ist weniger kooperativ als der von Sfl₃, der nur zwischen pH 5,9 und pH 6,3 liegt. Im Gegensatz zu den repetitiven Teilen des Proteins befinden sich in der carboxyterminalen Region auch positiv geladene Aminösäureseitenketten. Analog zur Aggregation durch Phosphat scheinen diese auch hier einen Einfluss auf die Löslichkeit haben. Positiv geladene Seitenketten behalten ihre Ladung bei sauren pH-Werten und können somit weiter mit dem polaren Lösungsmittel wechselwirken. Einen ähnlichen Einfluss könnte

auch der aminoterminalen Bereich haben, da auch hier positiv geladene Seitenketten – sogar noch 5 mehr als beim carboxyterminalen Bereich – auftreten.

Daher wurde auch das Verhalten der terminalen Domänen allein bei unterschiedlichen pH-Werten genauer untersucht. Erstaunlicherweise gibt es bisher keine Hinweise auf eine vollständige Aggregation der beiden terminalen Regionen nrNT und nrCT. Der Assay wurde genau wie bei allen anderen Proteinen durchgeführt, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In Abb. 3.3-28 ist das Aggregationsverhalten von nrNT und nrCT bei pH 2, 5, 5, 6, 7 und 8 dargestellt. Die Werte liegen um 100 % Anteil löslichen Proteins. Größere Werte als 100 % entstehen durch die Referenzmessung bei pH 8. Bei der Normierung konnte nicht ausgeschlossen werden, dass bei pH 8 ein kleiner Teil des Proteins aggregiert ist. Daher sind Werte von mehr als 100 % löslichem Protein anderen pH-Werten möglich. Die Aussage bezieht sich immer auf den Referenzwert bei pH 8. Für beide Proteine, nrNT und nrCT, konnte bei keinem pH-Wert signifikante Aggregation nachgewiesen werden.

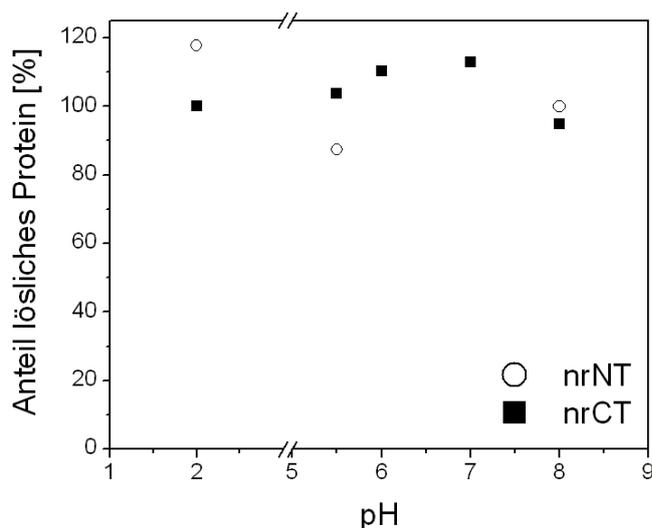


Abb. 3.3-28 – Aggregationsverhalten rekombinanter Flagelliform-Seidenproteine in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Die Proteine Sfl (schwarz) und Sfl₃ (rot) wurden bei einer Ausgangskonzentration von 0,3 mg/ml bei 25 °C und unterschiedlichen pH-Werten der Lösung 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das verbleibende lösliche Protein im Überstand bestimmt und der Anteil dessen am Gesamtproteingehalt der Probe berechnet.

3.4 Assemblierungsformen rekombinanter Flagelliformseide

3.4.1 Gießen von Filmen

Als eine mögliche Assemblierungsform wurden bei rekombinanten Spinnenseidenproteinen schon Proteinfilme beschrieben (Slotta *et al.*, 2006; Vendrely *et al.*, 2007). Die Herstellung

solcher Filme kann dabei aus unterschiedlichen Lösungen erfolgen. In der Regel sollten möglichst salzfreie Lösungsmittel verwendet werden, denn der Proteinfilm entsteht nach Abdampfen des Lösungsmittels. So wird gewährleistet, dass sich ausschließlich Protein im Rückstand befindet. Die Wahl des Lösungsmittels richtet sich nach der Löslichkeit des Proteins und nach der Flüchtigkeit des Lösungsmittels. Je nach Anwendung kann auch die Toxizität des Lösungsmittels eine wichtige Rolle spielen.

Die Proteine Sfl, Sfl₃ und SflCT wurden zum Gießen von Proteinfilmen verwendet. Dabei wurde das Lösungsmittel variiert, um ein möglichst geeignetes für das Gußverfahren zu finden. Sfl ist beispielsweise in Hexafluoroisopropanol (HFIP), Dimethylformamid (DMF) und Ameisensäure (HCOOH) löslich, in Chloroform (CHCl₃) bildet es eine gelartige Konsistenz aus und in Methylenchlorid (CH₂Cl₂), Aceton ((CH₃)₂CO) Pyridin (C₅H₅N) und Cyclohexan (C₆H₁₂) ist es unlöslich. Daher lässt sich zusammenfassen, dass Sfl eher in polaren Lösungsmitteln löslich ist.

Lyophilisiertes Sfl wurde in organischen Lösungsmitteln, wie HFIP oder Ameisensäure, gelöst und anschließend auf einer (im jeweiligen Lösungsmittel unlöslichen) Oberfläche gleichmäßig verteilt. Der nach Verdampfung des Lösungsmittels entstandene Proteinfilm ist stabil und in gewissem Umfang reißfest. Der Film scheint sich jedoch in Wasser oder 10 mM Tris/HCl pH 8 jedoch nach einiger Zeit zu lösen.

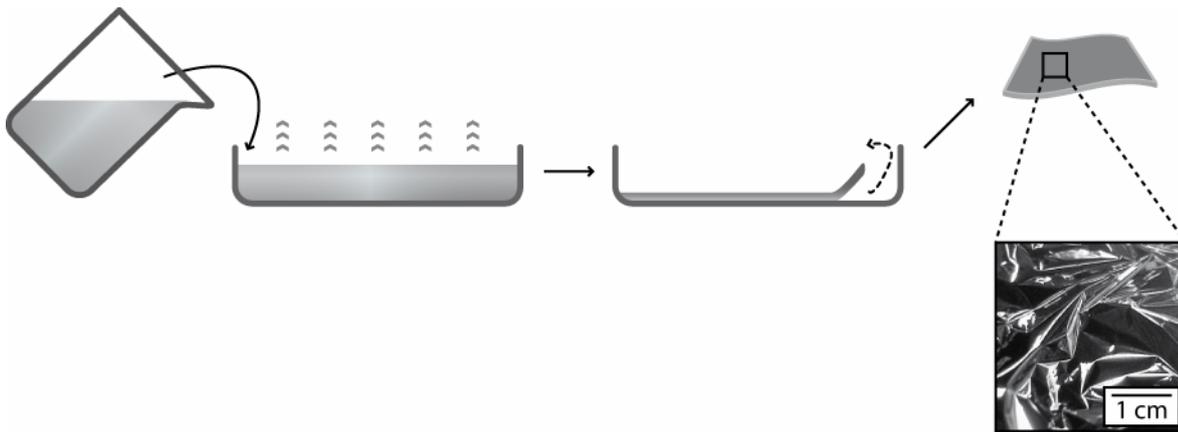


Abb. 3.3-29 – Verfahren zum Gießen von Filmen aus rekombinanten Flag-Proteinen. Sfl, Sfl₃ und SflCT wurden für zur Herstellung von Proteinfilmen verwendet. Zunächst wurde das Protein in einem organischen Lösungsmittel gelöst und auf eine Oberfläche (z.B. Petrischale) gegossen. Sobald das Lösungsmittel vollständig verdunstet war, blieb ein stabiler Proteinfilm zurück, der sich im Ganzen von der Oberfläche ablösen ließ. Der Bildausschnitt zeigt einen Film aus Sfl aus Hexafluoroisopropanol (HFIP).

Auch Sfl₃ und SflCT waren in HFIP löslich. Daher wurde dieses Lösungsmittel neben Ameisensäure als Standard zum Gießen von Proteinfilmen auf Oberflächen verwendet. Bei HFIP handelt es sich um ein durchsichtiges, polares und mit Wasser mischbares Lösungsmittel. Zudem ist es thermisch stabil und durchlässig für ultraviolettes Licht, weshalb auch die Proteinstruktur von Sfl in HFIP bestimmt wurde (siehe 3.4.2). Der Siedepunkt von HFIP liegt bei 58,2 °C. Das Lösungsmittel hat daher einen sehr viel geringeren Dampfdruck als Wasser und ist somit flüchtig, ideal für die Herstellung von Proteinfilmen.

3.4.2 Sekundärstruktur von Filmen

Mit Hilfe der CD-Spektrometrie wurden solche Filme auf ihre Sekundärstruktur untersucht. Ein Proteinfilm aus Sfl, welches zuvor in HCOOH gelöst war, wurde auf Quarzglas gegossen und im CD-Spektrometer gemessen. Eine Angabe der molaren Elliptizität ist bei einem Film nicht möglich, da das Signal sowohl von der Schichtdicke als auch der lokalen Proteinkonzentration beeinflusst wird. Das Spektrum (Abb. 3.3-30A) weist ein deutliches Minimum bei 218 nm auf. Der Film beinhaltete demnach hauptsächlich β -Faltblatt-Struktur.

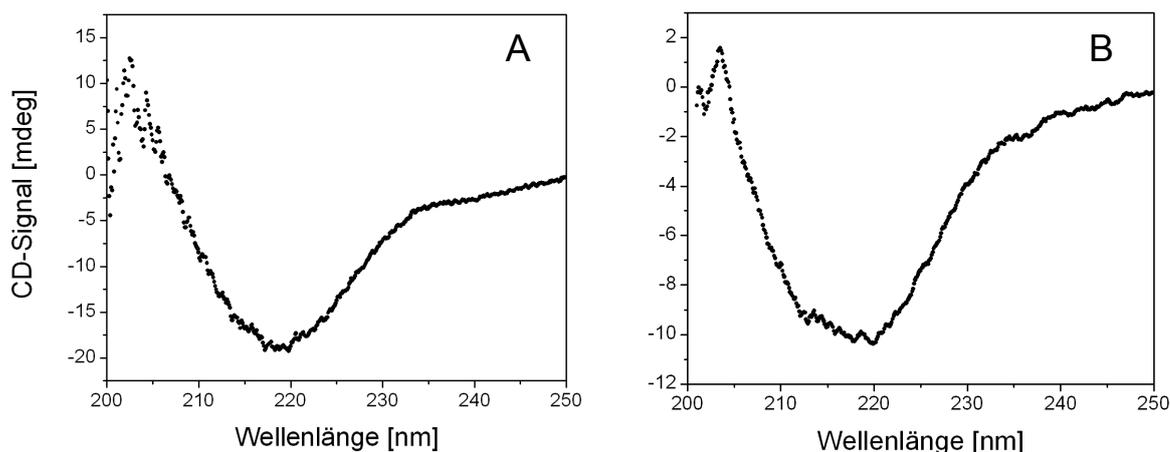


Abb. 3.3-30 – CD-Spektrum im fern-UV von Filmen bestehend aus Sfl. Zuvor wurde Sfl in Ameisensäure (HCOOH) (A) sowie in Hexafluoroisopropanol (HFIP) (B) gelöst. Die Filme wurden jeweils auf Quarzglas gegossen und im Spektrometer analysiert. Beide Spektren zeigen eine dominante Struktur aus β -Faltblättern. Die Höhe des CD-Signals hängt dabei von der Dicke und der lokalen Proteinkonzentration ab und kann daher nicht in molare Größen umgerechnet werden.

Ein ähnliches Ergebnis resultierte aus der Messung eines aus HFIP gegossenen Films von Sfl nach Aufnahme eines CD-Spektrums. Auch hier zeigte der Film aus Sfl eine deutliche β -Faltblatt-Struktur (Abb. 3.3-30B).

Für die Sekundärstruktur von Sfl-Filmen macht es offensichtlich keinen Unterschied, ob HFIP oder Ameisensäure als Lösungsmittel verwendet wird. Fraglich bleibt, ob die Struktur der Filme bereits in der Lösung entsteht oder erst direkt nach dem Verdampfen des Lösungsmittels. Um dies zu untersuchen, wurde Sfl in HFIP gelöst, eine Konzentrationsbestimmung im UV-Spektrometer durchgeführt und anschließend ein CD-Spektrum in Lösung aufgenommen. Aufgrund des niedrigen Dampfdrucks von HFIP wurde bei einer Temperatur von 10 °C gemessen.

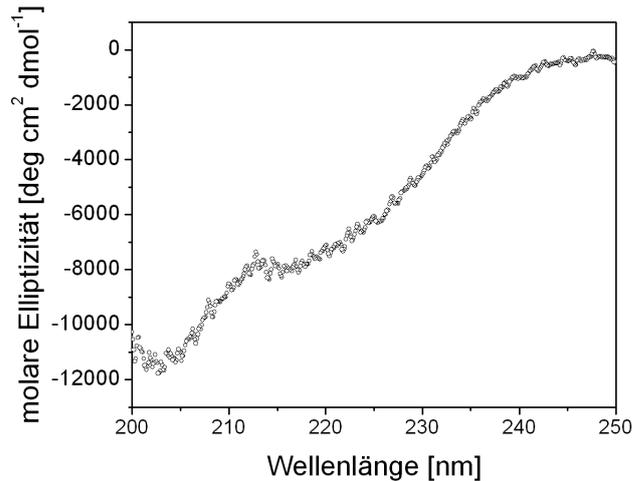


Abb. 3.3-31 – CD-Spektrum in fern-UV von Sfl gelöst in Hexafluoroisopropanol (HFIP). Das Spektrum zeigt ein Minimum bei 202 nm, interpretierbar als unstrukturiertes Protein, zusätzlich ein lokales Minimum bei 218 nm, als Hinweis auf eine bereits gebildete β -Faltblatt-Struktur. Für die Messung wurde ein Kuvette mit der Schichtdicke von 0,1 cm verwendet. Eine Angabe zur Konzentration von Sfl kann aufgrund der Flüchtigkeit des Lösungsmittels nicht gegeben werden. Die Messung wurde bei 10 °C aufgenommen.

Da Sfl in HFIP löslich ist und dieses Lösungsmittel nicht im Spektralbereich absorbiert, in den Bestimmungen für Konzentration und Sekundärstruktur von Proteinen durchgeführt werden, konnte ein CD-Spektrum aufgenommen werden. Anhand dieses Spektrums konnte für Sfl in HFIP gezeigt werden, dass das Protein nur partiell strukturiert ist. Zum einen zeigt ein Minimum bei 202 nm einen deutlichen unstrukturierten Anteil im Protein, zum anderen gibt es ein lokales Minimum bei 218 nm, was auf vorhandene β -Faltblätter schließen lässt. In der Lösung sind im Protein bereits Sekundärstrukturelemente enthalten, die der Film später ausbildet. Es gibt demnach eine gewisse Information über die Sekundärstruktur, in der zunächst aber nur Teile des Proteins vorliegen. Es handelt sich entweder um definierte Bereiche im Protein, die entweder β -Faltblatt oder *random coil* bevorzugen oder aber um einen dynamischen Prozess, in dem bestimmte Bereiche des Proteins nur temporär Struktur annehmen. Mit dem CD-Spektrum alleine kann jedoch keine Aussage über die Dynamik getroffen werden. Wie die CD-Spektren der Filme zeigen, passen sich die unstrukturierten Bereiche des Proteins während der Verdampfung des Lösungsmittels den vorhandenen β -Faltblättern an. Demnach sind bei den unstrukturierten Bereichen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel vorhanden. Die Geschwindigkeit des Abdampfens des Lösungsmittels hat damit sehr wahrscheinlich einen erheblichen Einfluss auf die Strukturbildung. Diese Geschwindigkeit kann durch Änderung der Umgebungstemperatur und des Drucks variiert werden. Für die Entwicklung eines Gussverfahrens sind diese Parameter essentiell, da sie eine

Änderung der Struktur im Film und damit ganz andere Eigenschaften hervorrufen könnten. In dieser Arbeit wurden alle Filme bei normalem Luftdruck und RT gegossen.

3.4.3 Dickenbestimmung von Proteinschichten mittels Ellipsometrie

Durch das beschriebene Gussverfahren können Proteinfilme zur Beschichtung von Oberflächen verwendet werden. Dabei spielt die Dicke dieser Filme eine entscheidende Größe. Die Methode der Ellipsometrie stellt ein Verfahren zur Messung von Schichtdicken dar. Hiermit sollte untersucht werden, ob die Dicke solcher Proteinfilme optimiert werden kann, indem eine entsprechende Proteinkonzentration verwendet wird.

Die Ellipsometrie verwendet linear oder zirkular polarisiertes Licht, welches an der Grenzfläche einer lichtdurchlässigen Schicht in Abhängigkeit vom Einfallswinkel entweder gebrochen oder reflektiert wird. Das zu messende Medium sollte dabei optisch dichter sein als Luft. Durch Detektion der Unterschiede in der Polarisation des Lichts lässt sich die Schichtdicke bestimmen.

Mit dieser Methode sollte bestimmt werden wie die Dicke eines Films mit der Konzentration des Proteins in Lösung, aus welcher der Film gegossen werden soll, zusammenhängt. Dafür wurden verschiedene rekombinante Spinnenseidenproteine in HFIP gelöst und auf einheitlich große Flächen gegossen. Die umfangreichsten Untersuchungen wurden mit den Proteinen Sfl und C₁₆, einem rekombinanten Proteinderivat der Dragline-Spinnenseide ADF-4 (Hümmerich *et al.*, 2004), durchgeführt. Als Untergrund wurden silanisierte Oberflächen verwendet. Die folgende Tabelle (Tab. 3.4) zeigt die Daten Schichtdickenbestimmung von aus unterschiedlich konzentrierten Proteinlösungen gegossenen Filmen.

Protein	Protein-konzentration [%]	Protein-konzentration [μM]	Dicke des Films [nm]	Proteinmenge pro Flächeneinheit [mg cm^{-2}]
C ₁₆	0,1	21,0	208,7	0,2
C ₁₆	0,05	10,5	124,6	0,1
C ₁₆	0,025	5,2	56,6	0,05
Sfl	0,1	34,4	114,3	0,2
Sfl	0,01	3,4	16,7	0,02

Tab. 3.4 – Bestimmung der Schichtdicken von Proteinfilmen mittels Ellipsometrie. Die Filme wurden aus Sfl oder C₁₆ gelöst in HFIP gegossen. Angegeben sind die Proben, die Konzentrationen, die Schichtdicken sowie Proteinmenge pro Fläche.

Der direkte Zusammenhang zwischen der Konzentration des Proteins und der Schichtdicke des resultierenden Films konnte hiermit nachgewiesen werden. Werden gleich große Flächen sowie gleiche Volumina zum Gießen der Filme verwendet, besteht im Rahmen der Messungen ein direkter, linearer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Schichtdicke. Dabei können jedoch nur Proben des gleichen Proteins verglichen werden. Etwa ein Drittel der molaren Konzentration von C₁₆ werden beispielsweise im Vergleich zu Sfl benötigt, um einen etwa gleich dicken Film zu gießen. Dabei ist die molare Masse von C₁₆ nicht doppelt so groß wie die von Sfl. Der Grund dafür, dass C₁₆ vergleichsweise dickere Filme macht als Sfl, muss also in der Struktur dieser Filme liegen. Es konnte nachgewiesen werden, dass C₁₆ direkt nach dem Gießen aus HFIP α -helikal strukturiert ist. Erst durch die Behandlung mit MeOH wird seine Struktur zu β -Faltblättern umorganisiert. Die Filme von C₁₆ wurden alle nach dieser Nachbehandlung gemessen. Filme aus Sfl hingegen zeigen, wie beschrieben, direkt nach dem Gießen β -Faltblatt-Struktur. Diese Struktur muss demnach bei Sfl kompakter sein.

Mit der Ellipsometrie konnte außerdem festgestellt werden, ob eine Oberfläche homogen war oder ob sie größere Schwankungen zeigte. Die gemessenen Filme waren alle homogen. Das Gießen von Filmen stellt demnach eine effiziente Methode zur Oberflächenbeschichtung und -funktionalisierung dar.

Um eine möglichst dünne Proteinschicht auf einer silanisierter Oberfläche zu erhalten, wurde versucht das Protein Sfl mit einem *crosslinker* auf die Oberfläche zu koppeln. Hierfür wurde Phenylendiisothiocyanat (PDITC) verwendet. Diese Verbindung ist durch die beiden Isothiocyanatgruppen in der Lage mit Aminogruppen zu reagieren. Dabei erfolgt ein nukleophiler Angriff des freien Elektronenpaares der Aminogruppe am partiell positiv geladenen Kohlenstoffatom des Isothiocyanats. Die Reaktion wurde in DMF mit 10 % Pyridin durchgeführt. Als Reaktionspartner wurde auf der einen Seite die zuvor mit APTES aminosilanierte Oberfläche und auf der anderen Seite die enständige Aminogruppe von Sfl verwendet. Die Reaktionen wurden in zwei Stufen durchgeführt. Zunächst wurde an die Oberfläche gekoppelt und nach drei Waschschritten mit dem Lösungsmittel wurde Sfl im gleichen DMF-Pyridin-Gemisch zugegeben.

Um nun eine Aussage über den Erfolg des Kopplungsversuchs machen zu können, wurde die Schichtdicke auf der silanisierter Oberfläche mittels Ellipsometrie bestimmt. Dazu wurden neben der kompletten Kopplung mit PDITC und Sfl zwei Kontrollen gemessen: Für die erste Kontrolle wurde nur PDITC auf die Oberfläche gegeben. Für die zweite Kontrolle wurde nur Sfl in DMF mit 10 % Pyridin auf der Oberfläche inkubiert. Drei Waschschrritte sollten das

Protein jedoch wieder entfernen und vermeiden, dass Sfl unspezifisch an der Oberfläche adhärirt. Die Ergebnisse der Messung mittels Ellipsometrie sind in Tab. 3.5 zusammengefasst.

Crosslinker/Protein	Dicke [nm]
PDITC	1,5
Sfl	0,6
PDITC/Sfl	8,6

Tab. 3.5 – Nachweis der Kopplung von Sfl über PDITC an eine aminosilanisierte Oberfläche mittels Ellipsometrie. Angegeben sind die Proben und deren Schichtdicke. PDITC kann an die Oberfläche koppeln, Sfl lässt sich ohne Quervernetzung nach mehreren Waschschrinen von der Oberfläche entfernen, bindet aber kovalent an PDITC auf der Oberfläche.

Die Daten der Ellipsometrie entsprachen den Vorhersagen für die Probe und die beiden Kontrollen. PDITC alleine bindet wie erwartet an die Oberfläche, was durch die Ellipsometriedaten gezeigt werden konnte. Die Länge des Moleküls PDITC beträgt etwa 1150 pm. Das Protein Sfl alleine haftet nach drei Waschschrinen mit DMF/Pyridin nicht an der Oberfläche. Die Kopplung von Sfl an die Oberfläche ist also möglich ohne dass Sfl unspezifisch daran bindet. Wie bereits erwähnt, ließ sich mittels Ellipsometrie auch die Homogenität einer Schicht nachweisen. Bei den Kopplungsversuchen von Sfl ergab sich eine homogene Schicht. Die Kopplung verlief demnach quantitativ auf der gesamten Oberfläche ab. Auf diese Weise können noch dünnere Proteinschichten effizient auf Oberflächen gebracht werden als es mit dem Giessen von Filmen möglich ist.

Ziel der Experimente mit variabel in der Höhe einstellbaren Proteinschichten war es einen Halbleiter-Chip zu beschichten. Hierbei sollte eine möglichst dünne Schicht aus Protein die Abschirmung eines Halbleiters gegenüber einer Elektrolytlösung herabsetzen, so dass im Halbleiter ein größerer Strom entstand. Die Messungen sollten dabei durch Bestimmung der Impedanz im Halbleiter die entsprechenden Ergebnisse liefern. Den Aufbau des Halbleiter-Chips zeigt Abb. 3.3-32.

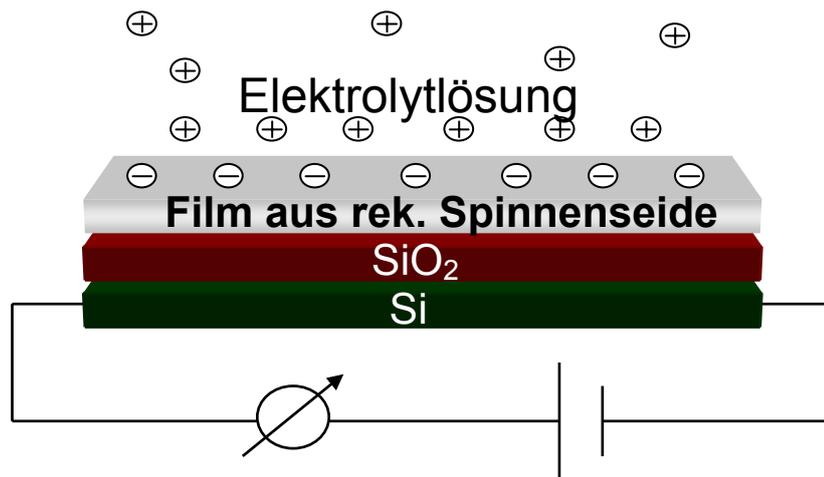


Abb. 3.3-32 - Aufbau und Funktion des Silikonchips aus Silizium (Si) und Siliziumoxid (SiO₂). Die Schicht aus Spinnenseide soll die Abschirmung der Elektrolytlösung auf dem Chip senken. Dies kann durch kleineren Widerstand gemessen werden.

4 Diskussion

4.1 Rekombinante Herstellung von Flagelliform-Spinnenseide

Flagelliform-Spinnenseide, aus welcher der zentrale Faden der Fangspirale im Netz einer Spinne besteht, kann als natürliches Material nur aus dem Netz entnommen werden. Bei Fäden, die aus der Spinne selbst gezogen werden, handelt es sich um den Abseilfaden der Spinne, die Dragline-Seide. Gegenüber anderen natürlichen und synthetischen Materialien weist die Flagelliform-Seide eine beinahe unübertroffene Elastizität auf und ist dabei noch immer extrem reißfest. Im Gegensatz zur Dragline-Seide besteht sie aus nur einer Proteinkomponente (Flag).

Aus den genannten Gründen ist eine rekombinante Herstellung von Flag besonders interessant. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet, um die jeweiligen Vorteile nutzen zu können.

Rekombinante Herstellung in Insektenzellen

Die Expression in Insektenzellen, bei der das rekombinante Gen durch Infektion mit Baculoviren in den Organismus gelangt, ist aus phylogenetischer Sicht dem natürlichen System der Epithelzellen in der Spinnndrüse relativ ähnlich. Unter Kontrolle des Polyhedrin-Promotors, der in der sehr späten Phase der Infektion angeschaltet wird, wurde das rekombinante, für FLAG-C kodierende Gen exprimiert. Eine optimale Ausbeute des Proteins FLAG-C konnte nach 3 d erzielt werden. Das Protein wurde dabei aus einer cDNA-Sequenz von *Nephila clavipes* synthetisiert. Ein Vorteil der Expression in Insektenzellen liegt darin, dass posttranslationale Modifizierungen mit großer Wahrscheinlichkeit ähnliche Muster aufweisen, wie im originalen Expressionssystem. In einem weiteren Ansatz wurde außerdem die zweite verfügbare cDNA für FLAG-N mit der von FLAG-C ligiert. Das entstehende Fusionsprotein wurde N-FLAG-C genannt und hat eine Größe von 151 kDa. Mit diesem Konstrukt kann rekombinant ein dem natürlichen Flag sehr ähnliches Protein synthetisiert werden, welches verglichen mit dem Original ein annähernd halb so großes Molekulargewicht besitzt und dank dem Expressionssystem ähnliche Phosphorylierungs- und Glycosylierungsmuster aufweisen sollte. Solche posttranslationalen Modifizierungen entstehen am Protein jedoch nur, wenn ein sekretorischer Pfad durchlaufen wird. Dafür besteht im Baculovirus-Expressionssystem die Möglichkeit die Signalsequenz von Mellitin aus der Honigbiene vor das rekombinante Gen zu klonieren (Wicker-Planquart *et al.*, 1996). Auch

die Analyse ist inzwischen bei größeren Proteinen mittels Massenspektrometrie möglich (Benesch *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Bac-to-Bac[®]-System sowohl für die Klonierung als auch die Expression von rekombinantem Flag geeignet ist. Die Ausbeuten lagen hingegen noch bei nur wenigen mg, da die verwendeten Sf9-Zellen adhären kultiviert wurden. Eine Erhöhung der absoluten Ausbeute sollte entweder durch Verwendung größerer Zellkulturflaschen oder eine Adaption der Sf9-Zellen auf Suspensionswachstum jederzeit möglich sein.

Zur Entwicklung einer Reinigungsstrategie von FLAG-C aus Sf9-Zellen wurden bereits erste Versuche durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss und Zentrifugation lag das Protein sowohl im Überstand als auch im Pellet vor. Die Verwendung eines Puffersystems bei pH 7,5 sollte für die Löslichkeit des Proteins mit einem relativ sauren pI von 3,9 zumindest aufgrund seiner Gesamtnettoladung bei neutralen pH-Werten jedoch ausreichen.

Mit dem im Überstand verbliebenen FLAG-C wurde nach dem Vorbild der Reinigung rekombinanter Proteine der Dragline-Seide eine Hitzedenaturierung durchgeführt, um diese als möglichen Reinigungsschritt zu etablieren. Dazu wurden drei Fraktionen mit löslichem FLAG-C 20 Min. bei 60, 70 und 80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation war in allen Proben FLAG-C im Pellet nachweisbar, wenngleich nur bei 80 °C nahezu vollständig. Die Hitzedenaturierung, bei der hauptsächlich die Verunreinigungen präzipitieren sollten, kann für FLAG-C demnach nicht angewendet werden. Da FLAG-C die carboxyterminale Domäne enthält, die α -helikal strukturiert ist, kann dieses Verhalten bei Temperaturen über 57 °C mit Denaturierungseffekten erklärt werden. Um für die rekombinanten Konstrukte aus Insektenzellen eine geeignete Reinigungsstrategie zu entwickeln, ist es sinnvoll, bei weiteren Versuchen das inzwischen etablierte Protokoll für die bakteriellen Konstrukte (siehe unten) zu verwenden.

Rekombinante Herstellung in Bakterien

Die Gene, die für die Konstrukte Sfl, Sfl₃, SflCT, Sfl₃CT, nrCT, nrNT sowie NTSfl und NTSflCT kodieren, wurden für die rekombinante Expression in *E. coli* mit dem beschriebenen Klonierungssystem aus den einzelnen Oligonukleotiden ligiert und dann in entsprechende Expressionssvektoren überführt (Hümmerich *et al.*, 2004; Vendrely *et al.*, 2007). Der zur Expression verwendete Bakterienstamm *E. coli* BLR (DE 3) eignet sich zur Herstellung repetitiver Proteine besonders, da ihm das Gen für die Rekombinase fehlt, welche für die homologe Rekombination verantwortlich ist. Dieser Punkt ist gerade für die rekombinante

Produktion von Spinnenseidenproteinen wichtig, die hochrepetitive Sequenzen besitzen und daher besonders anfällig für homologe Rekombination in Bakterien sind. Nach dreistündiger Synthese bei 37 °C waren die Proteine nrNT und nrCT löslich und wurden, da sie einen His₆-Tag enthielten, über Affinitätschromatographie (Ni-IMAC) gereinigt. Die Konstrukte Sfl, Sfl₃, SflCT und Sfl₃CT wurden nach Synthese bei 30 °C durch Reinigung aus *inclusion bodies* von den meisten *E. coli*-Proteinen getrennt (Rudolph *et al.*, 1997). Zusätzlich war eine Reinigung über Anionenaustauschchromatographie erforderlich, um weitere Verunreinigungen zu entfernen. Die Detektion bei diesen Proteinen erfolgte immunospezifisch über einen aminoterminalen T7-Tag.

Das Protein NTSfl wurde ebenfalls in *inclusion bodies* angereichert, jedoch fehlen hier aufgrund der in nrNT vorkommenden Schnittstelle für *Bam*HI sämtliche Tags. Zur Detektion wurde deshalb ein spezieller Antikörper gegen das Protein Sfl in Kaninchen hergestellt. Dieser polyklonale Antikörper erkennt jedoch auch andere Proteine, wie BSA, und ist deshalb für einen spezifischen Nachweis nicht geeignet. Da in Sfl möglicherweise entsprechende Epitope zur Antikörperbildung fehlen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Flagelliform-Seide nicht immunogen ist, was für Spinnenseiden schon allgemein vermutet wurde und für eventuelle Anwendungen, beispielsweise in der Medizintechnik, einen wichtigen Punkt darstellt. Einerseits konnte zwar ein reaktives Antiserum gegen einige Seidenproteine hergestellt werden (Sponner *et al.*, 2005), andererseits zeigen Experimente mit Schwann-Zellen, die Axons von peripheren Nervenzellen umhüllen, ein adhärentes Wachstum auf Spinnenseide (Allmeling *et al.*, 2006).

Alle Proteine – einschließlich nrNT und nrCT – wurden abschließend mit einer je nach Protein variablen Konzentration von (NH₄)₂SO₄ gefällt, wodurch eine Reinheit von ≥ 95 % erreicht werden konnte. Diese Reinheit konnte durch die Abwesenheit von Tryptophan in allen rekombinanten Flag-Proteinen mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden (Hümmerich *et al.*, 2004), da verunreinigende *E. coli*-Proteine einen durchschnittlichen Tryptophan-Anteil von 1,5 % aufweisen (Blattner *et al.*, 1997).

Die Ausbeuten sämtlicher rekombinanter Flag-Proteine lagen zwischen 5 und 12 mg/L Bakterienkultur (Induktion der Genexpression bei einer OD₆₀₀ von 0,8 für 3 h) und damit im Rahmen der Ausbeuten anderer rekombinanter Spinnenseidenproteine (Vendrely *et al.*, 2007). Eine Erhöhung der Gesamtausbeute ist bei *E. coli* durch entsprechende Fermentationstechniken möglich. Es konnte beobachtet werden, dass kleinere Proteine besser und in größeren Ausbeuten synthetisiert werden konnten, als größere. Eine Ursache hierfür liegt sehr wahrscheinlich in der mRNA, die bei steigender Länge aufgrund der Guanin- und

Cytosin-reichen Sequenz der Spinnenseide Sekundärstrukturen ausbilden kann (Hayshi & Lewis, 2001). Solche Strukturen können ein sogenanntes *ribosome stalling* bewirken, bei dem das Ribosom auf der mRNA aufgrund der von ihr gebildeten Haarnadel-Strukturen stehen bleibt und die Translation abbricht oder gar nicht erst beginnt (Phadtare *et al.*, 1999). Diesbezüglich wurden verschiedene Lösungsansätze getestet. Eine Erhöhung der Temperatur während der Expression sollte beispielsweise bewirken, dass gebildete Sekundärstrukturen durch die höhere Energie der Umgebung leichter wieder aufbrechen. Dennoch konnten im Fall von Sfl₃ für alle Temperaturen, bei denen die Expression stattfand, weiterhin Proteinbanden von Fragmenten detektiert werden, jedoch in unterschiedlicher Intensität.

Die alternative Möglichkeit bietet die Klonierung eines carboxyterminalen GST-Tags (Glutathion-S-Transferase). Dieser 26 kDa große Tag sollte zur Reinigung der Vollängenkonstrukte verwendet werden, da er im Fall des Auftretens von Sekundärstrukturen der mRNA nur translatiert wird, wenn die mRNA komplett abgelesen wird. Der Nachteil eines solchen Tags besteht in seiner Größe. Dadurch kommt das Protein näher an das Limit der Expression in *E. coli* und wird in noch geringeren Ausbeuten synthetisiert. Der Vorteil liegt in der möglichen Reinigung über Affinitätschromatographie, durch welche die Reinheit des Proteins weiter erhöht wird.

Um Ausbeuten der Proteinsynthese weiter zu erhöhen wurde die Zugabe von Glycerin zum Medium versucht. Glycerin führt im Stoffwechsel der Zelle zu Glycin, der mit über 50 % Anteil am häufigsten vorkommenden Aminosäure in Flag. Hingegen hat die direkte Zugabe von Glycin anstelle von Glycerin weniger Einfluss auf die Ausbeute (Chow *et al.*, 2006). Bei den rekombinanten Flag-Proteinen konnte aber weder eine Steigerung der Expression noch ein vermindertes Auftreten der Expression von verkürzten Fragmenten, die bei den länger-kettigen Flag-Proteinen auftraten, beobachtet werden. Die in der Zelle vorhandene Glycinkonzentration sollte demnach für die Produktion rekombinanter Seiden ausreichen.

4.2 Strukturuntersuchungen

Spinnenseidenproteine liegen in der Spinndrüse in gelöster Form vor (Craig, 1997). Ihre Konzentration kann dabei 50 % (w/v) erreichen (Hijirida, 1996). In der Flagelliform-Spinnenseide sorgen geladene Aminosäuren in den terminalen Regionen, sowie die sieben negativ geladenen Aminosäuren, die in jedem der elf Gesamtwiederholungseinheiten (Sfl) auftreten, für hydrophile Wechselwirkungen. Genau diese Beobachtungen konnten nach der Strukturuntersuchung der rekombinanten Flag-Domänen bestätigt werden. Bis auf die

carboxyterminale Region liegen alle anderen Domänen hauptsächlich unstrukturiert in Lösung vor. Durch die Interpretation der CD- und FTIR-Spektren von Sfl, Sfl₃, SflCT, Sfl₃CT und nrCT konnte der α -helikale Sekundärstrukturanteil eindeutig in der carboxyterminalen Domäne lokalisiert werden. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass diese Domäne bei der Assemblierung eine wichtige Rolle spielt. Die gleiche Schlussfolgerung kann aus einem weiteren Grund gezogen werden. Allein die Detektion der carboxyterminalen Domäne im fertig assemblierten Faden wurde bereits als Hinweis auf ihre wichtige Funktion während der Assemblierung gewertet (Sponner *et al.*, 2004).

Die Rolle der aminoterminalen Domäne bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Da sie, wie die Kerndomäne in Lösung hauptsächlich unstrukturiert vorliegt, könnte daraus zunächst geschlossen werden, dass eine ihrer putativen Funktionen die Verhinderung vorzeitiger Präzipitation des Proteins im Spinnkanal ist. Einige geladene Aminosäuren in der Sequenz dieser Domäne untermauern diese Vermutung. Mittels CD-Spektroskopie konnte die Strukturvorhersage für diese Region hingegen nicht bestätigt werden, nach der eine Helix-Turn-Helix-Konformation vorliegen sollte (Rising *et al.*, 2006). Angenommen wurde bisher zudem, dass sich in der aminoterminalen Domäne eine Signalsequenz befinden soll, die den Vesikeltransport im Rahmen der Proteinsekretion steuert (Plazola, 1991). Das Protein nrNT wurde jedoch ohne diese Sequenz konstruiert, um dieses Problem bewusst auszuklammern und nur auf den Bereich der aminoterminalen Domäne einzugehen, der im assemblierten Faden zu finden ist. Die Rolle von nrNT wird in Zusammenhang mit den verschiedenen Assemblierungsfaktoren später noch aufgegriffen.

Die repetitive mittlere Domäne zeigt ebenfalls wenig Struktur in wässriger Lösung, allerdings gibt es einen gewissen Anteil mit β -Faltblatt-Struktur. Strukturuntersuchungen mittels FTIR wurden nicht in Lösung, sondern am getrockneten Protein durchgeführt. Im Spinnkanal wird während der Assemblierung des Seidenfadens ebenfalls Wasser entzogen. Auch wenn bei einem einfachen Trocknungsprozess sicher keine Assemblierung erfolgt, konnten doch bei den Proteinen mit der längeren repetitiven Sequenz vermehrt β -Faltblatt-Struktur und unspezifische Aggregate gefunden werden. Dieser Trend setzt sich in der Reihe von Sfl über SflCT zu Sfl₃CT fort. Ein vermehrtes auftreten von β -Turn-Struktur, wie sie für die Motive (GPGGX)_n und (GPGGAGGPY)_n vorgeschlagen sind, oder 3_{10} -Helices im Motiv (GGX)_n konnten nicht bestätigt werden (Hayashi & Lewis, 2002).

Direkt nach der Produktion von Proteinen, die die carboxyterminale Domäne enthielten, wurde festgestellt, dass diese in nicht-reduzierten SDS-Gelen nur zu einem geringen Teil als

Monomer vorlagen. Alle anderen Domänen hingegen waren ausschließlich monomer. Dieses Verhalten war eindeutig auf die beiden in nrCT vorhandenen Cysteine zurückzuführen. Die Annahme, es handle sich um besonders stabile Disulfidbrücken mit entsprechend niedrigem Redoxpotential konnte durch eine Redox titration umgehend bestätigt werden. Für alle drei Proteine, Sfl₃CT, SflCT und nrCT, lag dabei das Redoxpotential bei -280 mV und somit mussten die Konstrukte bereits im Cytosol von *E. coli* oxidiert vorliegen (Gilbert, 1990), womit auch ausgeschlossen werden kann, dass sich Dimere oder Multimere erst beim Zellaufschluss unter nicht-reduzierenden Bedingungen bilden. Auch wenn das Redoxpotential von nrCT bei etwa -270 mV liegt, ist dieser Wert sehr niedrig, und es kann davon ausgegangen werden, dass die repetitiven Domänen keinen Einfluss auf die Bildung der beiden Disulfidbrücken haben. Auffällig bei der Redox titration war hingegen, dass unter den gegebenen Bedingungen – zur Einstellung und genauen Berechnung des Redoxpotentials nach der Nernstschen Gleichung war pH 7 notwendig (Hümmerich *et al.*, 2004) – das Protein nrCT nur als Monomer oder Dimer vorlag, während im Fall von SflCT und Sfl₃CT bei höheren Redoxpotentialen auch Multimere detektierbar waren. Es kann angenommen werden, dass durch die Anwesenheit der repetitiven Domäne die strukturierte Domäne nrCT eine definierte Ausrichtung annehmen kann und somit die Multimerisierung begünstigt wird. Dies kann sterische Gründe haben, da auch Sfl bereits ein Molekulargewicht von 29 kDa besitzt, oder durch elektrostatische Abstoßung begünstigt werden, da Sfl sieben ausschließlich negativ geladene Aminosäuren in der erwähnten Spacer-Sequenz beinhaltet. Bei nrCT hingegen bestehen diese Einschränkungen nicht. Daher liegt es nahe, dass nach Bildung der ersten Disulfidbrücke auch gleich die zweite in dem bereits kovalent verbundenen Dimer entsteht. Abb. 4-1 verdeutlicht diesen Sachverhalt.

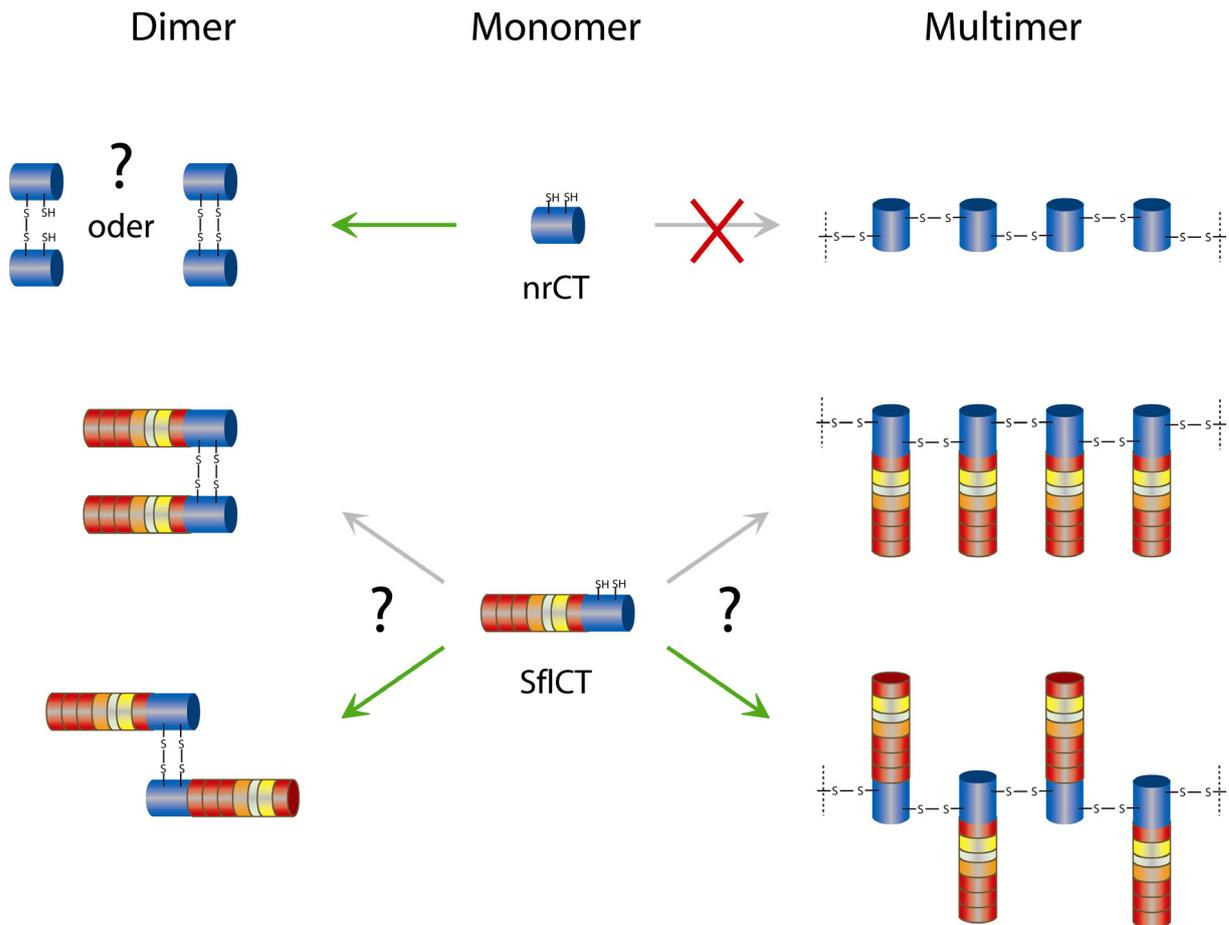


Abb. 4-1 – Schematische Darstellung der Stabilisierung der Dimere und Multimere von nrCT und SfICT. Während für das Protein nrCT in den verwendeten Puffern bei pH 8 nur das Dimer unter nicht-reduzierenden bzw. das Monomer unter reduzierenden Bedingungen detektiert werden konnten, multimerisierte SfICT unter den gleichen nicht-reduzierenden Bedingungen. Dabei stellt die Dimerisierung eine Konkurrenzreaktion zur Multimerisierung dar. Bei der Dimerisierung müssen beide Cysteine mit den beiden Cysteinen eines einzigen anderen Monomers die Disulfidbrücke bilden. Bei der Multimerisierung müssen die Cysteine jeweils mit Cysteinen verschiedener Monomere oxidiert werden. Welche der beiden Cysteine dabei miteinander reagieren ist unklar. Im Fall von SfICT ist es jedoch wahrscheinlich, dass sich aus sterischen und elektrostatischen Gründen antiparallele Dimere bzw. Multimere bilden.

Welche der beiden Cysteine jeweils miteinander eine Disulfidbrücke bilden, bleibt dabei unklar. Sind es jeweils die beiden an der selben Stelle in der Sequenz vorkommenden, so wäre anzunehmen, dass beide Disulfidbrücken auch ein voneinander verschiedenes Redoxpotential besitzen. Wird jedoch davon ausgegangen, dass sich die Sfl-Domänen möglichst entfernt voneinander anordnen wollen, ist die Disulfidbrücke zwischen beiden jeweils in unterschiedlicher chemischer Umgebung gelegenen Cysteinen wahrscheinlicher. Damit wäre das Redoxpotential für jedes Disulfid gleich. Strukturanalysen mittels NMR könnten hier

hilfreich sein. Bei den carboxyterminalen Domänen der Dragline-Seide konnte die Struktur mit dieser Technik bereits genauer untersucht werden, wodurch die genaue Lage der α -Helices bekannt wurde (Vendrely, persönliche Mitteilung). Jedoch besitzen die wenigsten carboxyterminalen Domänen von Spinnenseiden zwei Cysteine, die meisten beinhalten ein einziges Cystein, wodurch nur eine kovalente Dimerisierung möglich ist (Challis *et al.*, 2006). Teilweise wurden für diese Disulfidbrücken jedoch noch niedrigere Redoxpotentiale gefunden (Hümmerich *et al.*, 2004).

Um herauszufinden, welchen Einfluss die sehr starken Disulfidbrücken auf die Assemblierung oder Struktur von Flag haben, wurden weitere Strukturuntersuchungen durchgeführt. Dabei wurde stets zwischen reduzierendem und nicht-reduzierendem Puffermilieu unterschieden. Da TCEP keine Absorption bei spektroskopisch relevanten Wellenlängen zeigt, wurde es als Reduktionsmittel bevorzugt. Ein Einfluss auf die Sekundärstruktur durch die Anwesenheit von Disulfiden konnte nicht beobachtet werden. Für die Beobachtung der Tertiärstruktur wurde nah-UV CD gemessen, wobei ein Signal für nrCT und SflCT im Bereich zwischen 275 und 295 nm detektiert wurde. Ungewöhnlich ist jedoch, dass in beiden Proteinen keine Tryptophane vorkommen, auf denen das Signal in diesem Wellenlängenbereich normalerweise beruht. Demnach müssen die sechs Tyrosine für die Absorption und das CD-Signal verantwortlich sein. Sowohl für nrCT als auch für SflCT konnte nach Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 70 °C eine Differenz im Spektrum detektiert werden. Nach Zugabe von TCEP waren die Spektren bei 20 °C verglichen mit denen ohne TCEP identisch, auch die Spektren bei 70 °C waren von der Zugabe von TCEP nicht beeinflusst. Die Disulfide schienen demnach keinen Einfluss auf die Tertiärstruktur zu haben.

Die Bestimmung von Temperaturübergängen wurde ebenfalls mittels CD-Spektroskopie durchgeführt. Die maximalen Differenzen von bei 20 °C und 70 °C aufgenommenen Spektren lagen bei Wellenlängen von 223 nm und bei 287 nm. Thermoübergänge konnten für nrCT und SflCT bestimmt werden. Bei Sfl₃CT war der strukturierte Anteil in Lösung bereits so gering, dass ein Übergang der Entfaltung α -helikaler Struktur in der carboxyterminalen Domäne nicht eindeutig detektiert werden konnte. Für die Proteine nrCT und SflCT konnten sowohl bei 223 nm als auch bei 287 nm eine mittlere Übergangstemperatur der Entfaltung von 57 °C ermittelt werden. Dieser Übergang war in beiden Fällen bei einem Temperaturgradienten von 0,2 K/Min. nicht vollständig reversibel. Die carboxyterminale Domäne zeigt unter diesen Bedingungen nur partielle Rückfaltung. Möglicherweise existiert

neben dem globalen Minimum im Faltungstrichter des Proteins ein weiteres lokales Minimum, in dem nrCT nur partiell gefaltet vorliegt (Oliveberg & Wolynes, 2005). Langsameres Abkühlen könnte damit vollständige Rückfaltung bewirken. Der Vorgang der Faltung der nrCT-Domäne scheint demnach längere Zeit in Anspruch zu nehmen. Der Übergang war unabhängig von der Anwesenheit der repetitiven Domäne, aber auch unabhängig von der Anwesenheit von TCEP. Damit stabilisieren weder andere Teile von Flag noch die vorhandenen Disulfidbrücken die Struktur der carboxyterminalen Domäne.

Den Ergebnissen der Redoxtitration konnte entnommen werden, dass die Disulfide die Quartärstruktur stabilisieren. Ob auch weitere Interaktionen an der Entstehung von Dimeren und Multimeren beteiligt sind, wurde mittels asymmetrischer Fluss-Feldflussfraktionierung untersucht. In nicht-reduzierendem Puffer wurde SflCT sowohl unbehandelt als auch mit maskierten Thiolgruppen gemessen. Letztere Versuchsbedingungen ließen sämtliche nativen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Domänen zu, ohne dass eine kovalente Verbindung entstehen konnte. Sobald SflCT daran gehindert wurde Disulfide zu bilden, blieb das Protein monomer. Weitere Wechselwirkungen außer den Disulfidbrücken, die die Oligomerisierung stabilisieren können oder gar dafür verantwortlich sind, wurden nicht detektiert. Hinweise auf die Existenz von bestimmten hydrophoben Mustern, die beispielsweise bei der Assemblierung von *supercoils* wichtig sind (Woolfson, 2004), konnten nicht gefunden werden.

4.3 Einfluss von Phosphat und pH

Zur Assemblierung von Spinnenseidenproteinen tragen neben mechanischen Scher- und Zugkräften auch chemische Faktoren im Spinnkanal bei. Zu nennen sind hier wichtige Ionen wie Natrium, Kalium, Chlorid und Phosphat (Vollrath & Knight, 2001). In dieser Arbeit wurde besonders der Einfluss von Phosphat auf die rekombinanten Spinnenseidenproteine untersucht. Für die Experimente wurde stets Kaliumphosphat bei pH 8 in unterschiedlicher Konzentration verwendet. Im Spinnkanal ist vermutlich auch Kalium wichtig für die Assemblierung. Dort wird es gegen Natrium ausgetauscht, denn während die Konzentration von Natrium im Verlauf des Kanals sinkt, wird Kalium zugeführt (Vollrath & Knight, 2001). Im Vergleich zu Natrium ist der präzipitierende Effekt von Kalium auf die Proteine jedoch nur wenig größer. Die Einteilung von Ionen und ihrer chaotropen Wirkung auf Proteine ist dabei durch die Hofmeister Reihe gegeben (Hofmeister, 1888). Ein deutlich größerer Effekt kann demnach durch den Einfluss von Phosphat auf die rekombinanten Flag-Proteine erwartet

werden. Im Spinnkanal beträgt die Phosphatkonzentration umgerechnet aus den Gewichtsprozenten etwa 10 bis 30 mM PO_4^{3-} (Foo *et al.*, 2006).

Zunächst wurde die Aggregation rekombinanter Flag-Proteine im beschriebenen Assay untersucht. Bei einer Phosphatkonzentration von 175 mM präzipitierte Sfl zur Hälfte. Das längerkettige Protein Sfl₃ hingegen wurde, ähnlich wie SflCT, bereits zwischen 60 und 70 mM Phosphat gefällt. Hier haben also die Länge der repetitiven Domäne (Sfl_x) und die Präsenz carboxyterminalen Domäne erhebliche Auswirkungen auf den Aussalzeffekt. Das liefert einen weiteren Anhaltspunkt für die Funktion letztgenannter Domänen während der Assemblierung. Zudem zeigt die Analyse der Daten, die durch einen sigmoidalen Graphen beschrieben werden können, dass durch Anwesenheit der carboxyterminalen Domäne der Übergang an Kooperativität verliert. Diese Tatsache kann am besten durch die Ladungen in den repetitiven und nicht-repetitiven Domänen erklärt werden. Während in Sfl nur negative geladene Aminosäureseitenketten vorkommen, besitzt nrCT bei pH 8 zusätzlich positive Ladungen. Die Zugabe von negativ geladenem Phosphat zum Puffer bewirkt die Orientierung der polaren Wassermoleküle mit ihrer partiell positiv geladenen Seite zum Phosphation. Dadurch werden in erster Linie Wechselwirkungen negativ geladener Aminosäureseitenketten mit dem Wasser verhindert, während positiv geladene Seitenketten diesen Effekt noch kompensieren können.

Ein solcher Präzipitationsversuch von Sfl wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Dazu wurde Sfl aminoterminal mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. In 10 mM Kaliumphosphat verteilt sich Sfl gleichmäßig in der Lösung, während nach weiterer Phosphatzugabe bis zu einer Endkonzentration von 500 mM klare Foci definierbar waren. Das Fluorescein und damit das Protein konnte nur noch in bestimmten Bereichen der Lösung detektiert werden. Dieses Ergebnis lässt nun mehrere Schlussfolgerungen zu. Zum einen könnte es sich um eine Phasenseparation handeln, da nach dem Aussalzen die hydrophoben Wechselwirkungen im Protein verstärkt werden (Baldwin, 1996). Nach einer anderen Theorie könnte es sich um Mizellen handeln, bei denen der kurze Zwischenabschnitt mit den negativen Ladungen im Sfl nach außen zeigt, um noch die größtmögliche Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel zu erzielen. Im Experiment konnte gezeigt werden, dass solche wahrscheinlich kugelförmigen Anreicherungen von Protein aus der Lösung durch Abzentrifugieren zu entfernen waren, was für die wahrscheinlich existierenden hydrophoben Wechselwirkungen im Protein spricht. Der reversible Charakter dieser Zusammenlagerung von Sfl konnte ebenfalls gezeigt werden. Nach Dialyse gegen Puffer lag Sfl wieder

vollständig gelöst vor. Für einige Seiden konnte eine Assemblierung aus Mizellen bereits nachgewiesen werden (Jin *et al.*, 2001).

Wie groß die Wirkung von Phosphat auf die Anlagerung einzelner Sfl-Proteine in Bezug auf ihre Wechselwirkungen untereinander wirklich ist, zeigt das Experiment, in dem Sfl bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen in der AF4 analysiert wurde. Sfl blieb jedoch auch bei erhöhter Phosphatkonzentration von bis zu 100 mM noch Monomer, wenn auch mit verändertem Laufverhalten unter den gleichen Bedingungen. Diese Phosphatkonzentration hat auf die Quartärstruktur scheinbar noch keinen Einfluss, während bei der gleichen Phosphatkonzentration in der DLS ein Signal messbar war, jedoch bei deutlich höheren Proteinkonzentrationen. Bei 100 mM Phosphat und 2,5 mg/mL Sfl wurde ein hydrodynamischer Radius von 2,8 μm berechnet. Damit wurde gezeigt, dass die Bildung von kugelförmigen Phasen oder Mizellen für Sfl durch entsprechende Proteinkonzentrationen und Konzentrationen des Assemblierungsfaktors Phosphat möglich ist.

Bemerkenswerterweise ließen sich nrNT und nrCT durch die Zugabe von bis zu 500 mM Kaliumphosphat gar nicht präzipitieren. Dadurch könnte nrNT die Aufgabe haben, Flag vor der Assemblierung möglichst gut in Lösung zu halten. Auch nrCT präzipitiert nur, wenn es mit Sfl in Verbindung steht. Dennoch ist die vorrangige Aufgabe von nrCT höchstwahrscheinlich die Steuerung der Assemblierung. Der Einfluss von Phosphat auf eine Oligomerisierung von nrCT wird zur Zeit untersucht.

Die Assemblierung im Spinnkanal wird durch einen weiteren wichtigen Faktor begleitet. Der pH-Wert der Spinnlösung sinkt von 6,9 auf 6,3 (Vollrath & Knight, 2001). Diese Daten sind jedoch nur für die *major ampullate* Drüse bekannt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Spinne in jeder Drüse ganz andere Bedingungen für die Seidenassemblierung wählt. Der Aggregationsassay bei unterschiedlichen pH-Werten belegt sogar, dass der genannte pH-Bereich auch für Flag gelten muss. Proteine, die Sfl enthielten, aggregierten bei sauren pH-Werten und bleiben bei neutralen und basischen löslich. Während Sfl einen Übergangspunkt bei pH 5,5 zeigt, lag der von Sfl₃ bei pH 6,1. Beide Übergänge waren kooperativ, demnach erfolgte der Übergang von löslichem zu unlöslichem Protein in einem sehr kleinen pH-Bereich. Das Einkomponentensystem Flag reagiert in einem pH-Bereich, der im Spinnkanal relevant ist, auf die Änderung. Dabei liegt der Übergang von Sfl₃ dem physiologischen Bereich am nächsten. Auch hier zeigt sich, dass die Länge der repetitiven Domäne von entscheidender Bedeutung für den Assemblierungsvorgang ist. Eine Selbstassemblierung von Sfl konnte mittels AFM unter sauren Bedingungen (pH 2) jedoch nicht festgestellt werden.

Für einen Vergleich der repetitiven Domäne gegenüber der repetitiven mit carboxyterminaler Domäne wurden aufgrund der physiologischen Relevanz Sfl₃ und Sfl₃CT für den Assay verwendet. Für Sfl₃CT verschiebt sich der Übergang nur leicht, verliert aber auch hier an Kooperativität. Ähnlich wie bei der Bestimmung des Übergangs bei Erhöhung der Phosphatkonzentration kann hier mit der Verteilung der Ladung argumentiert werden. Während negativ geladene Aminosäuren in saurem Milieu nach und nach protoniert werden, behalten positiv geladene ihre Ladung und können weiter mit dem polaren Lösungsmittel interagieren. Hier zeigt sich wieder eine bereits vermutete Wirkung der carboxyterminalen Domäne. Diese scheint zu verhindern, dass während des Assemblierungsvorgangs das Flag-Protein zu schnell ausfällt und nicht mehr verspinnbar ist.

Ähnlich wie bei der Erhöhung der Phosphatkonzentration reagieren nrNT und nrCT alleine nicht auf die Ansäuerung und bleiben, wahrscheinlich aufgrund ihrer positiv geladenen Aminosäuren, in Lösung.

4.4 Proteinassemblate

Wie bereits für andere rekombinante Spinnenseidenproteine gezeigt werden konnte (Slota *et al.*, 2007), lassen sich aus rekombinanten Flag-Seidenproteinen Filme gießen. Sfl ist vorwiegend in polaren Lösungsmitteln löslich. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in den Ladungen, die im Spacer vorhanden sind. Die Filme aus allen Lösungsmitteln zeigten stets einen dominanten β -Faltblatt-Charakter. Sogar in der Lösung aus welcher der Film gegossen wurde, war der β -Faltblatt-Anteil deutlich erhöht. Der unstrukturierte Anteil ist hier möglicherweise für die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel verantwortlich. Dadurch wurde angenommen, dass vorwiegend die hydrophoben, Glycin-reichen Abschnitte der Primärstruktur in β -Faltblätter falten. Dagegen spricht, dass Glycin aufgrund seiner konformationellen Flexibilität Sekundärstrukturbildung aus entropischen Gründen eher verhindert (Monsellier & Chiti, 2007). Aufgrund des hohen Glycingehalts in Sfl ist es jedoch denkbar, dass um die Glycine β -Faltblätter entstehen und somit ungünstigere Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Bereichen und dem polaren Lösungsmittel verhindert werden.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit die Proteinkonzentration bei gleichem Auftragsvolumen und gleicher Fläche, auf die der Film gegossen wurde, die Schichtdicke des Films beeinflusst. Das Ergebnis zeigte eine lineare Abhängigkeit in dem Bereich, in welchem Filme mit homogener Oberfläche gegossen werden konnten. Die direkte Abhängigkeit von

der Proteinkonzentration zur Dicke des Films ist zusätzlich vom Protein abhängig, da sich die entsprechend im Film gebildeten Strukturen in ihrer räumlichen Anordnung unterscheiden.

Eine Alternative zum Gießen eines Films stellte die Kopplung der Proteine an eine entsprechend funktionalisierte Oberfläche dar. Hier konnten Schichten mit der Dicke von nur wenigen nm erzeugt werden, die dennoch homogen waren.

Die Anwendungen solcher Filme und dünnerer Schichten könnte im Bereich der Halbleitertechnik liegen. Dort sollten Experimente durchgeführt werden, in der eine sehr dünne Schicht aus Spinnenseide die Abschirmung eines Halbleiters gegenüber einer Polyelektrolytlösung herabsetzen soll, um den Widerstand im Halbleiter zu optimieren.

Jedoch sind auch andere Anwendungen für solche Beschichtungen denkbar. Spinnenseide gilt als nicht-immunogen (Ref), dies konnte zumindest ansatzweise bestätigt werden, da sich kein Sfl-spezifischer Antikörper generieren ließ. Daher sollten Anwendungen innerhalb der Kosmetik oder Medizintechnik möglich sein (Vendrely *et al.*, 2007)

4.5 Fazit

In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal rekombinante Proteine, die einzelnen Domänen der Flagelliform-Seide aus *Nephila clavipes* entsprachen, in *E. coli* produziert werden. Zuvor beschränkte sich die rekombinante Produktion nur auf bestimmte einzelne Peptide (Zhou *et al.*, 2001). Alternativ wurde die Produktion von größeren Bereichen der authentischen Flag-Sequenz in Insektenzellen etabliert (Miao *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte zudem eine Gensequenz vorbereitet werden, die die Produktion eines Proteins mit allen Domänen von Flag in Insektenzellen ermöglicht.

Mit den einzelnen rekombinanten Proteinen aus *E. coli*, die sowohl die nicht-repetitiven als auch die repetitiven Domänen aus Flag repräsentieren, konnten sowohl die Struktur als auch die Funktion dieser Domänen in Flag näher untersucht werden. Dadurch konnten grundlegende Erkenntnisse über den Assemblierungsmechanismus des Einkomponentensystems Flag gewonnen werden.

Die erfolgreiche Beschichtung von Oberflächen mit den rekombinanten Proteinen zeigt außerdem, dass potentielle technische Anwendungen für die Proteine vorhanden sind.

5 Zusammenfassung

Flagelliform-Seide bildet im Spinnennetz die besonders elastische Fangspirale und besteht aus einer einzigen Proteinkomponente (Flag). Flag besitzt ein Molekulargewicht von etwa 360 kDa und ist aus einer sehr langen repetitiven Domäne aufgebaut, die aus elf Wiederholungseinheiten besteht, die von kurzen nicht-repetitiven terminalen Domänen flankiert wird. Über den Assemblierungsmechanismus ist bisher nur wenig bekannt. Im Spinnkanal wird dieser durch mechanische Scher- und Zugkräfte und chaotrope Ionen unterstützt.

In dieser Arbeit wurden einzelne Domänen von Flag aus *Nephila clavipes* in Bakterien rekombinant produziert, um ihre Aufgabe und Funktion im Protein zu entschlüsseln. Für die Expression in *E. coli* mussten die bekannten Gensequenzen mit einem Klonierungssystem angepasst werden.

Strukturuntersuchungen ergaben, dass nur die carboxyterminale Domäne (nrCT) eigenständig faltet, während alle anderen Domänen in Lösung hauptsächlich unstrukturiert vorliegen. Die nrCT-Domäne beinhaltet außerdem die beiden einzigen Cysteine in Flag, die extrem stabile Disulfidbrücken mit entsprechend niedrigem Redoxpotential erzeugen. Diese kovalenten Bindungen sind essentiell für die Assemblierung, indem sie die Entstehung der oligomeren Quartärstruktur ermöglichen. Ein direkter Einfluss auf die Stabilität des Proteins oder die Faltung der nrCT-Domäne konnte nicht nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Funktion einzelner Domänen während der Assemblierung von Flag. In dieser Phase stellen vor allem die Änderung der Phosphatkonzentration und des pH-Werts wichtige Faktoren dar. Bei erhöhter Phosphatkonzentration oder in saurem Milieu aggregiert die repetitive Domäne (Sfl). Dieses Verhalten ist von der Länge dieser Domäne abhängig. Das dreimal längere Sfl₃ reagiert viel sensitiver auf die Faktoren. Die Kombination der repetitiven mit der nicht-repetitiven Domäne scheint die Aggregation zwar nicht zu verhindern, jedoch abzuschwächen. Die nicht-repetitiven terminalen Domänen alleine hingegen bleiben auch unter extremeren Bedingungen löslich. Aus den unterschiedlichen Messungen wurde geschlossen, dass die terminalen Domänen die Fadenassemblierung im Spinnkanal exakt steuern können und sowohl für die nötige Löslichkeit als auch für die Ausrichtung und rechtzeitige Anlagerung der repetitiven Domänen sorgen. Die Aufgabe der repetitiven Domäne liegt vor allem darin die Struktur im fertig assemblierten Faden zu stabilisieren.

In dieser Arbeit wurden erstmalig Konstrukte rekombinant in Bakterien produziert, die ganzen Domänen der authentischen Sequenz des Flag-Proteins entsprechen. Diese Domänen konnten einzeln sowie in Kombination untersucht werden, um detaillierte Aussagen über ihre Funktion innerhalb von Flag treffen zu können. Damit stellt diese Arbeit eine wichtige Grundlage für das Verständnis der natürlichen Assemblierung der Flagelliform-Seide dar.

6 Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1995) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition. VHC, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- Allmeling, C., Jokuszies, A., Reimers, K., Kall, S. & Vogt, P. M. (2006) Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. *J. Cell. Mol. Med.* **10** (3): 770-777.
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. H. & März, L. (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* **16**: 109-123.
- Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J. & Moran, F. (1993) Evaluation of Secondary Structure of Proteins from UV Circular-Dichroism Spectra Using An Unsupervised Learning Neural-Network. *Protein Engineering* **6**: 383-390.
- Baldwin, R. L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J.* **71** (4): 2056-2063.
- Baldwin, R. L. (2005) Early Days of Studying the Mechanism of Protein Folding. In: *Protein Folding Handbook*. Wiley VCH, Weinheim.
- Becker, N., Oroudjev, E., Mutz, S., Cleveland, J. P., Hansma, P. K., Hayashi C. Y., Makarov, D. E., Hansma, H. G. (2003) Molecular nanosprings in spider capture-silk threads. *Nat. Mater.* **2** (4): 278-283.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T. & Brunak, S. (2005) Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* **6**: 167-175.
- Benesch, J. L. P., Ruotolo, B.T., Simmons, D.A. & Robinson, C. V. (2007) Protein Complexes in the Gas Phase: Technology for Structural Genomics and Proteomics. *Chem. Rev.* **107** (8): 3544-3567.
- *Blattner, F. R., Plunkett, G., III, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-ides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**: 1453-1474.
- Brahms, S. & Brahms, J. (1980) Determination of Protein Secondary Structure in Solution by Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism. *J. Mol. Biol.*, **138** (2): 149-178.
- Bras, M., Queenan, B. & Susin, S. A. (2004) Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. *Biochemistry (Moscow)* **70** (2): 231-239.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry*. Freeman & Co, San Francisco.
- Challis, R. J., Goodacre, S. L. & Hewitt, G. M. (2006) Evolution of spider silks: conservation and diversification of the C-terminus. *Insect Molecular Biology*, **15** (1): 45-56.

- Chen, X., Knight, D. P. & Vollrath, F. (2002) Rheological characterization of nephila spidroin solution. *Biomacromolecules* **3**: 644-648.
- Chothia, C., Levitt, M. & Richardson, D. (1981) Helix to helix packing in proteins. *J. Mol. Biol.* **145** (1): 215-250.
- Chow, D. C., Dreher, M. R., Trabbic-Carlson, K. & Chilkoti A. (2006) Ultra-High Expression of a Thermally Responsive Recombinant Fusion Protein in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.*, **22**: 638-646.
- Clark, J. L. & Steiner, D. F. (1969) Insulin biosynthesis in the rat: demonstration of two proinsulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **62** (1):278-285.
- Cleland, W.W. (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochem.* **3**: 480-482.
- Colfen, H. & Antonietti, M. (2000) Field-flow fractionation techniques for polymer and colloid analysis. *New Developments in Polymer Analytics I* **150**: 67-187.
- Colgin, M. & Lewis, R.V. (1998) Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like "spacer regions". *Protein Sci.* **7**: 667-672.
- Cowin, S. C. (1999) Structural Change in Living Tissues. *Meccanica* **34**: 379-398.
- Craig, C. L. (1997) Evolution of arthropod silks. *Annu. Rev. Entomol.* **42**: 231-267.
- Creighton, T. E. (1993) Proteins: Structures and Molecular Properties, 2nd edition. *W. H. Freeman and Company, New York*.
- Crick, F. H. (1952) Is alpha-keratin a coiled coil? *Nature* **170** (4334): 882-883.
- Denny, M. (1976) Physical-Properties of Spiders Silk and Their Role in Design of Orb-Webs. *Journal of Experimental Biology* **65**: 483-506.
- DeRider, M. L., Wilkens, S. J., Waddell, M. J., Bretscher, L. E., Weinhold, F., Raines, R. T. & Markley, J. L. (2002) Collagen stability: insights from NMR spectroscopic and hybrid density functional computational investigations of the effect of electronegative substituents on prolyl ring conformations. *J. Am. Chem. Soc.* **124** (11): 2497-2505.
- Dicko, C., Kenney, J. M., Knight, D. P. & Vollrath, F. (2004) Transition to a β -Sheet-Rich Structure in Spidroin in Vitro: The Effects of pH and Cations. *Biochemistry*, **43**: 14080-14087.
- Edmonds, D. & Vollrath, F. (1992) The contribution of atmospheric water vapour to the formation and efficiency of a spiders's web. *Proc. R. Soc. Lond.*, **248**: 145-148.
- Exler, J. H., Hümmerich, D. & Scheibel, T. (2007) The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Ang. Chem. Int. Ed.* **119**: 3629-3632.

- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-2617.
- Fischer, E. (1907) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **53**: 126.
- Fleischmajer, R., Olsen, B.R., Timpl, R., Perlish, J.S. & Lovelace, O. (1983) Collagen fibril formation during embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **80**: 3354-3358.
- Floquet, N., Héry-Huynh, S., Dauchez, M., Derreumaux, P., Tamburro, A. M. & Alix, A. J. (2004) Structural characterization of VGVAPG, an elastin-derived peptide. *Biopolymers* **76** (3): 266-280.
- Foo, C. W. P., Bini, E., Hensman, J., Knight, D. P., Lewis, R. V. & Kaplan, D. L. (2006) Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders. *Appl. Phys. A* **82**: 223-233.
- Fraser, R. D. B. & MacRae, T. P. (1973) In: Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides. *Academic Press, New York, London*.
- Fuchs, E. & Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 345-82.
- Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. & Lewis, R. (2001) Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science* **291** (5513): 2603-2605.
- Gauld, S. B., Dal Porto, J. M. & Cambier, J. C. (2002) B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles in Cell Development and Disease. *Science* **296**: 1641-1642.
- Gilbert, H. F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Elat. Areas. Mol. Biol.* **63**: 69-172.
- Gosline, J. M., Denny, M. W. & DeMont, M. E. (1984) Spider Silk as rubber. *Nature* **309**: 551-552.
- Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S. & Savage, K. M. (1999) The Mechanical Design of Spider Silks: From Fibroin Sequence to Mechanical Function. *J. Exp. Biol.*, **202**: 3295-3303.
- Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia Coli*. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 465-506.
- Guerdoux-Jamet, P., Hénaut, A., Nitschké, P., Risler, J. L. & Danchin, A. (1997) Using codon usage to predict genes origin: is the *Escherichia coli* outer membrane a patchwork of products from different genomes? *DNA Res.* **4** (4): 257-265.
- Gurd, F.R. (1972) Carboxymethylierung von Proteinen. *Methods Enzymol.* **25**, 424-438.

- Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. (1998) Evidence from Flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *J. Mol. Biol.*, **275**: 773-784.
- Hayashi, C. Y., Shipley, N. H. & Lewis, R. V. (1999) Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**: 271-275.
- Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. (2000) Molecular Architecture and Evolution of a Modular Spider Silk Protein Gene. *Science*, **287**: 1477-1479.
- Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. (2001) Spider Flagelliform silk: lessons in protein design, gene structure, and molecular evolution. *BioEssays*, **23**: 750-756.
- Hayashi, C. Y. (2002) Evolution of spider silk proteins: insight from phylogenetic analyses. *EXS*. (92): 209-223.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32.
- Hijirida, D. H., Do, K. G., Michal, C., Wong, S., Zax, D. & Jelinski, L. W. (1996) ¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophys. J.*, **71**: 3442-3447.
- Hinek, A. & Rabinovitch, M. (1994) 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J. Cell. Biol.* **126** (2): 563-574.
- Hofmeister, F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. (Leipzig)* **24**: 247.
- Hronska, M., van Beek, J. D., Williamson, P. T., Vollrath, F. & Meier, B. H. (2004) NMR characterization of native liquid spider dragline silk from *Nephila edulis*. *Biomacromolecules*. **5**: 834-839.
- Huemmerich, D., Helsen, C. W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R. & Scheibel, T. (2004a) Primary Structure Elements of Spider Dragline Silks and Their Contribution to Protein Solubility. *Biochemistry* **43**: 13604- 13612.
- Huemmerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U., Ittah, S. (2004b) Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Current Biology* **14**: 2070-2074.
- Huemmerich, D., Slotta, U. & Scheibel, T. (2006) Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Appl. Phys. A*, **82**: 219-222.
- Hutchinson, E. & Thornton, J. (1994). A revised set of potentials for β -turn formation in proteins. *Protein Science*, **3**: 2207-2216.
- Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Sheppard, P., Anderson, N., Rosenbloom, J. C., Peltonen, L. & Rosenbloom, J. (1987) Alternative Splicing of Human Elastin mRNA

- Indicated by Sequence Analysis of Cloned Genomic and Complementary DNA. *PNAS* **84** (16): 5680-5684.
- Jaenicke, R. (2005) Paradigm Changes from „Unboiling an Egg“ to „Synthesizing a Rabbit“. In: Protein Folding Handbook. *Wiley VCH*, Weinheim.
- Jin, H.-J. & Kaplan, D. L. (2003) Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, **424**: 1057-1061.
- Kaplan, D., Adams, W. W., Farmer, B. & Viney, C. (1993) In: Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology. *American Chemical Society, Washington D. C.*
- Keeley, F. W., Bellingham, C. M. & Woodhouse, K. A. (2002) Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **357** (1418): 185-189.
- Kelly, S. M. & Price, N. C. (2000) The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein and Peptide Science*, **1** : 349-384.
- Kenney, J. M., Knight, D., Wise, M. J. & Vollrath, F. (2002) Amyloidogenic nature of spider silk. *Eur. J. Biochem.* **269**: 4159-4163.
- Kerkam, K., Viney, C., Kaplan, D. & Lombardi, S. (1991) Liquid crystallinity of natural silk secretions. *Nature* **349**: 596-598.
- Kim, W., McMillan, R. A., Snyder, J. P. & Conticello, V. P. (2005) A stereoelectronic effect on turn formation due to proline substitution in elastin-mimetic polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **127** (51): 18121-18132.
- Knight, D. P. & Vollrath, F. (1999) Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proc. R. Soc. Lond.*, **266**: 519-523.
- Knight, D. P. & Vollrath, F. (2001) Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Naturwissenschaften* **88**: 179-82.
- Knight, D. P., Knight, M. M. & Vollrath, F. (2000) Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *Int. J. Biol. Macromol.* **27**: 205-210.
- Krämer, R. (1998) Mitochondrial carrier proteins can reversibly change their transport mode: the cases of the aspartate/glutamate and the phosphate carrier. *Experimental Physiology* **83**: 259-265.
- Kroll, D. J., Abdel-Malek Abdel-Hafiz, H., Marcell, T., Simpson, S., Chen, C. Y., Gutierrez-Hartmann, A., Lustbader, J. W. & Hoeffler, J. P. (1993) A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection. *DNA Cell Biol.* **12**: 441-453.
- Krimm, S. & Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* **38**: 181-364.

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259): 680- 685.
- Lavigne, P., Sonnichsen, F. D., Kay, C. M. & Hodges, R. S. (1996) Interhelical salt bridges, coiled-coil stability, and specificity of dimerisation. *Science* **271**, 1136-1137.
- Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J. F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E. A., Soares, J. W. & Karatzas, C. N. (2002) Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* **295**: 472-476.
- Li, G., Zhou, P., Shao, Z., Xie, X., Chen, X., Wang, H., Chunyu, L. & Yu, T. (2001) The natural silk spinning process. A nucleation-dependent aggregation mechanism? *Eur. J. Biochem.* **268** (24): 6600-6606.
- Lin, G. Y., Zhong, J. & Wang, X. Z. (2000) Abnormal formation of polyhedra resulting from a single mutation in the polyhedrin gene of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J. Invertebr. Pathol.* **76** (1): 13-19.
- Lee, H., Lee, B.P. & Messersmith, P. B. (2007) A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature* **448** (7151): 338-341.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998) Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg/Berlin.
- Lumb, K. J. & Kim, P. S. (1995) A buried polar interaction imparts structural uniqueness in a designed heterodimeric coiled coil. *Biochemistry* **34** (27): 8642-8648.
- MacPhee, C. E. & Woolfson, D. N. (2004) Engineered and designed peptide-based fibrous biomaterials *Curr. Opin. in Solid State and Mat. Sci.* **8**: 141-149.
- Madsen, B., Shao, Z. Z. & Vollrath, F. (1999) Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**: 301-306.
- Mecham, R. P. & Davis, E. (1994) Elastic fiber structure and assembly. *Extracellular Matrix Assembly and Structure* (editors Yurchenco, P. D., Birk, D. E. & Mecham, R. P.). *Academic Press, New York*: 281-314.
- Medigue, C., Rouxel, T., Vigier, P., Henaut, A. & Danchin, A. (1991) Evidence for horizontal gene transfer in *Escherichia coli* speciation. *J. Mol. Biol.* **222**: 851-856.
- Miao, Y., Zhang, Y., Nakagaki, K., Zhao, T., Zhao, A., Meng, Y., Nakagaki, M., Park, E. Y., Maenaka, K. (2006) Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71** (2): 192-199.
- Monsellier, E. & Chiti, F. (2007) Prevention of amyloid-like aggregation as driving force of protein evolution. *EMBO reports* **8** (8): 737-742.

- Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C.Y. & Lewis, R.V. (2005) Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules* **6**: 3152-3159.
- Ohgo, K., Kawase, T., Ashida, J. & Asakura, T. (2006) Solid-State NMR Analysis of a Peptide (Gyl-Pro-Gly-Gly-Ala)₆-Gly Derived from a Flagelliform Silk Sequence of *Nephila clavipes*. *Biomacromolecules*, **7**: 1210-1214.
- Oliveberg, M. & Wolynes, P. G. (2005) The experimental survey of protein-folding energy landscapes. *Q. Rev. Biophys.* **38** (3): 245-288.
- Padgett, K. A. & Sorge, J. A. (1996) Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene* **168**: 31-35.
- Phadtare, S., Alsina, J. & Inouye, M. (1999) Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**: 175-180.
- Plazaola, A. & Candelas, G. C. (1991) Stimulation of fibroin synthesis elicits ultrastructural modifications in spider silk secretory cells. *Tissue Cell* **23** (2): 277-284.
- Rammensee, S., Scheibel, T. & Bausch, A. R. (2007) Mechanism of spider silk assembly. *Nature mat., eingereicht*.
- Reiersen, H., Clarke, A. R. & Rees, A. R. (1998) Short elastin-like peptides exhibit the same temperature-induced structural transitions as elastin polymers: implications for protein engineering. *J. Mol. Biol.* **283** (1): 255-264.
- Ross, R., Fialkow, R. J. & Altman, L. K. (1977) The morphogenesis of elastic fibers. *Adv. Exp. Med. Biol.* **79**: 7-17.
- Rudall, K. M. (1962) In "Comparative Biochemistry" (M. Florkin & H. S. Mason, eds.), Vol. 4, p. 397. *Academic Press, New York*.
- Rudall, K. M. & Kenchington, W. (1971) Arthropod Silks: The Problem of Fibrous Proteins in Animal Tissues. *Annu. Rev. Entomol.* **16**, 73.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. (1997) Protein Function, A Practical Approach (editor: Creighton, T.E.), *IRL Press, New York*.
- Sandberg, L. B., Leslie, J. G., Leach, C. T., Alvarez, V. L., Torres, A. R. & Smith, D. W. (1985) Elastin covalent structure as determined by solid phase amino acid sequencing. *Pathol. Biol. (Paris)* **33** (4). 266-274.
- Sambrook, J., Fritsch, E. E. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY*.
- Scheibel, T. (2004). Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbial Cell Factories* **3**: 14.

- Scheibel, T. (2005). Protein fibers as performance proteins: new technologies and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**: 427-433.
- Schmid, F. X. (1997) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: Protein Structure: a Practical Approach, Ed: Creighton, T. E., IRL Press, Oxford.
- Schmidt, M., Römer, L., Strehle, M. & Scheibel, T. (2007) Conquering isoleucine auxotrophy of *Escherichia coli* BLR(DE3) to recombinantly produce spider silk proteins in minimal media. *Biotechnol. Lett.* DOI10.1007/s10529-007-9461-z.
- Silver, F. H. & Christiansen, D. L. (1999) Biomaterials Science and Biocompatibility, Springer, New York.
- Slotta, U., Tammer, M., Kremer, F., Koelsch, P. & Scheibel, T. (2006) Structural Analysis of Spider Silk Films. *Supramolecular Chemistry*, **18** (5): 465-471.
- Slotta, U., Hess, S., Spieß, K., Stromer, T., Serpell, L. & Scheibel, T. (2007) Spider Silk and Amyloid Fibrils: A Structural Comparison. *Macromol. Biosci.* **7**: 183-188.
- Sponner, A., Unger, E., Grosse, F. & Weisshart, K. (2004) Conserved C-termini of Spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread. *Biomacromolecules* **5**: 840-845.
- Sponner, A., Schlott, B., Vollrath, F., Unger, E., Grosse, F. & Weisshart, K. (2005) Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk. *Biochemistry*, **4**: 4727 – 4736.
- Steinmetz, M. O., Jelesarov, I., Matousek, W. M., Honnappa, S., Jahnke, W., Missimer, J. H., Frank, S., Alexandrescu, A. T. & Kammerer, R. A. (2007) Molecular basis of coiled-coil formation. *PNAS* **104**: 7062-7067.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H. & Aebi, U. (2003) Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* **25** (3): 243-251.
- Tamm, L. K. & Tatulian, S. A. (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.*, **4**: 365-429.
- Tillinghast, E. K., Chase, S. F. & Townley, M. A. (1984) Water extraction by the major ampullate duct during silk formation in the spider, *Argiope aurantia* Lucas. *J. Insect Physiol.* **30**: 591-596.
- Tillinghast, E. K., Huxtable, R. J., Watson, W. H. & Townley, M. A. (1987) Evidence of the presence of gabamide on the web of orb web weaving spiders. *Comp. Biochem. Physiol. B* **88** (2): 457-460.
- Tillinghast, E. K., Townley, M. A., Bernstein, D. T. & Gallagher, K. S. (1991) Comparative study of orb web hygroscopicity and adhesive spiral composition in three araneid spiders. *J. Exp. Zool.*, **259**: 154-165.

- Trelstad, R. L. & Hayashi, K. (1979) Tendon collagen fibrillogenesis: intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. *Dev. Biol.* **71** (2): 228-242.
- Trötschel, C., Deutenberg, D., Bathe, B., Burkovski, A. & Krämer, R. (2005) Characterisation of Methionine Export in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **187**: 3768-3794.
- Urry, D. W. (1993) Molecular machines: how motion and other functions of living organisms can result from reversible chemical changes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**: 819-841.
- Urry, D. W., Hugel, T., Seitz, M., Gaub, H. E., Sheiba, L., Dea, J., Xu, J. & Parker, T. (2002) Elastin: a representative ideal protein elastomer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357** (1418): 169-184.
- van Hee, P., Middelberg, A. P. J., van der Lans, R. G. J. M. & van der Wielen, L. A. M. (2004) Relation Between Cell Disruption Conditions, Cell Debris Particle Size, and Inclusion Body Release. *Biotechnology and Bioengineering*, **88** (1): 100-110.
- Vendrey, C. & Scheibel, T. (2007) Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromol. Biosci.* **7**: 401-409.
- Vendrey, C., Ackerschott, C., Römer, L. und Scheibel, T. (2007) Modular design of recombinant repetitive proteins: Flagelliform spider silk as basis for biomaterials, *Protocols in Nanostructural Design*, submitted.
- Vollrath, F. & Edmonds D. (1989) Modulation of the mechanical properties of spider silk by coating with water. *Nature*, **340**: 305-307.
- Vollrath, F., Fairbrother, W. J., Williams, R. J. P., Tillinghast, E. K., Bernstein, D. T., Gallagher, K. S. & Townley, M. A. (1990) Compounds in the droplets of the orb spider's viscid spiral. *Nature* **345**: 526-528.
- Vollrath, F. & Tillinghast, E. K. (1991) Glycoprotein glue inside a spider web's aqueous coat. *Naturwissenschaften*, **78**: 557-559.
- Vollrath, F. & Knight, D. P. (2001b) Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, **410**: 541-548.
- Vollrath, F. (2000) Strength and structure of spider's silks. *Reviews in Molecular Biotechnology*, **74**: 67-83.
- Vollrath, F., Barth, P., Basedow, A., Engstrom, W. & List, H. (2002) Local tolerance to spider silks and protein polymers *in vivo*. *In Vivo*, **16** (4): 229-234.
- Vollrath, F., Knight, D. P. & Hu, X. W. (1998) Silk production in a spider involves acid bath treatment. *Proc. R. Soc. Lond.*, **265**: 817-820.
- Vollrath, F. (2006) Spider Silk: Thousands of Nano-Filaments and Dollops of Sticky Glue. *Curr. Biol.* **16** (21): R925-927.

- Vrhovski, B. & Weiss, A. S. (1998) Biochemistry of tropoelastin. *Eur. J. Biochem.* **258** (1): 1-18.
- Waite, J. H., Qin, X. X. & Coyne, K. J. (1998) The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biol.* **17** (2): 93-106.
- Warwicker, J. O. (1960) Comparative studies of fibroins. II. The crystal structures of various fibroins. *J. Mol. Biol.* **2**: 350-362.
- Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D. & Palmer, E. (2003) Signaling Life and Death in the Thymus: Timing Is Everything. *Science* **299**: 1859-1863.
- Wicker-Planquart, C., Canaan, S., Rivière, M., Dupuis, L. & Verger, R. (1996) Expression in insect cells and purification of a catalytically active recombinant human gastric lipase. *Protein Eng.* **9** (12): 1225-1232.
- Williams, D. (2003) Sow's Ears, Silk Purses and Goats' Milk: New Production Methods and Medical Applications for Silk. *Medical device Technology* June 2003; 9-11.
- Woolfson, D. N. (2005) The design of coiled-coil Structures and Assemblies. *Adv. In Prot. Chem.* **70**: 79-112.
- Woolfson, D. N. & Ryadnov, M. G. (2006) Peptide-based fibrous biomaterials: some things old, new and borrowed. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**: 559-567.
- Yamagishi, J., Isobe, R., Takebuchi, T. & Bando, H. (2003) DNA microarrays of baculovirus genomes: differential expression of viral genes in two susceptible insect cell lines. *Arch. Virol.* **148**: 587-597.
- Zhou, Y., Wu, S., & Conticello, V.P. (2001) Genetically Directed Synthesis and Spectroscopic Analysis of a Protein Polymer Derived from a Flagelliform Silk Sequence. *Biomacromolecules*, **2**: 111-125.
- Zhou, H. & Zhang, Y. (2005) Hierarchical chain model of spider capture silk elasticity. *Phys. Rev. Lett.* **94** (2): 028104.
- Zschokke, S. (2003). Spider-web silk from the Early Cretaceous. *Nature* **424**: 636-637.
- Zimm, B. H. (1948) Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering - Preliminary Results on Polystyrene Solutions. *Journal of Chemical Physics* **16**: 1099-1116.

7 Abkürzungen

A	Ampère
ADF	<i>Araneus diadematus</i> Fibroin
AF4	Asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung
AFM	<i>Atomic force microscopy</i> (Rasterkraftmikroskopie)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
A.U.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
ca.	circa
CD	Circulardichroismus
d	Tag, lat: <i>dies</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl: <i>desoxyribonucleic acid</i>
ϵ	Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
E	Elastizitätsmodul
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
etc	und so weiter, lat: <i>et cetera</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flag	Flagelliform
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FTIR	fourier-transformiertes Infrarot
g	Gramm
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung ($9,81 \text{ m s}^{-2}$)
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
GPa	Giga-Pascal
h	Stunde, lat: <i>hora</i>
H ₂ O _{dd}	Quarzbidestilliertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
J	Joule
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
λ	Wellenlänge
lat.	lateinisch
LMW	<i>low molecular weight</i> (Molekulargewichtsstandard)
ln	Natürlicher Logarithmus
m	Meter
M	Molar
MaSp	<i>Major Ampullate</i> Spidroin
mg	Milligramm
Min.	Minuten
mL	Milliliter

mM	Millimolar
μM	Mikromolar
MW	relative Molekülmasse
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> , Ausschlussgröße
N	Newton
nm	Nanometer
NR	nicht repetitiv
nrCT	nicht-repetitive carboxyterminale Domäne
nrNT	nicht-repetitive aminoternale Domäne
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysis</i>
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDITC	Phenylendiisothiocyanat
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
Phe	Phenylalanin
pI	isoelektrischer Punkt
pm	Pikometer
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RI	<i>Refractive Index</i> (Brechungsindex)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sfl	Gesamtwiederholungseinheit in der Flag-Sequenz (synthetisches Flag)
T	Temperatur
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VIS	visuell
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
www	<i>world wide web</i>

8 Publikationen

Vendrely, C.* , **Ackerschott, C.***, Römer, L. & Scheibel, T. (2008) Molecular Design of Performance Proteins with Repetitive Sequences: Recombinant Flagelliform Spider Silk as Basis for Biomaterials. In: *Methods in Molecular Biology* **474**, Chapter 1.

(* = gleichberechtigte Co-Autoren)

Ackerschott, C., Heim, M. & Scheibel, T. (2008) Domain Structure and Stability of Spider Flagelliform Silk. *JBC*, *eingereicht*.

Geisler, M., Pirzer, T., **Ackerschott, C.**, Lud, S., Garrido, J., Scheibel, T. & Hugel, T. (2008) Hydrophobic and Hofmeister effects on the Adhesion of Spider Silk Proteins onto Solid Substrates: An AFM-Based Single-Molecule Study. *Langmuir* **24** (4): 1350-1355.

9 Anhang

Nukleotidsequenz 5'FLAG

```

1  cgcttgcttt  acctcggcag  tgatatttct  tttcttagcg  cagtgtgcgt  cgacgtacgg
61  aagggggatt  atagccaact  cccctttctc  aaaccctaac  acagcggaaa  gcttttgcac
121  gatctttcgt  gagcaatatt  gtttctagtg  gagaatttgg  agcccaagga  gccgaagact
181  tcgatgacat  aattcagagt  ctacatacagg  cccagagcat  gggcaaaggg  cggcatgata
241  cgaaggccaa  ggcgaaagcg  atgcaggtag  cccttgcttc  ttctatagcc  gaattggtta
301  ttgcagaaag cagcggaggc gatgtgcaac  gcaaaaccaa  cgttatctcc  aacgctttga
361  gaaacgcctt  gatgtctaca  acaggcagcc  caaacgaaga  gttcgtccat  gaagttcaag
421  acctcatcca  gatgttatct  caagaacaga  tcaacgaggt  agatacttca  ggaccagggc
481  agtactacag  gtcgtcttct  tccggtggag  gaggtggagg  acaaggaggt  cctgtagtta
541  ctgaaacact  gaccgttaca  gttggcggat  ccggtggagg  gcaaccttca  ggtgcaggtc
601  ctagtggtag  aggtggatat  gcaccaactg  gatacgcgcc  aagcggctca  ggtgcaggtg
661  gcgttcgacc  tagtgcctcc  ggtccaagtg  gtagtggacc  tagtggtgga  tctcgtccta
721  gtagtagtgg  acctagtgga  actcgtccca  gccctaattg  tgcaagtgga  tctagccctg
781  gtggtatcgc  acctggtgga  tccaattctg  gtggtgctgg  agtatccggc  gcaactggag
841  gacctgcac  cagcggctcc  tacggaccag  gaagtacagg  tggaacatat  ggacctagtg
901  gaggaagtga  acctttcgga  ccaggagtgg  ctggaggacc atacagccca ggtggagctg
961  gacctggtgg  tgcaggtgga  gcctatggac  caggaggtgt  aggaactggt  ggagccggac
1021  caggaggtta  cggacctggt  ggagccggac  caggaggtta  tggacctggt  ggagccggac
1081  caggaggtta  cggacctggt  ggagctggac  caggaggtta  cggacctggt  ggagctgggc
1141  ctggaggtta  cggacctggt  ggagctggac  ctggaggtta  cggacctggt  ggagctggac
1201  ctggaggtta  cggacctggt  ggaactggac  ctggtggata  cggacctggt  ggaactggac
1261  ctggaggagt  tggacctgga  ggagctggac  caggaggata  tggacctggt  ggtgctggac
1321  ctggtggtgc  tggacctggt  ggtgctggac  ctggtggtgc  tggacctggt  ggtgctggac
1381  ctggtggtgc  tggacctggt  ggatacggcc  ctggtggatc  tggacctggt  ggtgctggac
1441  ctagtggtag  cggacttggg  ggtgctggac  ctggaggtag  gggacttggg  ggagcaggac
1501  ctggaggagc  aggaaccagt  ggtgccggac  ccggtggagc  aggaccggg  ggagcaggac
1561  aaggtgatgc  tggaccgggt  ggtgcaggac  gtggaggagc  aggtcgtggt  ggtgtaggtc
1621  gtggtggtgc  aggtcgtgga  ggtgcaggac  gtggtggagc  tagaggtgct  ttggagcag
1681  gaggtgctgg  tggagcagga  ggtaccggcg  gcacaacaat  cgtagaggat  ttggatatta
1741  caattgatgg  tgcagatggc  ccgataacaa  tatcagaaga  attaacaatc  ggtggagcag
1801  gcgctggagg  ttccggacc  ggtggtgctg  gaccaggaaa  cgttggacct  ggtcgtctctg
1861  gaccaggagg  agtaggacct  ggtggctctg  gaccaggagg  cgtaggacct  ggtagctttg
1921  gaccaggagg  cgtaggacct  ggtggctccg  gaccaggagg  cgtaggatct  ggtggctccg
1981  gacaaggagg  agtaagacct  agtggctccg  gaccaggtag  cgtaggaact  ggaggcgtag
2041  gaccgggtgg  tgctggagga  ccttacggtc  ctggtggttc  cggaccggga  ggtgcaggaa
2101  gcgctggagg  aacttatgga  cctggtggtt  tccgaggacc  cgggtggttc  ggaggaccgg
2161  gtggtgctgg  tggaccctac  ggtccagggt  gtgctggtgg  acctacgga  ccagggtggtg
2221  ctggtggacc  ctacggacca  ggtggtgctg  gtggacccta  cgggcccggg  ggtgctggtg
2281  gaccctacgg  gccgggaggt  gctggtggat  cctacgggct  ggggtggtgct  ggtggatcag
2341  gaggtgtagg  acctggtgga  agtggacctg  gaggttatgg  acccgggtgga  gccggacctg
2401  gaggttacgg  acccgggtgg  tctggtccag  gtggatacgg  acctggcggg  tctggatctg
2461  gtggatacgg  acctggaggt  tctggacctg  gtggttctgg  acctggtgga  tacggacctg
2521  gtggtactgg  acctggtggt  tctgaatctg  gtggatacgg  acctggtgga  tctggacctg
2581  gcggttctgg  acctggtgga  tctggacctg  gcggttctgg  acctggtgga  tacggacctg
2641  gtggttctgg  acctagcagt  tttgtacctg  gcggttctgg  acctggtgga  tctggacctg
2701  gtggcgtgg  acccgggtgg  gctggaccgg  gtggtggtgg  acttggaggt  gctggacgtg
2761  gtggagctgg  acgtggtgga  gctggaagtg  ttggagctgg  acgtggtgga  gctggacgtg
2821  gtggaactgg

```

Abb. 9-1 – publizierte Nukleotidsequenz von 5'FLAG (Genbank Eintrag: AF027972; Hayashi & Lewis, 1998). Markiert sind: Mutationen der in dieser Arbeit vorliegenden Sequenz (rot hinterlegt), das Startkodon von Flag (rot) sowie die Bindestellen der Primer FLAG-N-chr-sense und FLAG-N-chr-anti (gelb hinterlegt).

Nukleotidsequenz 3'FLAG

```

1 ggaccaggag gtgtaggacc tgggtggaagt ggacctggag gttatggacc cgggtggagct
61 ggacctggag gttacggacc tgggtggttct ggtccagggtg gatacggacc cgggtggttcg
121 ggaccaggag gatacggacc tggcggttct ggacctggtg gatacggacc aggcggttct
181 ggacctggtg gatacggacc aggcggttct ggacctggtg gatacggacc tgggtggatat
241 ggacctggtg gttctggacc tgggtggatat ggacctggtg gtactggacc tgggtggttct
301 ggacccggcg gatacggacc tgggtggttct ggacctggcg gttctggacc tgggtggatac
361 ggacctggtg gttctggacc tggcggtttt ggacctggcg gttctggacc tgggtggatac
421 ggacctggtg gctctggacc cgggtggtgct ggtcccggcg gtgttggacc cgggtggtttt
481 ggacctggtg gtgctggacc tgggtggagct ggacctggtg gaggctggacc tgggtggtct
541 ggacctggtg gtgctggacc tgggtggagct ggacctggtg gtgctggacc tgggtggagct
601 ggacctggtg gtgctggacc tgggtggagct ggacctggtg gtgctggtgg cgctggagga
661 gcaggcggag caggagggtt aggtggagca ggaggatccg gcggtacaac aatcatagaa
721 gacttggata ttacaattga tggcgtgat ggcccgataa cgatttcaga agaattaaca
781 attagtgggtg ctggagggtt cggaccgggt ggtgctggac caggagggtg agggcctggt
841 ggctccggac caggagggtg aggacctgga ggctctggac caggagggtg aggacctggt
901 ggttctggtc caggaggcgt aggacctggt ggtgctggcg gaccttacgg acctggcgggt
961 tctggacctg gaggtgcagg cggagctgga ggacctggtg gagcatacgg acctggtgga
1021 tcatatggac ctggtggttc cggaggaccc ggtggtgctg gcggaccata cggacctgga
1081 ggtgaaggac ccggtggtgc tggcggaccc tacggacctg gtggtgcagg tggaccttac
1141 ggcccagggtg gtgcagggtg accctacgga ccagggtggtg aagggtggacc ctacggacca
1201 ggtggatcat acggaccggg tgggtgctggt ggaccatacg gaccagggtg accctacgga
1261 cctggagggtg aaggaccagg tgggtgctggc ggaccctatg gaccaggagg ttaggacct
1321 ggtggaagtg gacctggagg ttatggacct ggtggaagtg gacctggagg ttatggacct
1381 ggtggttctg gacctggagg ttacggacct ggtggttctg gtccagggtg atacggacc
1441 ggtggttctg gtccagggtg atacggacct ggtggttccg gaccaggagg atacggacct
1501 ggcggttctg gacctggtgg atacggatct gcgggtgctg gacctggtgg atacggacct
1561 ggcggttctg gacctggtgg atacggctct ggaggttctg gacctggtgg ttatggacct
1621 ggtggtactg gacctggtgg tactggacct ggtggttctg gacctggcgg atacggacct
1681 ggtggttctg gacctggcgg ttctggacct ggcggttctg gacctggtgg atacggacct
1741 agtggttcgg gacctggtgg atacggacct agtggttctg gacctggcgg atacggctct
1801 ggcggttctg gacctggtgg atacggaccg ggtggctctg gagccggtg tactggacct
1861 ggtggcgctg gaggagcagg cggagcagga ggttcagggtg gagcaggagg ttcagggtgt
1921 gcaggagggtt cagggtggagc aggaggttca ggtgaggtag gaggatccgg cggtaacaaca
1981 atcaccgaag acttgatgat tacaattgat ggcgcagatg gcccgataac gatttcagaa
2041 gaattaacaa ttagtgggtg tggaggttct ggacctggag gtgctggacc aggtggtgta
2101 gggcctgggtg gctctggacc aggagggtgta ggacctggag tctctggacc aggaggcgtg
2161 ggacctggtg gttctggacc aggaggcgtg ggttctggtg gttctggacc aggaggcgtg
2221 ggacctggtg gttacggacc tggaggttct ggatcaggag gcgtaggacc tgggtggttac
2281 ggacctggag gttcaggagg attttacgga cctggagggt cagaaggacc ttatggacct
2341 agtggaaact atggttctgg aggaggatat ggtcctggtg gtgctggagg accatagga
2401 cctggaagtc ctggaggagc ttatggacct ggaagccctg gaggagctta ttatcctagc
2461 tcgctgttcc cggataggtt gaatggtata atgagtgcta tgcaaggatc tggttttaac
2521 taccaaatgt ttgtaatat gctatcacia tattcgtctg gttcaggaac atgcaatcca
2581 aataatgtta atgttttgat ggatgctttg ttagctgctt tgcaactgtc aagtaaccac
2641 ggatcatcat cttttgcacc ttctccaact ccggctgcta tgagtgcgta ttctaattct
2701 gtaggaagaa tgttctgctta ttaagcctat tctttcattt tttttaaaac gattttgaaa
2761 atgttttgac aacactgaaa aattactgta gaaaaaata aatatctttt tagcagatth
2821 aaataaaaa

```

Abb. 9-2 – publizierte Nukleotidsequenz von 3'FLAG (Genbank Eintrag: AF027973; Hayashi & Lewis, 1998). Markiert sind: Mutationen der in dieser Arbeit vorliegenden Sequenz (rot hinterlegt), das Stopkodon von Flag (rot) sowie die Bindestellen der Primer FLAG-C-*chr*-sense und FLAG-C-*chr*-anti (gelb hinterlegt).

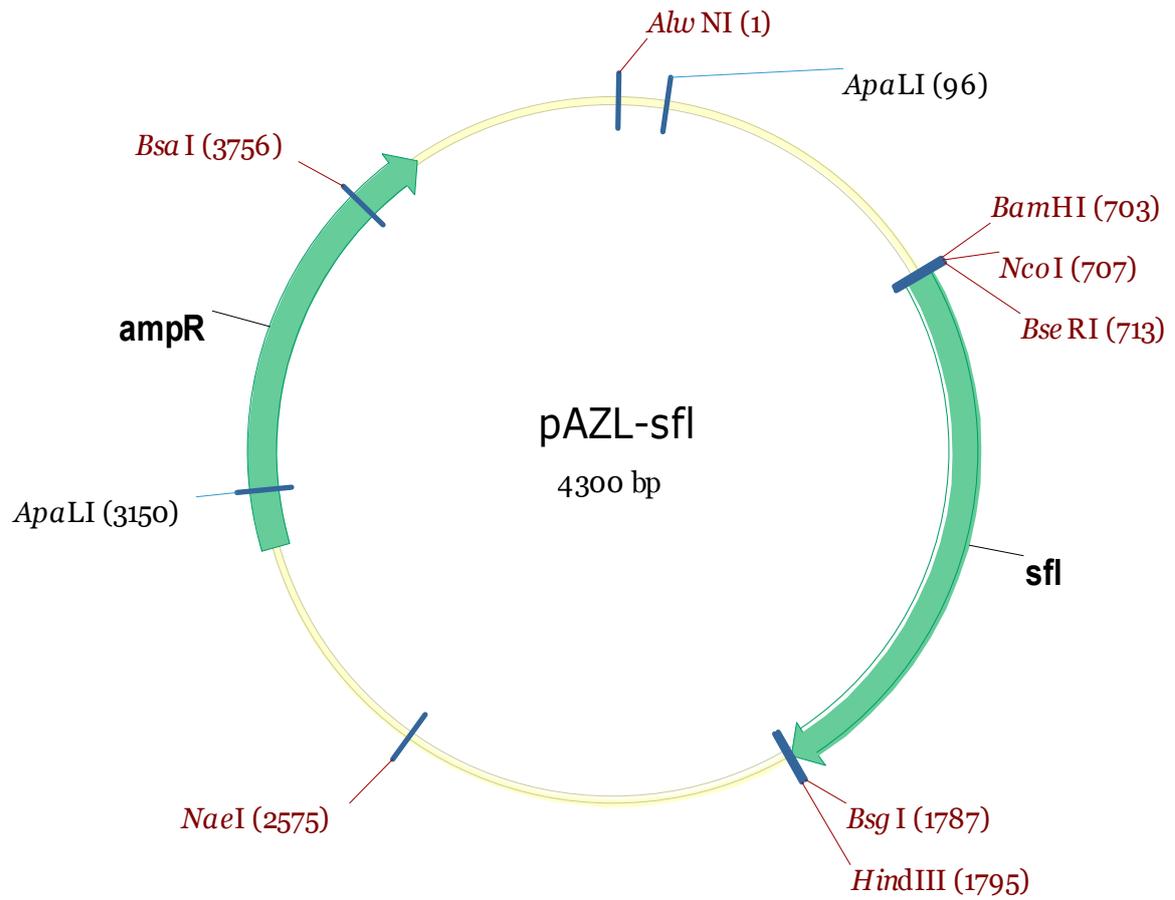


Abb. 9-3 – Plasmidkarte des Klonierungsvektors pAZL mit dem Insert sfl (erstellt mit Vector NTI).

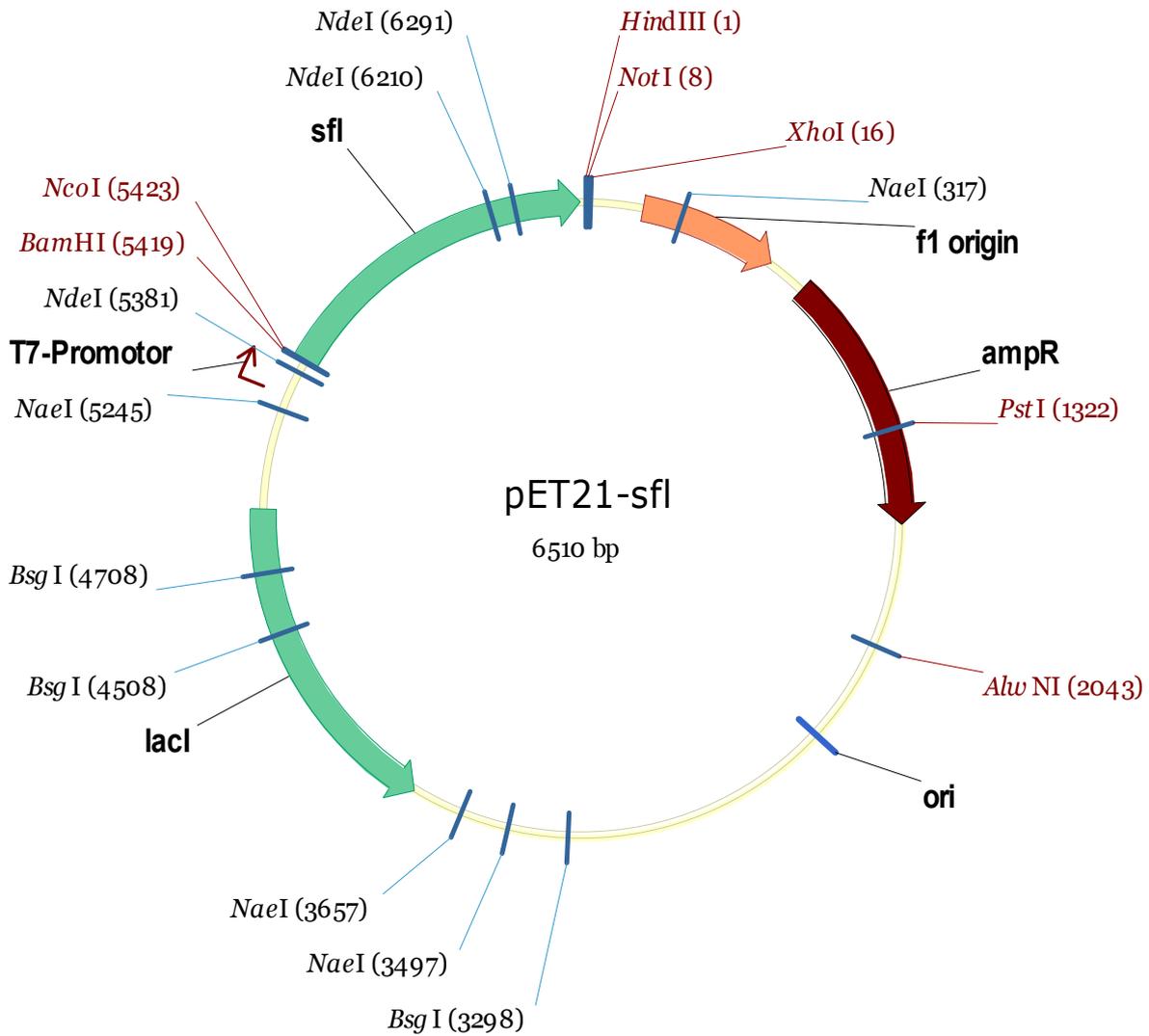


Abb. 9-4 – Plasmidkarte des Expressionsvektors pET21a mit dem Insert sfl (erstellt mit Vector NTI).

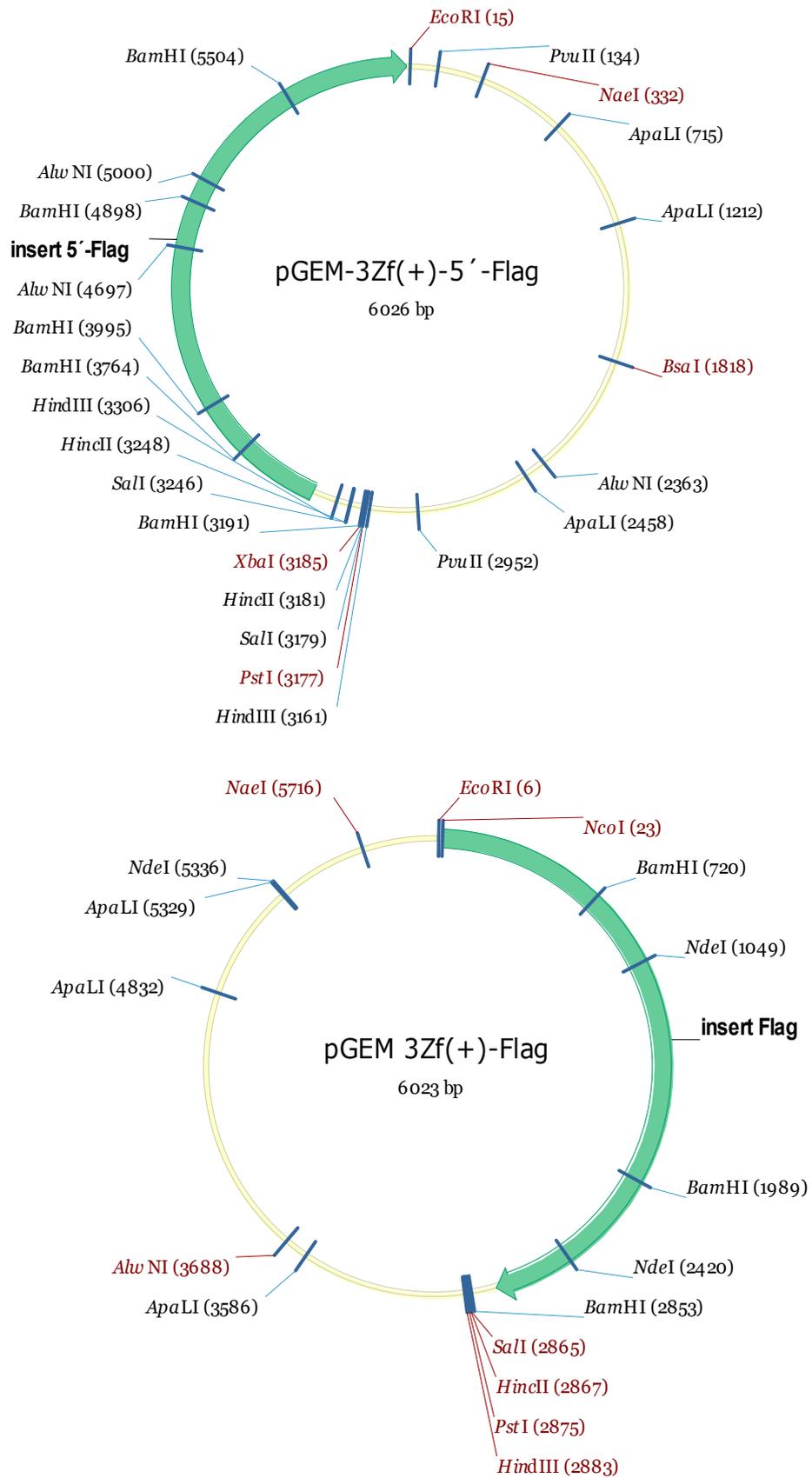


Abb. 9-5 – Plasmidkarten des Klonierungsvektors pGEM-3Zf(+) mit den Inserts 5'FLAG und 3'FLAG (erstellt mit Vector NTI).

Mein Dank gilt allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Besonders danken möchte ich...

...Prof. Dr. Johannes Buchner für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl.

...Dr. Thomas Scheibel für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, für viele fruchtbare Diskussionen und seine Unterstützung, auf die ich immer zählen konnte.

...den Fibers. So jetzt seid ihr alle dran: Andy, Anja, Charlotte, David, Eileen, Kristina, Lin, Markus (mein Erbe), Martin, Michi, Simone und Ute für die vielen Diskussionen, Ratschläge und Tipps, das Korrekturlesen dieser Arbeit, aber natürlich auch für das nötige Rahmenprogramm. Ja, es hat mir gefallen und ich war gerne ein Fiber.

...den Ex-Fibers, allen voran Daniel, der mich in die Geheimnisse der Spinnenseide und des Lehrstuhls eingeweiht hat, und Susanne, die in ihrem Herzen immer ein Fiber bleiben wird.

...Petra Neff und Sebastian Rammensee für die Unterstützung bei den Ellipsometrie- und FTIR-Messungen.

...dem Rest des Lehrstuhls Buchner für die gute Atmosphäre.

...meinen guten Freunden Clemens, Ben und Sherif und natürlich allen anderen Freunden eben für ihre Freundschaft und die zahlreichen Besuche im fernen München (ok., Ben war schon vorher da!).

...meiner Familie, meinen beiden Omas und besonders meiner Schwester und meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben ganz gleich, was mich gerade bewegt hat. Durch Euch konnte ich meinen Weg bis hier gehen.

Vielen herzlichen Dank!!!

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

Garching, im August 2007