

Department Chemie
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Charakterisierung von Assemblierungsformen rekombinanter
Spinnenseidenproteine**

Ute K. Slotta

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Chr. F. W. Becker

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Die Dissertation wurde am 10.06.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 03.08.2009 angenommen.

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Seide | 1 |
| 1.1.1 | Struktur und Aufbau von Spinnenseide | 3 |
| 1.1.2 | Mechanische Eigenschaften | 6 |
| 1.1.3 | Von der Proteinlösung zum Seidenfaden | 9 |
| 1.1.3.1 | Die Spinndrüse sowie biochemische und physikalische Prozesse während der Fadenassemblierung | 9 |
| 1.1.3.2 | Modelle der Fadenassemblierung auf molekularer Ebene | 12 |
| 1.1.4 | Rekombinante Produktion von Spinnenseidenproteinen | 14 |
| 1.2 | Nativ entfaltete Proteine | 16 |
| 1.3 | Der Einsatz von Spinnenseidenproteinen als Biomaterial | 18 |
| 1.3.1 | Biomaterialien und Werkstoffe | 18 |
| 1.3.2 | Erweitertes Einsatzspektrum von Biopolymeren durch verschiedene Morphologien | 19 |
| 1.4 | Zielsetzung | 21 |
| 2 | Material und Methoden | 23 |
| 2.1 | Verwendetes Material | 23 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 23 |
| 2.1.2 | Größenstandards und Kits | 24 |
| 2.1.3 | Bakterienstämme und Plasmide | 24 |
| 2.1.4 | Proteine | 25 |
| 2.1.5 | Geräte | 25 |
| 2.1.6 | Sonstige Materialien | 26 |
| 2.1.7 | Computerprogramme | 27 |
| 2.1.8 | Medien, Puffer und Lösungen | 27 |
| 2.2 | Molekularbiologische Arbeitstechniken | 28 |
| 2.2.1 | Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> | 28 |
| 2.2.2 | Transformation von <i>E. coli</i> | 29 |
| 2.2.3 | Präparation und Reinigung von DNA | 29 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.3 | Expression und Reinigung | 29 |
| 2.3.1 | Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> | 29 |
| 2.3.2 | Proteinreinigung | 30 |
| 2.4 | Proteinanalytik | 31 |
| 2.4.1 | Bestimmung der Reinheit | 31 |
| 2.4.1.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 31 |
| 2.4.1.2 | Silberfärbung von Proteingelen | 31 |
| 2.4.1.3 | Größenausschlusschromatographie (SEC) | 32 |
| 2.4.1.4 | Statische Lichtstreuung | 32 |
| 2.4.2 | Nachweis amyloider Fibrillen | 32 |
| 2.4.2.1 | Thioflavin T (ThT) | 32 |
| 2.4.2.2 | Kongo Rot | 33 |
| 2.4.3 | Spektroskopische Methoden | 33 |
| 2.4.3.1 | UV/Vis-Spektroskopie | 33 |
| 2.4.3.2 | Fluoreszenzspektroskopie | 34 |
| 2.4.3.3 | Zirculardichrosismus (CD)-Spektroskopie | 35 |
| 2.4.3.4 | Fouriertransformierte Infrarot (FTIR)-Spektroskopie | 36 |
| 2.4.3.5 | Laserbeugungsspektroskopie | 37 |
| 2.4.3.4 | Röntgenbeugungsanalyse | 38 |
| 2.4.4 | Mikroskopische Methoden | 38 |
| 2.4.4.1 | Rasterkraftmikroskopie (AFM) | 38 |
| 2.4.4.2 | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 39 |
| 2.4.4.4 | Rasterelektronenmikroskopie (REM)/Cryo-Rasterelektronenmikroskopie | 40 |
| 2.4.5 | Herstellung gelöster rekombinanter Seidenproteine | 41 |
| 2.4.6 | Durchführung der Aggregationsassays | 41 |
| 2.4.7 | Rheologie | 42 |
| 2.4.8 | Stopped-Flow | 43 |
| 2.5 | Herstellung veschiedener Seidenmorphologien | 43 |
| 2.5.1 | Vliese (Elektrospinning) | 43 |
| 2.5.2 | Filme | 45 |
| 2.5.3 | Fibrillenassemblierung und Herstellung von Keimen | 45 |
| 2.5.4 | Herstellung von Mikrokugeln | 46 |
| 2.5.5 | Mikrofluidik | 46 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3 | Ergebnisse | 48 |
| 3.1 | Charakterisierung der gelösten Spinnenseidenproteine | 48 |
| 3.1.1 | Analyse der Sekundärstruktur | 48 |
| 3.1.2 | Analyse der Viskosität | 49 |
| 3.1.3 | Analyse der Proteinlösung hinsichtlich oligomerer Spezies | 51 |
| 3.2 | Morphologien prozessierter Spinnenseiden | 53 |
| 3.2.1 | Spinnenseidenvliese | 53 |
| 3.2.1.1 | Elektrospinnen von eADF4(C16) | 53 |
| 3.2.1.2 | Sekundärstruktur und chemische Eigenschaften | 55 |
| 3.2.2 | Spinnenseidenfilme | 56 |
| 3.2.2.1 | Einfluss des Lösungsmittels auf die Eigenschaften von Seidenfilmen | 57 |
| 3.2.2.1.1 | Analyse der Sekundärstruktur mit CD-Spektroskopie | 57 |
| 3.2.2.1.2 | Analyse der Sekundärstruktur mit FTIR-Spektroskopie | 59 |
| 3.2.2.2 | Filme aus verschiedenen rekombinanten Spinnenseidenproteinen | 60 |
| 3.2.2.2.1 | Analyse der Sekundärstruktur von Einzelproteinfilmen mit FTIR-Spektroskopie | 61 |
| 3.2.2.2.2 | Chemische Stabilität | 63 |
| 3.2.2.2.3 | Analyse der Sekundärstruktur von Zweiproteinfilmen mit FTIR-Spektroskopie | 64 |
| 3.2.2.2.4 | Chemische Stabilität | 65 |
| 3.2.3 | Assemblierung von eADF4(C16) | 67 |
| 3.2.3.1 | Einfluss von Salzkonzentration und Temperatur | 68 |
| 3.2.3.2 | Einfluss des pH-Werts | 69 |
| 3.2.3.3 | Einfluss von Proteinkonzentration und Kettenlänge | 70 |
| 3.2.3.4 | Einfluss von Salzkonzentration kombiniert mit pH-Variationen | 70 |
| 3.2.3.5 | Zusammenhang mit dem natürlichen System | 72 |
| 3.2.3.6 | Bildung verschiedener Morphologien abhängig von der Salzkonzentration | 73 |
| 3.2.4 | Nanofibrillen | 74 |
| 3.2.4.1 | Bindung von Thioflavin T und Kongo Rot | 74 |
| 3.2.4.2 | Sekundärstrukturanalyse mit CD- und FTIR-Spektroskopie | 76 |
| 3.2.4.3 | Röntgenbeugungsanalyse | 77 |
| 3.2.4.4 | Morphologie | 78 |
| 3.2.4.5 | Fibrillenbildung in Abhängigkeit von der Temperatur | 80 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.2.4.6 | Fibrillenbildung in Abhängigkeit von der Salzkonzentration_____ | 82 |
| 3.2.4.7 | Fibrillenbildung in Abhängigkeit von der Zugabe von Keimen_____ | 83 |
| 3.2.5 | Mikrokugeln_____ | 85 |
| 3.2.5.1 | Morphologie_____ | 85 |
| 3.2.5.2 | Chemische Stabilität_____ | 89 |
| 3.2.5.3 | Sekundärstruktur_____ | 89 |
| 3.2.5.4 | Aggregatbildungskinetik_____ | 90 |
| 3.2.6 | Assemblierung von eADF3((AQ)24nr3_____ | 93 |
| 4 | Diskussion_____ | 96 |
| 4.1 | Assemblierungsformen aus rekombinanten Seidenproteinen_____ | 96 |
| 4.2 | Filme aus rekombinanten Spinnenseiden_____ | 97 |
| 4.2.1 | Einfluss des Lösungsmittels_____ | 97 |
| 4.2.2 | Einfluss des Proteins_____ | 99 |
| 4.3 | Abhängigkeit der Assemblierung von eADF4(C16) von verschiedenen Parametern_____ | 101 |
| 4.4 | Nanofibrillen, Mikrokugeln und Seidenfäden_____ | 103 |
| 4.4.1 | Assemblierung der Nanofibrillen_____ | 104 |
| 4.4.2 | Assemblierung der Mikrokugeln_____ | 106 |
| 4.4.3 | Assemblierung der Seidenfäden_____ | 108 |
| 5 | Zusammenfassung_____ | 110 |
| 6 | Literatur_____ | 112 |
| 7 | Abkürzungen_____ | 122 |
| 8 | Publikationen_____ | 124 |

1 Einleitung

1.1 Seiden

Die Kokonseide des Seidenspinners *Bombyx mori* gehört zu den bekanntesten und bereits seit Jahrtausenden in der Textilproduktion genutzten Seiden. Im biologisch-biochemischen Sinn umfasst der Begriff Seide eine Klasse von Proteinfasern, die von Arthropoden (Gliederfüßer) hergestellt werden und bestimmte biophysische und biochemische Eigenschaften aufweisen. Die Gattungen Lepidoptera (Schmetterlinge), Hymenoptera (Hautflügler), Diptera (Zweiflügler), Neuroptera (Netzflügler), Acari (Milben) und Arachniden (Spinnentiere) nutzen Seiden in vielfältigen Bereichen, angefangen von der Reproduktion bis hin zum Beutefang (Craig 1997; Vollrath and Porter 2006).

Spinnen verwenden Seiden schon seit über 450 Millionen Jahren. Seit die verschiedenen Spinnenarten vor über 125 Millionen Jahre divergierten, erhielt sich die Seide hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und ihrer Struktur in fast unveränderter Form. Von den mehr als 37000 Spinnenarten verwendet die Hälfte Netze zum Beutefang (Coddington, Giribet et al. 2004). Es sind ungefähr 130 verschiedene Netzformen bekannt, von denen das Radnetz wohl die bekannteste ist. Spinnen wie die Europäische Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* oder die Goldene Radnetzspinne *Nephila clavipes* können sechs verschiedene Seidenarten produzieren, die im Lauf der Evolution perfekt an den entsprechenden Verwendungszweck angepasst wurden (Vollrath 2000; Lewis 2006). Alle dieser verschiedenen Seidenarten werden in eigenen speziellen Drüsen produziert, welche aus einer gemeinsamen ursprünglichen Drüse entstanden sind (Hu, Vasanthavada et al. 2006; Romer and Scheibel 2008). Einen Überblick über die verschiedenen Seidenarten und deren Einsatz gibt Abbildung 1.1.

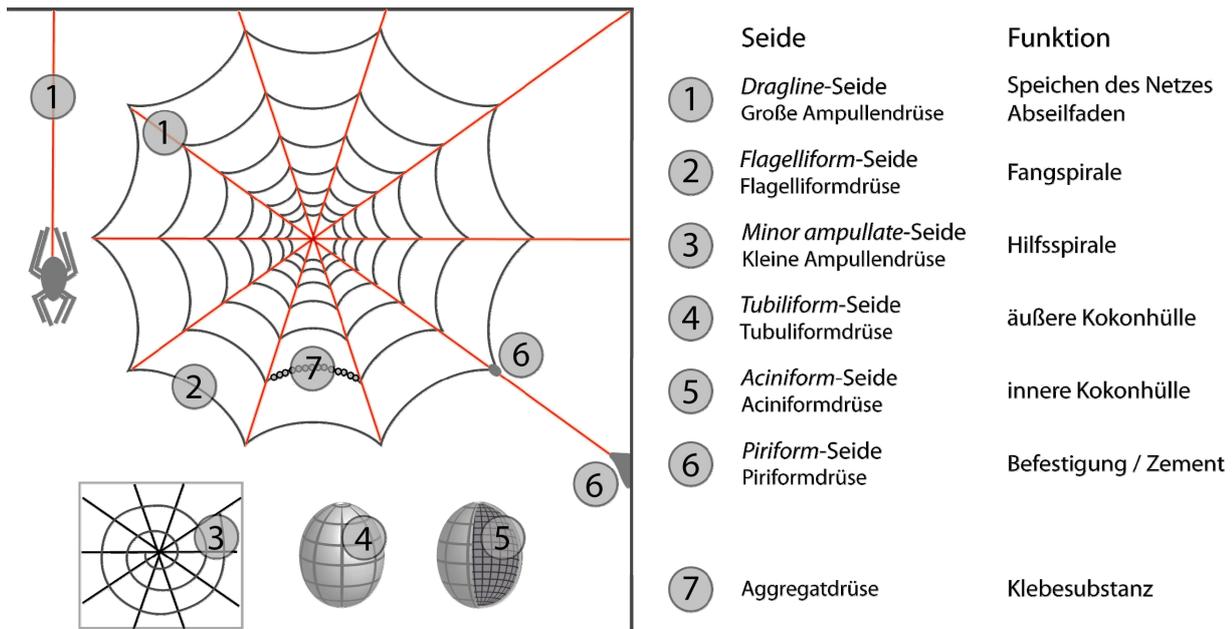


Abbildung 1.1: Gezeigt sind die sechs verschiedenen Seidentypen und die Klebesubstanz, die von der weiblichen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* produziert werden. Die *Dragline*-Seide (1) bildet Rahmen und Speichen des Netzes sowie den Abseilfaden der Spinne. Die Fangspirale besteht aus der *Flagelliform*-Seide (2). Die *Aggregat*-Seide (7), welche ein Bestandteil der Klebesubstanz ist, wird auf die *Flagelliform*-Seide aufgetragen (wichtig für das Anhaften von Insekten). Der Bau des Netzes wird zu Beginn durch einen speziellen Seidentyp unterstützt, der eine Art Hilfsspirale (3) bildet. Die Kokonhülle von Spinnen besteht aus zwei verschiedenen Seiden (4, 5), die die innere und äußere Eihülle bilden. Ein weiteres Klebeprotein (6) dient zur Verbindung von *Dragline*- und *Flagelliform*-Seide und befestigt das Netz am Substrat.

Das Spinnennetz selbst besteht hauptsächlich aus zwei verschiedenen Seidenarten. Die sehr reißfeste *Dragline*-Seide bildet Rahmen und Speichen des Netzes sowie den Abseilfaden, der diesem Seidentyp den Namen gibt (engl. *to drag* = hinterherziehen). Der Durchmesser dieser Seide ist abhängig vom Gewicht der Spinne und der Spinnenspezies sowie verschiedener Spinnparameter und beträgt zwischen 1 und 20 μm . Die *Dragline*-Seide ist hauptsächlich aus den beiden Proteinkomponenten MaSp1 und MaSp2 (Major Ampullate Spidroin 1 und 2), die ein Molekulargewicht von jeweils über 300 kDa besitzen, aufgebaut (Vollrath 1999; Hu, Vasanthavada et al. 2006). Die *Flagelliform*-Seide, welche die zweite Netzseide ist, besteht aus nur einem einzigen Protein und bildet die Fangspirale. Diese Seide besitzt ebenfalls ein sehr hohes Molekulargewicht von ca. 500 kDa und viskoelastische Eigenschaften, um die Energie des Aufpralls fliegender Beute zu verteilen (Winkler and Kaplan 2000; Dicko, Knight et al. 2004; Scheibel 2004). Ein Großteil der aufgenommenen Energie (ca. 65%) wird dabei

nicht in kinetische Energie sondern in Wärme umgewandelt, um ein Zurückkatapultieren der gefangenen Beute zu verhindern. Da Spinnenseide an sich nicht klebrig ist, wird eine zusätzliche Klebesubstanz auf die *Flagelliform*-Seide aufgetragen, um die Beute am Netz haften zu lassen. Dieser Kleber ist keine Seide sondern besteht aus organischen Molekülen, Salzen, Fettsäuren und kleinen Glykoproteinen (Townley, Tillinghast et al. 2006). Die Seide, welche in der kleinen Ampullendrüse gebildet wird, ist, wie die *Dragline*-Seide, hauptsächlich aus zwei Proteinkomponenten aufgebaut und besitzt ähnliche mechanische Eigenschaften. Mit ihr wird die Hilfsspirale gebildet, die im fertiggestellten Netz nicht mehr vorkommt, da sie lediglich als Gerüst zum Bau des Netzes dient (Dicko, Knight et al. 2004; Hardy, Roemer et al. 2008). Die Seiden, die in der *Tubuliform*- und der *Aciniform*-Drüse gebildet werden, dienen zum Schutz der Nachkommen und formen die Kokonhülle (Hayashi, Blackledge et al. 2004; Rising, Hjalm et al. 2006). Die *Piriform*-Drüse produziert eine seidenähnliche Klebesubstanz, die das Netz an Oberflächen wie Wänden oder Pflanzen haften lässt. Des Weiteren verbindet sie *Dragline*- und *Flagelliform*-Seide miteinander. Um die gewünschten Klebeeigenschaften zu erfüllen, besitzt diese Seide einen hohen Anteil an polaren und geladenen Aminosäuren (Hardy, Roemer et al. 2008).

1.1.1 Struktur und Aufbau von Spinnenseide

Die wegen ihrer herausragenden Eigenschaften am intensivsten erforschte Spinnenseide ist die *Dragline*-Seide. Wie bereits erwähnt, besteht der Kern des Seidenfadens aus zwei Proteinkomponenten. Im Fall von *Nephila clavipes* handelt es sich um das hydrophile MaSp1 und das hydrophobere MaSp2. Die Proteine besitzen einen hohen Anteil (~ 60 %) der unpolaren, hydrophoben Aminosäuren Glycin und Alanin (Xu and Lewis 1990; Vollrath 2000; Rising, Nimmervoll et al. 2005) aber unterscheiden sich in ihrem Prolingehalt. Der Aufbau der Primärstruktur erinnert an den eines Blockcopolymers mit einer repetitiven Abfolge von alaninreichen, hydrophoberen und glycinreichen, hydrophileren Regionen (Winkler and Kaplan 2000). Man findet in diesen Regionen charakteristische Polypeptideinheiten, die zu großen Wiederholungseinheiten kombiniert werden. MaSp2 enthält neben einem charakteristischen GGX-Motiv auch ein GPGXX-Motiv, das bis zu neunmal hintereinander auftritt. Dieses Motiv ist in MaSp1 nicht vorhanden, wodurch der niedrige Prolingehalt erklärt werden kann. Eine weitere charakteristische Peptideinheit sind Polyalaninmotive, welche aus sechs bis neun Alaninen bestehen. Die gesamte Wiederholungseinheit tritt in einem einzelnen Protein mehrere hundertmal hintereinander auf

(Abbildung 1.2). In der carboxyl- und aminoterminalen Region der Proteine befinden sich hoch konservierte, nicht-repetitive Regionen, die aus etwa hundert Aminosäuren bestehen (Beckwitt and Arcidiacono 1994; Rising, Hjalms et al. 2006). Diese Regionen sind gefaltet und enthalten die einzigen Cysteine des Proteins und es wird vermutet, dass diese eine essenzielle Rolle bei der Ausrichtung sowie der Di- oder Oligomerisierung der Proteine während der initialen Assemblierungsphase spielen (Abbildung 1.2) (Dicko, Knight et al. 2004; Huemmerich, Helsen et al. 2004; Hedhammar, Rising et al. 2008). Durch Kenntnis des Prolingehalts der einzelnen Proteine wurde berechnet, dass der Anteil der Proteine in der *Dragline*-Seide von *Nephila clavipes* 81 % MaSp1 und 19 % MaSp2 beträgt. Jedoch sind die Verhältnisse der beiden Proteine nicht immer gleich und variieren vor allem zwischen verschiedenen Spezies stark. Bei der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* werden die *Dragline*-Komponenten als ADF3 und ADF4 (*Araneus diadematus fibroin*) bezeichnet (Hinman and Lewis 1992; Gatesy, Hayashi et al. 2001). Diese beiden Seidenproteine sind MaSp2-Analoga und enthalten somit die Aminosäure Prolin. Betrachtet man die Hydrophobizität der Proteine, fällt auf, dass auch in diesem System eine hydrophilere und eine hydrophobere Komponente existieren. ADF 3 ist hydrophiler und besser in wässrigen Systemen löslich als ADF 4, das leicht zu filamentösen Strukturen assembliert (Lazaris, Arcidiacono et al. 2002; Huemmerich, Scheibel et al. 2004). Obwohl bei dieser Spinnenart neben Fragmenten des repetitiven Bereichs lediglich die nicht-repetitive carboxylterminale Region bekannt ist, wird vermutet, dass bei dieser Seide ebenfalls eine nicht-repetitive aminoternale Region existiert.

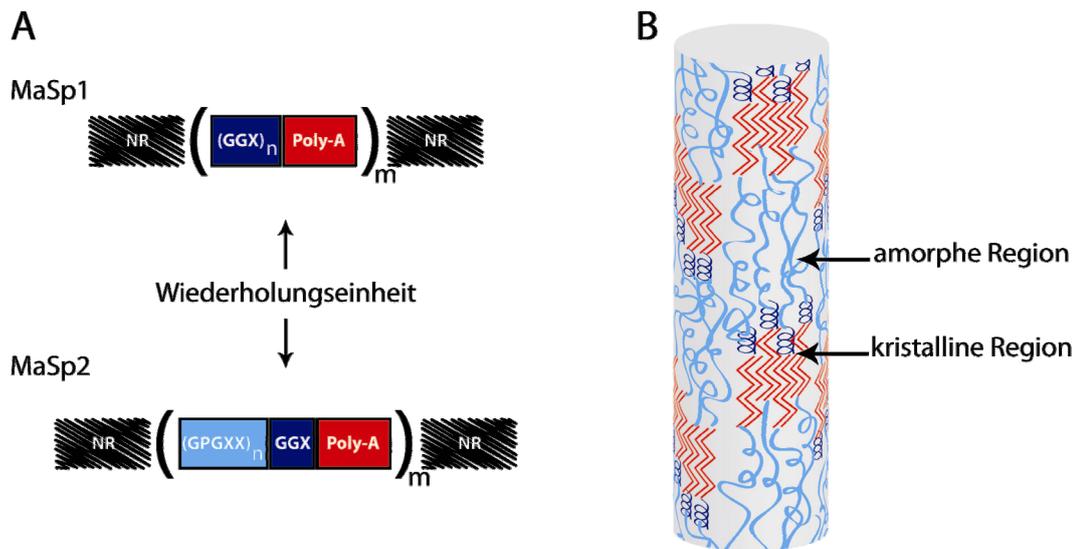


Abbildung 1.2: Der prinzipielle strukturelle Aufbau von *Dragline*-Seide. A) Dargestellt sind die charakteristischen Aminosäuremotive der Primärstruktur der Spinnenseidenproteine am Beispiel von *Nephila clavipes* (GPGXX, GGX und Poly-A (A_n und $(GA)_n$). Die Sequenz der jeweils amino- und carboxylterminalen Region ist nicht-repetitiv (NR). B) Modell zur Strukturanordnung in einem Seidenfilament. Aus den glycinreichen Bereichen (blau) entsteht die amorphe Matrix, die dem Faden Elastizität verleiht, während die alaninreichen Regionen (rot) β -faltblattreiche Kristalle bilden, die für die hohe Stabilität des Fadens verantwortlich sind.

Sowohl die glycinreichen als auch die alaninreichen Motive bilden unterschiedliche Sekundärstrukturen aus, wodurch der Seidenfaden seine charakteristischen Eigenschaften erhält. Röntgenbeugungsanalysen (Riekel, Branden et al. 1999) und Untersuchungen mittels NMR (Hijirida, Do et al. 1996; Simmons, Michal et al. 1996; Parkhe, Seeley et al. 1997; van Beek, Hess et al. 2002) haben gezeigt, dass Spinnenseide zu großen Teilen aus β -Faltblättern besteht, die in Richtung der Fadenachse angeordnet sind. Außerdem wurden Hinweise auf β -Turns, 3_1 -Helices und ungeordnete Bereiche gefunden (van Beek, Kummerlen et al. 1999). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Sekundärstrukturen den verschiedenen Sequenzmotiven zugeordnet.

Die amorphen Bereiche, die dem Spinnenfaden seine Elastizität verleihen, bestehen aus den Motiven GGX, welche eine 3_1 -Helix bildet und GPGXX, das als elastische β -Spirale vorliegt. Das Motiv GPGXX ist auch in Elastan und besonders häufig in der sehr elastischen *Flagelliform*-Seide vorhanden (Hutchinson and Thornton 1994; Urry, Luan et al. 1995). Die Aminosäure Proline bildet den Fixpunkt für die Rückzugskräfte, die nach der Dehnung des Fadens auftreten. Wird an einem Seidenfaden gezogen, brechen Wasserstoffbrückenbindungen, was zur Folge hat, dass die Proline stressinduziert die Konformation ändern und

dadurch die Energie für das Rückziehen des Fadens liefern (Liu, Spenner et al. 2008). In die amorphe Matrix sind kristalline Bereiche eingebettet, die für die hohe Reißfestigkeit des Fadens verantwortlich sind. Diese kristallinen Bereiche bestehen aus den Polyalanin-Motiven welche β -Faltblätter bilden, die parallel zur Fadenachse verlaufen und werden durch Strukturen der GGX-Motive miteinander verbunden und ausgerichtet. Es wird vermutet, dass eine Verdrehung der β -Faltblätter für die Superkontraktion des Fadens in Wasser verantwortlich ist. Die Seide kann sich dabei reversibel auf weniger als 50 % ihrer Ausgangslänge verkürzen und wird dadurch elastischer (Lewis 2006).

Die Seiden, die von Insekten und Spinnen gebildet werden, besitzen keine einheitliche Struktur und können somit in verschiedene Klassen eingeordnet werden (Craig 1997). Die hier ausführlich beschriebene *Dragline*-Seide gehört zu den Parallel- β -Seiden, die durch einen komplexen Spinnprozess gebildet werden. Zu weiteren Strukturklassen gehören α -helikale Seiden, welche einen niedrigen Glycingehalt und einen erhöhten Anteil an geladenen Aminosäuren besitzen, wodurch besonders α -helikale Strukturen begünstigt werden, sowie die Cross- β -Seiden, bei denen die β -Faltblätter, die aus übereinander geschichteten β -Strängen gebildet werden, rechtwinklig zur Fadenachse verlaufen. Diese Seiden werden nicht versponnen sondern extrudiert oder abgesondert. Ein in diesem Zusammenhang interessanter Aspekt ist, dass sich sowohl die α -helikalen Seiden als auch die Cross- β -Seiden durch Zug- oder Scherkräfte in Parallel- β -Seiden umwandeln lassen. Somit wird deutlich, dass nicht nur die Primärstruktur von Proteinen sondern auch die Prozessierung einen entscheidenden Einfluss auf die finale Struktur im Seidenfaden hat.

1.1.2 Mechanische Eigenschaften

Die mechanischen Eigenschaften von synthetischen und natürlichen Einzelfasern können durch Spannungs-Dehnungs-Kurven (Abbildung 1.3) beschrieben werden, bei denen die Faser so lange gestreckt wird, bis sie reißt. Durch Analyse so genannter Zugexperimente an verschiedenen Seidenfäden konnte gezeigt werden, dass die Werte für denselben Seidentyp von verschiedenen Spinnenarten (Madsen, Shao et al. 1999) sowie für verschiedene Seidentypen der gleichen Spinnenspezies (Hu, Vasanthavada et al. 2006) und sogar für den gleichen Seidentyp derselben Spinne variabel sind.

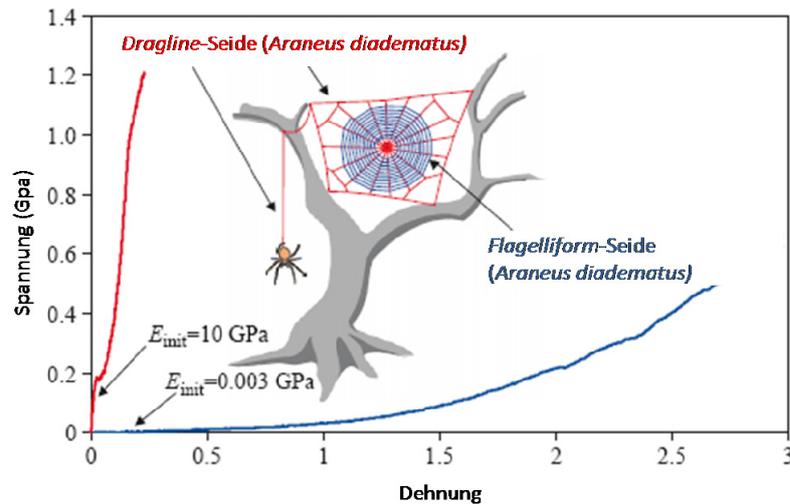


Abbildung 1.3: Spannungs-Dehnungs-Kurven der *Dragline*- und *Flagelliform*-Seide von der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* (nach Gosline et al. 1999, mit Genehmigung angepasst). E_{mit} beschreibt die Steifigkeit des Materials, die für die *Dragline*-Seide mit 10 GPa deutlich höher ist als für die *Flagelliform*-Seide mit 0,003 GPa.

Diese Unterschiede beruhen auf den jeweils gewählten Messbedingungen, aber vor allem auf den unterschiedlichen Zusammensetzungen der Spinnlösung und den Umgebungsbedingungen während des Spinnprozesses. Es konnte gezeigt werden, dass sich, abhängig vom Fütterungszustand der Spinne, der Anteil der jeweiligen *Dragline*-Seidenproteine im Faden verändert und auch eine selektive Expression verschiedener Varianten der Proteinkomponenten MaSp1 und MaSp2 möglich ist (Gaines and Marcotte 2008; Guehrs, Schlott et al. 2008). Außerdem kann die Spinne die Reißfestigkeit und Elastizität des Spinnenfadens aktiv durch die Anpassung der Spinnengeschwindigkeit und damit der Fadendicke regulieren. Der Schwerpunkt der bisherigen Seidenforschung liegt auf der *Dragline*-Seide, da diese wünschenswerte Eigenschaften wie eine geringe Dichte, eine hohe Zugfestigkeit und eine beachtliche Zähigkeit für eine mögliche Anwendung vereint (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Zusammenfassung von mechanischen Daten einiger natürlicher und synthetischer Werkstoffe im Vergleich zur *Dragline*-Seide der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus*. Die dargestellten Werte sind auf das Volumen bzw. den Durchmesser der entsprechenden Probe bezogen (Gosline, Guerette et al. 1999).

| Material | Dichte [gcm ⁻³] | Zugfestigkeit | Steifigkeit | Dehnbarkeit | Zähigkeit |
|--|--------------------------------|-----------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | | [GPa] Streckgrenze | [GPa] E-Modul | [%] Bruchdehnungsgrenze | [MJm ⁻³] Bruchenergie |
| <i>Dragline</i> -Seide <i>A. diadematus</i> | 1,3 | 1,1 | 10 | 27 | 160 |
| <i>Flagelliform</i> -Seide <i>A. diadematus</i> | 1,3 | 0,5 | 0,003 | 270 | 150 |
| Kokon-Seide <i>B. mori</i> | 1,3 | 0,6 | 7 | 18 | 70 |
| Wolle | 1,3 | 0,2 | 0,5 | 50 | 60 |
| Elastin | 1,3 | 0,002 | 0,001 | 15 | 2 |
| Nylon 6.6 | 1,1 | 0,95 | 5 | 18 | 80 |
| Kevlar 49™ | 1,4 | 3,6 | 130 | 2,7 | 50 |
| Karbonfaser | 1,8 | 4 | 300 | 1,3 | 25 |
| Stahl | 7,8 | 1,5 | 200 | 0,8 | 6 |

Die Besonderheit von Spinnenseide im Allgemeinen liegt in der Balance zwischen Festigkeit, Dehnbarkeit und viskoelastischen Eigenschaften. Zudem ist sie als biologisches Material besonders leicht. Die *Dragline*-Seide besitzt eine Zugfestigkeit (Zugfestigkeit = Kraft pro Fläche, die für das Zerreißen des Fadens aufgebracht werden muss) von 1,1 GPa, welche sie mit synthetischen Hochleistungsmaterialien wie Nylon 6.6 (0,95 GPa) und Stahl (1,5 GPa) vergleichbar macht (Gosline, Guerette et al. 1999). Bezieht man das Gewicht der verschiedenen Fäden in die Berechnung mit ein, ergibt sich für Spinnenseide, die eine geringe Dichte besitzt, verglichen mit hochfestem Stahl sogar eine fünffach höhere Zugfestigkeit (Gosline, Guerette et al. 1999; Hu, Vasanthavada et al. 2006). Spinnenseide zeigt in ihrer Zähigkeit (Zähigkeit = Energie pro Volumen, die benötigt wird, um Material zu zerreißen) deutlich höhere Werte als alle anderen in Tabelle 1.1 aufgeführten Materialien. Die *Dragline*-Seide besitzt eine Zähigkeit von 160 MJm⁻³, *Flagelliform*-Seide von 150 MJm⁻³. Eine Gegenüberstellung der in der Tabelle aufgeführten Werte der beiden Spinnenseiden macht deutlich, dass die *Flagelliform*-Seide mit 270 % deutlich dehnbarer (Dehnbarkeit = auf ursprüngliche Länge normierte Ausdehnung) als die *Dragline*-Seide ist (27 %), welche dafür wesentlich zugfester und mit einem Wert von 10 GPa steifer (Steifigkeit = Widerstand gegen Verformung) ist. Hier zeigt sich die perfekte Anpassung der verschiedenen Seidenarten an die entsprechenden mechanischen Anforderungen. Die Werte für Dehnbarkeit und Stärke lassen,

wegen der unterschiedlichen Anteile an Strukturmotiven, Rückschlüsse auf die mechanische Bedeutung dieser Motive zu.

Die zugfesteste und steife *Dragline*-Seide enthält viele kristalline Polyalanin-Segmente, welche in der elastischen *Flagelliform*-Seide fehlen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass diese Bereiche dem Seidenfaden seine Stabilität verleihen. Die elastische *Flagelliform*-Seide enthält, genauso wie die *Dragline*-Proteinkomponente MaSp2, das Motiv GPGXX. Dieses Motiv ist Bestandteil der glycinreichen Bereiche, welche dem Faden die Elastizität verleihen (Porter, Vollrath et al. 2005; Sponner, Unger et al. 2005).

1.1.3 Von der Proteinlösung zum Seidenfaden

Der Spinnprozess ist eine erstaunliche Entwicklung der Natur, bei dem aus einer wässrigen Proteinlösung unter in der Umgebung herrschenden Temperatur- und Druckverhältnissen eine der stabilsten natürlichen Fasern gebildet wird, die in ihren mechanischen Eigenschaften besser als viele synthetische Hochleistungsfasern ist. Der exakte Mechanismus der Fadenassemblierung ist bislang noch nicht vollständig aufgedeckt jedoch sind mehrere Modelle dafür beschrieben worden.

1.1.3.1 Die Spinndrüse sowie biochemische und physikalische Prozesse während der Fadenassemblierung

Das Spinnorgan der Goldenen Radnetzspinne *Nephila clavipes*, welches die Proteine der *Dragline*-Seide produziert, besteht aus mehreren Komponenten, die jeweils bestimmte Funktionen erfüllen (Abbildung 1.4). Die paarig angeordnete Hauptampullendrüse untergliedert sich in zwei Abschnitte. In der Membran der A-Zone, die aus dem Drüsenfortsatz und dem distalen Teil des Speichersegments besteht, befinden sich große Säulenepithelzellen. Aus ihnen werden die Seidenproteine MaSp1 und MaSp2, die später den Kern des Seidenfadens bilden, in das Lumen sekretiert. Die Epithelzellen der B-Zone ähneln denjenigen der A-Zone. Jedoch wird vermutet, dass dort die Proteine, welche den Seidenfaden ummanteln, produziert werden, wobei es sich möglicherweise um Glykoproteine handelt. (Vollrath and Knight 2001; Sponner, Vater et al. 2007). Die Spinnenseidenproteine werden bis zu ihrer Verwendung hochkonzentriert in einer wässrigen Lösung (bis zu 50 % (w/v)) im Drüsenlumen gespeichert. Es wurden verschiedene Theorien diskutiert, wie eine vorzeitige

Assemblierung der Seidenproteine verhindert wird. Möglicherweise besitzt die Spinnlösung flüssigkristalline Eigenschaften und/oder die dem Lösungsmittel ausgesetzten Proteine sind durch Glykosilierung vor Aggregation geschützt. An die Drüse schließt sich der S-förmige Spintrakt an, in dem die Assemblierung der Seidenproteine zum fertigen Seidenfaden von perfekt aufeinander abgestimmten biochemischen und physikalischen Prozessen initiiert wird.

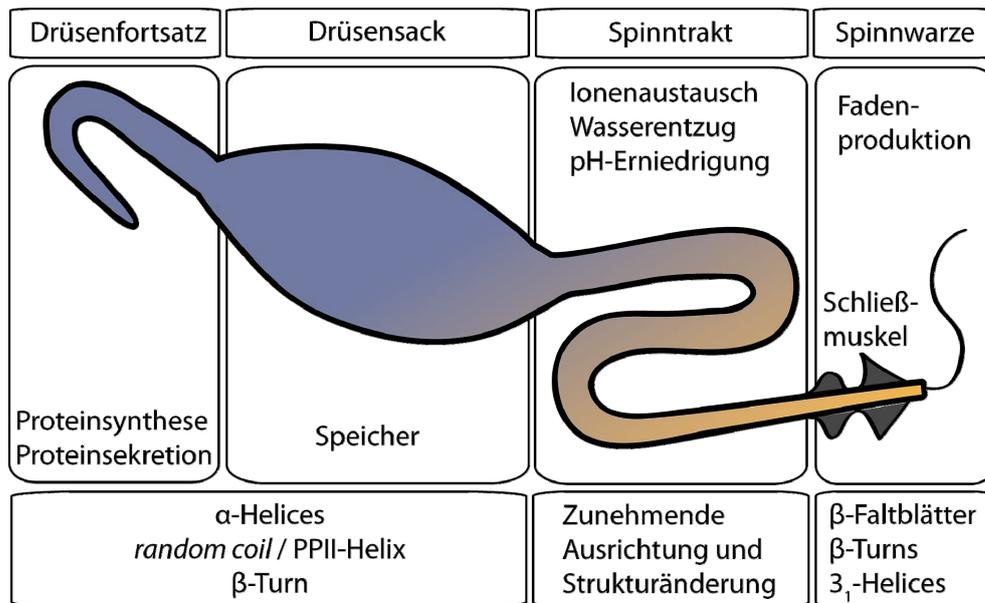


Abbildung 1.4: Darstellung des Spinnprozesses in der Großen Ampullendrüse von Radnetzspinnen. Die verschiedenen Bestandteile der Drüse sind gezeigt und ihre Funktion dargestellt. Die jeweilige Sekundärstruktur von der Proteinlösung bis hin zum Faden, worin die Proteine vorliegen, ist den einzelnen Abschnitten der Drüse zugeordnet.

Es konnte unter Anderem mit Raman-Spektromikroskopie gezeigt werden, dass die *Dragline*-Seidenproteine im Drüsensack der Spinnendrüse hauptsächlich als nativ entfaltete Moleküle vorliegen (Hijirida, Do et al. 1996; Dicko, Knight et al. 2004; Lefevre, Leclerc et al. 2007). Jedoch wurden auch Hinweise auf α -helikale Strukturen gefunden, welche von den alaninreichen Bereichen gebildet werden. Die glycinreichen Regionen scheinen entweder als β -Turn Struktur oder als *random coil* vorzuliegen (Lefevre, Boudreault et al. 2008). Zusätzlich wurden gefaltete Anteile mit 3_1 -helikaler (Polyprolin II (PPII)-Helix ähnlicher) Struktur beschrieben (Lefevre, Leclerc et al. 2007). Wie die Assemblierung der Proteine zum Faden auf molekularer Ebene abläuft, ist noch nicht endgültig erforscht und es werden verschiedene Modelle diskutiert. Die wichtigsten Schritte auf dem Weg zur Fadenentstehung sind jedoch in allen Modellen übereinstimmend beschrieben. Dazu gehören Ausdehnung, Ausrichtung, Strukturänderung und Verdichtung der Seidenproteine, die hauptsächlich in der

letzten Windung des Spinntraktes auftreten. Eine seit fast 50 Jahren bekannte Tatsache ist, dass die Umwandlung der gelösten Seidenproteine zu einem festen Faden eng mit Zugkräften verbunden und kein klassischer Extrusionsprozess ist (Wilson 1962; Heim, Keerl et al. 2009). Während der Passage der Seidenlösung durch den Spinntrakt werden Natrium- und Chloridionen durch kosmotrope Kalium- und Phosphationen ersetzt. Die Seidenlösung wird durch die Resorption von Wasser weiter aufkonzentriert und der pH-Wert ändert sich von 6,9 auf 6,3 durch die Aktivität einer Protonenpumpe (Dicko, Knight et al. 2004; Scheibel 2004). Ein ähnlicher Mechanismus kann auch beim Seidenspinner *Bombyx mori* beobachtet werden. Die Änderung des pH-Wertes könnte verschiedene strukturierte Bereiche der Proteine durch Entzug der Hydrathülle denaturieren und auch den Ladungszustand von geladenen Aminosäureseitenketten verändern. Des Weiteren beeinflusst die Änderung des pH-Wertes den Ionisierungszustand der nicht-repetitiven carboxylterminalen Region der Seidenproteine, die zur Steuerung der Assemblierung wichtig ist. Neben der Zunahme hydrophober Wechselwirkungen durch die biochemischen Änderungen ist auch die Wirkung von Zug- und Scherkräften bei der Entfaltung, Ausrichtung und Strukturumwandlung der Seidenproteine wichtig. Hierfür spielt die spezielle Geometrie des Spinntraktes („draw-down taper“), vor allem im distalen Teil eine Rolle (Wong Po Foo, Bini et al. 2006). Dieser verjüngt sich, wodurch eine Dehnströmung entsteht, die das Entfalten der Moleküle begünstigt und auch eine Strukturänderung bewirken kann. Besonders die Polyalaninsegmente (A_n und $(GA)_n$) können sich dadurch von α -Helices in Lösung zu antiparallelen β -Faltblättern in Assemblaten umwandeln, aus denen die kristallinen Bereiche des Seidenfadens entstehen. Der letzte Teil des Spinnorgans besteht aus der Spinnwarze. Dort befindet sich ein Schließmuskel, dessen Durchmesser von der Spinne aktiv verändert werden kann und der möglicherweise verschiedene Aufgaben erfüllt. Zum Einen reguliert er die Menge an Seidenlösung, die der Austrittsdüse zugeführt wird und kontrolliert die Fadendicke sowie die Kraft, die für das Herausziehen des Fadens benötigt wird (Wilson 1962; Wilson 1962). Zum Anderen wird diskutiert, dass der Schließmuskel benötigt wird, um den Spinnprozess erneut zu starten, falls der Seidenfaden reißt (Vollrath and Knight 1999).

1.1.3.2 Modelle der Fadenassemblierung auf molekularer Ebene

Die molekularen Details und der Ort, an dem die endgültige Transformation von der Seidenlösung zum Seidenfaden stattfindet, sind noch nicht geklärt. In Abbildung 1.5 sind die bisher diskutierten Modelle zusammengefasst, die den Mechanismus der Fadenassemblierung beschreiben.

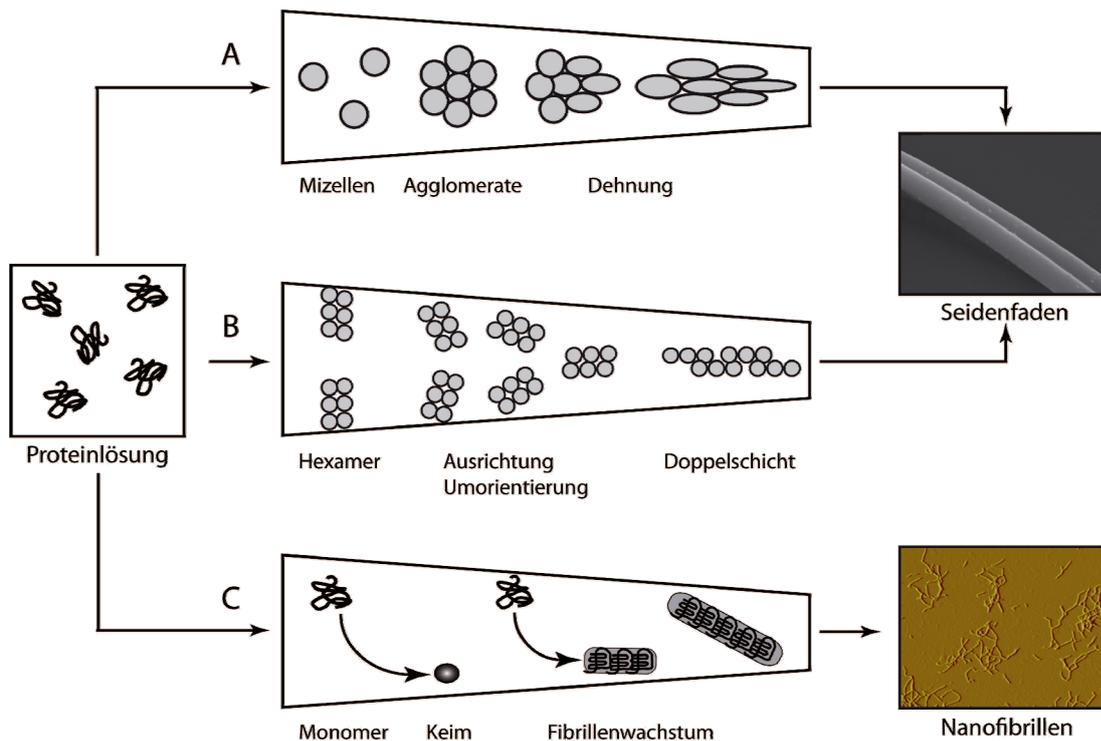


Abbildung 1.5: Modelle zur Assemblierung von gelösten Seidenproteinen zu einem Spinnfaden. Dargestellt ist die Mizellen-Theorie von Jin und Kaplan (Jin and Kaplan 2003) (A), die Flüssigkristall-Theorie von Vollrath et al. (Knight, Knight et al. 2000) (B) und die Fadenentstehung über den Nukleations-Aggregations-Mechanismus der für amyloide Fibrillen beschrieben wurde (Li, Zhou et al. 2001) (C).

Im ersten Modell (Abbildung 1.5 (A)), das von Jin und Kaplan vorgeschlagen wurde, wird davon ausgegangen, dass die Seidenproteine von *Bombyx mori* im Spinnkanal Mizellen mit einem Durchmesser von 100 bis 200 nm bilden, was aufgrund ihrer amphiphilen Primärstruktur mit abwechselnd hydrophilen und hydrophoben Bereichen möglich ist (Jin and Kaplan 2003). Bei Erhöhung der Proteinkonzentration, die durch die Resorption von Wasser hervorgerufen wird, verschmelzen die Mizellen zu so genannten „Globules“, Mizellen-Agglomeraten, die einen Durchmesser von 1 bis 15 μm besitzen. Im Spinnkanal auftretende Scherkräftedehnen diese Mizellen-Agglomerate und durch Interaktionen zwischen den

Molekülen entsteht der Seidenfaden. Da sich die Seidenproteine von *Bombyx mori* und Spinnen hinsichtlich ihres amphiphilen Charakters ähneln, kann diese Theorie auch auf die Assemblierung des Spinnenfadens übertragen werden.

Das zweite Modell (Abbildung 1.5 (B)) nach Vollrath et al. beschreibt, dass die Seidenlösung flüssigkristalline Eigenschaften besitzt (Knight and Vollrath 2001). Deshalb kann die Spinnlösung fließen, ist aber trotzdem hochorientiert. Somit bildet ein flüssig-kristalliner Phasenübergang mit einer Separation in eine wässrige und eine proteinreiche Phase die Grundlage für dieses Modell (Knight, Knight et al. 2000). Die Seidenproteine bilden hierbei bereits im Lumen tropfenförmige Strukturen aus, die aus sechs säulenförmig angeordneten Proteinmolekülen bestehen, die senkrecht zur Epithelwand als Hexamer angeordnet sind. Durch den Laminarfluss im Spinnkanal werden diese Hexamere neu ausgerichtet, bis deren Achse parallel zur Epithelwand liegt. Diese Anordnung wird als einfache nematische Textur bezeichnet. Im späteren Verlauf des Spinntraktes ziehen sich die Moleküle auseinander, bis sich zweilagige Scheiben bilden. Diese Anordnung der Moleküle ist komplexer und wird als „cellular optic“ Textur bezeichnet. Durch Interaktion der Moleküle, die die Scheiben bilden, entsteht der Seidenfaden.

Eine Kombination aus den beiden ersten Modellen beschreibt die Spinnlösung als lyotropen Flüssigkristall, der einen amphiphilen Charakter besitzt. Eine spontane Mizellenbildung kann bei niedrigen Proteinkonzentrationen auftreten, welche sich bei steigender Proteinkonzentration in eine Anordnung aus hexagonalen Säulen ändert. Möglicherweise basieren die unterschiedlichen Modelle auf Beobachtungen, die bei verschiedenen Proteinkonzentrationen gemacht wurden (Heim, Keerl et al. 2009).

Ein drittes Modell (Abbildung 1.5 (C)) diskutiert die Fadenentstehung nach dem Nukleations-Aggregations-Mechanismus, der auch die Grundlage für die Entstehung amyloider Fibrillen darstellt (Li, Zhou et al. 2001). Durch eine Um- oder Fehlfaltung von Proteinmonomeren bildet sich ein Keim, an den sich weitere Proteinmonomere anlagern. Durch die Anlagerung ändern auch diese Proteinmoleküle ihren Faltungszustand und es kommt zum Fibrillenwachstum. Wenn die entstandenen Fibrillen eine kritische Größe erreicht haben, brechen sie und die Bruchstücke lagern weitere Proteinmonomere an (Scheibel, Bloom et al. 2004; Fandrich 2007). Im Vergleich zur Bildungskinetik eines Seidenfadens *in vivo* erscheint die Bildung von amyloiden Fibrillen zu langsam, um dabei eine ausschlaggebende Rolle zu spielen. Jedoch wurden bereits Nanofibrillen mit amyloidem Charakter in der B-Zone des Drüsenlumens beschrieben (Kenney, Knight et al. 2002). Die Untersuchung der Sekundärstruktur der Proteinlösung im Verlauf des Spinntraktes mit Raman-

Spektromikroskopie beschreibt die Entstehung von β -Faltblättern in der ersten und zweiten Windung. Es wird diskutiert, ob diese ersten β -Faltblätter eine wichtige Voraussetzung für die Fadenassemblierung sind, indem sie als Keime die Aggregation der Seidenproteine beschleunigen (Lefevre, Boudreault et al. 2008). Die Beobachtung, dass sich Cross- β -Seiden durch die Wirkung von Zug- und Scherkräften in Parallel- β -Seiden umwandeln können (Craig 1997) unterstützt zusätzlich das Modell, nach dem die Assemblierung der Seidenproteine über den Nukleations-Aggregations-Mechanismus stattfinden könnte.

1.1.4 Rekombinante Produktion von Spinnenseidenproteinen

Die Produktion von Spinnenseiden in großem Maßstab auf Farmen, ähnlich der Raupenseide des Seidenspinners *Bombyx mori*, ist wegen des kannibalistischen Verhaltens der meisten Spinnen nicht möglich. Deshalb ist die rekombinante Herstellung von Spinnenseide ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Anwendung als Biomaterial oder in der Technik.

Eine Möglichkeit zur Herstellung von Seidenproteinen ist die Expression in eukaryotischen Wirtsorganismen. Dazu gehören Hefen (*Pichia pastoris*) (Fahnestock and Bedzyk 1997), Zelllinien (MAC-T, BHK, Sf9) (Lazaris, Arcidiacono et al. 2002; Huemmerich, Scheibel et al. 2004), *Bombyx mori*, Pflanzen (Tabak, Kartoffel) (Scheller, Guhrs et al. 2001) und Säugetiere (Maus, Ziege) (Karatzas, Turner et al. 1998; Lazaris, Arcidiacono et al. 2002). In diesen Expressionssystemen sind die Erfolge der Proteinproduktion unterschiedlich. Zwar treten hier keine Probleme mit *Codon usage* oder der homologen Rekombination auf, die durch den hoch-repetitiven Aufbau der Seide möglich ist, aber die Reinigung der Seidenproteine gestaltet sich oft schwierig oder die Proteinausbeuten sind zu gering.

Zur industriellen Produktion rekombinanter Proteine oft genutzte und kostengünstige Wirtsorganismen sind Bakterien wie *Escherichia coli*. Jedoch kann in diesem System nur eine limitierte Proteingröße produziert werden, weswegen die Herstellung der in der Regel sehr großen authentischen Spinnenseidenproteine (Größe der Gene: bis 15 Mbp) nicht möglich ist. Des Weiteren stellen die homologe Rekombination repetitiver Sequenzen in *E. coli* und die unterschiedliche *Codon usage* von Prokaryoten und Eukaryoten ein Problem dar (Vendrey, Ackerschott et al. 2008). Aus diesen Gründen muss für eine erfolgreiche Expression die genetische Information optimiert werden. Huemmerich et al. verwendeten ein System zur Produktion von rekombinanten Spinnenseidenproteinen in *Escherichia coli* (Huemmerich, Helsen et al. 2004). Dazu wurden charakteristische Sequenzmotive, die die *Dragline*-Proteine ADF3 und ADF4 der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* am besten widerspiegeln,

definiert. Die beiden Motive aus ADF3 werden als Module A und Q, das Motiv aus ADF4 als Modul C bezeichnet. Oligonukleotide, die diese Motive codieren wurden, mit für *Escherichia coli* optimierter *Codon usage*, synthetisiert. Die zu Doppelsträngen hybridisierten Oligomere wurden durch verschiedene Klonierungsschritte multipliziert, um verschiedene rekombinante Spinnenseidengene und entsprechende Proteine zu erhalten. Die Gene der nicht-repetitiven Regionen, die bei *Araneus diadematus* für die carboxylterminale Region bereits beschrieben sind, wurden durch PCR amplifiziert (ADF3: Modul nr3, ADF4: Modul nr4) und konnten ebenfalls an die synthetischen repetitiven Einheiten nahtlos ligiert werden (Abbildung 1.6).

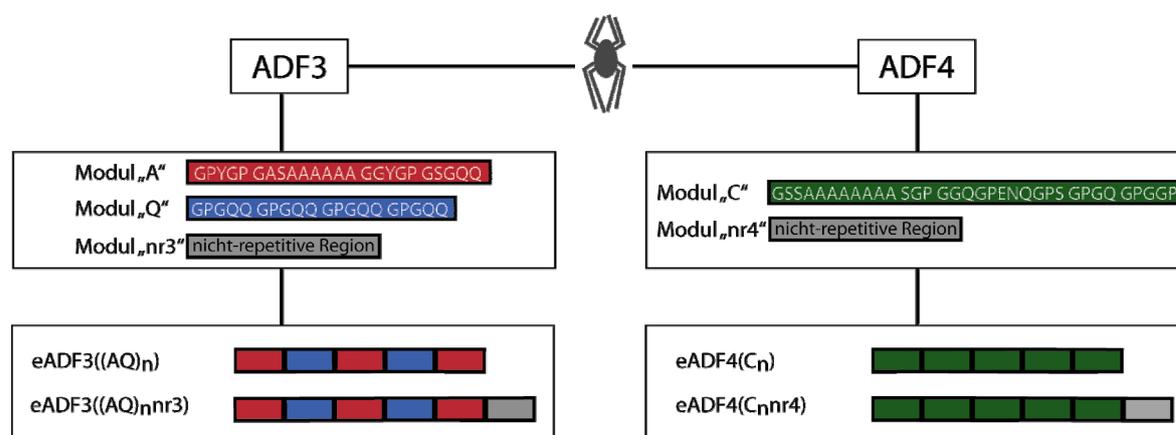


Abbildung 1.6: Zusammensetzung rekombinanter Seidenproteine basierend auf den *Dragline*-Seidenproteinen ADF3 und ADF4 von *Araneus diadematus*.

Durch entsprechende Klonierungsschritte können einzelne DNA-Motive beliebig miteinander verbunden werden. Somit spiegeln diese synthetischen Sequenzen die Konsensusmotive der Originalproteine ADF3 und ADF4 wider. Verschiedene Variationen der rekombinanten Seidenproteine in Größe und Modulabfolge sind möglich. Basierend auf der Sequenz von ADF3 wurden die rekombinanten Proteine eADF3((AQ)12) (MW = 48,1 kDa) und eADF3((AQ)24) (MW = 93,8 kDa) auch in Kombination mit der nicht-repetitiven Region eADF3(nr3) (MW = 13,3 kDa) hergestellt. Aus ADF4 leiten sich die Proteine eADF4(C16) (MW = 47,7) und eADF4(C32) (MW = 93 kDa) ab; auch hier ist die Kombination mit der nicht-repetitiven Region eADF4(nr4) (MW = 11,9 kDa) möglich.

Die Reinigung dieser rekombinanten Spinnenseidenproteine gestaltet sich durch die Verwendung von Hitze- und Präzipitationsschritten relativ einfach. Die Proteinausbeuten liegen zwischen 30 und 360 mg/L (Vendrely and Scheibel 2007).

1.2 Nativ entfaltete Proteine

Spinnenseidenproteine zählen in Lösung zu den so genannten nativ entfalteten Proteinen, welche sich durch eine geringe Kompaktheit, die Abwesenheit von globulären Bereichen, einen geringen Anteil an Sekundärstruktur und eine hohe Flexibilität auszeichnen. Die Grundlage für diese genannten Eigenschaften bildet eine niedrige Hydrophobizität und eine relativ hohe Nettoladung, denn nur unter diesen Voraussetzungen bleiben ungefaltete Proteine unter physiologischen Bedingungen stabil in Lösung (Uversky, Gillespie et al. 2000; Uversky 2002). In wässrigen Lösungen sind Proteine von einer hoch geordneten Hydrathülle umgeben, die für die Stabilität des gelösten Proteins verantwortlich ist. Werden verschiedene Faktoren wie Ionenzusammensetzung, pH-Wert oder Temperatur verändert, dann ändern sich vor allem die Eigenschaften dieser Hydrathülle, und das Protein reagiert mit Strukturbildung und/oder Aggregation (Grigsby, Blanch et al. 2001). Es können zwei Gruppen von nativ entfalteten Proteinen definiert werden (Uversky 2002; Fink 2005); eine Gruppe beinhaltet Proteine, die über die gesamte Länge entfaltet sind, der anderen gehören Proteine an, die größtenteils entfaltet sind aber trotzdem strukturierte Bereiche beinhalten. Zu dieser zweiten Gruppe gehören gelöste Spinnenseidenproteine. Entfaltete Bereiche in Proteinen sind sehr flexibel und besitzen eine große Oberfläche, was eine größere Kontaktfläche zur Interaktion zwischen Proteinmolekülen ermöglicht. Die *random coil*-Konformation stellt die einzige Möglichkeit dar, um optimale Bedingungen für Interaktionen zu schaffen (Fink 2005).

Die Hofmeister-Serie wurde von Lewith (Lewith 1888) und Hofmeister (Hofmeister 1888) experimentell bestimmt. Dabei wurde die minimale Konzentration von verschiedenen neutralen Salzen untersucht, die benötigt wird, um ein gelöstes Protein zu fällen. Bei den Hofmeister-Salzen wird zwischen kosmotropen (aussalzenden) und chaotropen (einsalzenden) Eigenschaften der Ionen unterschieden (Abbildung 1.7).

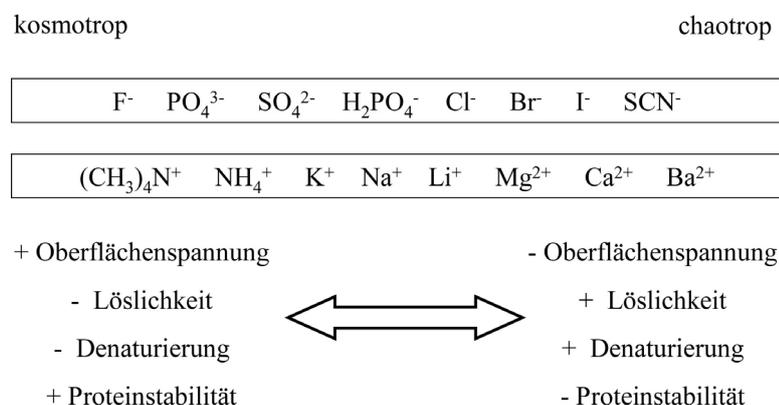


Abbildung 1.7: Ionen der Hofmeister-Serie.

Hofmeister-Effekte spielen im Bereich von mittleren bis höheren Salzkonzentrationen zwischen 1 und 5 M, die wichtigste Rolle. Die Salze wirken auf alle gelösten Spezies (Baldwin 1996). Dabei haben Anionen einen größeren Effekt als Kationen. Es gibt 3 verschiedene Klassen von Hofmeister-Salzen: Die polar kosmotropen wie Ammoniumsulfat, die chaotropen, wie Guanidiniumthiocyanat und die nicht-polaren kosmotropen wie nicht-ionische organische Moleküle, die aber eine untergeordnete Rolle spielen (Cacace, Landau et al. 1997).

Das generelle Prinzip der Wirkung von Ionen gemäß der Hofmeister-Serie liegt in einer Kombination der generellen Effekte von Salzen auf die Lösungsmittelstruktur und der spezifischen Effekte zwischen Salzen und dem gelösten Protein. Ursprünglich wurde der Einfluss verschiedener Ionen auf die Löslichkeit von Proteinen nur mit dem unterschiedlichen Hydratisierungsgrad von Salz und Protein beschrieben. Dabei entziehen kosmotrope Ionen, die sehr stark hydratisiert sind, dem Protein die Hydrathülle, gefolgt von Aggregation. Chaotrope Ionen haben den entgegengesetzten Effekt. Sie wirken destabilisierend auf das Protein und erhöhen dessen Löslichkeit. Somit spielen sowohl die Interaktion der Ionen mit dem Lösungsmittel Wasser als auch mit dem Protein eine große Rolle (Zhang and Cremer 2006). Auch der pH-Wert hat einen Effekt auf die Löslichkeit von Proteinen. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins, an dem das Verhältnis von positiven und negativen Ladungen im Protein ausgeglichen ist, definiert dabei dessen Eigenschaften. Bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes besitzt das Protein eine positive Nettoladung, während bei pH-Werten oberhalb des pI eine negative Nettoladung vorliegt. Je höher die Nettoladung ist, desto stärker ist die Coulomb'sche Abstoßung zwischen gleichen Ladungen und desto stabiler bleibt das Protein in Lösung. Ist das Protein ungeladen, steigt seine Tendenz zur Aggregatbildung.

Die Temperatur beeinflusst die Strukturierung von Proteinen ebenfalls. Eine Temperaturerhöhung begünstigt hydrophobe Wechselwirkungen im Protein, was einen hydrophoben Kollaps bewirkt (SenGupta and Scheibel 2007). Bei niedrigen Temperaturen zeigt z. B. α -Synuclein ein für ungefaltete Proteine typisches Fern-UV-CD-Spektrum mit einem Minimum bei 200 nm (Uversky 2002) während eine Erhöhung der Temperatur eine Sekundärstrukturbildung induziert. Diese Änderungen sind meistens vollständig reversibel. Somit zeigen nativ entfaltete Proteine ein gegensätzliches Verhalten zu *molten globules*, die durch eine Temperaturerhöhung reversibel entfaltet werden.

1.3 Der Einsatz von Seidenproteinen als Biomaterial

1.3.1 Biomaterialien und Werkstoffe

Als Biomaterial werden allgemein synthetische oder nicht-lebende natürliche Materialien oder Werkstoffe bezeichnet, die in der Medizin für therapeutische oder diagnostische Zwecke eingesetzt werden. Dabei ersetzen sie verlorengegangene Körperfunktionen entweder allein oder in Kombination mit elektrischen oder elektronischen Bauteilen (Epple 2003) und treten in chemische, physikalische und biologische Wechselwirkungen mit den entsprechenden biologischen Systemen. In der Forschung wird der Begriff „Biomaterial“ enger gefasst und beschreibt lediglich Materialien, die zum längerfristigen Verbleib im Körper gedacht sind.

Ein Biomaterial muss deshalb besondere chemische und physikalische Eigenschaften besitzen, um eine funktionelle Kompatibilität zu dem Organ oder dem Gewebe, das ersetzt werden soll zu gewährleisten. So sind vergleichbare Eigenschaften wie Härte, Elastizität, Plastizität oder Durchlässigkeit für verschiedene Substanzen eine wichtige Voraussetzung. Des Weiteren muss der eingesetzte Werkstoff eine möglichst große biologische Verträglichkeit aufweisen. Das ideale Biomaterial besitzt daher eine perfekte Erfüllung der funktionellen Eigenschaften kombiniert mit einer vollständigen Biokompatibilität, was eine uneingeschränkte Anwendung mit dauerhafter Funktion im Körper gewährleisten kann (Epple 2003). Biomaterialien sind keine homogene Werkstoffgruppe. Die ältesten eingesetzten Materialien sind Metalle wie Gold, Platin oder Titan. Diese zeichnen sich neben ihrer chemischen Beständigkeit durch eine hohe mechanische Festigkeit aus.

Natürliche Biopolymere wie Collagen, Chitosan (aus Chitin) oder Alginat (aus Seetang), die hauptsächlich zur Oberflächenbeschichtung verwendet werden um die Biokompatibilität zu erhöhen, finden heutzutage immer häufiger Anwendung. Die Seide des Seidenspinners *Bombyx mori* ist das erste Seidenmaterial, das im biomedizinischen Bereich als Wundverband oder Nahtmaterial eingesetzt wurde und immer noch wird (Moy, Lee et al. 1991). Diese Seide besitzt für diese Applikation wichtige Eigenschaften wie Reißfestigkeit, Elastizität, biologische Abbaubarkeit und gute Verknotbarkeit, jedoch wird deren Biokompatibilität diskutiert. Um eine Immunreaktion zu verhindern, muss bei der Raupenseide das Protein Sericin, das immunogene Eigenschaften besitzt, vollständig entfernt werden (Altman, Diaz et al. 2003). Ein potenzieller biologischer Werkstoff, der aufgrund seiner herausragenden Eigenschaften für den Einsatz im Bereich Biomaterialien in den Fokus der Forschung gerückt ist, ist Spinnenseide (Altman, Diaz et al. 2003; Vendrely and Scheibel 2007; Wang, Wenk et al. 2007). Sie besitzt exzellente mechanische Eigenschaften wie eine hohe Reißfestigkeit und

eine geringe Dichte, ist antimikrobiell, hypoallergen und vollständig biologisch abbaubar. Auch Spinnenseide wurde schon sehr früh zur Wundversorgung als Verbandsmaterial verwendet (Hardy, Roemer et al. 2008; Romer and Scheibel 2008).

1.3.2 Erweitertes Einsatzspektrum von Biopolymeren durch verschiedene Morphologien

Da Biomaterialien in den verschiedensten Bereichen, angefangen von Verbandsmaterial über Implantate, als Ersatz für Knochen oder Gefäße, bis hin zur Herz-Lungenmaschine ihren Einsatz finden, sind verschiedene Verarbeitungsformen von Interessen.

Aus den Seidenproteinen von Seidenspinnern und verschiedenen Spinnenarten können, abhängig von der Weiterverarbeitung des Rohproteins, nicht nur Fäden nach dem Vorbild der Natur, sondern auch eine Reihe anderer Assemblierungsformen wie Vliese, Hydrogele, Mikrokugeln, Folien, Schäume oder Mikrokapseln gebildet werden (Abbildung 1.8).

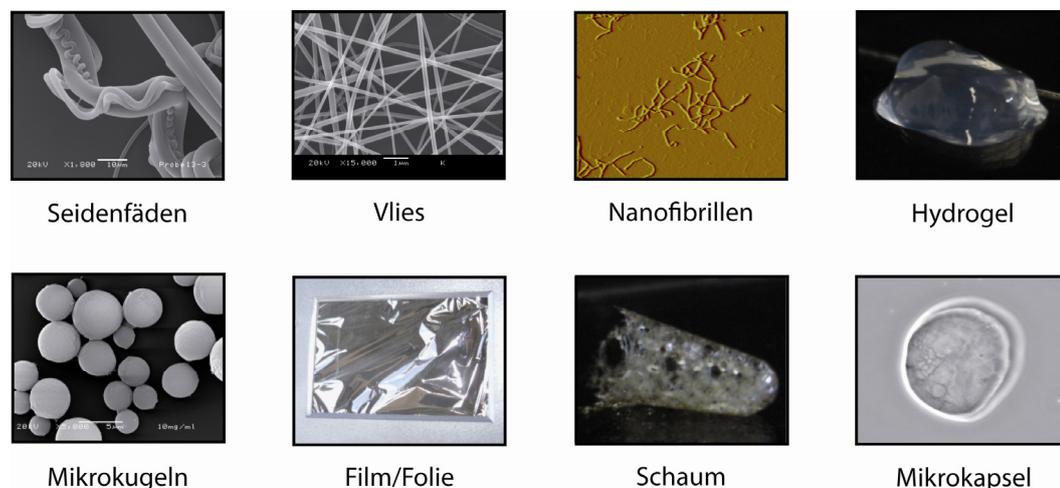


Abbildung 1.8: Verschiedene Morphologien, die aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen, abhängig von der Weiterverarbeitung des Rohproteins gebildet werden können.

Vliese aus Seidenproteinen können durch die Methode des Elektrosplinnens hergestellt werden (Greiner and Wendorff 2007). Die daraus entstandenen Fasern haben variable Durchmesser im Nanometer- bis Mikrometermaßstab. Viele Studien wurden mit dem Fibroin der Seidenspinner *Bombyx mori* und *Samia cynthia ricini* aber auch mit Proteinen der *Dragline*-Seide von *Nephila clavipes* gemacht. Die besten Resultate (homogene Fasern) erhält man bei dieser Methode unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie

Hexafluoroisopropanol oder Hexafluoroaceton-Hydrat, die jedoch teuer und nicht umweltverträglich sind (Ohgo, Zhao et al. 2003). Wässrige Lösungen besitzen jedoch meistens eine zu geringe Viskosität und Oberflächenspannung, um sich erfolgreich elektroverspinnen zu lassen. Deshalb muss z. B. Polyethylenoxid der Seidenlösung beigemischt werden, um die Viskosität zu erhöhen (Jin, Fridrikh et al. 2002). Vliese aus Seidenproteinen könnten als Wundabdeckung oder als Trägersubstanz für die *in vitro* Gewebekultur dienen.

Der Grundbaustein von Hydrogelen sind nanofibrilläre Strukturen (Rammensee, Huemmerich et al. 2005; Slotta, Hess et al. 2007). Fibroin von *Bombyx mori* welches in hohen Konzentrationen gelöst ist, (> 23 % (w/v)) bildet spontan Hydrogele. Dieser Prozess kann durch eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration oder der Temperatur, einem pH-Wert nahe dem isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins und der Zugabe von Ionen wie Ca^{2+} beschleunigt werden (Ayub, Arai et al. 1993; Kang, Nahm et al. 2000).

Kugeln aus Fibroin (*Bombyx mori*) mit einem Durchmesser über 100 μm können durch Sprühtrocknung produziert werden (Yeo 2003). Kleinere Mikrokugeln mit Durchmessern unter 2 μm können aus Raupenseide, durch die Verwendung von Lipidvesikeln als Template gebildet werden (Wang, Wenk et al. 2007). Das Lipid wird danach durch Waschstritte mit Methanol und Natriumchlorid entfernt, was gleichzeitig die Bildung von stabilen β -faltblattreichen Strukturen induziert. Eine weitere Methode zur Bildung von Mikrokugeln mittels GAS (Gas Anti-Solvent Fällungsprozess) wurde für Lysozym, Insulin und Myoglobin beschrieben (Thiering, Dehghani et al. 2000). Dabei werden nahezu kritische oder superkritische flüssige Anti-Solvente, wie flüssiges CO_2 , zur Fällung von Proteinlösungen verwendet. Die Durchmesser der Proteinkugeln liegen hier im Bereich von 0,05 bis 2 μm . Ziel der Herstellung von Proteinkugeln ist momentan hauptsächlich deren Verwendung im medizinischen Bereich. Dazu sind kleine Durchmesser, eine möglichst homogene Größenverteilung und, wie bei allen anderen Verarbeitungsmethoden, die Vermeidung giftiger Chemikalien im Produktionsprozess erforderlich. Mikrokapseln, lassen sich durch Assemblierung eines rekombinanten Spinnenseidenproteins an einer Toluol/Wasser-Grenzfläche herstellen (Hermanson, Harasim et al. 2007).

Folien können durch das Gießen von Proteinlösungen auf Oberflächen und anschließendem Abdampfen des Lösungsmittels hergestellt werden. Die so entstandenen Folien können abgezogen und verwendet oder chemisch und strukturell durch Nachbehandlung modifiziert werden. Auch hier finden sowohl wässrige als auch organische Lösungen Anwendung. So

wurden Filme aus *Bombyx mori*-Fibroin, das in Wasser, 1-Butyl-3-Methylimidazolchlorid, Hexafluoroisopropanol und Ameisensäure gelöst war, hergestellt.

1.4 Zielsetzung

Seiden von Spinnen sind aufgrund ihrer außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften sehr interessant für medizinische und technische Anwendungen. In dieser Arbeit wurden rekombinante Seidenproteine verwendet, welche von der *Dragline*-Seide der Europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* abgeleitet sind, wobei hauptsächlich das Protein eADF4(C16) analysiert wurde.

Diese Seidenproteine können neben den allgemein bekannten Seidenfäden und abhängig von der Weiterverarbeitung der Seidenproteinlösung auch diverse andere Morphologien wie Vliese, Filme, Mikrokugeln und Nanofibrillen (Hydrogele) bilden.

Eine generelle Charakterisierung der Ausgangsproteinlösung und die Kenntnis des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Assemblierung oder Aggregation der Seidenproteine ist die Grundvoraussetzung für deren Weiterverarbeitung. Dazu wurden die Sekundärstruktur der Proteine in wässrigen und organischen Lösungsmitteln und die Viskosität solcher Proteinlösungen analysiert. Oligomere Spezies haben ebenfalls Auswirkungen auf das Assemblierungsverhalten der untersuchten Seidenproteine, weswegen getestet wurde, ob sich diese ausreichend entfernen lassen. Bestimmte Ionenaustauschprozesse, eine pH-Wertänderung und Wasserresorption sind wichtige Parameter im natürlichen Spinnprozess, bei dem aus einer hochkonzentrierten Proteinlösung eine der stabilsten natürlichen Fasern entsteht. Deshalb befasst sich ein Teil dieser Arbeit mit dem Einfluss des Salzes Kaliumphosphat, des pH-Wertes, der Proteinkonzentration und des Molekulargewichtes auf die Aggregation des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16). Im Rahmen dieser Aggregationsuntersuchungen zeigte sich, dass die Salzkonzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie der Aggregate hat. Die so entstandenen Nanofibrillen und Mikrokugeln wurden hinsichtlich ihrer Morphologie, Struktur und Assemblierung genauer untersucht.

Die Eignung des Proteins eADF4(C16) für die Methode des Elektrosplennens wurde in dieser Arbeit getestet. Dabei wurden die optimalen Versuchsbedingungen, welche zur Bildung von Proteinvliesen mit homogenen Einzelfäden führen, untersucht. Des Weiteren wurden Morphologie und Sekundärstruktur der Vliese analysiert.

Es wurde untersucht, welche Lösungsmittel sich zur Herstellung von Seidenfilmen eignen und welche chemischen Eigenschaften daraus resultieren. Vor allem werden die Filme auf ihre Stabilität gegen Wasser und verschiedene Denaturierungsmittel untersucht. Dabei haben neben den verwendeten Lösungsmitteln sowohl die Proteine selbst als auch die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Seidenmolekülen einen entscheidenden Einfluss.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendetes Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|--|--------------------------------------|
| 1,1,1,3,3,3 Hexafluor-2-Propanol | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| 2-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Acrylamidlösung Rothiphorese Gel 40 | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ameisensäure, p. a. | Sigma-Aldrich, Seelze, 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 |
| Ethidiumbromid, 1 % | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA |
| Formaldehyd, 37 %, p. a. | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Glutardialdehyd, 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, für biochemische Zwecke | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Harstoff, p. a. | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Hefeextrakt, für die Biotechnologie | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Isopropylthiogalactosid (IPTG), > 99 % | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Kongo Rot, für die Mikroskopie | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS), > 85 % | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Thioflavin T | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), p. a. | Roth, Karlsruhe, Deutschland |

Anorganische Salze, Säuren und Basen sowie organische Lösungsmittel wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und

hatten, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p. a.. Für die Herstellung von Puffern wurde, soweit nicht anders vermerkt, zweifach destilliertes oder ultrareines Wasser aus einer Milli-Q-Anlage von Millipore (Billerica, MA, USA), verwendet.

2.1.2 Größenstandards und Kits

| | |
|---|------------------------------|
| Molekulargewichtsstandard Low Range (LMW) | BioRad, München, Deutschland |
| Wizard Plus SV Miniprep Kit | Promega, Madison, WI, USA |

2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

| Plasmid | Eigenschaften | Quelle |
|--------------------------|---|-------------------------------|
| pET21a-C16 | Resistenz: Ampicillin Promotor: T7 Insert: C16 | D. Hümmerich |
| pET21a-C32 | Resistenz: Ampicillin Promotor: T7 Insert: C32 | D. Hümmerich |
| pET21a-(AQ)24 | Resistenz: Ampicillin Promotor: T7 Insert: (AQ)24nr3 | D. Hümmerich |
| Bakterienstamm | Eigenschaften | Quelle |
| <i>E. coli</i> DH10B | $F^+ mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacX74 recA1 endA1$ $ara\Delta 139 \Delta(ara, leu)7697 gal/U$ $gal/K \lambda^- rpsL (Str^R) nupG$ | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| <i>E. coli</i> BLR (DE3) | $F^+ ompT hsdS_B(R_B^- m_B^-)$ $gal dcm (DE3) recA^-$ | Novagen, Madison, WI, USA |

Der *E. coli*-Stamm DH10B wurde zur Plasmidgewinnung und BLR (DE3) zur Expression der rekombinanten Spinnenseidenproteine unter dem T7-Promotorsystem verwendet.

2.1.4 Proteine

Lysozym Sigma, St. Louis, USA

In dieser Arbeit wurden folgende rekombinanten Spinnenseidenproteine verwendet:

| Natürliches Seidenprotein | Rekombinantes Seidenprotein | Quelle |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------|
| ADF3 (<i>A. diadematus</i>) | eADF3(AQ12nr3) | D. Hümmerich |
| ADF3 (<i>A. diadematus</i>) | eADF3(AQ24) | |
| ADF4 (<i>A. diadematus</i>) | eADF4(C16) | |
| ADF4 (<i>A. diadematus</i>) | eADF4(C16nr4) | D. Hümmerich |
| ADF4 (<i>A. diadematus</i>) | eADF4(C32) | |

2.1.5 Geräte

| Gerät | Modell | Firma |
|--------------------------------|-----------------------------|---|
| Absorptionsspektrometer | Cary 50 Bio | Varian, Darmstadt, Deutschland |
| | Cary 100 Bio | Varian, Darmstadt, Deutschland |
| Analysenwaage | BP 121 S | Satorius, Göttingen, Deutschland |
| Chromatographieanalge | ÄktaFPLC | GE Healthcare, Umeå, Schweden |
| CD-Spektrometer | Jasco J-715 | Jasco Int. Co. Ltd., Tokyo, Japan |
| | Jasco J-815 | Jasco Int. Co. Ltd., Tokyo, Japan |
| Cryo-Probenvorbereitungskammer | Gatan ALTO2500 | Gatan Inc. Pleasanton, CA, USA |
| Fluoreszenzspektrometer | Spex FluoroMax-3 | Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA |
| | Jasco FP-6500 | Jasco Int. Co. Ltd., Tokyo, Japan |
| FTIR-Spektrometer | IFS 66 s | Bruker AXS Inc., Madison, USA |
| | Tensor 27 (Ge-ATR-Kristall) | Bruker AXS Inc., Madison, USA |
| | Bio-Rad FTS 6000 | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Gelelektrophoreseapparatur | Hoefer SE250 | GE Helthcare, München, Deutschland |
| | Mighty Small II | |
| Kühlzentrifuge | Avanti J-25 | Beckmann Coulter Inc., Fullerton, CA, USA |
| | Rotoren: JA10+, JA25.50 | |
| Lyophilie | Unikat | Med. Techn. Laborgeräte, J. H. Schrader, Friedland, Deutschland |
| Rasterelektronenmikroskop | JSM-5900LV | Jeol Ltd., Tokyo, Japan |

| | | |
|---------------------------------------|---|--|
| | Hitachi S-4800 | Hitachi, Tokyo, Japan |
| Rasterkraftmikroskop | Multimode SPM | Veeco Instrument Inc., Woodbury, NY, USA |
| Rheometer | Physica MCR 301 | Anton Paar, Graz, Österreich |
| Stopped-Flow | Bio Sequential SX18MmV | Applied Photophysics, Foster City, CA, USA |
| Transmissionselektronen- mikroskop | 100 CX | Jeol Ltd., Tokyo, Japan |
| Ultraschallgenerator | HD/UW2200 Sonde: KE76 | Bandelin, Berlin, Deutschland |
| Ultrazentrifuge | Optima MAX-E Rotor: TLA-45 Optima MAX-XP Rotor: TLA-55 | Beckmann Coulter Inc., Fullerton, CA, USA Beckmann Coulter Inc., Fullerton, CA, USA |

2.1.6 Sonstige Materialien

| | |
|--|--|
| AFM-Plättchen, 15 mm | Ted Pella, Redding, USA |
| Glimmer | Veeco Instruments Inc. Woodbury, NY, USA |
| Pointprobe NCH-50 (Siliziumnitrid, Radius ~ 7 nm) | Nanosensors, Neuchatel, Schweiz |
| Kupfer Grids Square 300 Mesh | Plano W Planet GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Leitsilber | Plano W Planet GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Quarzglas Suprasil Küvetten (unterschiedliche Ausführungen) | Hellma, Mühlheim, Deutschland |
| Spectrapore Dialysemembran 1 (MWCO 6-8 kDa) | Spectrum Laboratories Inc. Rancho Domingues, CA, USA |
| Superdex 200 10/300 GL | GE Healthcare, Umeå, Schweden |
| Thermanox® plastic cover slips | Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA |

Alle sonstigen Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.7 Computerprogramme

| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| Adobe Design Standard CS3 | Adobe, San Jose, CA, USA |
| Microsoft Office | Microsoft, Redmond, USA |
| OriginPro 7.5G | OriginLab, Northampton, USA |
| Nanoscope software | Veeco, Santa Barbara, USA |
| OPUS software | Bruker AXS Inc., Madison, USA |

2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Medien

LB₀-Medium 10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl (pH 7,2)
für Platten: + 15 g/l Agar-Agar

Antibiotikum 100 µg/ml

Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Lösung A 3 M Natriumacetat (pH 5,5), 1 M CaCl₂, 2,8 M MnCl₂
(sterilfiltriert)

Lösung A-Glyzerin 13 % (v/v) Lösung A, 87 % (v/v) Glyzerin

Puffer für die Proteinreinigung

Puffer 1 100 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH 7,5), 2,5 % (w/v) Lysozym

Puffer 2 10 mM (NH₄)HCO₃ (pH 7,8)

SDS-PAGE

Auftragspuffer (5x Lämmli) 300 mM Tris/HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glyzerin, 10 % (w/v)
SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol

Trenngelpuffer (4x) 1.5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,8 % (w/v) SDS

Sammelgelpuffer (2x) 250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS

Laufpuffer (10x) 250 mM Tris/HCl (pH 8,8), 2 M Glycin (v/v), 1% (w/v) SDS

Silberfärbung

| | |
|------------------|--|
| Fix I | 30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure |
| Fix II | 0,4 M Natriumacetatpuffer (pH 6,0), 0,5 % (v/v) Eisessig, 30 % (v/v) Ethanol auf 100 ml frisch zugefügt: 0,1 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ , 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd |
| Färbelösung | 6 mM AgNO ₃ 0,025 % (v/v) Formaldehyd |
| Entwicklerlösung | 235 mM Na ₂ CO ₃ , 0,36 % (v/v) Formaldehyd |
| Stopplösung | 50 mM EDTA (pH 7,5) |

Puffer für Assays

| | |
|--------------|--|
| pH 1 – pH 2 | 0,1 M Glycin/HCl |
| pH 3 – pH 6 | 0,1 M Citrat/NaOH |
| pH 7 – pH 8 | 0,1 M Tris/HCl |
| pH 9 – pH 10 | 0,1 M Glycin/NaOH |
| CRBB | 5 mM Kaliumphosphatpuffer (pH6,8), 150 mM NaCl |

2.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken**2.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli***

Ausstrichkulturen von *E. coli* auf Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und zur Lagerung im Kühlschrank unter Luftausschluss aufbewahrt. Die Anzucht von Einzelkolonien in 4 ml Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium unter Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin. Größere Volumina wurden mit entsprechenden Vorkulturen, die zur Entfernung der sezernierten β-Lactamase abzentrifugiert (5000 x g) und in frischem Medium resuspendiert wurden, überimpft. Volumina bis 4 ml wurden im Reagenzglasroller, Kulturen über 10 ml im Umluftschüttelinkubator inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch verfolgt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa 2,5 x 10⁸ Zellen/ml (Sambrook and Russel 2001). Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 300 µl 50 % (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden die entsprechenden Stämme nach Sambrook & Russel (2001) kompetent gemacht. Dazu wurde eine frische 100 ml Flüssigkultur mit einer OD_{600} zwischen 0,5 bis 1,0 mit 2 ml 1 M $MgCl_2$ versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 60 min auf Eis gekühlt und 5 min bei 4 °C und 5000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Lösung A resuspendiert und weitere 60 min auf Eis gekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4 °C wurde das Pellet in 2 ml Lösung A-Glyzerin aufgenommen und die Zellen in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt. Die Zellen können zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert werden oder direkt mit maximal 10 % (v/v) Plasmid-DNA transformiert werden. Die mit der Plasmid-DNA versetzten kompetenten Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und einem Hitzeschritt (1 min, 42 °C) unterzogen. Anschließend wurden die Zellen sofort auf Eis abgekühlt und nach der Zugabe von 500 µl LB_0 40 min im Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Danach wurden ca. 100 µl der Bakteriensuspension auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.3 Präparation und Reinigung von DNA

Für die Präparation und Reinigung von DNA aus dem *E. coli*-Stamm DH10B wurde folgender Kit, den Herstellerangaben entsprechend, verwendet:

Wizard Plus SV Miniprep Kit

Promega, Madison, WI, USA

Die Lagerung der isolierten DNA in entionisiertem Wasser erfolgte bei -20 °C.

2.3 Expression und Reinigung

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

Zur Herstellung der rekombinanten Spinnenseidenproteine eADF4(AQ)24, eADF4(C16) und eADF4(C32) wurde der *E. coli*-Stamm BLR(DE3) verwendet. Die Anzucht wurde in LB_{Amp} -Medium in Schüttelkolben (2 l pro Kolben) durchgeführt. Diese wurden mit einer 4 ml

Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen bei 25 °C weiter inkubiert. Danach wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (6.371 x g, 20 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 35 ml Puffer 1 resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

2.3.2 Proteinreinigung

Die rekombinanten Spinnenseidenproteine eADF3(AQ)24, eADF4(C16) und eADF4(C32) wurden nach dem Protokoll von Huemmerich et al. (Huemmerich, Helsen et al. 2004), durch Hitze- und Fällungsschritte gereinigt.

Das bei -80 °C eingefrorene Zellpellet wurde in warmem Wasser aufgetaut und nachdem Lysozym zugegeben wurde, erfolgte eine Inkubation des Zellpellets auf Eis für 20 Minuten. Im Anschluss daran erfolgte eine Ultraschallbehandlung (TLA 45, 5 x 15 s bei 60 %) der Zellsuspension, um die Effizienz des Zellaufschlusses weiter zu erhöhen. Nach einem Zentrifugationsschritt (48.348 x g) wurde der Überstand, der alle löslichen Proteine enthält, für 20 Minuten auf 80 °C erhitzt. Dabei hitzedenaturieren die meisten *E. coli*-Proteine und fallen aus, während die rekombinanten Spinnenseidenproteine weiterhin in Lösung bleiben. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (48.348 x g) wurden die aggregierten *E.coli*-Proteine entfernt, der Überstand wird weiterverarbeitet. Die gewünschten rekombinanten Spinnenseidenproteine wurden durch die Zugabe von 30 % (w/v) Ammoniumsulfat für ca. 1 Stunde gefällt.

Im Fall von eADF4(C16) und eADF4(C32) wird das Pellet, um die Reinheit weiter zu erhöhen, zuerst mit 8 M Harnstoff und danach mit MilliQ-Wasser gewaschen. Dieser Schritt ist bei eADF3(AQ)24 nicht möglich. Deshalb wird dieses Protein in 6 M Guanidiniumhydrochlorid gelöst und gegen Puffer 2 dialysiert. Zur langfristigen Aufbewahrung der Proteine werden diese nun mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, lyophilisiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Reinheit der Proteine wurde mit Fluoreszenzspektroskopie (siehe 2.4.3.2) unter Analyse des Tyrosin- und Tryptophanspektrums, mit SDS-Page (siehe 2.4.1.1) und Größenausschlusschromatographie (siehe 2.4.1.3) bestimmt.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Bestimmung der Reinheit

2.4.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Diese Methode beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld, bei der die Ladung, die Größe und die Form des Moleküls die entscheidende Rolle spielt.

In dieser Arbeit wurden SDS-Gele der Größe 10 x 8 x 0,075 cm mit 12,5 % Trenngel und 3 % Sammelgel verwendet (Fling and Gregerson 1986). Zu Trenngel- und Sammelgelpuffer wurde APS und TEMED zugegeben, um die Polymerisierungsreaktion zu starten und danach die Gellösung in eine entsprechende Vorrichtung gegossen.

Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese in 1 x Lämmli-Auftragspuffer zur vollständigen Denaturierung für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt (Laemmli 1970) und aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteine wurden zusätzlich Proteinstandards aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA je Gel für 45 bis 60 Minuten.

2.4.1.2 Silberfärbung von Proteingelen

Die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine werden bei dieser Färbemethode zuerst im Gel fixiert. Dazu wird das Gel 20 Minuten in Fix I und anschließend 30 Minuten in Fix II geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen des Gels mit H_2O_{dd} wird die Färbelösung zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Bei diesem Schritt komplexieren die Proteine einige Silberionen. Die Zugabe der Entwicklerlösung die ein starkes Reduktionsmittel enthält führt zur Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber. Da Peptidbindungen und funktionelle Gruppen bereits vor Zugabe des Reduktionsmittels eine reduzierende Wirkung haben, färben sich die Proteinbanden viel schneller als der Hintergrund braun bis schwarz. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 mM EDTA durch Komplexbildung der restlichen Silberionen gestoppt (Heukeshoven and Dernick 1988). Die Silberfärbung ermöglicht die Detektion geringer Proteinmengen mit einer Nachweisgrenze von 10 ng.

2.4.1.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Das gelöste Protein eADF4(C16) wurde hinsichtlich höherer oligomerer Spezies und Verunreinigungen mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) analysiert. Dabei werden Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt, was durch die unterschiedliche Permeation der Analyten in das poröse Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße bewirkt wird. Je kleiner die Moleküle sind, umso besser können sie in die Poren diffundieren, weswegen diese Moleküle eine Verzögerung erfahren. Somit haben die kleinsten Komponenten die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und werden zuletzt eluiert.

In den Experimenten wurde als stationäre Phase eine Superdex 200 (GE Healthcare) und als mobile Phase 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) verwendet. Es wurde ein Probenvolumen von 15 μ l (Probenpuffer 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)) auf die Säule aufgetragen. Die Flußrate betrug während des Experiments 0,7 ml/min. Die Detektion des Proteins erfolgte photo-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm.

2.4.1.4 Statische Lichtstreuung

Die molare Masse der durch die Größenausschlusschromatographie aufgetrennten Proteine erfolgte durch den an die Säule angeschlossenen Lichtstredetektor DawnEOS. Die Lichtstreuung ist direkt proportional zur molaren Masse eines Partikels und kommt daher ohne die Verwendung von Proteinstandards aus (Zimm 1948). Die Proteinkonzentration wurde über die UV-Absorption bei 280 nm berechnet und die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes Astra. Das für die Auswertung verwendete Brechungsindexinkrement (dn/dc) betrug 0,185, welches ein Standardwert für Proteine ist.

2.4.2 Nachweis amyloider Fibrillen

2.4.2.1 Thioflavin T (ThT)

Eine Möglichkeit, amyloide Fibrillen zu detektieren, ist die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T (ThT). Bindet ThT an amyloide Strukturen steigt die Emission des Farbstoffes bei 482 nm an (Vassar and Culling 1959). Für ThT-Fluoreszenzmessungen wurde die zu untersuchende eADF4(C16)-Proteinlösung mit 200 μ M ThT in MilliQ-Wasser versetzt. Das Emissionsspektrum von ThT wurde von 470 bis 550 nm und einer Anregungswellenlänge von 450 nm gemessen.

2.4.2.2 Kongo Rot (CR)

Ein weiterer typischer Nachweis amyloider Fibrillen ist die Bindung von Kongo Rot an amyloide Strukturen (Klunk, Pettegrew et al. 1989). Durch die Bindung des Farbstoffes ändert sich dessen Absorptionsspektrum. Das Maximum verschiebt sich von orange zu rosa. Kongo Rot wurde in dem Puffer CRBB aufgenommen, zweimal sterilfiltriert und auf eine Konzentration von 12,5 μM eingestellt. Die Konzentration der reinen Kongo Rot-Lösung konnte durch die Absorption bei 540 nm ($\epsilon_{540} = 25295 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und 477 nm ($\epsilon_{477} = 46306 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet werden.

Zum Nachweis der amyloiden Eigenschaften des Spinnenseidenproteins eADF4(C16) wurden daraus gebildete Nanofibrillen mit 12,5 μM Kongo Rot-Lösung versetzt und in halbmikro Einmalküvetten im UV/Vis-Spektrometer von 400 bis 600 nm ein Spektrum aufgenommen.

2.4.3 Spektroskopische Methoden

2.4.3.1 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde die Methode der UV-Absorptionsspektroskopie verwendet. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann, bei bekanntem wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten ϵ , die Proteinkonzentration durch Messung der Extinktion E bei der entsprechenden Wellenlänge berechnet werden.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

(Lambert-Beer'sches Gesetz)

Dabei entspricht E der Extinktion, ϵ dem molaren Extinktionskoeffizienten, c der Konzentration der gelösten Substanz (mol/l) und d der Schichtdicke der Küvette (cm). Den Hauptbeitrag zur Absorption von Proteinen liefern die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin aber auch Phenylalanin und Cystein, die jedoch nur eine geringe Absorption besitzen, spielen hierbei eine Rolle (Cantor and Schimmel 1980; Pace and Schmid 1997).

Der Extinktionskoeffizient ϵ berechnet sich aus der Primärstruktur des Proteins und bezieht sich auf eine bestimmte Wellenlänge λ . Der Extinktionskoeffizient der rekombinanten Spinnenseidenproteine eADF4(C16) und eADF4(C32) wurde mit Hilfe des Programmes ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) basierend auf der Methode von Gill und Hippel (Gill and Vonhippel 1989) aus den bekannten Extinktionskoeffizienten von Tryptophan, Tyrosin und Cystin ermittelt.

$$\epsilon_{\lambda(\text{Protein})} = \epsilon_{\lambda(\text{Tryptophan})} \cdot n_{(\text{Tryptophan})} + \epsilon_{\lambda(\text{Tyrosin})} \cdot n_{(\text{Tyrosin})} + \epsilon_{\lambda(\text{Cystin})} \cdot n_{(\text{Cystin})}$$

Tabelle 2.1: Extinktionskoeffizienten der in der Arbeit verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine.

| Rekombinantes Spinnenseidenprotein | Molarer Extinktionskoeffizient ϵ |
|------------------------------------|---|
| eADF4(C16) | $\epsilon_{276} = 46400$ |
| eADF4(C32) | $\epsilon_{280} = 95360$ |

In allen Experimenten wurden Quarzglas Suprasil Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

2.4.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind für die so genannte „intrinsische Fluoreszenz“ von Proteinen verantwortlich. Dabei wird das Fluoreszenzverhalten 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 (PR 1980; Schmid 1997). Daher ergeben sich relative Empfindlichkeiten dieser bestimmten Aminosäuren für die Fluoreszenz zu etwa:

$$\text{Trp} : \text{Tyr} : \text{Phe} = 1100 : 200 : 8$$

Die intrinsische Fluoreszenz wurde zur Überprüfung der Reinheit der rekombinanten Spinnenseidenproteine, die kein Tryptophan und nur Tyrosin enthalten, verwendet. Deshalb sollte reines Protein lediglich das Emissionsspektrum von Tyrosin mit einem Maximum bei ca. 310 nm zeigen.

Extrinsische Fluoreszenz kann Proteinen durch spezielle Markierung (kovalent oder nichtkovalent) mit verschiedenen Fluorophoren verliehen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese zur Detektion amyloider Fibrillen, mit Thioflavin T, verwendet.

Tabelle 2.2: Auflistung der Messparameter für die Reinheitsbestimmung von rekombinanten Spinnenseidenproteinen und für Thioflavin T-Messungen.

| | Tyr/Trp | Thioflavin T |
|-----------------------|-------------|--------------|
| Anregungswellenlänge | 280 nm | 450 nm |
| Aufnahme der Emission | 300-400 nm | 470-520 nm |
| Spaltbreiten | 5 nm / 5 nm | 5 nm / 5 nm |
| Integrationszeit | 0,5 s | 0,5 s |

2.4.3.3 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Zirkulardichroismus zeichnet sich durch eine ungleiche Absorption von zirkular polarisiertem Licht an asymmetrischen optischen Zentren aus. Je nach der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes wird zwischen Nah-UV-Bereich (320 bis 250 nm) und Fern-UV-Bereich (250 bis 170 nm) unterschieden.

Zur Untersuchung von Faltungs- und Entfaltungsprozessen von Proteinen wird im Nah-UV-Bereich gemessen. Hierbei spielt die Absorption von aromatischen Aminosäuren in asymmetrischer Umgebung eine Rolle, weswegen dieser Bereich auch als aromatische Region bezeichnet wird. Nah-UV-CD-Spektren vermitteln für jedes Protein einen typischen, abstrakten Gesamteindruck. Zur Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen wird im Fern-UV-Bereich gemessen. In diesem Bereich liegen die $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Peptidbindung, welche abhängig von der Sekundärstruktur des Proteins unterschiedlich absorbiert. Dieser Bereich wird deshalb auch als Amidregion bezeichnet.

Tabelle 2.3: Zusammenfassung der charakteristischen Maxima und Minima im Fern-UV-Bereich bei der CD-Spektroskopie für bestimmte Proteinsekundärstrukturen.

| Sekundärstruktur | Minimum (nm) | Maximum (nm) |
|---------------------------------------|--------------|--------------|
| α -Helix | 208 und 222 | 192 |
| β -Faltblatt | 218 | 196 |
| unstrukturiert (<i>random coil</i>) | 195 | 212 |

Die Sekundärstrukturuntersuchungen von eADF4(C16) wurden in Lösung mit Proteinkonzentrationen von 100 bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ und Quarzküvetten mit Schichtdicken von 0,1 cm durchgeführt. Zur Untersuchung von Spinnenseidenfilmen aus rekombinanten

Seidenproteinen wurden diese direkt aus 0,01 % (w/v) Lösungen auf Quarzglasplättchen hergestellt.

Für die Messungen wurde ein Jasco 715 Spectropolarimeter mit folgenden Geräteeinstellungen verwendet:

| | |
|----------------------|-----------------|
| Wellenlängenbereich: | 200 nm – 250 nm |
| Auflösung: | 0,1 nm |
| Geschwindigkeit: | 50 nm/s |
| Response: | 1,0 s |
| Akkumulation: | 4 |

Aus der gemessenen Elliptizität Θ wurde die molare Elliptizität Θ_{MRW} (in grad cm² dmol⁻¹) nach Schmid (Schmid 1997) berechnet.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MW}{c \cdot d \cdot n}$$

Dabei ist Θ die gemessene Elliptizität (in grad), MW das Molekulargewicht des Proteins (in g mol⁻¹), c die Proteinkonzentration (in g l⁻¹), d die Schichtdicke der Küvette (cm) und n die Anzahl der Aminosäuren im Protein. Die molare Elliptizität Θ_{MRW} spiegelt den durchschnittlichen Beitrag einer Peptidbindung zur Elliptizität wieder.

2.4.3.4 Fouriertransformierte Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

Mit der Fourier Transform Infrarot Spektroskopie (FTIR) ist es möglich, die Sekundärstruktur von Proteinen zu untersuchen. Aus der Absorption der Peptidbindung ergeben sich für Proteine neun charakteristische Banden (Amid A, B, I, II, ...,VII). Die aussagekräftigste und für die Auswertung relevante Bande zur Bestimmung der Sekundärstruktur ist jedoch die Amid I-Bande, die im Wellenzahlbereich zwischen 1600 und 1700 cm⁻¹ liegt. Ihr Zugrunde liegt hauptsächlich die C=O-Streckschwingung der Peptidbindung. In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 2.4) sind die Absorptionsbereiche für die Sekundärstruktur von Proteinen in Wasser (Goormaghtigh, Cabiaux et al. 1994) zusammengefasst:

Tabelle 2.4: Zusammenfassung der charakteristischen Absorptionsbereiche die bestimmten Proteinsekundärstrukturen zugeordnet werden können.

| Sekundärstruktur | Amid I – Bande (cm^{-1}) | Amid II – Bande (cm^{-1}) |
|---------------------------------------|--|--------------------------------------|
| α -Helix | 1654 (1648 – 1657) | 1546 (1545 – 1550) |
| β -Faltblatt | 1633 (1623 – 1641) 1684 (1674 – 1695) | 1528 (1525 – 1532) |
| β -Turn/Schleifen | 1672 (1662 – 1682) | |
| unstrukturiert (<i>random coil</i>) | 1654 (1642 – 1657) | |

Die zu untersuchenden Proben wurden auf Kalziumfluoridplättchen präpariert. Die Analyse erfolgte in einem Bruker IR-Mikroskop (IRscope), das an ein IR-Spektrometer (IFA66/s) gekoppelt war. Es wurden Absorptionsspektren im Bereich von 700 bis 6000 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Die Sekundärstrukturanteile wurden durch Dekonvolution der Amid I-Bande mit Lorentz-Oszillatoren bestimmt (OriginPro 7.5).

Die Messungen zur Analyse von Filmen aus verschiedenen rekombinanten Spinnenseidenproteinen wurden freundlicherweise von Michael Tammer (Universität Leipzig, Institut für Experimentalphysik) durchgeführt.

2.4.3.5 Laserbeugungsspektroskopie

Die Partikelgrößen und ihre Größenverteilung von eADF4(C16)-Mikrokugeln wurden unter Verwendung eines Laserbeugungsspektrometers (Horiba, Partica LA-950, Japan) bestimmt. Die Grundlage der Laserbeugungsspektroskopie bildet die Tatsache, dass an Partikeln eine Lichtwelle durch Reflexion, Brechung oder Beugung gestreut wird. Kugelförmige Partikel zeigen dabei ein symmetrisches, teilchengrößenabhängiges Beugungsbild aus konzentrischen Kreisen. Der Partikeldurchmesser verhält sich dabei umgekehrt proportional zu den Radien der Beugungsringe bzw. der Beugungswinkel. Somit beugen kleine Partikel unter großen Winkeln und große Partikel unter kleinen Winkeln. Bei den Untersuchungen von eADF4(C16)-Mikrokugeln betrachtet man eine Mischung unterschiedlicher Partikelgrößen, was zu einer Überlagerung der verschiedenen Beugungsbilder zu einem komplexen Interferenzmuster führt. Dieses Interferenzmuster wird mathematisch mit der Gerätesoftware ausgewertet. Zur Bestimmung der Partikelgröße wurden Brechungsindices von 1,33 für Wasser und 1,60 für das Protein verwendet.

2.4.3.6 Röntgenbeugungsanalyse

Durch die Röntgenbeugung an Fibrillen (*X-ray fibre diffraction*) können, ebenso wie bei der Röntgenkristallographie durch Beugung eines Röntgenstrahls an einem Kristallgitter Aussagen über die Struktur eines Proteins getroffen werden. Wegen der regelmäßigen Anordnung der Atome, kommt es zur Interferenz der von den Atomen emittierten Röntgenstrahlung. Meist führt diese Interferenz zur Auslöschung, aber in bestimmten Richtungen ergibt eine konstruktive Interferenz einen in Bezug auf den Primärstrahl gebeugten Röntgenstrahl. Die Richtung des gebeugten Röntgenstrahls ist dabei von dem kristallinen Gitter abhängig (Lottspeich F. 1998). Bei der Röntgenkristallographie ist die regelmäßige, periodisch sich wiederholende räumliche Anordnung der Atome im Kristallgitter wichtig. Um diese Regelmäßigkeit bei fibrillären Proteinen zu erhalten, müssen bei der Röntgenbeugungsanalyse die Fibrillen möglichst parallel angeordnet werden, um die Beugung des Röntgenstrahls und somit sich wiederholende Strukturen innerhalb der Fibrille aufzeigen zu können.

Suspensionen von NM- und eADF4(C16)-Fibrillen wurden für eine partielle Ausrichtung zwischen zwei mit Wachs verschlossene Kapillaren plaziert und an der Luft getrocknet. Die Röntgenbeugungsmuster wurden unter Verwendung einer CuK- α rotierenden Anode und eines R-Achsen 4⁺⁺ Detektors mit einem Abstand von 160 oder 150 mm zwischen Detektor und Probe aufgenommen. Die Röntgenbeugungsmuster wurden mit der Software CrystalClear (MSC) geprüft und mit MOsflm ausgewertet. Die Messungen wurden freundlicherweise von Louise Serpell (University of Sussex, UK) durchgeführt.

2.4.4 Mikroskopische Methoden

2.4.4.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Bei der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) wird ein Bild von der Oberfläche einer Probe durch das mechanische Abtasten mit einer feinen Nadel erhalten. Dabei werden Anziehungs- bzw. Abstoßungskräfte zwischen der Spitze und der Probe gemessen (Binnig G. 1986). Die Bewegung der Probe in alle drei Raumkoordinaten wird dabei durch Piezokristalle vermittelt. Während des Scannens über die Probe wird die Auslenkung der Nadel durch die Reflexion eines Lasers detektiert und in ein Signal verwandelt (Auslenkung). 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-Piezo (Höhe) kann wie die Auslenkung

abgebildet werden und vermittelt so einen optischen Eindruck von der Probe. Es gibt verschiedene Messmethoden. Im *Tapping Mode* wird die Spitze an einem oszillierenden *Cantilever* über die Probe bewegt. Die Spitze steht hierbei nicht in ständigem Kontakt mit der Probe, was meist zu einer höheren lateralen Auflösung und weniger Beschädigung der Probe führt. Im *Contact Mode* steht die Spitze mit konstanter Kraft in ständigem Kontakt zur Probenoberfläche. Dabei auftretende Reibungskräfte können jedoch die Probe beschädigen und zu einer verzerrten Darstellung führen.

Die Untersuchung von Nanofibrillen, die aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen gebildet wurden erfolgte mit einem Multimode SPM Mikroskop im *Contact Mode*. Für die Probenpräparation wurden 10-30 µm Probe auf frisch gespaltene Glimmerplättchen, die auf AFM-Probenplättchen (Ø 15 mm) aufgeklebt waren, aufgetragen und für 3 min inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurde die Probe dreimal mit je 100 µl H₂O_{MQ} gewaschen und luftgetrocknet. Die AFM-Aufnahmen wurden an Luft mit Siliciumnitrid-*Cantilevern* (*Contact Mode*: DNP-S20, Veeco; Spitzenradius ~10 nm, Federkonstante 0,06 N/m) und einer Aufnahmegeschwindigkeit von 1,5 Hz durchgeführt. Für Höhen- und Breitenbestimmung wurde die Software Nanoscope (Veeco) verwendet.

2.4.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Um Aussagen über die Fibrillenmorphologie von eADF4(C16) zu erhalten wurde, neben der Rasterkraftmikroskopie (AFM), zusätzlich Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Dabei wird eine dünne Probe von Elektronen durchstrahlt und so auf einem Leuchtschirm abgebildet. Für die Probenpräparation wurden mit amorpher Kohlefolie beschichtete Kupfernetzchen (*Grids*) verwendet, die für eine bessere Probenadsorption, durch das Beglimmen unter Hochvakuum bei hoher Spannung kurzfristig einen hydrophilen Charakter bekamen. Zur Probenpräparation wurde ein *Grid* in den entsprechenden Reaktionsansatz getaucht. Nach einer Inkubationsdauer von 1 min wurde der Überstand mit einem Filterpapier entfernt. Anschließend wurden die *Grids* 2 x 30 s in MQ-Wasser getaucht. Für die Negativkontrastierung wurden 10 µl einer 1 % (w/v) Uranlyacetat-Lösung für 30 s auf dem *Grid* inkubiert. Danach wurde das überschüssige Uranlyacetat entfernt und die Probe getrocknet. Das Schwermetallsalz lagert sich bei diesem Schritt an die Proteine an und ermöglicht aufgrund seiner starken elektronenstreuenden Eigenschaften die Darstellung der Probe. Die Proben wurden in einem Jeol 100CX Transmissionselektronenmikroskop bei einer

Anodenspannung von 100 kV untersucht. Die Messungen wurden freundlicherweise von Bettina Richter vorgenommen.

2.4.4.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM) / Cryo-Rasterelektronenmikroskopie

Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) lassen sich Objektoberflächen mit einer hohen Tiefenschärfe und mit einem hohen Vergrößerungsfaktor darstellen. Für die Analyse der Proben müssen diese zuerst mit einer leitenden Schicht aus Gold bedampft werden. Das Meßprinzip des REM beruht auf der Abtastung einer Objektoberfläche mit einem fein gebündelten Elektronenstrahl. Sekundärelektronen, die dadurch hauptsächlich aus der Oberfläche herausgeschlagen werden, werden von einem Detektor registriert und das Signal in eine Bildinformation umgewandelt.

Für die rasterelektronischen Aufnahmen der Mikrokugeln aus eADF4(C16) wurden diese in Wasser resuspendiert und in entsprechender Menge auf Thermanox® *cover slips* aufgetragen und dort getrocknet. Die auf Aluminiumfolie elektrogewebenen Seidenvliese wurden mit Leitsilber direkt auf die REM-Probenträger aufgeklebt. Die Proben wurden anschließend mit Gold bedampft und in einem JSM 5900 LV Rasterelektronenmikroskop analysiert. Die Goldbedampfung sowie die Analyse der Proben im REM wurden freundlicherweise von Bettina Richter durchgeführt.

Für die Cryo-Rasterelektronenmikroskopie wurden die eADF4(C16)-Mikrokugeln auf einen Metallträger aufgetragen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden danach in eine Cryo-Probenvorbereitungskammer überführt und dort mit einer gekühlten Metallklinge geschnitten. Die Sublimation des Wassers erfolgte bei einer Temperaturdifferenz von 50 °C (Probe: -90 °C, Probenhalterung: -140 °C). Nach der Besputterung mit Gold-Palladium wurden die Proben in gefrorenem Zustand in einem Cryo-REM (Hitachi S-4800) bei -120 °C analysiert. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Stanislav Gorb durchgeführt.

2.4.5 Herstellung gelöster rekombinanter Spinnenseidenproteine

Rekombinant hergestellte Spinnenseidenproteine werden in lyophilisierter Form bei -20°C gelagert. Für die Herstellung wässriger Lösungen wurden die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine in 6 M Guanidiniumthiocyanat denaturiert. Danach erfolgte eine Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 4°C oder bei Raumtemperatur. Nach einem Zentrifugationsschritt bei $145.000 \times g$ für 30 Minuten bei 4°C , der zur Entfernung eventuell entstandener Aggregate diente, wurde die Konzentration an gelöstem Protein mittels UV-Vis-Absorptionsspektroskopie bestimmt.

2.5.5 Durchführung der Aggregationsassays

Die Aggregation des rekombinanten Spinnenseidenproteins abhängig von Salzkonzentration und pH-Wert wurde durch Aggregationsassays bestimmt (Abbildung 2.3). Dazu wurde gelöstes eADF4(C16) in 10 mM Tris/HCl wie beschrieben (siehe S. 41) hergestellt.

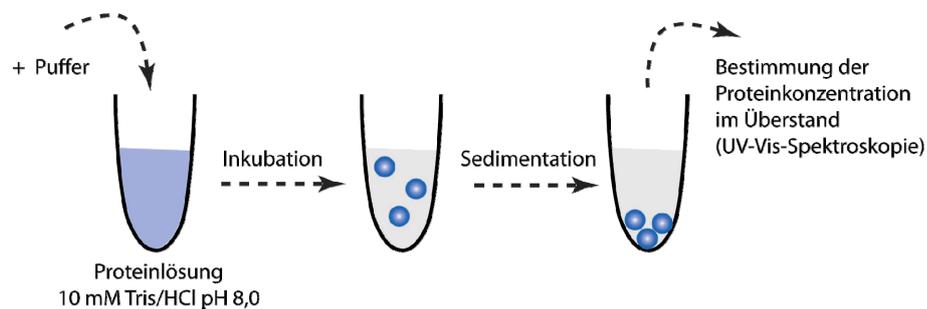


Abbildung 2.1: Durchführung der Aggregationsassays.

Zu einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde das gleiche Volumen des entsprechenden Puffers zugegeben. Die Salzkonzentration der pH-Puffer lag im finalen Ansatz bei 100 mM, um die Salzeffekte bei gleichzeitiger optimaler Pufferung des Systems zu minimieren. Bei der Untersuchung des Einflusses der Ionenstärke auf die Aggregation wurden finale Kaliumphosphatkonzentrationen zwischen 0 und 500 mM eingesetzt.

Die Ansätze wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 30°C im Thermoblock für 1 Stunde inkubiert. Die entstandenen Aggregate wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei $14.000 \times g$ für 5 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde sofort abgenommen und die in Lösung verbliebene Proteinkonzentration spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 276 nm bestimmt. Zur Auswertung wurde, ausgehend von der

Anfangsproteinkonzentration der prozentuale Anteil des verbliebenen gelösten Proteins berechnet.

2.4.7 Rheologie

Die Methode der Rheologie wird verwendet, um das Verformungs- und Fließverhalten von verschiedenen Materialien zu charakterisieren. Es können Informationen über Elastizität von Festkörpern, Viskosität von Flüssigkeiten und Relaxationsverhalten gewonnen werden. Die Materialien können anhand ihres Verformungs- und Fließverhaltens in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Man unterscheidet dabei Newton'sche Stoffe, Nicht-Newton'sche Stoffe, Gele und Festkörper.

Da die Materialfunktionen theoretisch oft nicht vollständig bestimmt werden können, werden die so genannten linear viskoelastischen Modelle zur Beschreibung herangezogen. Diese setzen sich aus linearen Federn, welche den elastischen Teil des Materials beschreiben, und Dämpfern, die dem viskosen Teil zugeordnet werden, zusammen. Federn und Dämpfer sind dabei starr miteinander verbunden. Zwei der wichtigsten Modelle sind das Maxwell-Modell (serielle Schaltung von Feder und Dämpfer) und das Voigt-Kelvin-Modell (parallele Schaltung von Feder und Dämpfer). Das Maxwell-Modell beschreibt viskoelastische Flüssigkeiten, das Voigt-Kelvin-Modell viskoelastische Festkörper.

Bei rheologischen Messungen zur Untersuchung der Viskosität wird die zu messende Flüssigkeit zwischen zwei Metallplatten eingebracht. Es wird angenommen dass die Flüssigkeit dazwischen mehrere Schichten bildet. Wenn eine Metallplatte bewegt wird, bewegt sich die erste Flüssigkeitsschicht mit, während die Schicht, die der starren Platte am nächsten ist ebenfalls starr ist. Die Flüssigkeitsschichten dazwischen gleiten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten aneinander vorbei. Die gemessene Kraft F , die zur Bewegung der einen Platte benötigt wird, ist proportional zu ihrer Fläche A sowie der Rotationsgeschwindigkeit v und antiproportional zum Abstand der Platten d .

$$F \sim \eta \frac{A \cdot v}{d}$$

Die Proportionalitätskonstante η beschreibt die dynamische Viskosität der Lösung. Ist η unabhängig von v spricht man von einer Newton'schen Flüssigkeit. Ist η abhängig von v ist die Flüssigkeit Nicht-Newton'sch.

Die rheologischen Untersuchungen an gelösten rekombinanten Spinnenseidenproteinen zur Bestimmung der Viskosität der Lösungen wurden mit einem Physica MCR 301-Rheometer vorgenommen. Verschiedene Lösungsmittel wie Hexafluoroisopropanol, Ameisensäure und 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) kamen zum Einsatz. Die Proteinkonzentrationen betragen zwischen 0,1 und 10,5 % (w/v). Es wurden 20 Meßpunkte bei einer Meßdauer von 5 Sekunden und einer Temperatur von 10 °C aufgenommen. Die Drehzahl betrug bei den Messungen 0,5 Hz.

2.4.8 Stopped-Flow-Messungen

Stopped-Flow-Messungen ermöglichen die Untersuchung von sehr schnell ablaufenden Reaktionen wie Enzymkinetiken. Die Reaktanden werden dazu in zwei verschiedene Spritzen vorgelegt. Nach einer raschen Durchmischung der applizierten Volumina wird der Reaktionsansatz in eine Beobachtungskammer geleitet, in der dieser spektroskopisch analysiert wird. Abhängig vom Detektionsgerät sind verschiedene Signale, wie Fluoreszenz, elektrische Leitfähigkeit oder CD-Signal möglich.

Die Entstehung von Mikrokugeln wurde in einem Stopped-Flow-Gerät (Bio Sequential SX 18 MmV, Applied Photophysics) unter Beobachtung des Streusignals über die Zeit gemessen. Für die Messungen wurde eine eADF4(C16)-Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml mit dem gleichen Volumen einer 1 M Kaliumphosphatlösung (1 M) gemischt und die Streuung bei einer Wellenlänge von 500 nm beobachtet.

2.5 Herstellung verschiedener Spinnenseidenmorphologien

2.5.1 Vliese (Elektrospinning)

Mit der Methode des Elektrospinnens lassen sich Vliese, hauptsächlich aus Polymerlösungen oder Polymerschmelzen, herstellen. Der Durchmesser der Einzelfäden variiert dabei zwischen wenigen Mikrometern bis hin zu wenigen Nanometern. Der schematische Aufbau einer klassischen Elektrospinningapparatur ist in Abbildung 2.1 gezeigt (Abbildung 2.1).

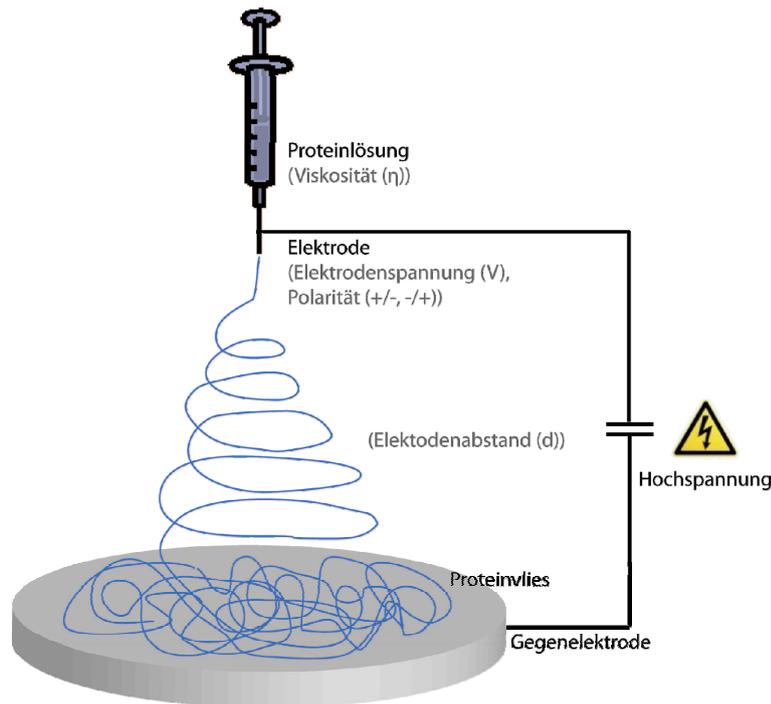


Abbildung 2.2: Aufbau einer Elektrospinningapparatur; die Variationsmöglichkeiten sind grau dargestellt.

Beim Elektrosponnen wird die Polymerschmelze oder –lösung durch eine dünne Nadel (Innendurchmesser ca. 100 μm) gepumpt. An diese Nadel ist eine Hochspannung angelegt und der Abstand zur Gegenelektrode beträgt im Labormaßstab 10 bis 25 cm. An der Nadelspitze entsteht ein kegelförmiger Tropfen, aus dem durch die angelegte Spannung Fäden entstehen, die sich dann auf der Gegenelektrode abscheiden. Auf der Distanz zwischen den Elektroden verdunstet das Lösungsmittel. Um die gewünschten Eigenschaften des Vlieses zu erhalten, können verschiedene Parameter verändert werden. So spielen sowohl die Eigenschaften des zu verspinnenden Polymers selbst (Molekulargewicht, Glasübergangstemperatur und Löslichkeit) als auch die Eigenschaften der Polymerlösung selbst (Viskosität, Viskoelastizität, Konzentration, Oberflächenspannung und elektrische Leitfähigkeit) eine große Rolle. Des Weiteren haben der Dampfdruck des Lösungsmittels, die relative Feuchte der Umgebung, die Feldstärke zwischen den Elektroden und die Zuflussrate des Polymers einen Einfluss auf die Vlieseigenschaften.

In den Experimenten zur Verspinnbarkeit des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) wurde das organische Lösungsmittel Hexafluoroisopropanol (HFIP) gewählt. Die getesteten Proteinkonzentrationen lagen im Bereich von 10 bis 20 % (w/v). Die

Elektrodenspannungen variierten für die Anode von 0 bis 8 kV und für die Kathode von 20 bis 25 kV und der Abstand zwischen den Elektroden betrug zwischen 10 und 20 cm.

2.5.2 Filme

Filme aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen können hergestellt werden, indem man eine Proteinlösung auf beliebige Oberflächen aufträgt und das Lösungsmittel abdampfen lässt (Abbildung 2.2)

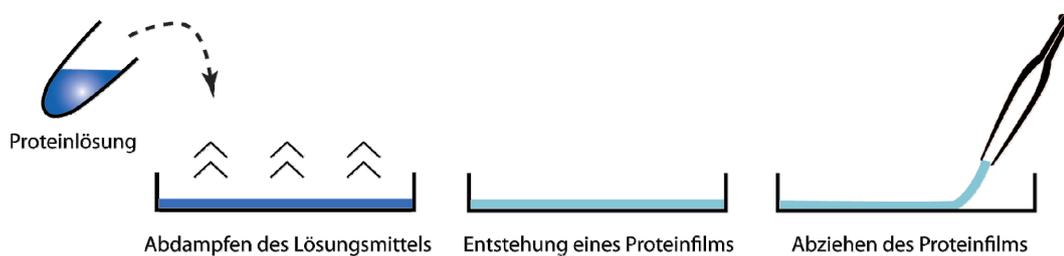


Abbildung 2.3: Herstellung eines Proteinfilms.

In dieser Arbeit wurden Filme auf Basis wässriger Lösungen, Hexafluoroisopropanol-lösungen und Ameisensäurelösungen hergestellt. Je höher dabei die Ausgangsprotein-konzentration ist, desto dicker und stabiler sind die resultierenden Filme. Es ist darauf zu achten, dass die verwendeten Spinnenseidenproteine vollständig gelöst sind und keine Aggregate vorhanden sind. Geeignete Konzentrationen zur Herstellung von Filmen, die sich gut von der Oberfläche abziehen lassen liegen über 2 % (w/v).

Zur spektroskopischen Untersuchung der Seidenproteinfilme wurden 100 μ l der entsprechenden Lösungen mit einer Konzentration von 0,01 % (w/v) für die CD-Spektroskopie auf Quarzglasplättchen und für die FTIR-Spektroskopie direkt auf dem ATR-Kristall hergestellt.

2.5.3 Fibrillen-assemblierung und Herstellung von Keimen

Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) bildet durch Selbstassemblierung aber auch abhängig von Faktoren wie Salzkonzentration oder Temperatur und der Zugabe von Keimen mit unterschiedlichen Kinetiken amyloide Fibrillen.

Zur Untersuchung der Fibrillenbildungskinetiken wurde gelöstes, monomeres Protein (siehe 2.4.5) unter den entsprechenden Bedingungen direkt in einer Quarzküvette oder in separaten Reaktionsansätzen im Thermomixer inkubiert und im CD-Spektrometer zur Analyse der Sekundärstruktur oder im Fluoreszenz-Spektrometer zur Analyse der Thioflavin-T-Bindung vermessen. Die Proteinkonzentration betrug in diesen Untersuchungen 0,25 mg/ml. Es wurden in den Versuchen Temperaturen von 30 °C und 60 °C sowie Salzkonzentrationen von 100 und 200 mM getestet.

Zur Bildung von Nanofibrillen ohne äußere Einflüsse wurde eADF4(C16) mit einer Konzentration von 2 mg/ml bei Raumtemperatur für eine Woche rotiert. Bei der Fibrillenassemblierung durch Rotation wird die Bildung der Keime und somit der gesamten Reaktion beschleunigt. Die dadurch gebildeten Nanofibrillen wurden zur Herstellung von Keimen (sehr kurze Fibrillen mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 100 nm) für die „geseedeten“ Fibrillenbildungskinetiken mit einer Ultraschallbehandlung zerkleinert. Dazu wurden 500 µl des rotierten Ansatzes in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in einem Kühlblock mit der Ultraschallsonde KE 76 (Bandelin) bei niedrigster Energie (10 %) 6 x 15 Sekunden behandelt. Die so hergestellten Keime wurden für die entsprechenden Fibrillenbildungsuntersuchungen in einer Konzentration von 10 % (w/w) eingesetzt.

2.5.4 Herstellung von Mikrokugeln

Zur Herstellung von Mikrokugeln aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16), wurde das Protein in unterschiedlichen Konzentrationen entweder durch die direkte Zugabe von kosmotropen Salzen in hohen Konzentrationen (bei Kaliumphosphat > 500 mM) zur Proteinlösung gefällt oder es erfolgte eine Dialyse des gelösten Proteins gegen 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Entfernung des Salzes wurden die Kugeln durch Zentrifugation (5 Minuten, 7.128 x g) sedimentiert und zweimal mit H₂O_{MQ} gewaschen.

2.5.5 Mikrofluidik

Die Assemblierung von rekombinanten Spinnenseidenproteinen in Abhängigkeit von Salzkonzentration, pH-Wert und Scherkräften wurde in einem Mikrofluidikkanal, welcher mittels *Rapid Prototyping* aus PDMS (Polydimethylsiloxan) hergestellt wurde, untersucht.

Dazu wurde das Design des Kanals mit einer Auflösung von 3000 dpi auf eine Transparentfolie gedruckt und anschließend auf einen Fotolack (SU-8 50 positive photoresist, Microchem, Newton, MA, USA) übertragen. Nach seiner Entwicklung dient der Fotolack als Vorlage für die PDMS-Struktur, welche als Flüssigkeit darauf aufgetragen wurde. Nach Aushärtung des PDMS für eine Stunde bei 70 °C wird der so entstandene Mikrofluidikkanal nach einer Plasmaoxidation von Glas und PDMS mit einem Standarddeckgläschen versiegelt. Um die Adhäsion der Seidenprotein an den Kanalwänden zu minimieren, wurde eine 1%ige (w/v)-Lösung eines F108 Blockcopolymers in die Kanäle gefüllt und für eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Vor der Verwendung wurden alle Kanäle mit 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) gespült. Für die Assemblierungsuntersuchungen wurde folgendes Design des Mikrofluidikkanals verwendet (Abbildung 2.4):

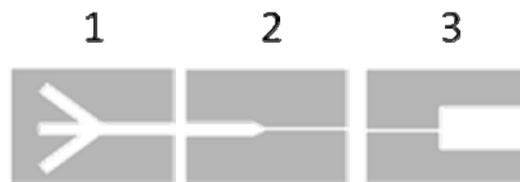


Abbildung 2.4: Design des in den Experimenten zur Fadenassemblierung verwendeten Mikrofluidikkanals. 1) Laminare Mischung; 2) Dehnströmung; 3) Kanal zur Analyse (Rammensee, Slotta et al. 2008). Der mittlere Kanal führt das Protein zu, während die beiden äußeren Kanäle dem Zufluss der entsprechenden Kaliumphosphatpuffer dienen.

Konstruktion und Design des Mikrofluidikkanals sowie die Experimente zur Fadenassemblierung im Mikrofluidikkanal wurden von Sebastian Rammensee (TU München) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der gelösten Spinnenseidenproteine

Aus gelösten Spinnenseidenproteinen können neben Fäden auch eine Vielzahl weiterer morphologischer Strukturen *in vitro* hergestellt werden. Da alle diese Morphologien, seien es Vliese, Folien, Mikrokugeln oder Fibrillen, aus derselben Proteinlösung entstehen, mussten die entsprechenden Assemblierungseigenschaften dazu in den intrinsischen Eigenschaften der gelösten Proteine liegen. Aus diesem Grund ist eine Charakterisierung der gelösten Spinnenseidenproteine von fundamentalem Interesse. Im folgenden Kapitel werden Lösungen verschiedener rekombinant hergestellter Spinnenseidenproteine hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur, Viskosität und Oligomerisierung untersucht.

3.1.1 Analyse der Sekundärstruktur

Die Information über Struktur und Konformation von Proteinen ist hauptsächlich durch die Primärstruktur festgelegt (Creighton 1990). Jedoch können Proteine im Zusammenspiel mit dem verwendeten Lösungsmittel verschiedene Sekundärstrukturen annehmen. Für die Sekundärstrukturuntersuchungen von gelöstem Protein wurden Lösungen des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 100 % Hexafluoroisopropanol (HFIP) mittels CD-Spektroskopie vermessen (Abbildung 3.1).

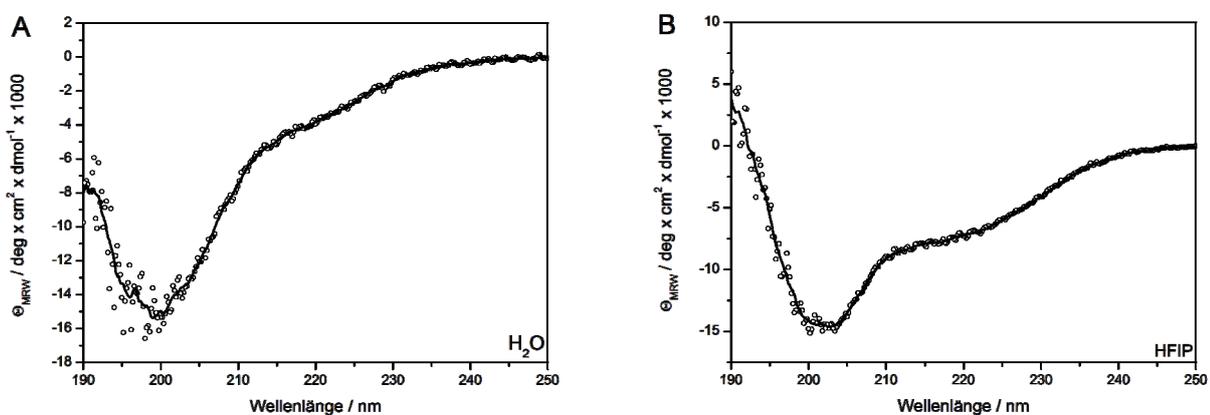


Abbildung 3.1: Fern-UV-CD-Spektroskopie von eADF4(C16)-Seidenproteinlösungen in wässriger Lösung (A) und in Hexafluoroisopropanol (HFIP) (B) (Huemmerich, Slotta et al. 2006).

Aus den Spektren wird ersichtlich, dass das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) abhängig vom Lösungsmittel verschiedene Sekundärstrukturanteile besitzt. Ein Minimum bei einer Wellenlänge unter 200 nm deutet bei beiden untersuchten Lösungsmitteln auf einen hohen Anteil an ungefalteten Proteinmolekülen hin (Abbildung 3.1). Somit gehört eADF4(C16), ebenso wie das Originalprotein ADF4 des Abseilfadens der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus*, zu der stetig wachsenden Gruppe der *in vitro* nativ entfalteten Proteine. Das Proteinspektrum der Hexafluoroisopropanollösung von eADF4(C16) besitzt neben einem Minimum bei ca. 200 nm eine Schulter im Bereich von 220 nm. (Abbildung 3.1B). Dies deutet auf einen erhöhten α -helikalen Anteil im ansonsten nativ entfalteten Protein hin. Es wurde bereits beschrieben, dass Proteine und Peptide unter Einfluss halogener Alkohole α -helikale Strukturen einnehmen (Sonnichsen, Van Eyk et al. 1992; Gast, Siemer et al. 2001). Dies gilt auch für Seidenfibroin aus *Bombyx mori* (Zhao, Yao et al. 2003) und ein rekombinantes Spinnenseidenprotein aus *Nephila clavipes* (Stephens, Fahnestock et al. 2005). Leider war es nicht möglich, eine Proteinlösung von eADF4(C16) in Ameisensäure aufgrund der starken optischen Aktivität des Lösungsmittels, zu untersuchen.

3.1.2 Analyse der Viskosität

Ein weiterer Parameter, der besonders für die Herstellung von Vliesen und Folien eine Rolle spielt, ist die Viskosität der Polymer- bzw. Proteinlösung. Deshalb wurde die Viskosität von Lösungen der rekombinanten Spinnenseidenproteine eADF3(AQ24nr3) und eADF4(C16) in den organischen Lösungsmitteln Hexafluoroisopropanol und Ameisensäure, sowie im wässrigen System (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) mittels rheologischer Messungen, in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, bestimmt (Abbildung 3.2). Die Messungen wurden bei einer Drehzahl $n = 30 \text{ min}^{-1}$ und einer Temperatur $10 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, um ein zu schnelles Abdampfen der flüchtigen Substanzen zu vermindern. Die Viskosität der reinen Lösungsmittel bei 20°C sind für Wasser $1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, für Ameisensäure $1,4 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ und für Hexafluoroisopropanol $1,65 \text{ mPa}\cdot\text{s}$.

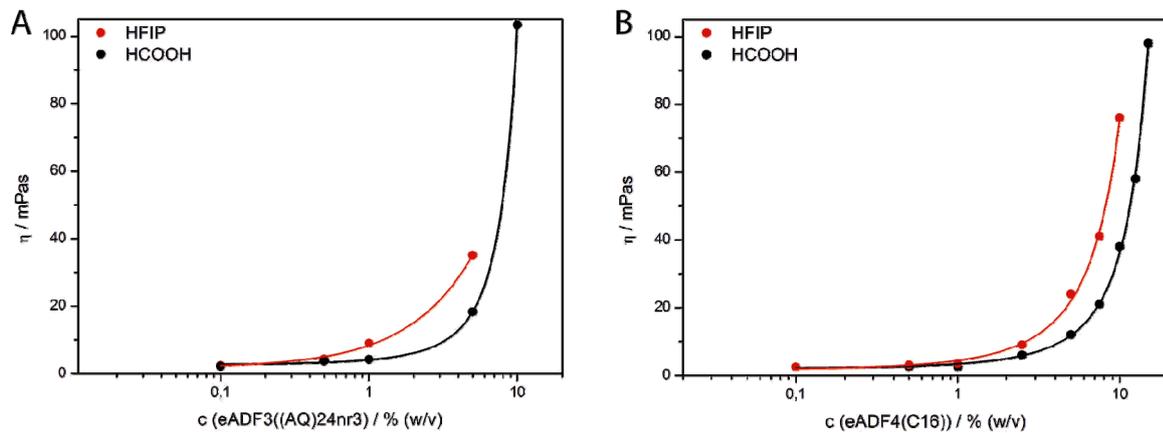


Abbildung 3.2: Viskosität η von Proteinlösungen der Seidenproteine eADF3(AQ24nr3) (A) und eADF4(C16) (B) in Ameisensäure und Hexafluoroisopropanol, abhängig von ihrer Konzentration.

Es zeigt sich, dass die Viskosität der Proteinlösung sowohl vom verwendeten Lösungsmittel als auch vom Protein selbst und dessen Konzentration abhängt. In Tabelle 3.1 sind die Viskositätswerte von Spinnenseidenproteinlösungen in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), Hexafluoroisopropanol und Ameisensäure, die als Lösungsmittel in den folgenden Versuchen verwendet wurden, vergleichend zusammengefasst. Um im wässrigen System eine Konzentration über 1 % (w/v) zu erreichen, erfolgte eine Dialyse des in 6 M Guanidiniumthiocyanat gelösten Proteins für zwei Stunden bei Raumtemperatur gegen 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und nach einem Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 186.000 x g und 4 °C eine sofortige rheologische Analyse.

Tabelle 3.1: Viskositätswerte in mPa·s der Spinnenseidenlösungen in Hexafluoroisopropanol, Ameisensäure und 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) aus rheologischen Messungen. (x = nicht bestimmt)

| Proteinkonzentration / % (w/v) | 0,1 | 0,5 | 1 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 |
|--------------------------------|------|------|------|-------|-------|------|--------|
| Hexafluoroisopropanol | | | | | | | |
| eADF3(AQ24nr3) | 2,47 | 4,33 | 8,99 | 35,05 | x | x | x |
| eADF4(C16) | 2,5 | 3,1 | 3,5 | 9 | 24 | 41 | 76 |
| Ameisensäure | | | | | | | |
| eADF3(AQ24nr3) | 2,21 | 3,76 | 4,25 | x | 18,28 | x | 103,34 |
| eADF4(C16) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 6 | 12 | 21 | 38 |
| Proteinkonzentration / % (w/v) | 0,85 | 1 | 1,7 | 2 | 3,3 | 4 | 10,5 |
| Wasser | | | | | | | |
| eADF3(AQ24nr3) | x | x | x | x | 3,66 | | 61,8 |
| eADF4(C16) | 1,69 | 1,69 | 2 | 2,53 | x | 3,66 | x |

Generell kann beobachtet werden, dass die Hexafluoroisopropanollösungen beider Proteine eine höhere Viskosität aufweisen als die entsprechenden Ameisensäure- oder Tris-Lösungen. Betrachtet man stellvertretend die Viskosität von eADF4(C16) bei einer Proteinkonzentration von 1 % (w/v) (in Tabelle 3.1 grau hinterlegt), zeigt sich, dass die Viskosität von Tris/HCl ($\eta = 1,69 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) über Ameisensäure ($\eta = 2,5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) zu Hexafluoroisopropanol ($\eta = 3,5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) zunimmt. Diese Beobachtung könnte mit der Sekundärstruktur (Abschnitt 3.1.1), die das Protein in den verschiedenen Lösungsmitteln annimmt, zusammenhängen. Während eADF4(C16) in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) nur einen sehr geringen Anteil an geordneter Sekundärstruktur hat, besitzt es in Hexafluoroisopropanol einen erhöhten Anteil an α -Helices.

Auch die Unterschiede zwischen den Eigenschaften der beiden rekombinanten Spinnenseidenproteine haben einen Einfluss auf die Viskosität der Lösung. Das hydrophilere Protein eADF3((AQ)24nr3) besitzt ein wesentlich höheres Molekulargewicht als eADF4(C16) (MW = 47,7 kDa) und liegt als disulfidverbrücktes Dimer (MW = 212,6 kDa) vor, was die Kettenlänge nochmals verdoppelt. Der Einfluss der Kettenlänge auf die Viskosität wird auch bei aliphatischen Kohlenwasserstoffen festgestellt. Dabei kann das generelle Prinzip – je länger die Kette, umso höher die Viskosität – gezeigt werden.

Die Analyse wässriger Lösungen von eADF4(C16) wird durch dessen starke Neigung zu aggregieren, was besonders bei hohen Proteinkonzentrationen auftritt, erschwert. Dieses Verhalten wird zusätzlich durch die bei rheologischen Messungen auftretenden Scherkräfte verstärkt.

3.1.3 Analyse der Proteinlösung hinsichtlich oligomerer Spezies

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) kann Informationen sowohl über die Reinheit von Proteinen als auch über die Anwesenheit von oligomeren Spezies in der Proteinlösung liefern. Für die Untersuchung von Fibrillenbildungsprozessen ist es ausschlaggebend, ob sich Oligomere in der Anfangsproteinlösung befinden. Die Entstehung von oligomeren Spezies (potentielle Keime) stellt bei der Fibrillenbildung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und hat somit einen starken Einfluss auf dessen Kinetik. Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) wurde mit einer Gelfiltrationssäule (Superdex 200) hinsichtlich dieser Faktoren analysiert. Zusätzlich wurde die Oligomergröße mittels Statischer Lichtstreuung bestimmt. Diese Methode ermöglicht die Berechnung des Molekulargewichts ohne Größenstandards.

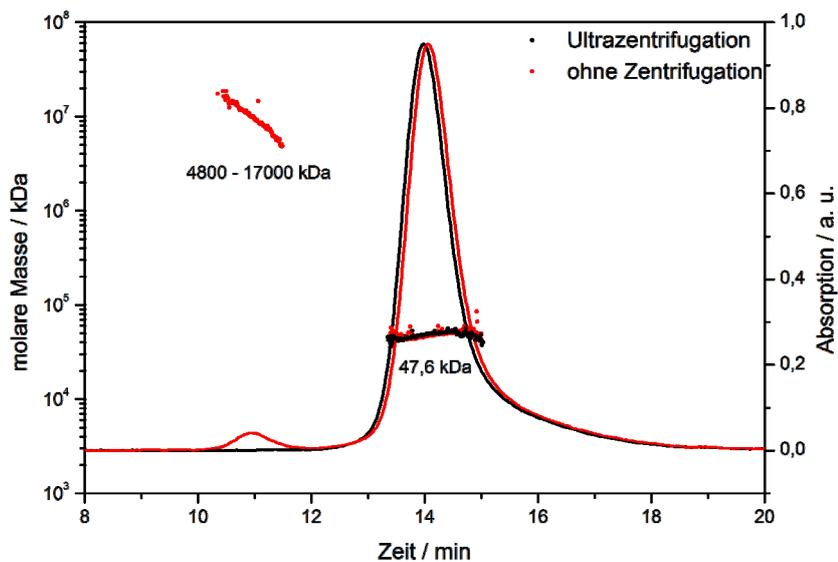


Abbildung 3.3: Chromatogramme von eADF4(C16)-Lösungen in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) unter Verwendung einer Gelfiltrationssäule (Superdex 200). Schwarz: nach einem Zentrifugationsschritt bei 186000 x g für 60 Minuten; Rot: ohne Zentrifugation. (a. u. = willkürliche Einheiten)

Nach einer Retentionszeit von 14 Minuten kann ein Peak detektiert werden, welcher nach Auswertung der Statischen Lichtstreuung eine einzige Proteinspezies mit einer molaren Masse von 47.6 kDa enthält. Das berechnete Molekulargewicht von eADF4(C16) beträgt 47,7 kDa. Demnach entspricht dieser Peak der monomeren Proteinspezies. Ein Peak nach einer Retentionszeit von 11 Minuten weist auf die Anwesenheit von höheren Oligomeren hin, für die eine molare Masse zwischen 4800 und 17000 kDa berechnet werden kann (Abbildung 3.3). Nach einem Zentrifugationsschritt für 60 Minuten bei 186.000 x g zeigt sich, dass sich fast ausschließlich monomeres eADF4(C16) im Überstand befindet. Die SEC-Experimente wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass in den für die späteren Versuchsansätze verwendeten wässrigen Proteinlösungen ausschließlich die monomere Spezies des Proteins vorliegt.

3.2 Morphologien prozessierter Spinnenseidenproteine

Im folgenden Kapitel werden Untersuchungen zu Vliesen, Filmen, Nanofibrillen und Mikrokugeln beschrieben. Dazu gehören morphologische Analysen mit Rasterkraftmikroskopie (AFM), Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sowie Strukturuntersuchungen mittels CD- und FTIR-Spektroskopie und Röntgenbeugungsanalyse. Besonders die Entstehungsbedingungen und Aggregationsprozesse von Nanofibrillen und Mikrokugeln werden analysiert.

3.2.1 Spinnenseidenvliese

Seidenvliese lassen sich durch Elektrospinnen von Seidenproteinen aus flüchtigen Lösungsmitteln wie Hexafluoroisopropanol herstellen. Bei der Technik des Elektrospinnens spielt eine ganze Reihe von verschiedenen Faktoren eine große Rolle. So sind die Eigenschaften des zu verspinnenden Polymers oder Proteins (Molekulargewicht und Löslichkeit) genauso wie die Eigenschaften der Polymerlösung selbst (z. B. Viskosität, Viskoelastizität, Konzentration, Oberflächenspannung oder elektrische Leitfähigkeit) wichtig. Neben den internen Faktoren haben auch externe Faktoren wie Dampfdruck, relative Feuchte der Umgebung, die Feldstärke und die Geometrie der Elektroden einen Einfluss auf die Morphologie des elektrogesponnenen Vlieses (Greiner and Wendorff 2007). Für jedes Protein oder Polymer, das elektroversponnen werden soll, müssen die Bedingungen individuell angepasst und optimiert werden.

Die Versuche zum Elektrospinnen von eADF4(C16) wurden am Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie (Prof. Andreas Greiner) an der Universität Marburg durchgeführt.

3.2.1.1 Elektrospinnen von eADF4(C16)

Zum Verspinnen des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) wurde das organische Lösungsmittel Hexafluoroisopropanol gewählt. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen betragen 10 % (w/v), 15 % (w/v) und 20 % (w/v), um verschiedene Viskositäten der Proteinlösung zu erhalten. Die optimale Viskosität der Proteinlösung für die Methode des Elektrospinnens liegt zwischen 10 und 100 mPa·s (Greiner and Wendorff 2007), welche mit den getesteten Konzentrationen erreicht wird (siehe Abschnitt 3.1.2). Sowohl die

Elektrodenspannung als auch die Vorschubgeschwindigkeiten des Spritzenstempels wurden variiert. Die unter den verschiedenen Bedingungen gebildeten Vliese wurden morphologisch mittels REM analysiert.

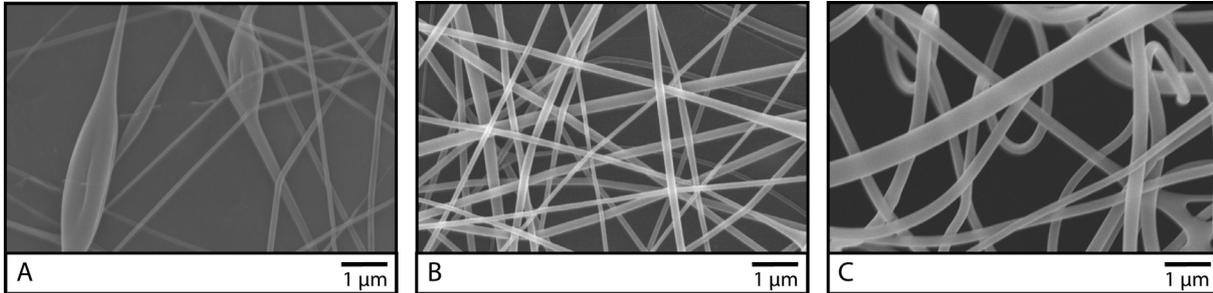


Abbildung 3.4: Elektrogesponnene eADF4(C16)-Vliese aus Hexafluorisopropanollösungen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und unter Verwendung unterschiedlicher Elektrodenspannungen. A) 10% (w/v) eADF4(C16) (Kathode: 25 kV, Anode: 8 kV, d: 20 cm), B) 10% (w/v) eADF4(C16) (Kathode: 20 kV, Anode: 5 kV, d: 15 cm) C) 20 % (w/v) eADF4(C16) (Kathode: 20 kV, Anode: 5 kV, d: 20 cm).

Es zeigt sich, dass eine zu hohe oder zu geringe Elektrodenspannung und ein zu schneller Vorschub zu tropfenförmigen Strukturen im Vlies führt (Abbildung 3.4A). Eine Kathodenspannung von 20 kV und eine Anodenspannung von 5 kV führten bei den getesteten Bedingungen zum besten Ergebnis bei der Herstellung von Vliesen mit homogener Faserdicke.

Die Proteinkonzentration hat einen großen Einfluss auf den mittleren Durchmesser der Einzelfäden. Dieser variiert von $2,2 \pm 0,95 \mu\text{m}$ bei einer Proteinkonzentration von 10 % (w/v) bis zu $4,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$ bei 20 % (w/v) und nimmt demnach mit steigender Konzentration und der damit verbundenen, steigenden Viskosität zu (Abbildung 3.4B, C). Bei niedrigen Proteinkonzentrationen entstehen dünnere Einzelfäden, aber gleichzeitig bilden sich unerwünschte tropfenförmige Verdickungen in der Faser. Dies kann durch eine Erhöhung der Leitfähigkeit der Lösung vermieden oder zumindest verringert werden (Greiner and Wendorff 2007). Zu niedrige Seidenproteinkonzentrationen sind aufgrund ihrer zu geringen Viskosität, nicht für die Methode des Elektrosinnens geeignet.

3.2.1.2 Sekundärstruktur und chemische Eigenschaften

Spinneseidenvliese welche aus eADF4(C16)-Hexafluoroisopropanollösungen hergestellt wurden, sind wasserlöslich. Um diese Löslichkeit zu verringern können die Vliese mit 100 % Methanol nachbehandelt werden. Um die dadurch induzierten Änderungen auf molekularer Ebene nachvollziehen zu können, wurde die Sekundärstruktur von unbehandelten und mit Methanol behandelten Spinneseidenvliesen mittels FTIR-Spektroskopie untersucht.

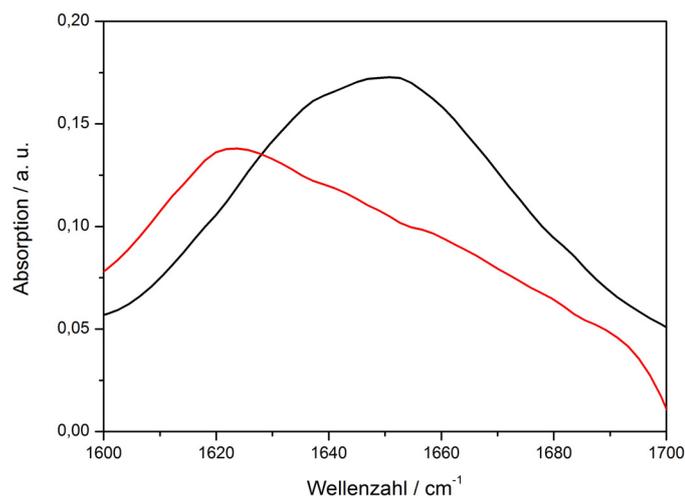


Abbildung 3.5: Analyse der Sekundärstruktur von Spinneseidenvliesen hergestellt aus Hexafluoroisopropanollösungen (Proteinkonzentration 10% (w/v)) (schwarze Linie) und nach Behandlung mit 100% Methanol (rote Linie) mittels FTIR-Spektroskopie. Gezeigt ist der Wellenzahlbereich von 1600 bis 1700 cm⁻¹ (Amid I-Bande). (a. u. = willkürliche Einheiten)

Die Amid I-Bande im Bereich zwischen Wellenzahlen von 1600 und 1700 cm⁻¹ besitzt bei unbehandelten eADF4(C16)-Vliesen ein Maximum bei 1650 cm⁻¹. Dies lässt auf einen hohen Anteil an α -helikalen Strukturen schließen. Nach einer Behandlung mit 100 % Methanol verschiebt sich das Maximum deutlich zu niedrigeren Wellenzahlen auf 1622 cm⁻¹, was mit der Entstehung von β -Faltblättern und dem Verlust α -helikaler Strukturen gleichzusetzen ist (Abbildung 3.5). Somit zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Sekundärstrukturzusammensetzung und Löslichkeit der Spinneseidenvliese.

Ein Nachteil einer Nachbehandlung der Vliese liegt darin, dass die Einzelfäden verschmelzen und auseinander fließen. Dies könnte durch die Verwendung anderer Lösungsmittel oder gleichzeitiger Zugabe von Methanol während des Spinnprozesses vermieden werden.

3.2.2 Spinnenseidenfilme

Spinnenseidenfilme lassen sich leicht aus Lösungen in flüchtigen organischen Lösungsmitteln wie Hexafluoroisopropanol, Ameisensäure oder Trifluoroessigsäure herstellen (Um, Kweon et al. 2001; Zhao, Yao et al. 2003; Ha, Tonelli et al. 2005; Teramoto and Miyazawa 2005). Dazu wird die Proteinlösung auf eine Oberfläche aufgetragen und das Lösungsmittel abgedampft. Zurück bleibt ein transparenter Proteinfilm, dessen Dicke, abhängig von der verwendeten Proteinkonzentration und der Auftragungsfläche, von unter einem Mikrometer bis hin zu Millimetern variieren kann. Da organische Lösungsmittel meist toxisch oder ätzend sind, ist ihre Verwendung besonders im medizinischen Bereich nicht erwünscht. Deshalb ist die Herstellung von Proteinfilmen auf wässriger Basis ein wichtiger Aspekt. Bisher wurden die meisten Untersuchungen an Seidenfilmen aus Fibroin, dem Hauptbestandteil der Seide des Seidenspinners *Bombyx mori* gemacht (Vendrey and Scheibel 2007; Hardy, Roemer et al. 2008). Die folgende Abbildung zeigt einen Proteinfilm, der aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) aus einer Hexafluoroisopropanollösung, hergestellt wurde (Abbildung 3.6).

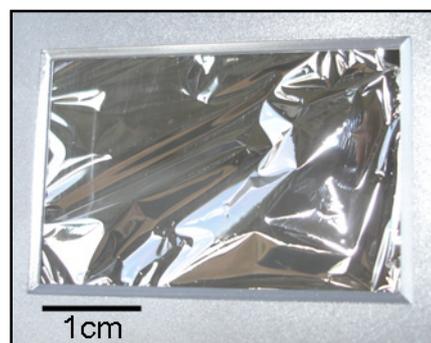


Abbildung 3.6: Film aus rekombinantem Spinnenseidenprotein (Beispiel: eADF4(C16)).

Eigenschaften wie Löslichkeit oder mechanische Stabilität hängen direkt mit der Sekundärstruktur der Proteinfilme zusammen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels und der Entstehung von Filmen, behalten die Seidenproteine häufig entweder ihre ursprüngliche Sekundärstruktur in Lösung bei oder nehmen eine β -faltblattreiche Struktur an. Weist der resultierende Proteinfilm eine α -helikale Struktur auf oder liegen die Proteine ungefaltet vor, kann eine β -faltblattreiche Sekundärstruktur mit Alkoholen wie Ethanol oder Salzen wie Kaliumchlorid induziert werden. Dies führt meistens zu einer höheren Stabilität gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln (Um, Kweon et al. 2001; Chen, Knight et al. 2002; Zhao, Yao et al. 2003; Ha, Tonelli et al. 2005; Teramoto and Miyazawa 2005; Metwalli, Slotta et al. 2007).

3.2.2.1 Einfluss des Lösungsmittels auf die Eigenschaften von Seidenfilmen

3.2.2.1.1 Analyse der Sekundärstruktur von Seidenfilmen mit CD-Spektroskopie

Proteinfilme aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) gelöst in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) sowie den organischen Lösungsmitteln Hexafluoroisopropanol und Ameisensäure wurden hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur mit CD-Spektroskopie analysiert. Sowohl der strukturelle Einfluss einer Nachbehandlung mit Wasser, 100% Methanol oder 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0), als auch der spätere Einfluss auf die Löslichkeit der Proteinfilme in Wasser und verschiedenen Denaturierungsmitteln wurden untersucht. Für die Messungen im CD-Spektrometer wurden Spinnenseidenfilme aus eADF4(C16) direkt auf Quarzglasplättchen hergestellt und nach Abdampfen des Lösungsmittels vermessen (Abbildung 3.7).

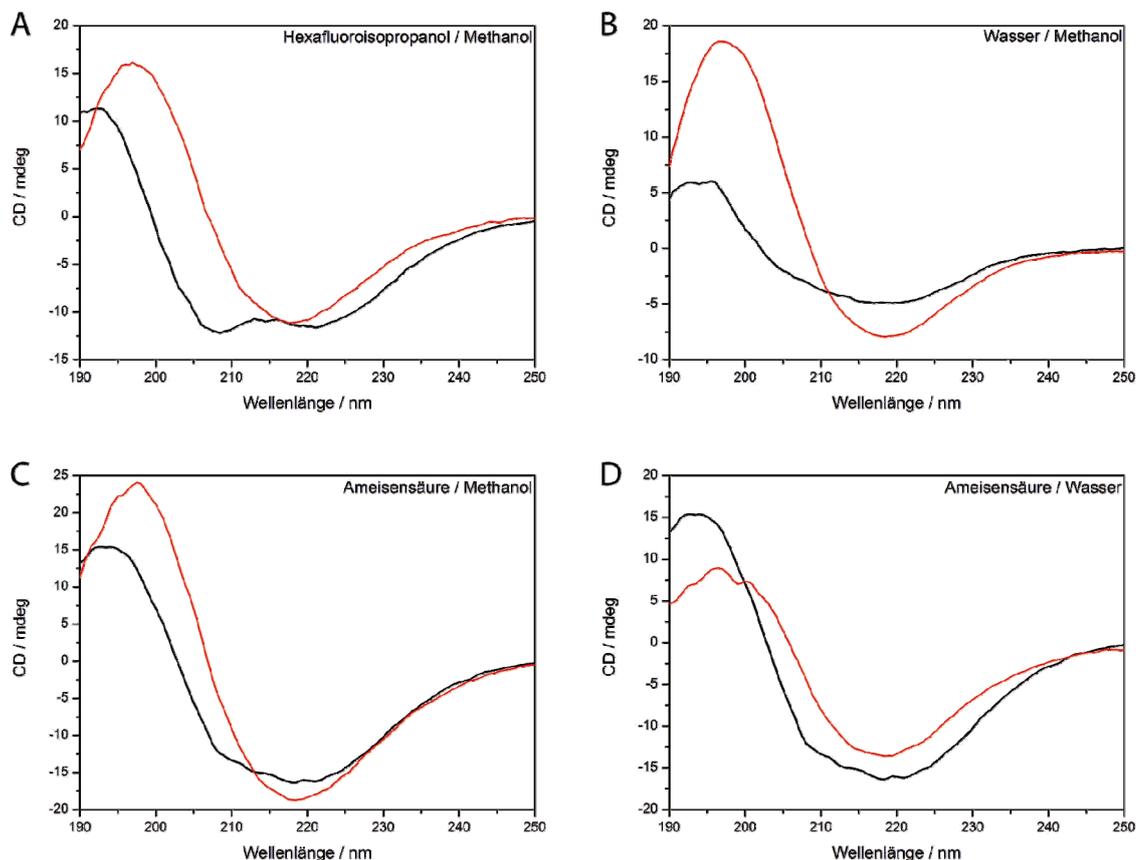


Abbildung 3.7: Untersuchung der Sekundärstruktur von Filmen aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) basierend auf Lösungen in Hexafluoroisopropanol (A), Wasser (B) und Ameisensäure (C, D) (Proteinkonzentration: 0,1 % (w/v)) (schwarze Linie) und deren Änderung durch Behandlung mit Methanol und Wasser (rote Linie) mittels CD-Spektroskopie. Eine direkte Nachbehandlung mit Wasser ist nur bei den Ameisensäurefilmen möglich, da sich die anderen Filme sofort auflösen. (mdeg = Milligrad)

Es zeigt sich, dass das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) im Film, abhängig vom verwendeten Lösungsmittel, verschiedene Sekundärstrukturen annehmen kann. Unbehandelte Filme aus eADF4(C16) gegossen aus Hexafluoroisopropanollösungen zeigen im Fern-UV zwei Minima bei 208 nm und 222 nm, was auf einen hohen Anteil an α -helikalen Strukturen hindeutet. Eine Nachbehandlung mit Methanol führt zu einer Umfaltung zu einer β -faltblattreichen Struktur mit nur einem Minimum bei 218 nm (Abbildung 3.7A).

Bei Filmen aus Wasser erhält man CD-Spektren, denen nicht eindeutig eine bestimmte Sekundärstruktur zugeordnet werden kann. Es zeigt sich zwar ein Minimum bei 218 nm, jedoch ist der Kurvenverlauf im Bereich von 225 bis 208 nm sehr flach. Verglichen mit einem typischen β -Faltblattspektrum, das man durch Methanolnachbehandlung des eADF4(C16)-Spinnenseidenfilms erhält, könnte das Spektrum des nachbehandelten Films auf eine Mischung zwischen ungefalteten Anteilen und β -Faltblatt hinweisen (Abbildung 3.7B). Darauf deuten ein niedriges Maximum im unteren Wellenlängenbereich und ein flacher Kurvenverlauf im Bereich von 240 bis 220 nm sowie ein Minimum bei 218 nm hin. Es wurde bereits beschrieben, dass Proteine im Film häufig die Sekundärstruktur, die sie in Lösung besitzen, beibehalten. Die Beobachtung, dass eADF4(C16) im wässrigen System intrinsisch entfaltet vorliegt, lässt vermuten, dass es diese Konformation auch im Proteinfilm teilweise beibehält. Auf der anderen Seite bilden die Poly-Alanin-Bereiche der Spinnenseidenproteine im Seidenfaden β -Faltblätter, was demnach auch in Filmen möglich ist (Lefevre, Boudreault et al. 2008).

eADF4(C16)-Filme aus Ameisensäure besitzen ebenfalls eine gemischte Sekundärstruktur mit einem breiten Kurvenverlauf im Bereich von 222 bis 208 nm und einem Minimum bei 218 nm. Wegen diesem beobachteten Kurvenverlauf liegt hier möglicherweise eine Mischung aus α -Helices, die im Fern-UV deutliche Minima bei 222 und 208 nm besitzen und β -Faltblättern vor. Eine Nachbehandlung mit Methanol führt auch hier zu einem hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen mit einem eindeutigen Minimum im Fern-UV bei 218 nm (Abbildung 3.7C). Erstaunlicherweise sind eADF4(C16)-Filme aus Ameisensäure, anders als die Filme aus Hexafluoroisopropanol oder Wasser, bereits ohne Nachbehandlung wasserunlöslich. Der Hauptsekundärstrukturanteil im Film ändert sich hier schon durch Wasserkontakt in β -Faltblatt (Abbildung 3.7D). Hydratisierungseffekte spielen hierbei keine Rolle, da die Filme nach der Behandlung wiederum in trockenem Zustand vermessen wurden. Zwar fällt auf, dass sich die Intensität des CD-Signals nach der Behandlung mit Wasser vermindert, aber eine partielle Auflösung des unbehandelten Ameisensäurefilms konnte durch die Analyse des Überstandes mit UV-Vis-Spektroskopie ausgeschlossen werden.

3.2.2.1.2 Analyse der Sekundärstruktur mit FTIR-Spektroskopie

Um die Aussagen über die mittels CD-Spektroskopie bestimmte Sekundärstruktur der Filme aus eADF4(C16) zu unterstützen, wurden Messungen im FTIR-Spektrometer vorgenommen. Hier wurden die Seidenfilme aus verschiedenen Lösungsmitteln direkt auf dem ATR (attenuated total reflection)-Kristall (Ruthenium) gegossen und auch dort unter Umständen nachbehandelt (Abbildung 3.8).

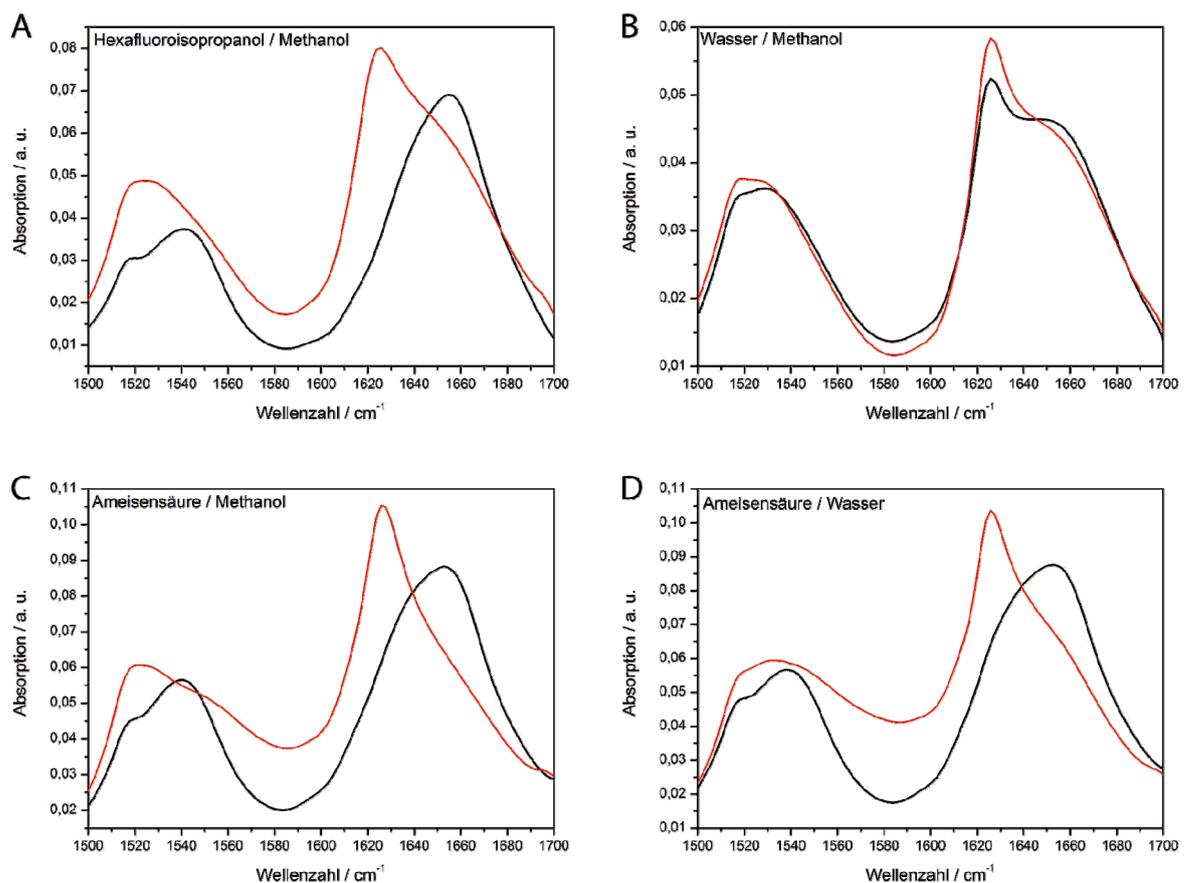


Abbildung 3.8: Untersuchung der Sekundärstruktur von Filmen aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16), gegossen aus Lösungen in Hexafluoroisopropanol (A), Wasser (B) und Ameisensäure (Proteinkonzentration 1 % (w/v) (C, D) (schwarze Linie) und deren Änderung durch Behandlung mit Methanol und Wasser (rote Linie) mittels FTIR-Spektroskopie. Dargestellt sind die Amid I-Bande (1600 bis 1700 cm^{-1}) und die Amid II-Bande (1500 bis 1600 cm^{-1}) welche normalerweise für die Sekundärstrukturuntersuchung von Proteinen eingesetzt werden. (a. u. = willkürliche Einheiten)

Unbehandelte eADF4(C16)-Filme aus Hexafluoroisopropanol zeigen Maxima bei 1655 cm^{-1} und 1540 cm^{-1} , welche charakteristisch für α -helikale Strukturen oder entfaltete Proteine sind.

Eine Nachbehandlung mit Methanol führt zu einer Verschiebung dieser Maxima auf 1625 cm^{-1} bzw. 1525 cm^{-1} , was auf die Entstehung von β -Faltblättern in den Spinnenseidenfilmen hindeutet (Abbildung 3.8A).

Die untersuchten Filme auf wässriger Basis besitzen schon ohne Nachbehandlung Maxima bei 1625 cm^{-1} und 1530 cm^{-1} und damit einen signifikanten Anteil an β -Faltblättern. Eine stark ausgeprägte Schulter mit einem Maximum bei 1650 cm^{-1} im Spektrum der Amid I-Bande deutet auf α -helikale Anteile oder ungefaltete Bereiche hin (Abbildung 3.8B). Aus den CD-spektroskopischen Untersuchungen und der Tendenz von Proteinen, in Filmen ihre bereits in Lösung vorhandene Struktur beizubehalten, wird die Annahme gefestigt, dass Filme aus Wasser eine Mischung aus β -Faltblattstrukturen und ungefalteten Bereichen einnehmen.

Unbehandelte Filme aus Ameisensäure besitzen Maxima bei 1653 cm^{-1} und 1540 cm^{-1} , welche typisch für α -Helices oder entfaltete Proteine sind. Eine Nachbehandlung, sowohl mit Methanol als auch mit Wasser, führt zur Verschiebung der Maxima auf 1626 cm^{-1} und 1532 cm^{-1} . Dies weist auf die Entstehung von β -Faltblattstrukturen hin (Abbildung 3.8C, D). Durch dieses Ergebnis konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob es sich bei der Sekundärstruktur von unbehandelten eADF4(C16)-Ameisensäurefilmen tatsächlich um eine Mischung aus α -Helices und β -Faltblättern handelt. Jedoch konnte die Anwesenheit von α -helikalen Strukturen oder ungefalteten Bereichen im unbehandelten Film gezeigt werden.

3.2.2.2 Filme aus verschiedenen rekombinanten Spinnenseidenproteinen

Nicht nur das Lösungsmittel hat einen entscheidenden Einfluss auf die strukturellen und chemischen Eigenschaften von Spinnenseidenfilmen, sondern auch das verwendete rekombinante Seidenprotein selbst. Im natürlichen System besteht der Abseilfaden der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* aus den Komponenten ADF3 und ADF4, wobei Ersteres hydrophiler und löslicher als ADF4 ist. Beide Proteine geben durch ihre Kombination im Seidenfaden diesem seine außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften. Da dieser Zusammenhang auch für Filme denkbar ist, wurden vergleichende Untersuchungen der strukturellen und chemischen Eigenschaften von Filmen aus verschiedenen Spinnenseidenproteinen und besonders von Mischfilmen untersucht. Dazu wurden die rekombinanten Seidenproteine eADF3(AQ12), eADF3(AQ24nr3), eADF4(C16) und eADF4(C16nr4) unter Verwendung des Lösungsmittels Hexafluoroisopropanol eingesetzt (Slotta, Tammer et al. 2006).

3.2.2.2.1 Analyse der Sekundärstruktur von Einzelproteinfilmen mit FTIR-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur und deren Änderung nach Behandlung mit 100 % Methanol oder 1 M Kaliumphosphatlösung (pH 8,0) von Filmen aus einem Seidenprotein wurde mittels FTIR-Spektroskopie analysiert (Abbildung 3.9). Der Einfluss der nicht-repetitiven Region auf Sekundärstruktur und chemische Stabilität wurde besonders betrachtet.

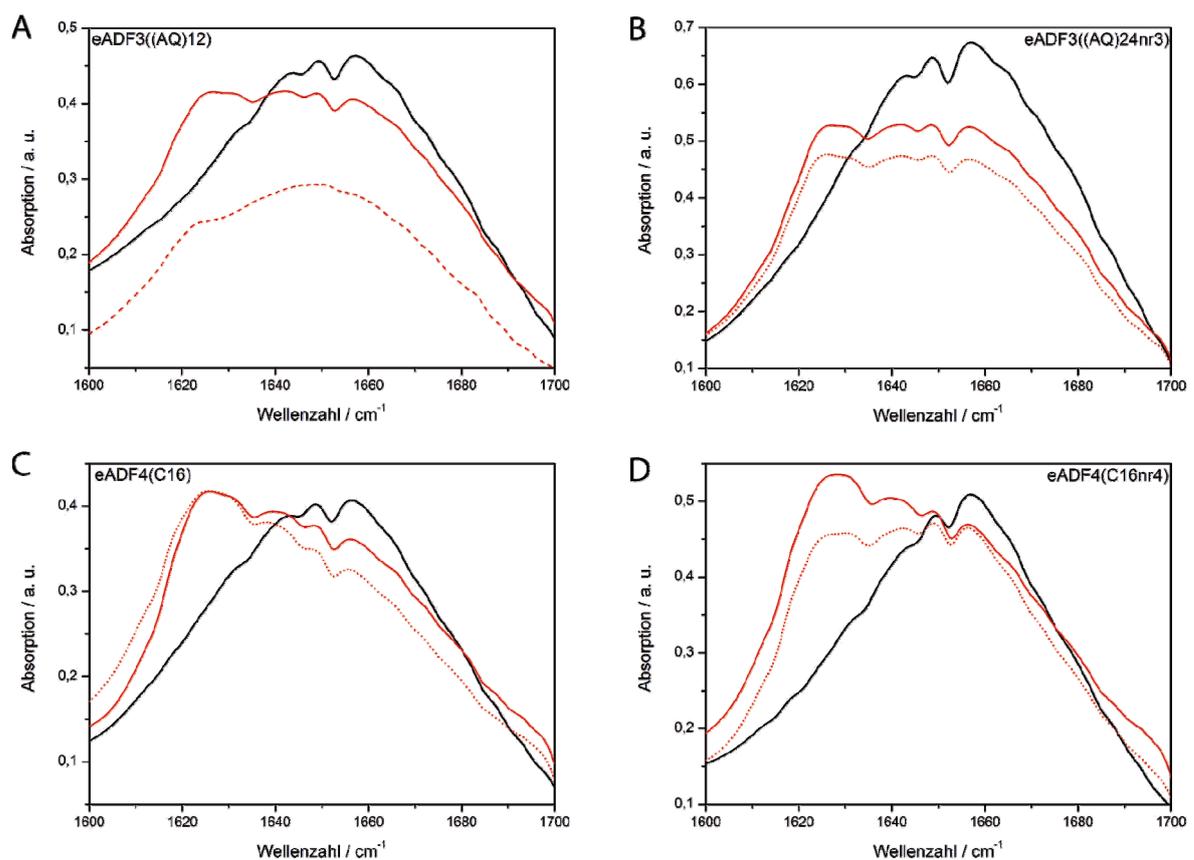


Abbildung 3.9: FTIR-Spektroskopie von Filmen aus eADF3(AQ12), eADF3((AQ)24nr3), eADF4(C16) und eADF4(C16nr4) (A-E); Unbehandelt (schwarze Linie), mit 100 % Methanol behandelt (rote Linie) und mit 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) behandelt (rote Punkte) (Slotta, Tammer et al. 2006). (a. u. = willkürliche Einheiten)

Alle untersuchten unbehandelten Filme aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen besitzen im Nah-Infrarot (NIR)-Bereich ein deutliches Maximum bei einer Wellenzahl von 1660 cm⁻¹ (Abbildung 3.9). Dies deutet auf einen hohen α -helikalen Anteil hin. Betrachtet man vergleichend die Amid I-Banden der entsprechenden Seidenproteine mit und ohne nicht-repetitive Regionen, zeigt sich, dass diese kaum einen Einfluss auf die Sekundärstrukturanteile im Protein haben. Da die nicht-repetitiven Regionen deutlich kürzer

als der repetitive Teil sind, spielt ihr Anteil an der Gesamtsekundärstruktur eine untergeordnete Rolle. Nach einer Behandlung der Filme mit 100 % Methanol oder 1 M Kaliumphosphatlösung (pH 8,0) verschiebt sich bei allen Filmen das Maximum der Amid I-Bande zu niedrigeren Wellenzahlen auf den Bereich um 1630 cm^{-1} , was charakteristisch für β -Faltblattstrukturen ist (Abbildung 3.9). Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchung der Filme aus Hexafluoroisopropanol mittels CD-Spektroskopie bestätigt. In Tabelle 3.2 sind die Sekundärstrukturverteilungen, die durch Dekonvolution unter Verwendung von Lorentz Oszillatoren erhalten wurden, zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Sekundärstrukturanteile in % von Spinnenseidenfilmen, gegossen aus Hexafluoroisopropanollösungen (jeweils unbehandelt oder mit 100 % Methanol oder 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) behandelt).

| Seidenprotein | α -Helix | β -Faltblatt | β -Turn | ungefaltet |
|--|-----------------|--------------------|---------------|------------|
| Unbehandelte Seidenfilme | | | | |
| eADF3(AQ12) | 23,7 | 27,7 | 30,1 | 18,5 |
| eADF3(AQ24nr3) | 19,5 | 28,3 | 39,4 | 12,8 |
| eADF4(C16) | 19,0 | 35,0 | 32,2 | 13,8 |
| eADF4(C16nr4) | 25,6 | 21,1 | 32,6 | 20,7 |
| Behandelte Seidenfilme (Methanol) | | | | |
| eADF3(AQ12) | 18,4 | 34,8 | 29,2 | 17,6 |
| eADF3(AQ24nr3) | 18,5 | 41,1 | 28,6 | 12,1 |
| eADF4(C16) | 12,9 | 45,2 | 23,8 | 18,0 |
| eADF4(C16nr4) | 17,1 | 40,5 | 29,6 | 12,8 |
| Behandelte Seidenfilme (Kaliumphosphat) | | | | |
| eADF3(AQ12) | 9,9 | 36,5 | 32,0 | 21,6 |
| eADF3(AQ24nr3) | 11,5 | 38,1 | 35,8 | 13,8 |
| eADF4(C16) | 13,2 | 52,1 | 25,5 | 9,2 |
| eADF4(C16nr4) | 18,7 | 36,8 | 30,1 | 14,4 |

Auffällig sind Unterschiede im Anteil an β -Strukturen (β -Faltblatt und β -Turn) zwischen der Behandlung der Spinnenseidenfilme mit Methanol und Kaliumphosphat. Kaliumphosphat scheint einen stärkeren Einfluss auf die Struktur zu haben als Methanol. Diese Beobachtung könnte mit einem unterschiedlichen Einfluss beider Substanzen auf die Strukturbildung von Proteinen erklärt werden. An die Behandlung mit Kaliumphosphatpuffer muss zusätzlich ein Waschschrift mit Wasser zur Entfernung des Salzes angeschlossen werden. Möglicherweise hat die dadurch verlängerte Behandlungsdauer der Filme oder die Nachbehandlung mit Wasser ebenfalls einen Einfluss auf die Sekundärstrukturverteilung.

3.2.2.2 Chemische Stabilität

Die chemische Stabilität der Filme variiert mit der Sekundärstruktur. Die Löslichkeit der verschiedenen Spinnenseidenfilme wurde in Wasser und Denaturierungsmitteln wie 8 M Harnstoff, 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) und 6 M Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN) untersucht. Die Behandlung mit Denaturierungsmitteln führt in den meisten Fällen zu einer Entfaltung der Proteine durch das Brechen von Wasserstoffbrückenbindungen. In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen von unbehandelten und behandelten Filmen zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Löslichkeit von unbehandelten und behandelten HFIP-Spinnenseidenfilmen in Wasser, 8 M Harnstoff, 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) und 6 M Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN). Als unlöslich werden Filme bezeichnet, die nach der Behandlung und nach optischer Kontrolle weiterhin unversehrt vorhanden sind. (+ = löslich, - = unlöslich).

| Seidenprotein | Wasser | 8 M Harnstoff | 6 M GdmCl | 6 M GdmSCN |
|---|--------|---------------|-----------|------------|
| Unbehandelte Seidenfilme | | | | |
| eADF3(AQ12) | + | + | + | + |
| eADF3(AQ24nr3) | + | + | + | + |
| eADF4(C16) | + | + | + | + |
| eADF4(C16nr4) | + | + | + | + |
| Behandelte Seidenfilme (Methanol/Kaliumphosphat) | | | | |
| eADF3(AQ12) | - | + | + | + |
| eADF3(AQ24nr3) | - | + | + | + |
| eADF4(C16) | - | - | - | + |
| eADF4(C16nr4) | - | - | - | + |

Alle unbehandelten Filme, die nur aus einem Protein bestehen, sind löslich in Wasser und allen untersuchten Denaturierungsmitteln. Eine Nachbehandlung mit Methanol führt neben der Änderung der Sekundärstruktur auch zu einer Änderung der Löslichkeit. Filme aus den rekombinanten Seidenproteinen eADF3(AQ12) und eADF3(AQ24nr3) sind danach unlöslich in Wasser, während Filme aus eADF4(C16) und eADF4(C16nr4) zudem unlöslich in 8 M Harnstoff und 6 M GdmCl sind. Alle Filme bleiben auch nach Methanolbehandlung löslich in 6 M GdmSCN, welches das stärkste der getesteten Denaturierungsmittel ist (Tabelle 3.3).

3.2.2.2.3 Analyse der Sekundärstruktur von Zweiproteinfilmen mit FTIR-Spektroskopie

In der Natur ist eine Interaktion der Seidenproteine ADF3 und ADF4 bei der Assemblierung zu einem Seidenfaden notwendig. Die nicht-repetitiven Regionen, die das einzige bislang detektierte Cystein der Proteine enthalten, dimerisieren und die enthaltenen Cysteine bilden intermolekulare Disulfidbrücken aus, was eine große Rolle beim Assemblierungsprozess spielt (Jin and Kaplan 2003; Huemmerich, Helsen et al. 2004; Sponner, Unger et al. 2004). Aus diesem Grund wurden die Mischfilme mit und ohne nicht-repetitive Region (NR) hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur (Abbildung 3.10) mittels FTIR-Spektroskopie und ihrer Löslichkeit in verschiedenen Denaturierungsmitteln näher untersucht. Das Verhältnis der eingesetzten Seidenproteine in den Mischfilmen betrug 1:1.

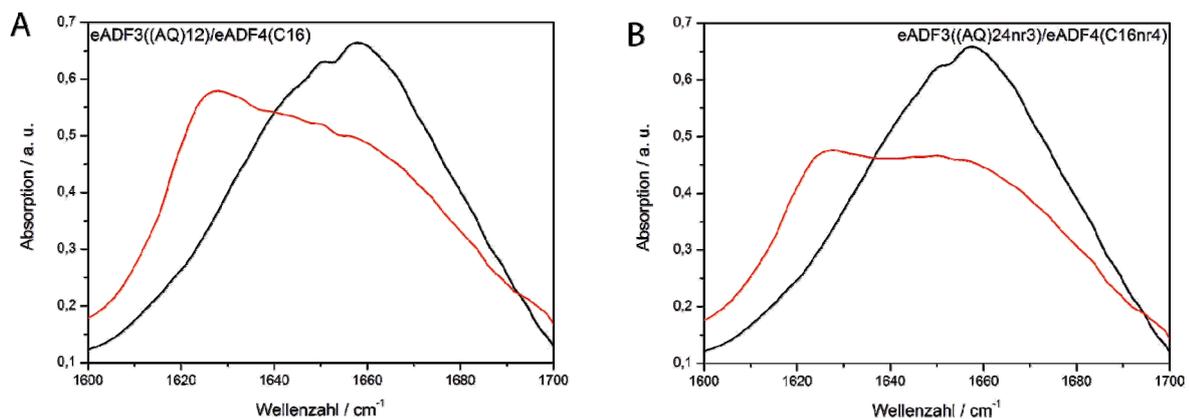


Abbildung 3.10: FTIR-Spektroskopie von Mischfilmen aus eADF3(AQ)12/eADF4(C16) und eADF3(AQ)24nr3/eADF4(C16nr4). Unbehandelt (schwarze Linie), mit 100 % Methanol behandelt (rote Linie) (Slotta, Tammer et al. 2006). (a. u. = willkürliche Einheiten)

Ein offensichtlicher struktureller Unterschied zu den Einzelproteinfilmen konnte nicht festgestellt werden. Mischfilme mit und ohne nicht-repetitive Region weisen ohne Behandlung ebenfalls einen großen Anteil an α -helikalen Strukturen auf, während eine Behandlung mit Methanol zu einem steigenden Anteil an β -Strukturen führt. Die durch Dekonvolution (Verwendung von Lorentz Oszillatoren) bestimmten Sekundärstrukturanteile sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Sekundärstrukturanteile in % von Spinnenseidenmischfilmen gegossen aus Hexafluoroisopropanol (unbehandelt und mit 100 % Methanol behandelt).

| Seidenprotein | α -Helix | β -Faltblatt | β -Turn | ungefaltet |
|--|-----------------|--------------------|---------------|------------|
| Unbehandelte Seidenfilme | | | | |
| eADF3(AQ)12/eADF4(C16) | 20,5 | 20,5 | 35,7 | 23,3 |
| eADF3(AQ)24nr3/eADF4(C16nr4) | 22,5 | 17,7 | 33,7 | 26,1 |
| Behandelte Seidenfilme (Methanol) | | | | |
| eADF3(AQ)12/eADF4(C16) | 8,2 | 46,4 | 19,9 | 25,5 |
| eADF3(AQ)24nr3/eADF4(C16nr4) | 9,9 | 38,8 | 30,3 | 21,0 |

3.2.2.2.4 Chemische Stabilität

Obwohl keine deutlichen Unterschiede in der Sekundärstruktur vorhanden sind, zeigen die Mischfilme hinsichtlich ihrer Löslichkeit kombinierte Eigenschaften, welche von denen der Einzelproteinfilme abgeleitet werden können (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Löslichkeit von unbehandelten und behandelten HFIP-Mischfilmen in Wasser, 8 M Harnstoff, 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) und 6 M Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN). Als unlöslich werden Filme bezeichnet, die nach der Behandlung und nach optischer Kontrolle weiterhin unversehrt vorhanden sind.

(+ = löslich, +/- = amorphe Aggregate, - = unlöslich)

| Seidenprotein | Wasser | 8 M Harnstoff | 6 M GdmCl | 6 M GdmSCN |
|--|--------|---------------|-----------|------------|
| Unbehandelte Seidenfilme | | | | |
| eADF3(AQ)12/eADF4(C16) | + | + | + | + |
| eADF3(AQ)24nr3/eADF4(C16nr4) | +/- | + | + | + |
| Behandelte Seidenfilme (Methanol) | | | | |
| eADF3(AQ)12/eADF4(C16) | - | - | + | + |
| eADF3(AQ)24nr3/eADF4(C16nr4) | - | - | +/- | + |

Unbehandelt sind Mischfilme aus eADF3(AQ)12 und eADF4(C16) in allen getesteten Substanzen löslich. Eine Nachbehandlung mit Methanol führt zu einer Unlöslichkeit in 8 M Harnstoff. Zusätzlich dazu konnte der Mischfilm in 6 M GdmCl nicht vollständig aufgelöst werden. Untersucht man Mischfilme aus eADF3(AQ24nr3) und eADF4(C16nr4) so stellt man fest, dass sogar unbehandelte Filme in Wasser nicht vollständig aufgelöst werden

können. Hier bleiben optisch sichtbare amorphe Aggregate zurück, die auch mit Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert wurden (Abbildung 3.11).

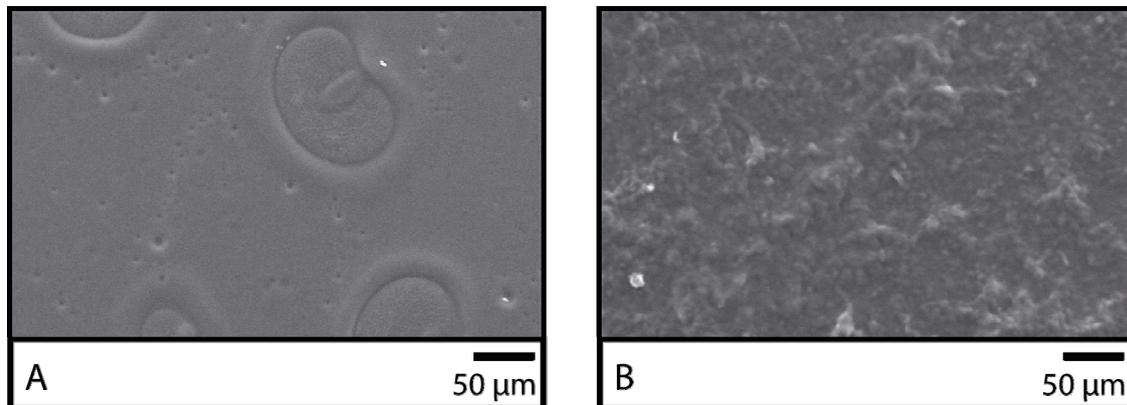


Abbildung 3.11: REM-Aufnahmen eines unbehandelten Mischfilms aus eADF3(AQ)24nr3/eADF4(C16nr4) (A) und nach dessen Inkubation in Wasser (B).

Der intakte, unbehandelte Mischfilm besitzt eine glatte Oberfläche mit unterschiedlich ausgeprägten Vertiefungen zwischen 1 und 10 μm sowie über 50 μm (Abbildung 3.11A). Nach der Behandlung mit Wasser verliert der Film seine glatte Oberfläche und amorphe Aggregate bleiben zurück (Abbildung 3.11B).

Durch die Anwesenheit der nicht-repetitiven Regionen, die ein Cystein enthalten, können sich Disulfidbrücken ausbilden, was zur Entstehung von Homo- und/oder Heterodimeren führt. Dies könnte der Grund für die höhere Stabilität der Filme in Wasser sein. Die Zugabe des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol (5 % (v/v)) zu den fertig gebildeten Filmen zeigte dabei keinen Einfluss auf diese Aggregate. Allerdings wurde beschrieben, dass das Redox-Potential der Disulfidbrücken der Homodimere des Proteins eADF4((AQ)24nr3) so negativ ist, dass die verwendete Menge an Reduktionsmittel nicht ausreicht, um diese vollständig aufzulösen (Exler 2006). Nach der Behandlung mit Methanol werden diese Mischfilme, ebenso wie diejenigen ohne nicht-repetitive Region, unlöslich in Wasser und 8 M Harnstoff. Hier bleiben auch in 6 M GdmCl amorphe Aggregate zurück, was einen weiteren Unterschied zu Filmen aus eADF3(AQ12) und eADF4(C16) darstellt.

3.2.3 Assemblierung von eADF4(C16)

In vitro wird die Aggregatbildung von Proteinen zum einen von deren dreidimensionalen Struktur und zum anderen von vielen experimentellen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und Proteinkonzentration beeinflusst, die thermodynamisch oder kinetisch Faltung und Struktur beeinflussen (Wang 2005; Top, Kiick et al. 2008). Die resultierenden Aggregate sind entweder amorphe, nicht-fibrilläre Präzipitate, Proteinkristalle oder orientierte Fibrillen (Bianchi, Conio et al. 1967; Chi, Krishnan et al. 2003; Top, Kiick et al. 2008).

Auch beim natürlichen Spinnprozess ist für die Entstehung des Seidenfadens aus einer hochkonzentrierten Proteinlösung eine perfekte Abstimmung verschiedener Parameter essenziell. Die Änderung der Ionenzusammensetzung (Austausch von Na^+ und Cl^- gegen K^+ und PO_4^{3-}) sowie des pH-Wertes (von pH 6,9 auf pH 6,3) im Verlauf des Spinntraktes bewirken Strukturänderungen, der Wasserentzug führt zu einer steigenden Proteinkonzentration und der abschließende Zug am Faden induziert die Assemblierungs-, Strukturänderungs- und Ausrichtungsprozesse der Moleküle.

Im folgenden Kapitel wird untersucht, inwieweit die Aggregation des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) von experimentellen Parametern wie Kaliumphosphatkonzentration, Temperatur, pH-Wert und Proteinkonzentration beeinflusst wird (Abbildung 3.12). Da die natürlichen Spinnenseidenproteine deutlich größer sind als die rekombinanten Proteine wurde auch in beschränktem Maße der Einfluss des Molekulargewichtes analysiert. Dazu wurde das rekombinante Seidenprotein eADF4(C32), welches das doppelte Molekulargewicht besitzt, verwendet. Möglicherweise lassen sich durch eine getrennte Betrachtung des Einflusses verschiedener Faktoren Informationen über die Assemblierung natürlicher Spinnenseidenproteine zum fertigen Faden gewinnen (Slotta, Rammensee et al. 2008). Als Standardbedingung wurde für alle Versuche, wenn nicht anders vermerkt, eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml, ein pH-Wert von 8,0 und eine Inkubationstemperatur von 30 °C gewählt.

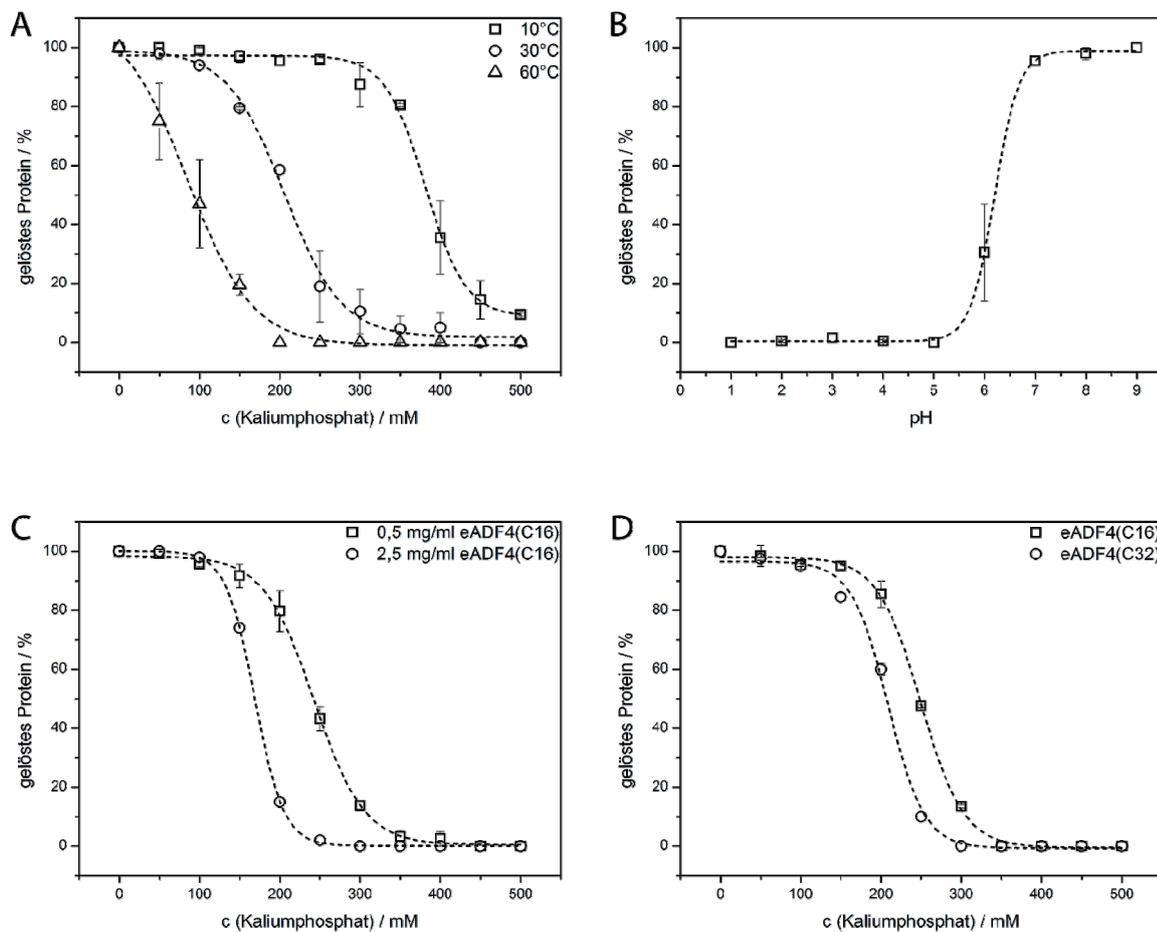


Abbildung 3.12: Aggregationsverhalten von eADF4(C16) abhängig von verschiedenen Faktoren: Temperatur (A), pH-Wert (B), Proteinkonzentration (C) und Kettenlänge (D). Zur Bestimmung des Aggregatanteils wurde die verbliebene Menge an gelöstem Protein im Überstand nach einem Zentrifugationsschritt bestimmt. Zur Auswertung wurden sigmoidale Fits verwendet (Slotta, Rammensee et al. 2008).

3.2.3.1 Einfluss von Salzkonzentration und Temperatur

Zur Untersuchung des Einflusses von Salzkonzentration und Temperatur auf die Aggregatbildung wurde gelöstes Spinnenseidenprotein ($c = 0,5 \text{ mg/ml}$ wenn nicht anders angegeben) in verschiedenen Kaliumphosphatkonzentrationen (0 bis 500 mM, pH 8,0) bei unterschiedlichen Temperaturen (10 °C, 30 °C, 60 °C) für eine Stunde inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Aggregate wurde die im Überstand verbliebene Proteinkonzentration UV-spektrometrisch (siehe Material und Methoden) bestimmt.

Es zeigt sich, dass mit zunehmender Salzkonzentration eine stärkere Aggregatbildung bei einer Inkubation für eine Stunde erfolgt (Abbildung 3.12A). Die Temperatur hat bei diesen Experimenten ebenfalls einen deutlichen Einfluss. Bei 10 °C liegt der Übergangspunkt zwischen aggregiertem und gelöstem Protein bei $381 \pm 4,2$ mM Kaliumphosphat. Eine Erhöhung der Temperatur steigert die Aggregation ebenfalls. Bei 30 °C befindet sich der Übergangspunkt bei $249 \text{ mM} \pm 1,6$ und bei 60 °C bei $85 \text{ mM} \pm 6,8$ Kaliumphosphat. Sowohl Salze als auch die Temperatur haben einen Einfluß auf die Hydrathülle von Proteinen und damit auf deren Löslichkeit. Salze interagieren sowohl nach der Hofmeister-Serie mit der Hydrathülle als auch mit den Proteinen selbst. Bei steigender Temperatur nimmt die Hydrathülle und die Hydratisierung von hydrophoben Seitenketten ab, weswegen bei 60°C eine deutlich schnellere Aggregation (resultierend in einer stärkeren Aggregation bei niedrigeren Kaliumphosphatkonzentrationen nach einer Stunde) zu beobachten ist als bei 10 °C (Abbildung 3.12A). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für die folgenden Experimente eine Temperatur von 30 °C und eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml als Standardbedingungen gewählt. Die Kinetik der Aggregation bei niedrigen Salzkonzentrationen wird in einem späteren Kapitel untersucht (Kapitel 3.2.4.6).

3.2.3.2 Einfluss des pH-Werts

Wie auch im natürlichen Spinnsystem hat der pH-Wert einen Einfluss auf die Aggregation von eADF4(C16), welches seinen berechneten isoelektrischen Punkt (pI) bei einem pH-Wert von 3,48 hat (Gasteiger, Hoogland et al. 2005). Für die *in vitro*-Untersuchungen wurde das rekombinante Spinnenseidenprotein mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml für 24 Stunden in verschiedenen Puffersystemen (siehe Material und Methoden) inkubiert. Dabei zeigt sich, dass eADF4(C16) bei höheren pH-Werten (über pH 7) über einen längeren Zeitraum (> 24 Stunden) stabil in Lösung bleibt. Bei niedrigeren pH-Werten zeigt es eine große Tendenz zur Aggregation, welche unter pH 5 nach 24 Stunden abgeschlossen ist. Der Übergangspunkt zwischen gelöstem und aggregiertem Protein liegt bei einem pH von 6,2 (Abbildung 3.12B). Das gewählte Puffersystem für die pH-Werte 3 bis 5 war Natriumcitratpuffer. Da das Citrat-Ion in der Hofmeister-Serie den aussalzenden Ionen zugeordnet wird, muss beachtet werden, dass die erfassten Effekte möglicherweise nicht ausschliesslich dem pH-Wert zugeordnet werden können.

3.2.3.3 Einfluss von Proteinkonzentration und Kettenlänge

Neben Kaliumphosphatkonzentration, Temperatur und pH-Wert beeinflussen sowohl hohe Proteinkonzentrationen als auch ein größeres Molekulargewicht die Aggregation von rekombinant hergestellten Varianten des Spinnenseidenproteins ADF4. Zur Untersuchung des Einflusses der Proteinkonzentrationen wurden Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 2,5 mg/ml des Seidenproteins eADF4(C16) unter Standardbedingungen getestet (Abbildung 3.12C). Dabei zeigte sich, dass eine höhere Proteinkonzentration eine Beschleunigung der Aggregation bewirkt. Der Übergangspunkt verschiebt sich von $249 \text{ mM} \pm 1,6$ (0,5 mg/ml) auf $168 \text{ mM} \pm 0,3$ Kaliumphosphat (2,5 mg/ml). Der beobachtete Effekt, der durch eine erhöhte Proteinkonzentration hervorgerufen wird, beruht möglicherweise lediglich auf der größeren Gesamtzahl der Einzelmoleküle im System. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Moleküle treffen und interagieren.

Eine Verlängerung der Molekülkette von eADF4(C16) auf das doppelte Molekulargewicht (eADF4(C32)) führt ebenfalls zu einer beschleunigten Aggregation (Abbildung 3.12D). Der Übergangspunkt verschiebt sich von $249 \text{ mM} \pm 1,6$ (eADF4(C16)) auf $208 \text{ mM} \pm 2,8$ Kaliumphosphat (eADF4(C32)). Durch REM-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass schon bei niedrigeren Salzkonzentrationen Mikrokugeln entstehen (siehe Abschnitt 3.2.5.1). Da der Bildung von Proteinkugeln ein anderer, im Vergleich zur Fibrillenbildung kinetisch schnellerer Mechanismus zugrunde liegt, lässt sich damit die frühere nahezu vollständige Aggregation erklären.

3.2.3.4 Einfluss von Salzkonzentration kombiniert mit pH-Variationen

Die Fadenentstehung *in vivo* beruht auf einem komplexen Zusammenspiel der schon beschriebenen Faktoren. Deshalb wurden Änderungen der Salzkonzentration und des pH-Werts in Aggregationsuntersuchungen von eADF4(C16) in Kombination getestet. Für diese Versuche wurde, genauso wie bei der Untersuchung der Einzelparameter bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Zugabe von verschiedenen Salzkonzentrationen (0 bis 500 mM) bei pH 5 und pH 8 Proben inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die entstandenen Aggregate abzentrifugiert und die verbliebene Proteinkonzentration im Überstand photometrisch (siehe Material und Methoden) bestimmt.

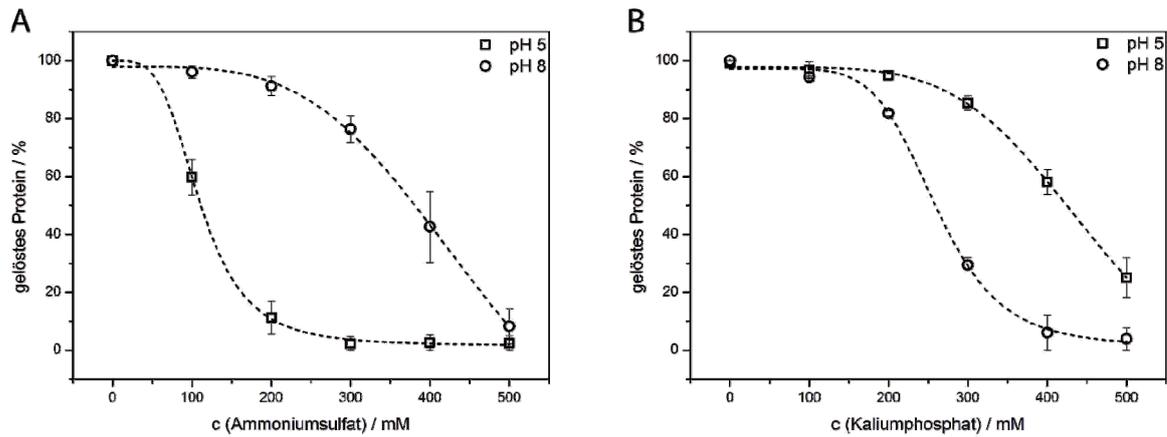


Abbildung 3.13: Aggregatbildung von eADF4(C16) ($c = 0,5 \text{ mg/ml}$) in Abhängigkeit von Salzkonzentration und pH-Wert. A) Ammoniumsulfat gepuffert mit 100 mM Na-Citratpuffer pH 5,0 und 100 mM Tris/HCl pH 8,0, B) Kaliumphosphatpuffer (pH 5,0 und pH 8,0). Zur Auswertung wurden sigmoide Fits verwendet.

Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) aggregiert entsprechend den Erwartungen durch Zugabe von Ammoniumsulfat bei niedrigeren pH-Werten schneller. Der Übergangspunkt befindet sich bei pH 5,0 bei $110 \text{ mM} \pm 1,7$ und bei pH 8,0 bei $481 \text{ mM} \pm 80$ (Abbildung 3.13A). Untersucht man jedoch das natürlich vorkommende Salz Kaliumphosphat bei verschiedenen pH-Werten, kann festgestellt werden, dass die Aggregation bei pH 5,0 wesentlich langsamer abläuft als bei pH 8,0. Der Übergangspunkt bei pH 5,0 liegt bei $472 \text{ mM} \pm 42$ und bei pH 8,0 bei $260 \text{ mM} \pm 7$ (Abbildung 3.13B).

Das verwendete Puffersystem Dikaliumhydrogenphosphat/Kaliumdihydrogenphosphat liegt bei verschiedenen pH-Werten in vier unterschiedlichen Protonierungsstufen vor, die unterschiedliche Aussalzeigenschaften besitzen. Ein pKs-Wert des Puffers liegt bei 7,2, weswegen das Salz bei pH 5,0 als Dihydrogenphosphat und bei pH 8,0 als Hydrogenphosphat vorliegt. Letzteres besitzt somit eine zusätzliche Ladung was den größeren kosmotropen Effekt und damit die schnellere Aggregation erklären könnte.

Um zu überprüfen, wie groß der Einfluss des ebenfalls kosmotropen Salzes Natriumcitrat ist, das als Puffersystem für Ammoniumsulfat bei pH 5,0 dient, wurde das Kaliumphosphatsystem bei diesem pH-Wert zusätzlich mit 100 mM Natriumcitrat (pH 5,0) gepuffert.

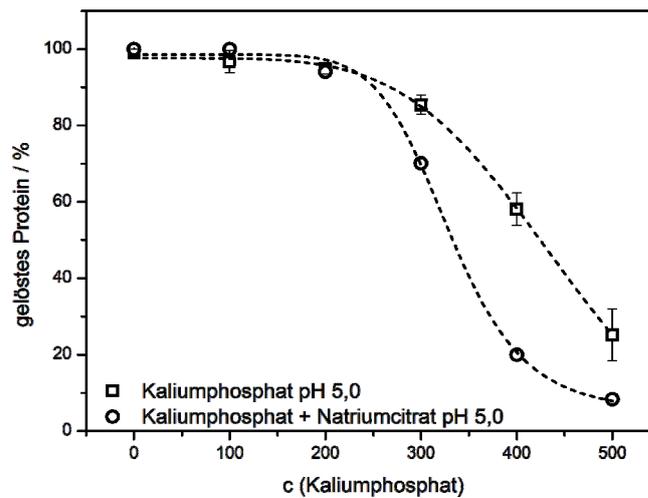


Abbildung 3.14: Aggregatbildung von eADF4(C16) unter Verwendung von Kaliumphosphatpuffer (pH 5,0) und Untersuchung des Einflusses von 100 mM Natriumcitratpuffer (pH 5,0). Zur Auswertung wurden sigmoidale Fits verwendet.

Die zusätzlichen aussalzenden Eigenschaften von Natriumcitrat bewirken in diesem Ansatz die beschleunigte Aggregation. Der Übergangspunkt von gelöstem zu ungelöstem Protein liegt bei der zusätzlichen Anwesenheit von 100 mM Natriumcitratpuffer (pH 5,0) bei $330 \text{ mM} \pm 7,4$ (Abbildung 3.14). Die hier beobachtete Verschiebung ist nicht so ausgeprägt wie bei der Fällung mit Ammoniumsulfat bei pH 5,0, aber es kann gezeigt werden, dass die Zugabe von Natriumcitrat die Aggregation schon bei niedrigeren Kaliumphosphatkonzentrationen ermöglicht.

3.2.3.5 Zusammenhang mit dem natürlichen System

Im natürlichen Spinnprozess spielen alle der untersuchten Faktoren in einem komplexen Zusammenspiel eine wichtige Rolle bei der Assemblierung der Seidenproteine zum fertigen Faden. Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) reagiert auf eine Erhöhung von Kaliumphosphat- und Proteinkonzentration und einer Senkung des pH-Wertes mit einer beschleunigten Aggregation. Damit liefert das System der rekombinanten Proteine eine Möglichkeit, Rückschlüsse auf den immer noch nicht vollständig aufgeklärten Spinnprozess von Radnetzspinnen zu ziehen. Jedoch sind die einzeln untersuchten Aggregatbildungsprozesse zum Einen zu langsam, um im direkten Zusammenhang mit der natürlichen Fadenassemblierung zu stehen und zum Anderen sind die natürlichen

Seidenproteine mit über 200 kDa wesentlich größer als das rekombinante Seidenprotein eADF4(C16) mit 47,7 kDa. Eine Verdopplung der Kettenlänge und damit des Molekulargewichtes führt, abhängig von der Kaliumphosphatkonzentration, zu einer beschleunigten Aggregation. Damit könnte das natürliche System wesentlich sensitiver und schneller auf eine Veränderung der Ionenzusammensetzung reagieren. Des Weiteren ist die Anfangsproteinkonzentration mit bis zu 50 % (w/v) *in vivo* ebenfalls höher als in den untersuchten *in vitro*-Ansätzen. Dies steht im Einklang mit den *in vitro*-Experimenten, in denen beobachtet werden konnte, dass auch hier eine Erhöhung der Proteinkonzentration zu einer beschleunigten Aggregation führt.

3.2.3.6 Bildung verschiedener Morphologien abhängig von der Salzkonzentration

Bei einer morphologischen Analyse der in den vorher beschriebenen Assays entstandenen Aggregate mittels AFM, TEM und REM konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche Morphologien existieren, die abhängig von der eingesetzten Salzkonzentration gebildet werden (Abbildung 3.15).

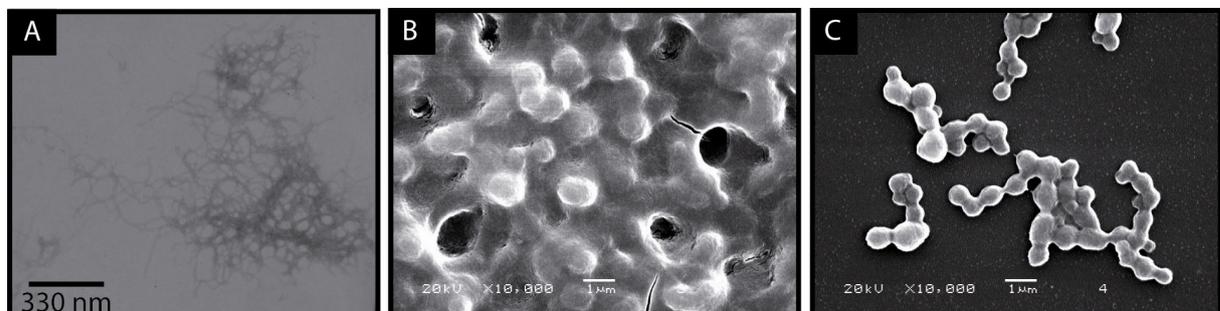


Abbildung 3.15: Bildung verschiedener Morphologien von eADF4(C16). Abhängig von der zugegebenen Kaliumphosphatkonzentration entstehen aus einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml Nanofibrillen und Mikroperlen. Die Entstehungsprozesse unterscheiden sich in thermodynamischen und kinetischen Aspekten. A) 300 mM Kaliumphosphat (TEM), B) 350 mM Kaliumphosphat (REM), C) 400 mM Kaliumphosphat (REM) (Slotta, Rammensee et al. 2008).

Bei niedrigen Salzkonzentrationen unter 300 mM wurden Nanofibrillen detektiert, während bei hohen Salzkonzentrationen über 400 mM kugelförmige Strukturen im Mikrometermaßstab entstanden. Im Übergangsbereich zwischen 300 mM und 400 mM

Kaliumphosphat wurde keine klar definierte vorherrschende Morphologie detektiert sondern amorphe Aggregate zusammen mit Fibrillen oder Kugeln (Abbildung 3.15).

Im Folgenden werden Nanofibrillen und Mikrokugeln aus eADF4(C16) hinsichtlich ihrer Entstehungsprozesse und ihrer morphologischen und strukturellen Eigenschaften näher untersucht.

3.2.4 Nanofibrillen

Die Assemblierung von nanofibrillären Strukturen ist normalerweise ein mehrstufiger Prozess. Ausgehend von der Konformationsänderung einzelner Proteinmonomere, die von mindestens einem Assemblierungsschritt begleitet wird, bilden sich lösliche oder unlöslichen Aggregate (Dobson 2003; Scheibel, Bloom et al. 2004; Ahmad, Uversky et al. 2005; Andrews and Roberts 2007; Top, Kiick et al. 2008). Dieser Prozess wird oft mit dem „nucleation-growth“ Modell beschrieben. Dabei wird zuerst, in einem reversiblen, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, ein Vorläufernukleus gebildet. An diesen lagern sich Proteinmoleküle an und es entstehen stabile Oligomere (Keime). Diese wachsen durch das Binden weiterer Monomere oder anderer Oligomere weiter, bis kein monomeres Protein mehr in Lösung ist, oder die Fibrille ihre kritische Größe erreicht hat und zerbricht (Dobson 2004; Uversky and Fink 2004; Top, Kiick et al. 2008).

3.2.4.1 Bindung von Thioflavin T und Kongo Rot

Um nähere Informationen über den strukturellen Charakter der Nanofibrillen des Spinnenseidenproteins eADF4(C16) zu erhalten, wurde die Bindung der amyloidspezifischen Farbstoffe Thioflavin T und Kongo Rot getestet (Abbildung 3.16). Diese beide Farbstoffe interagieren mit „cross- β “ – Strukturen und sind deshalb empfindliche Detektionssysteme für amyloid-ähnliche Strukturen. Thioflavin-Farbstoffe zeigen nach Bindung an amyloide Strukturen bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz bei 482 nm (Naiki, Higuchi et al. 1989; Khurana, Coleman et al. 2005). Kongo Rot bindet vorzugsweise an eine aggregierte, β -faltblattreiche jedoch üblicherweise nicht an die native Form von Proteinen und zeigt dabei eine Rotverschiebung im Absorptionsspektrum (Klunk, Jacob et al. 1999). Allerdings hängt die Spezifität beider Detektionsfarbstoffe von den Lösungs- und Färbebedingungen ab (Fandrich 2007). So wurden Reaktionen mit nicht-

fibrillären Aggregaten, globulären Proteinen und auch proteinfremden Substanzen beschrieben (DeLellis and Bowling 1970; Khurana, Uversky et al. 2001; Fandrich 2007).

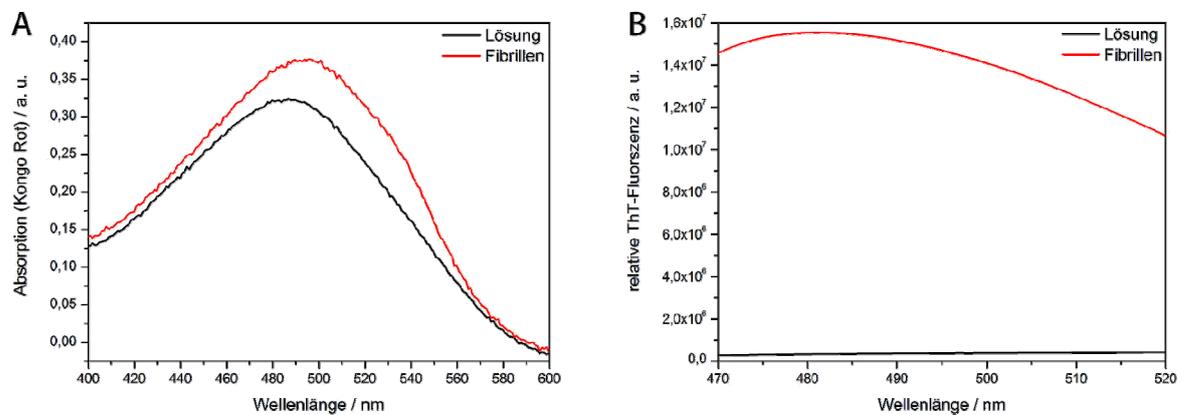


Abbildung 3.16: Bindung von Kongo Rot (A) und Thioflavin T (B) an Spinnenseidenfibrillen. Für die Messung von Thioflavin T wurde eine Anregungswellenlänge von 450 nm gewählt und die Emission zwischen 470 und 520 nm gemessen. Lösung (schwarz) beschreibt gelöstes eADF4(C16), Fibrillen (rot) bei Raumtemperatur durch Rotieren gebildete Nanofibrillen (Slotta, Hess et al. 2007). (a. u. = willkürliche Einheiten)

Bei der Inkubation der eADF4(C16)-Fibrillen, die bei Raumtemperatur unter Rotation gebildet wurden, mit diesen Farbstoffen zeigt sich bei Kongo Rot eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den Rotbereich sowie eine gesteigerte Absorption bei 541 nm (Abbildung 3.16A) und bei Thioflavin T eine gesteigerte Fluoreszenz bei 482 nm (Abbildung 3.16B). Die Bindung der amyloidspezifischen Farbstoffe Thioflavin T und Kongo Rot an Aggregate des Spinnenseidenproteins eADF4(C16) ist ein erster Hinweis auf deren amyloid-ähnlichen Charakter (Slotta, Hess et al. 2007).

3.2.4.2 Sekundärstrukturanalyse mit CD- und FTIR-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur der aus eADF4(C16) gebildeten Nanofibrillen wurde in weiteren Versuchen mittels CD- und FTIR-Spektroskopie analysiert, um weitere Hinweise auf deren amyloiden Charakter zu erhalten (Abbildung 3.17).

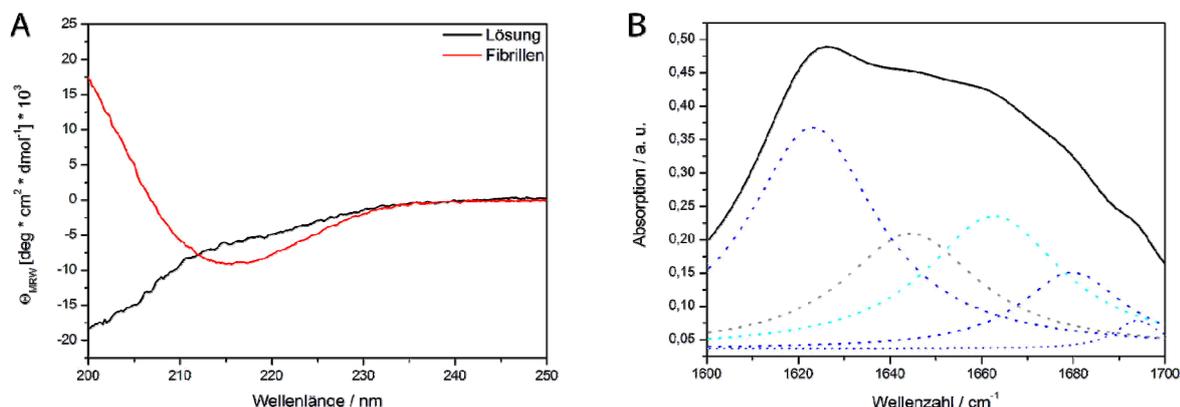


Abbildung 3.17: Fern-UV-CD-Spektren (A) zur Untersuchung der Sekundärstruktur von löslichem eADF4(C16) (Lösung, schwarz) und daraus gebildeten Fibrillen (Fibrillen, rot). FTIR-Spektrum der Amid I-Bande (B) von eADF4(C16)-Nanofibrillen mit Dekonvolution unter Verwendung von Lorentz Oszillatoren (blau = β -Faltblatt, türkis = β -Turn, grau = 3_1 -Helix/ungefaltet) (Slotta, Hess et al. 2007). (a. u. = willkürliche Einheiten)

Während in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 gelöstes eADF4(C16) hauptsächlich ungefaltet vorliegt, nimmt es in fibrillärer Form β -Faltblattstrukturen an, was bei der CD-spektroskopischen Untersuchung durch ein Minimum des Fern-UV-Spektrums bei 218 nm zu sehen ist (Abbildung 3.17A). Eine weitere Analyse der Nanofibrillen mit FTIR-Spektroskopie unterstützt diese Beobachtung (Abbildung 3.17B). Das Maximum der Amid I-Bande liegt hier bei 1623 cm^{-1} , was einem hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen entspricht. Zusätzlich liegt dieses Maximum im für amyloide Fibrillen charakteristischen Wellenzahlbereich zwischen 1610 und 1630 cm^{-1} (Zandomenighi, Krebs et al. 2004; Fandrich 2007). Die Dekonvolution der Amid I-Bande zeigt weitere Signale für β -Turns und 3_1 -Helices bzw. ungefaltete Strukturen. Die daraus berechneten Strukturanteile betragen 40 % β -Faltblatt, 38 % β -Turn und 22 % 3_1 -Helix bzw. ungefaltetes Protein (Slotta, Hess et al. 2007). Diese Analyse stimmt mit dem Modell überein, das für den strukturellen Aufbau eines Spinnenseidenfadens vorgeschlagen wurde. Hier nehmen die alaninreichen Motive β -Faltblattstrukturen ein und bilden die kristallinen Bereiche, während die glycinreichen Motive β -Turn und

3_1 -Helikale Strukturen annehmen, aus denen die amorphen Bereiche bestehen (Guerette, Ginzinger et al. 1996; Arrondo and Goni 1999; Gosline, Guerette et al. 1999).

3.2.4.3 Röntgenbeugungsanalyse

Die Röntgenbeugungsanalyse ist eine Methode, um Informationen über die Tertiärstruktur von fibrillären Proteinen zu erhalten. Um weitere unterstützende Hinweise für den amyloiden Charakter der Spinnenseidenfibrillen aus eADF4(C16) zu erhalten, wurden diese mit charakteristischen amyloiden Fibrillen des Hefeprionproteins Sup35p-NM verglichen (Abbildung 3.18) (Slotta, Hess et al. 2007).

Typische amyloide Fibrillen zeigen bei der Röntgenbeugungsanalyse eine meridionale Reflexion im Bereich von 4,6 bis 4,8 Å, welche den Abstand zwischen 2 β -Strängen, die über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, beschreibt (Hauptkettenabstand). Das äquatoriale Signal, welches den Abstand zwischen zweier nebeneinander liegenden β -Faltblättern angibt, liegt variabel zwischen 5 und 12 Å (Sunde and Blake 1997; Fandrich and Dobson 2002). Diese räumlichen Abstände passen zu der für Amyloide typischen cross- β -Struktur, bei der die β -Stränge der β -Faltblätter senkrecht zur Hauptfibrillenachse laufen.

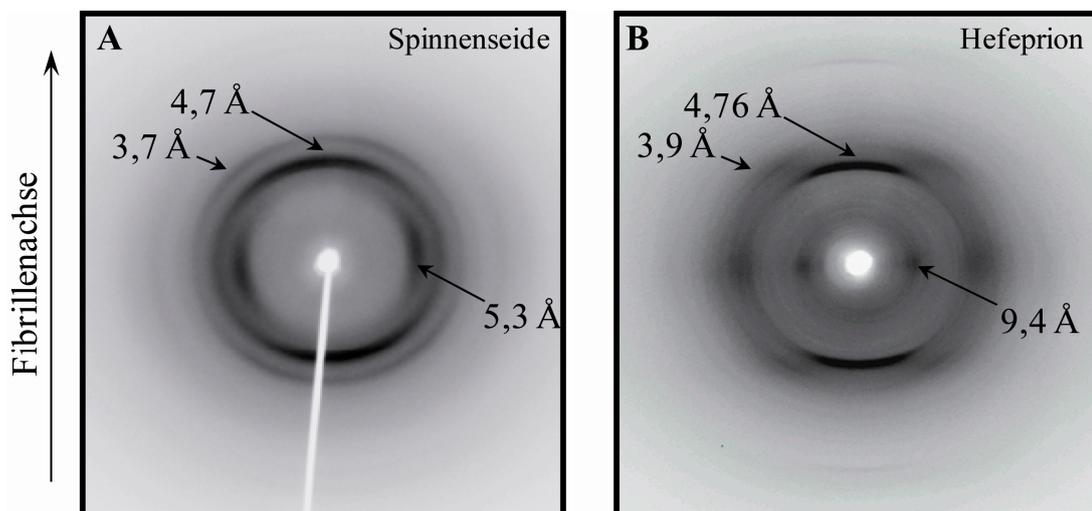


Abbildung 3.18: Röntgenbeugungsmuster von eADF4(C16) Fibrillen (A) im Vergleich zu amyloiden Fibrillen des Prionproteins Sup35p-NM (B) (Slotta, Hess et al. 2007).

Das Röntgenbeugungsmuster von eADF4(C16)-Fibrillen zeigt ein starkes meridionales Streusignal bei 4,7 Å, welches von einem diffusen Signal zwischen 4,5 und 4,7 Å umgeben

ist. Dieses entspricht dem Abstand zwischen den β -Strängen in einem β -Faltblatt. Ein äquatoriales Signal konnte bei $5,3 \text{ \AA}$ detektiert werden, welches dem Abstand zwischen den β -Faltblättern zugeordnet werden kann. Es weist im Fall der eADF4(C16)-Fibrillen auf eine sehr dichte Packung hin, was sich mit der geringen Länge der Seitenketten, welche hauptsächlich von Glyzinen stammen und daher sehr kurz sind, erklären lässt (Abbildung 3.18A). Das Röntgenbeugungsmuster des amyloiden Hefeprioproteins Sup35p-NM besitzt ein meridionales Streusignal bei $4,76 \text{ \AA}$ und ein äquatoriales Signal bei $9,4 \text{ \AA}$ (Abbildung 3.18B). Damit entspricht es dem typischen Muster amyloider Fibrillen. Der direkte Vergleich der beiden Röntgenbeugungsmuster zeigt, dass das äquatoriale Signal des Seidenproteins eADF4(C16) mit $5,3 \text{ \AA}$ signifikant kleiner ist. Generell ist jedoch das Beugungsmuster mit demjenigen einer amyloiden Cross- β -Struktur vergleichbar, da die charakteristischen Signale bei $4,7 \text{ \AA}$ und ein diffuses äquatoriales Signal vorhanden sind.

3.2.4.4 Morphologie

Die Untersuchung der selbstassemblierten Aggregate des Spinnenseidenproteins eADF4(C16) mittels AFM und TEM zeigt eindeutig eine hoch geordnete Struktur, welche typisch für amyloide Fibrillen ist (Abbildung 3.19).

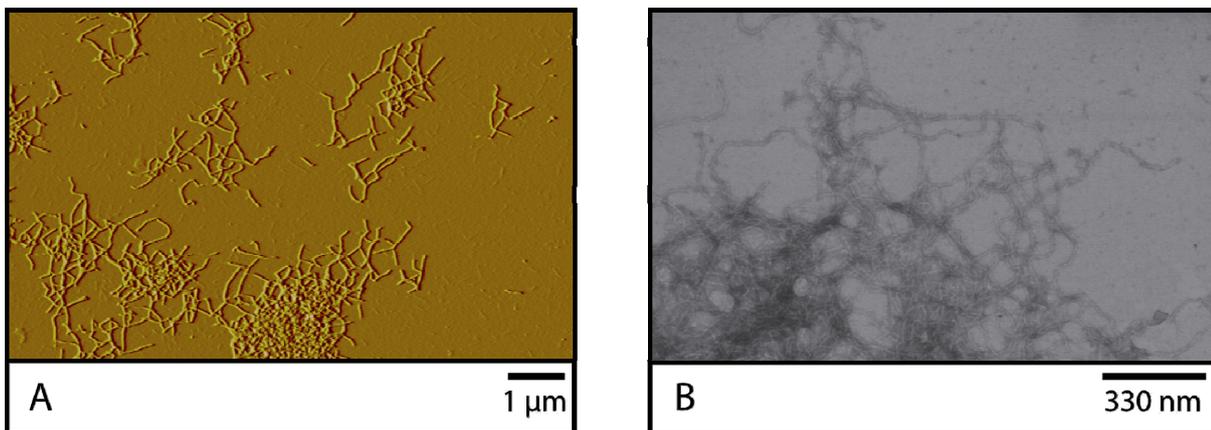


Abbildung 3.19: AFM- (A) und TEM-Aufnahme (B) von Nanofibrillen, die aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) gebildet wurden.

Die gebildeten Nanofibrillen besitzen eine mittlere Höhe von $3.3 \text{ nm} \pm 1$ (gemessen in trockenem Zustand). Somit sind sie ähnlich hoch wie amyloide Fibrillen (Beispiel: Fibrillen des Hefeprioproteins Sup35p-NM haben eine Höhe von $3 \text{ nm} \pm 1$). Die Länge der

Spinnenseidennanofibrillen beträgt bis zu 10 μm , was jedoch stark von den Assemblierungsbedingungen abhängt. Ob diese Nanofibrillen (gebildet bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml) eine Tendenz zur Verzweigung besitzen, kann weder mit AFM noch TEM hinreichend festgestellt werden, da Überlagerungen von Fibrillen fälschlicherweise für Verzweigungen gehalten werden könnten.

Hydrogele, welche das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) ausgehend von hohen Proteinkonzentrationen ab 10 mg/ml, bildet, bestehen aus vernetzten, nanofibrillären Strukturen. Dies zeigt die Analyse von gefriergebrochenen Hydrogelen mittels Kryo-REM (Abbildung 3.20).

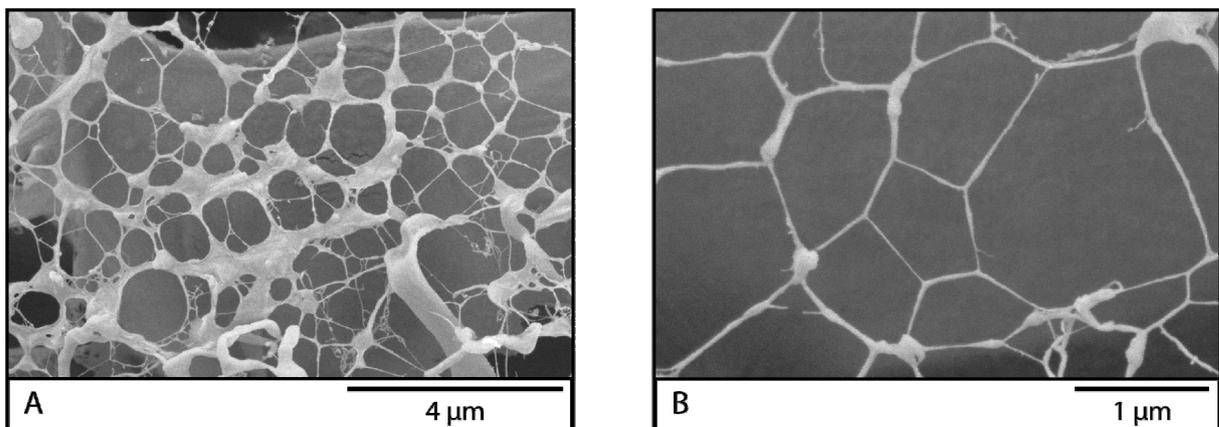


Abbildung 3.20: Kryo-REM-Aufnahmen von gefriergebrochenen Hydrogelen, gebildet aus einer Proteinlösung des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) mit einer Konzentration von 20 mg/ml unter Zugabe von 10 % (v/v) Methanol bei verschiedenen Vergrößerungen.

Auch rheologische Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass eADF4(C16)-Hydrogele aus einem verzweigten Netzwerk von Nanofibrillen bestehen (Rammensee, Huemmerich et al. 2005). Somit zeigt sich, dass die Proteinkonzentration einen Einfluss auf den Verzweigungsgrad der Nanofibrillen aus eADF4(C16) hat.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) gebildeten Nanofibrillen einen amyloid-ähnlichen Charakter besitzen. Die nachfolgenden Abschnitte befassen sich mit der Analyse der Fibrillenbildungskinetik in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration sowie der Zugabe von Keimen.

3.2.4.5 Fibrillenbildung in Abhängigkeit von der Temperatur

Um die Assemblierung von eADF4(C16) in Nanofibrillen hinsichtlich ihrer Kinetik zu untersuchen, wurde gelöstes, monomeres Protein mit einer Konzentration von 0,25 mg/ml bei 30 °C und 60 °C in Anwesenheit von 100 mM Kaliumphosphat inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde mittels Thioflavin T-Fluoreszenz zeitaufgelöst verfolgt (Abbildung 3.21).

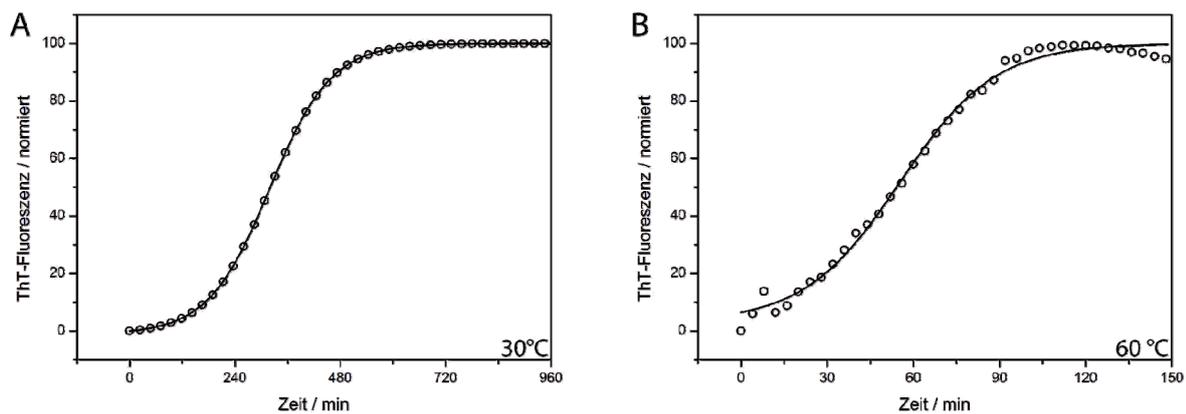


Abbildung 3.21: Fibrillenwachstum des Spinnenseidenproteins eADF4(C16) in Abhängigkeit von der Temperatur in Anwesenheit von 100 mM Kaliumphosphat pH 8,0 und einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml. (A) Inkubation bei 30 °C, (B) Inkubation bei 60 °C. Zur Auswertung wurden sigmoide Fits verwendet (Blotzmann).

Bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C beginnt das Fibrillenwachstum nach ca. 120 Minuten (Ende der Lag-Phase) und ist nach ca. 560 Minuten beendet (Abbildung 3.21A). Bei 60 °C ist die Lag-Phase mit ca. 15 Minuten wesentlich kürzer. Die Fibrillenbildung ist nach ca. 100 Minuten abgeschlossen (Abbildung 3.21B). Aus diesen Werten lässt sich somit schließen, dass sowohl die anfängliche Keimbildung als auch das Fibrillenwachstum bei höheren Temperaturen deutlich schneller ist. Die Abnahme des Thioflavin T-Signals, das am Ende des Plateaus beobachtet werden kann, könnte auf ein Absinken der Fibrillen hindeuten.

Proteine, die typische amyloide Fibrillen bilden, besitzen in ihrer monomeren, nativen Form oft eine Sekundärstruktur, die zunächst entfaltet werden muss, bevor sich die β -Faltblattstrukturen und dadurch Nanofibrillen bilden können. Somit wird der Temperatureffekt auf die Assemblierungskinetik unter anderem auf die thermische Entfaltung der nativen Strukturen zurückgeführt. Im Fall von eADF4(C16) liegt das Protein bereits in nativ entfalteter Form vor, weswegen eine Temperaturerhöhung dem System Energie zuführt.

Dies bewirkt eine beschleunigte Teilchenbewegung und beschleunigte Entfaltungsprozesse und könnte damit zu einer beschleunigten Keimbildung sowie der Abwesenheit bzw. Verkürzung der Lag-Phase führen. Des Weiteren verstärkt eine Temperaturerhöhung die inter- und intramolekularen hydrophoben Wechselwirkungen bei Proteinen (Gurau, Lim et al. 2004; Zhang, Furyk et al. 2005).

Die Sekundärstrukturänderung von *random coil* zu β -Faltblatt, die die Bildung von Keimen und das Wachstum von Fibrillen begleitet, kann zusätzlich mittels CD-Spektroskopie verfolgt werden. Die Fibrillenbildungskinetik von eADF4(C16) in einer Konzentration von 0,2 mg/ml wurde in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) bei 30 °C und 60 °C gemessen (Abbildung 3.22).

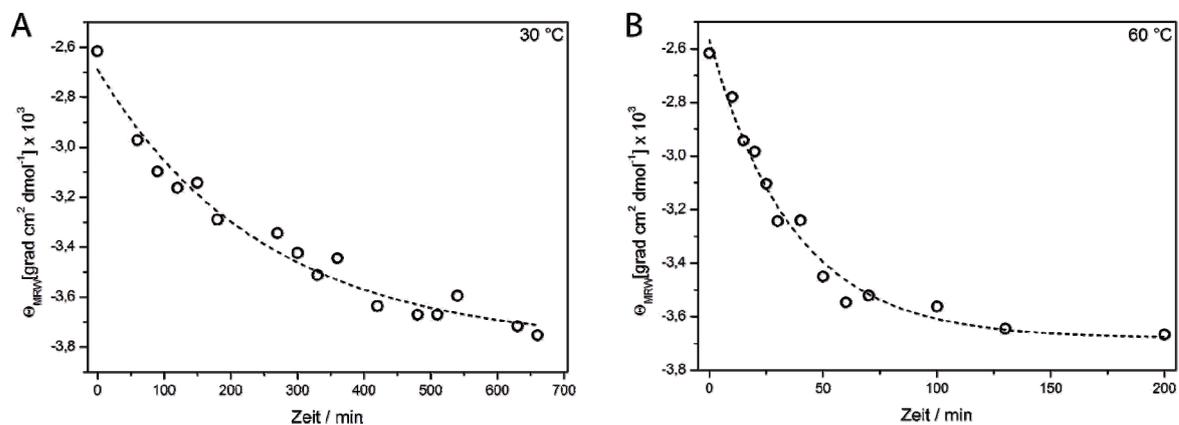


Abbildung 3.22: Fern-UV-CD-Spektroskopie zur Untersuchung der Strukturänderung bei 218 nm (charakteristisches Minimum eines β -Faltblatt-Spektrums) unter Einfluss der Temperatur (30 °C und 60 °C). Das System wurde mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) gepuffert. Zur Auswertung wurden exponentielle Fits verwendet.

Es kann beobachtet werden, dass bei der Untersuchung der Fibrillenbildungskinetik mittels CD-Spektroskopie bei den getesteten Bedingungen keine Lag-Phase detektiert werden kann. Die Strukturänderungsprozesse beginnen direkt beim Start des Versuchs. Wie schon bei der Analyse der Fibrillenbildung mit dem amyloidspezifischen Farbstoff Thioflavin T kann auch hier ein beschleunigender Einfluss der Temperatur gezeigt werden. Der Zeitpunkt, der beschreibt, wann die Hälfte der Moleküle ihre Struktur geändert haben beträgt bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C 248 min \pm 39,7. Bei einer Temperatur von 60 °C verschiebt sich die halbmaximale Strukturänderung auf 36,6 min \pm 3,9.

3.2.4.6 Fibrillenbildung in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Die eingesetzte Konzentration an kosmotropen Salzen hat einen Einfluss auf die hydrophoben Interaktionen und dadurch auf die Strukturbildung bzw. Assemblierung von Proteinen. Zur Untersuchung dieses Effektes wurde eADF4(C16) ($c = 0,2 \text{ mg/ml}$) bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Anwesenheit von 100 mM und 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) inkubiert. Die Analyse der Sekundärstrukturänderung erfolgte mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie (Abbildung 3.23).

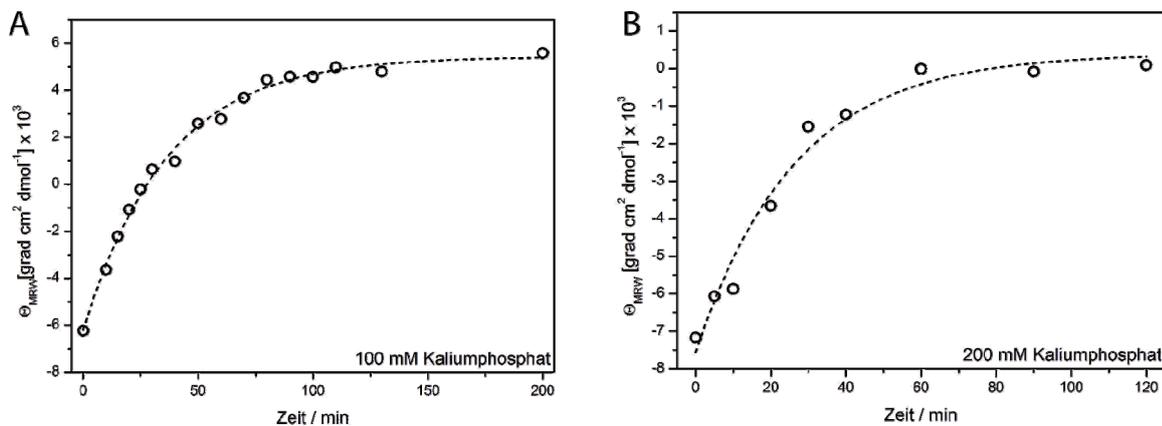


Abbildung 3.23: Fern-UV-CD-Spektroskopie zur Analyse der Sekundärstrukturänderung unter Einfluss von 100 mM und 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0). Inkubiert wurde bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Strukturänderung bei 200 nm (Minimum des *random coil*-Spektrums von eADF4(C16) in wässrigen Lösungen) verfolgt. Zur Auswertung wurden exponentielle Fits verwendet.

Aus den Messungen wird ersichtlich, dass die Fibrillenbildungskinetik durch eine höhere Salzkonzentration beschleunigt wird. Bei 100 mM Kaliumphosphat beträgt die Zeit nach der die Hälfte der Moleküle die Struktur geändert haben $36,6 \text{ min} \pm 1,9$, das Plateau und damit das Ende der Assemblierung wird nach ca. 100 Minuten erreicht. Unter Einfluss von 200 mM beschleunigt sich die Fibrillenbildung und die halbmaximalen Strukturänderung wird nach $26,4 \text{ min} \pm 4,6$ erreicht. Die Assemblierungsreaktion ist schon nach ca. 70 Minuten beendet.

3.2.4.7 Fibrillenbildung in Abhängigkeit von der Zugabe von Keimen

Ein Fibrillenwachstum, das dem „nucleation-growth“ Mechanismus folgt, kann durch die Zugabe von Keimen (kleinen Oligomeren) kinetisch beschleunigt werden. Dadurch fällt die anfängliche Keimbildung aus Proteinmonomeren, die den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (so genannte „Lag-Phase“) darstellt, weg. Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus auch für die Fibrillenbildung des Spinnenseidenproteins eADF4(C16) Gültigkeit hat, wurden zu gelöstem, monomerem Protein 10 % (v/v) eADF4(C16)-Keime, welche durch Ultraschallbehandlung von Nanofibrillen hergestellt wurden, zugesetzt und die Fibrillenentstehung mittels Thioflavin T-Fluoreszenz bei 25 °C und 60 °C aufgezeichnet (Abbildung 3.24).

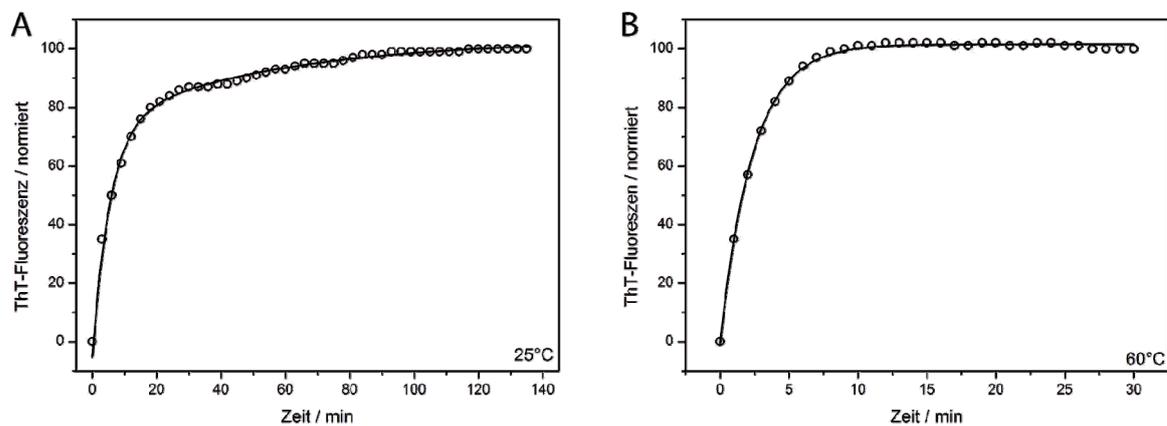


Abbildung 3.24: Untersuchung des Einflusses der Zugabe von 10 % (v/v) Keimen bei 25 °C und 60 °C auf die Fibrillenbildung von eADF4(C16). Zur Auswertung wurden doppelt-exponentielle Fits verwendet.

Dabei wurde festgestellt, dass durch die Zugabe von Keimen die Lag-Phase verschwindet. Dadurch wird das Plateau, das die Beendigung des Fibrillenwachstums anzeigt, schon nach 35 Minuten (25 °C) bzw. 8 Minuten (60 °C) erreicht (Abbildung 3.24). Durch diese Beobachtungen könnte die Bildung von Nanofibrillen aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) mit dem *nucleation-growth*-Modell beschrieben werden (siehe Diskussion).

Die Kinetik der Fibrillenbildung unter Anwesenheit von 10 % (v/v) Keimen wurde zusätzlich mit CD-Spektroskopie untersucht. Auch hier wurde die Zunahme an β -Faltblattstrukturen im Ansatz bei 218 nm verfolgt. Die eingesetzte Konzentration von eADF4(C16) betrug in diesem Experiment 0,2 mg/ml und der Ansatz wurde bei 60 °C inkubiert (Abbildung 3.25).

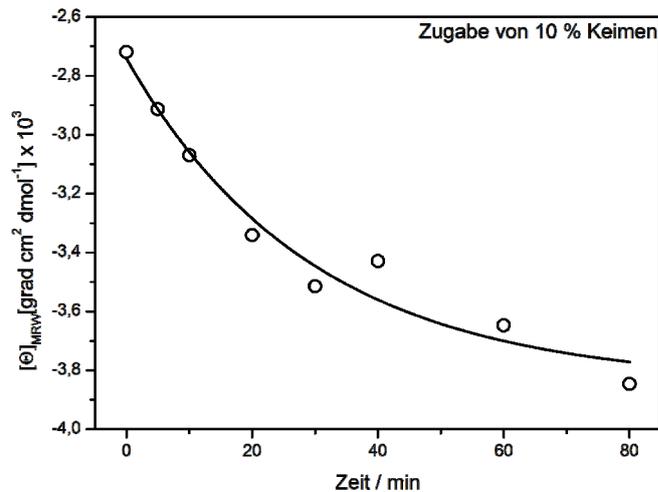


Abbildung 3.25: Beobachtung der Strukturänderung bei 218 nm unter Anwesenheit von 10 % (v/v) Keimen ($T = 60^\circ\text{C}$). Zur Auswertung wurde ein exponentieller Fit verwendet.

Die Entstehung von Nanofibrillen aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) ist durch die Zugabe von 10 % (v/v) Keimen bei 60°C schneller beendet (Abbildung 3.25) als bei Zugabe von 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) und einer Inkubationstemperatur von 60°C (Abbildung 3.22). Die halbmaximale Strukturänderung wird in diesem Experiment nach $29,5 \text{ min} \pm 8,3$ erreicht.

Die Ergebnisse der beiden verwendeten Methoden zur Untersuchung der Fibrillenbildungskinetik von eADF4(C16) (Bindung von Thioflavin T und Änderung der Sekundärstruktur) unter Zugabe von 10 % Keimen ergänzen sich hinsichtlich Bildungsrate und Zeitdauer bis zum Erreichen des Endzustandes. Es wird in beiden Fällen keine Lag-Phase detektiert. Erstaunlicherweise stimmen aber die Ergebnisse aus den Thioflavin T-Experimenten und CD-spektroskopischen Untersuchungen zur Fibrillenbildung in Anwesenheit von 100 mM Kaliumphosphat nicht überein. Während bei den Thioflavin T-Untersuchungen zur ungeseedeten Fibrillenbildung eine Lag-Phase beschrieben werden konnte (siehe Abbildung 3.21A), so wird diese bei den CD-spektroskopischen Untersuchungen nicht beobachtet (Abbildung 3.22). Im Zeitfenster der Lag-Phase wird eine Strukturänderung detektiert, was bedeutet, dass im Reaktionsansatz sofort Strukturänderungsprozesse beginnen, die vom amyloidspezifischen Farbstoff Thioflavin T nicht erkannt werden.

3.2.5 Mikrokugeln

Eine weitere Morphologie, die aus dem rekombinant hergestellten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) gebildet wird, sind Mikrokugeln. Es wurden bereits verschiedenste Methoden beschrieben, wie kugelförmige Strukturen aus Proteinen hergestellt werden können (siehe Einleitung).

3.2.5.1 Morphologie

Mikrokugeln aus eADF4(C16) werden durch Fällung von wässrigen Seidenproteinlösungen (z. B. 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit hohen Konzentrationen kosmotroper Salze wie Ammoniumsulfat oder Kaliumphosphat gebildet. Bei einer Kaliumphosphatkonzentration bis zu 500 mM entstehen keine vereinzelt Kugeln sondern „verschmolzene“ Cluster (Abbildung 3.26A).

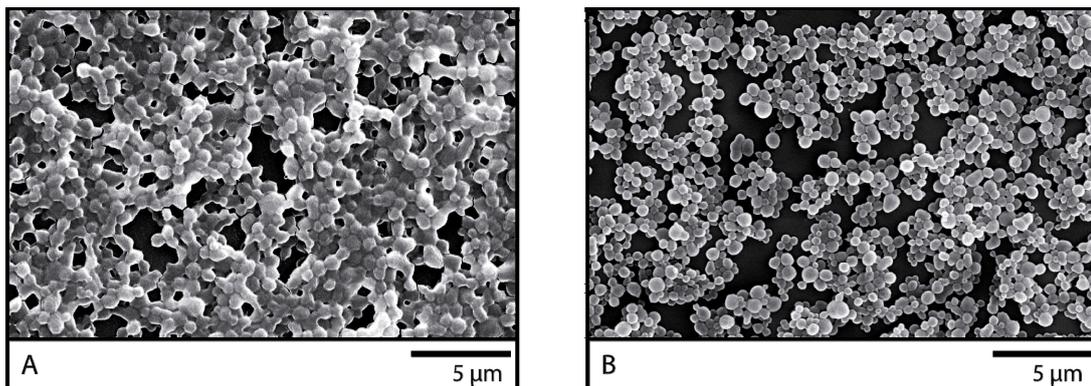


Abbildung 3.26: REM-Aufnahme zur Detektion der Bildung von Clustern bei niedrigen Kaliumphosphatkonzentrationen unter 500 mM; Fällung einer Proteinlösung von eADF4(C16) ($c = 1 \text{ mg/ml}$) mit 400 mM (A) und 1 M Kaliumphosphat (B).

Bei einer Erhöhung der Salzkonzentration auf 1 M, verminderte sich die Clusterbildung und separierte Mikrokugeln entstehen (Abbildung 3.26 B). Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration hat keinen zusätzlichen Effekt mehr. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass im Bereich von 10 °C bis 80 °C die Temperatur keine Veränderung der Kugelmorphologie hervorruft. Für diese Untersuchungen wurde die Fällung von eADF4(C16) ($c = 1 \text{ mg/ml}$) mit 400 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) im Endvolumen bei den

entsprechenden Temperaturen durchgeführt und mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert (Abbildung 3.27).

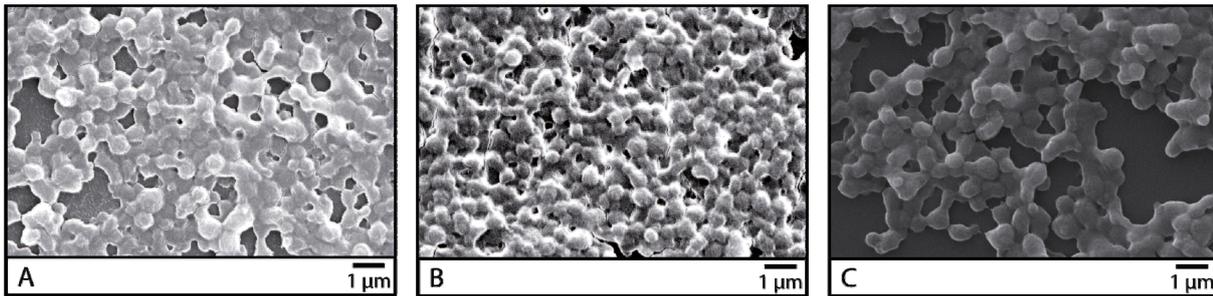


Abbildung 3.27: Fällung von eADF4(C16)-Lösungen mit 400 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) im Endvolumen bei unterschiedlichen Temperaturen: A) 10 °C, B) 40 °C, C) 80 °C.

Der Einfluss des Molekulargewichtes von rekombinanten Spinnenseidenproteinen auf die Kugelbildung wurde ebenfalls genauer analysiert. Hierfür wurde das Protein eADF4(C32) verwendet, das ein doppelt so großes Molekulargewicht wie eADF4(C16) besitzt, und mit diesem hinsichtlich der zur Kugelbildung minimal benötigten Kaliumphosphatkonzentration verglichen. Zu den gelösten Proteinen mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml wurden entsprechende Mengen Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Die Analyse der Mikrokugeln erfolgte im REM (Abbildung 3.28).

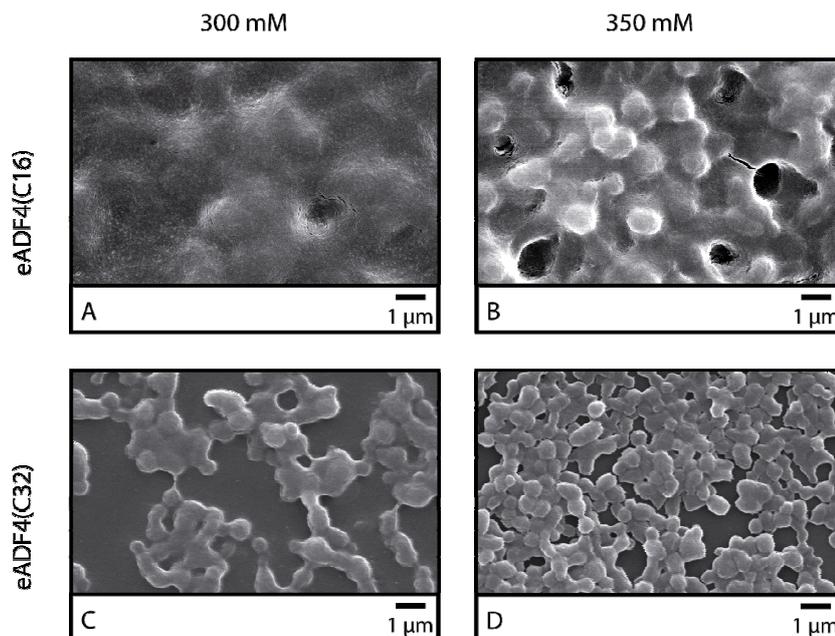


Abbildung 3.28: Kugelbildung von eADF4(C16) (A, B) und eADF4(C32) (C, D) in Abhängigkeit von der Kaliumphosphatkonzentration (300 und 350 mM).

Es zeigt sich, dass das Protein eADF4(C32) bereits bei 300 mM Kaliumphosphat (pH 8,0) Mikrokugeln bildet (Abbildung 3.28C), während diese Strukturen bei eADF4(C16) erst bei 350 mM zu entstehen beginnen (Abbildung 3.28B). Eine Verlängerung der Inkubationsdauer hat keinen weiteren Einfluss auf die Morphologie der Aggregate.

Die Spinnenseidenmikrokugeln besitzen eine gleichmäßig strukturierte Oberfläche. Durch eine Veränderung der Proteinkonzentration im Ansatz kann der mittlere Durchmesser dieser Mikrokugeln variiert werden. Wie stark sich der Kugeldurchmesser ändert, hängt mit den Mischparametern von Protein- und Salzlösung zusammen. Je langsamer die Durchmischung, desto größer der erzielte Durchmesser.

Das Protein wurde mittels Dialyse einer wässrigen Seidenproteinlösung (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) gegen 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 gefällt. Die daraus entstandenen Mikrokugeln wurden morphologisch mittels REM analysiert (Abbildung 3.29).

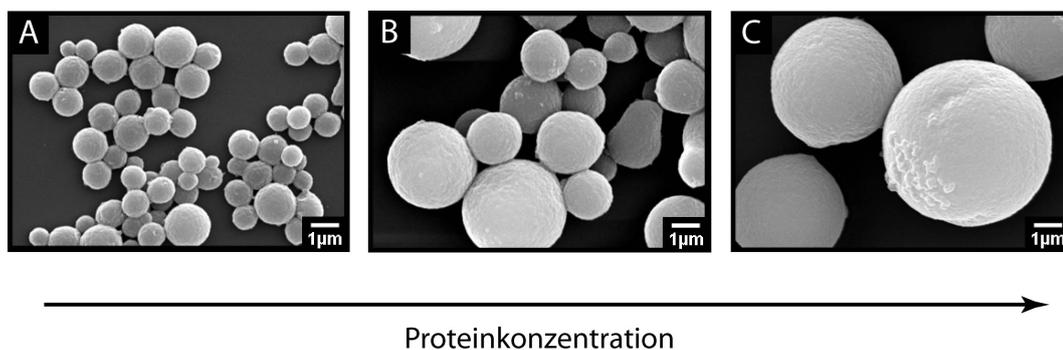


Abbildung 3.29: REM-Untersuchungen zur Analyse des Kugeldurchmessers abhängig von der Proteinkonzentration. Darstellung der durch Dialyse gegen 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) entstandenen Mikrokugeln assembliert mit Proteinausgangskonzentrationen von 0,1 mg/ml (A), 1 mg/ml (B) und 10 mg/ml (C).

Der Durchmesser der gebildeten Mikrokugeln steigt mit der Proteinkonzentration von $1,04 \mu\text{m} \pm 0,5$ bei 0,1 mg/ml auf $2,3 \mu\text{m} \pm 1,2$ bei 1 mg/ml und $3,9 \mu\text{m} \pm 1,7$ bei 10 mg/ml. Die Abweichung vom mittleren Durchmesser wird größer, je höher die Ausgangsproteinkonzentration ist. Diese Beobachtung wird durch Untersuchungen mittels Laserbeugungsspektroskopie bestätigt (Abbildung 3.30) (Lammel, Schwab et al. 2008).

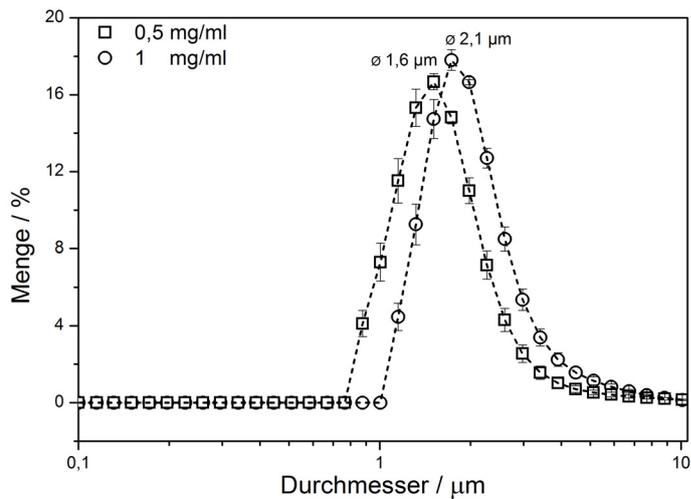


Abbildung 3.30: Laserbeugungsspektroskopie zur Analyse der Größenverteilung von eADF4(C16)-Mikrokugeln, die durch Dialyse von Proteinlösungen mit Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml gegen 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) hergestellt wurden (Lammel, Schwab et al. 2008).

Um die innere Morphologie der Mikrokugeln zu analysieren, wurden eADF4(C16)-Mikrokugeln, die durch Dialyse hergestellt wurden, durch eine Gefrierbruchtechnik aufgebrochen und mittels Kryo-REM morphologisch analysiert (Abbildung 3.31).

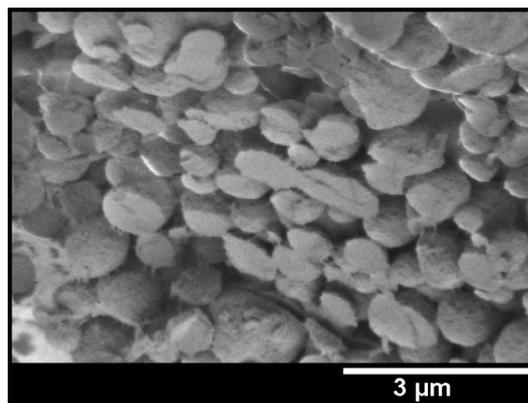


Abbildung 3.31: Kryo-REM Aufnahme von Mikrokugeln, gefällig aus eADF4(C16)-Lösungen ($c = 1 \text{ mg/ml}$) in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) mit 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) (Slotta, Rammensee et al. 2008).

Es zeigt sich deutlich, dass die Seidenkugeln aus eADF4(C16) kompakt sind und keine offensichtliche Unterstrukturierung wie Hohlräume oder Schichtstrukturen aufweisen.

3.2.5.2 Chemische Stabilität

Die fertig gebildeten Mikrokugeln werden weder durch Inkubation in wässrigen Systemen noch durch Behandlung mit Denaturierungsmitteln wie 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidiniumhydrochlorid, aufgelöst. Lediglich sehr starke Denaturierungsmittel wie Hexafluoroisopropanol, Ameisensäure oder 6 M Guanidiniumthiocyanat führen zur Denaturierung der Kugelstrukturen. Diese hohe Stabilität gegen Lösungsmittel, die allen zuvor beschriebenen Seidenmorphologien (Vliese, Filme, Nanofibrillen) zu eigen ist, könnte auf die Sekundärstruktur zurückgeführt werden (Slotta 2005).

3.2.5.3 Sekundärstruktur

Nachfolgend wurde deshalb die Sekundärstruktur der Mikrokugeln mittels FTIR-Spektroskopie analysiert. Dazu wurden Mikrokugeln auf einen ATR-Kristall (Ruthenium) aufgetragen und analysiert (Abbildung 3.32).

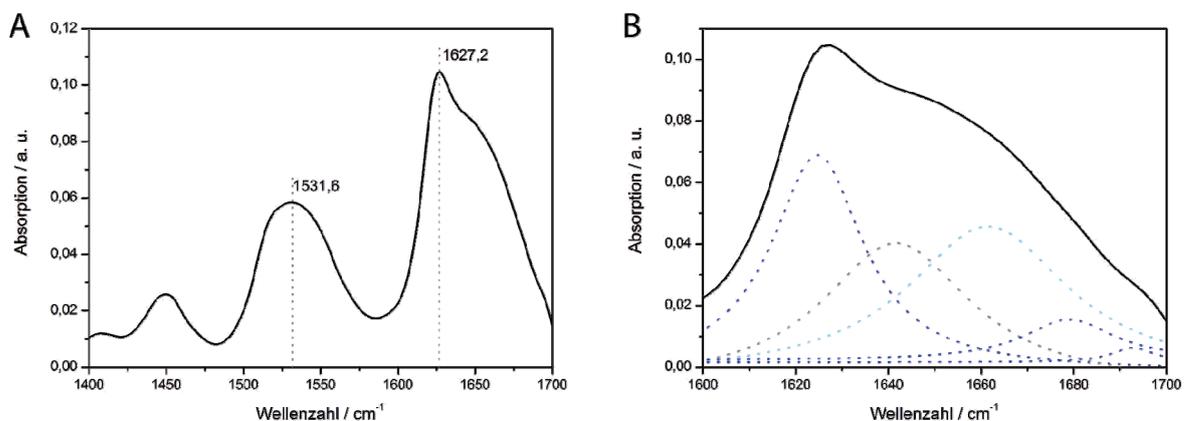


Abbildung 3.32: FTIR-Spektren von Mikrokugeln aus eADF4(C16). Dargestellt sind die Amidbanden I bis III (Wellenzahlbereich von 1400 bis 1700 cm^{-1}) (A) und die Dekonvolution der Amid I-Bande (blau = β -Faltblatt, türkis = β -Turn, grau = 3_1 -Helix/ungefaltet (B). (a. u. = willkürliche Einheiten)

Die Maxima der Amid I und Amid II-Bande liegen bei Wellenzahlen von $1627,2 \text{ cm}^{-1}$ und $1531,6 \text{ cm}^{-1}$, was auf einen großen Anteil an Strukturen hindeutet (Abbildung 3.27A). Nach Dekonvolution der Amid I-Bande mit Lorentzoszillatoren wird diese Beobachtung bestätigt. Es ergeben sich Werte von 34,5 % β -Faltblattstrukturen, 34,7 % β -Turn und 30,6 % 3_1 -Helix bzw. ungefaltetem Protein. Diese Sekundärstrukturanteile lassen sich mit denen vergleichen, die bei der Analyse der eADF4(C16)-Fibrillen gefunden wurden (siehe Abbildung 3.17).

3.2.5.4 Aggregatbildungskinetik

Die Assemblierung von Proteinen wie Lysozym zu kugelförmigen Strukturen wurde bereits gezeigt. Jedoch wurde der genaue Mechanismus der Kugelbildung noch nicht beschrieben. Sowohl unter dem Aspekt der Assemblierung von Spinnenseidenproteinen zum fertigen Faden *in vivo* als auch in Hinblick auf ihre Anwendung in verschiedensten technischen Bereichen ist das Verständnis der Prozesse, die zu Proteinmikrokugeln führen, von Interesse. Das Aussalzen von Proteinen kann allgemein als Flüssig-Flüssig-Phasenseparation bezeichnet werden. Dabei trennt sich die homogene Proteinlösung in eine wässrige und eine dichte proteinreiche Phase auf. Dieser Effekt wurde bereits für andere Proteine beschrieben und kann auch bei Spinnenseidenlösungen festgestellt werden (Exler, Hummerich et al. 2007). Da eine Trübung der Proteinlösung (Konzentration 0,5 mg/ml) unmittelbar nach der Zugabe des kosmotropen Salzes Kaliumphosphat (1 M, pH 8,0) erfolgt, wurde die Zeitdauer bis zum Erreichen der maximalen Streuung, die der Phasenseparation zugeordnet werden kann, in einem Stopped-Flow Gerät unter Betrachtung des Streusignals bei 500 nm untersucht (Abbildung 3.33).

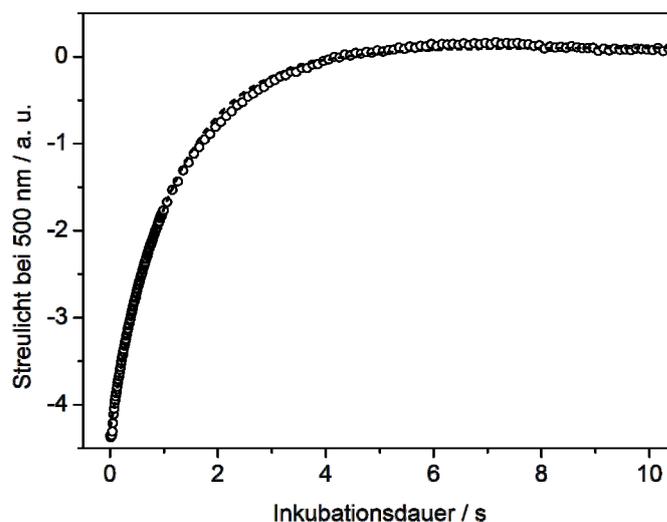


Abbildung 3.33: Stopped-Flow Messungen unter Beobachtung der Zunahme des Streusignals bei 500 nm nach Zugabe von 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 zu einer eADF4(C16)-Proteinlösung ($c = 0,5$ mg/ml). Zur Auswertung wurde ein exponentieller Fit verwendet (Slotta, Rammensee et al. 2008). (a. u. = willkürliche Einheiten)

Das maximale Streusignal wird nach fünf Sekunden erreicht. Danach nimmt das Streusignal nicht weiter zu sondern erreicht ein Plateau. Somit ist die Separation in wässrige und proteinreiche Phase abgeschlossen.

Das Verdünnen der Salzkonzentration im Ansatz auf 166 mM, welche unterhalb der für Aussalzen und Phasenseparation benötigten Konzentration liegt, führt anfangs zu einer vollständigen, später zu einer teilweisen Auflösung der Phasenseparation (Abbildung 3.34). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass neben der Trennung in eine proteinarme und eine proteinreiche Phase auch ein Phasenübergang von *random coil* zu höher geordneten Strukturen in der proteinreichen Phase eine große Rolle bei der Bildung von Mikrokugeln aus dem Seidenprotein eADF4(C16) spielt.

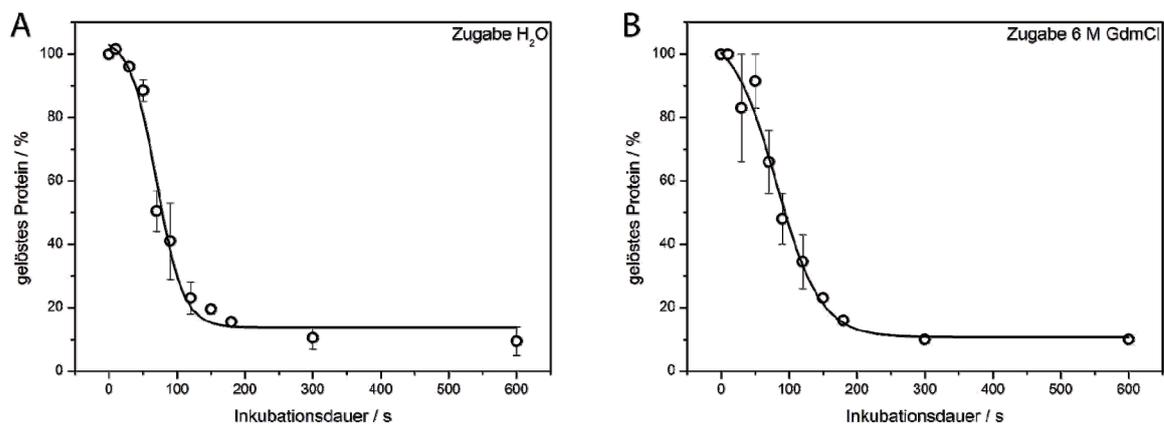


Abbildung 3.34: Umkehr der Phasenseparation durch Zugabe von Wasser (A) und 6 M GdmCl (B). Auf der Ordinate ist die im Überstand verbliebene Konzentration des Proteins eADF4(C16) zu den einzelnen Inkubationszeiten mit nachfolgender Zugabe der Verdünnungsmittel aufgetragen. Zur Auswertung wurden sigmoidale Fits verwendet.

Es fällt auf, dass es Unterschiede im Wiederauflösungsverhalten der Phasenseparation bzw. des Phasenübergangs zwischen der bloßen Verdünnung der Salzkonzentration mit Wasser und der Zugabe von Denaturierungsmitteln wie 6 M GdmCl oder 8 M Harnstoff (nicht gezeigt) gibt. Während nach der Zugabe von Wasser (Abbildung 3.34A) nach 120 Sekunden keine Auflösung des Proteins mehr erzielt werden kann, wird dieser Punkt nach der Zugabe von 6 M GdmCl erst nach 200 Sekunden (Abbildung 3.34B) erreicht.

Daraus lässt sich ableiten, dass es mindestens zwei Phasenübergangsprozesse gibt. Die Strukturen, die sich bei dem ersten Phasenübergang bilden, sind wasserunlöslich jedoch löslich in bestimmten Denaturierungsmitteln, während erst beim zweiten Phasenübergang gegen Denaturierungsmittel stabilere Strukturen (β -Faltblatt) ausgebildet werden.

Die während der zeitaufgelösten Untersuchungen gebildeten Aggregate wurden mittels REM-Untersuchungen genauer analysiert. Hierfür wurde zu einer wässrigen Proteidlösung (0,5 mg/ml) 1 M Kaliumphosphat (pH 8,0) zugegeben, um die Kugelbildung zu initialisieren.

Nach bestimmten Inkubationszeiten (30 Sekunden, 60 Sekunden und 300 Sekunden) wurde die Salzkonzentration mit destilliertem Wasser auf 166 mM unter die für die Kugelbildung benötigte Konzentration verdünnt. Nach einem Wasch- und Zentrifugationsschritt zur Entfernung des in Lösung verbliebenen Restproteins und des Salzes wurden die Aggregate auf ein REM-Plättchen aufgetragen und analysiert (Abbildung 3.35)

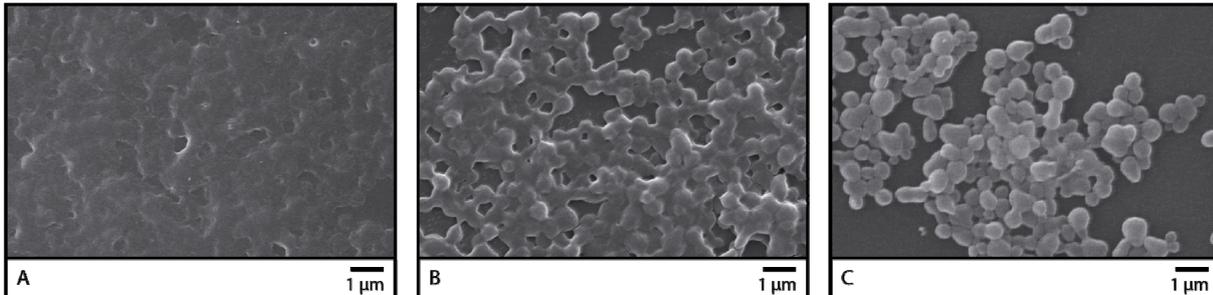


Abbildung 3.35: SEM-Untersuchung der zeitaufgelösten Kugelbildung von eADF4(C16). Zugabe von 1 M Kaliumphosphat (pH 8,0) und Stopp der Reaktion durch Verdünnen des Salzes mit Wasser auf 166 mM nach A) 30 s, B) 60 s und C) 300 s.

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen deutlich, dass mit zunehmender Inkubationsdauer, unter Einfluss von 500 mM Kaliumphosphat, die aus eADF4(C16) gebildeten Mikrokugeln strukturierter und vereinzelter vorliegen. Die REM-Aufnahme nach einer Inkubationszeit von 30 Sekunden zeigt einen Proteinteppich, was auf die Bildung von amorphen Aggregaten hindeutet. Nach einer Inkubationsdauer von 60 Sekunden sind bereits kugelförmige aber miteinander verschmolzene Aggregate zu sehen, während nach 300 Sekunden deutlich separierte Proteinkugeln zu erkennen sind (Abbildung 3.35). Diese Beobachtungen unterstützt die Theorie, dass auch die Kugelentstehung ein mehrstufiger Prozess ist:

Die beobachtete Phasenseparation in eine proteinreiche und eine proteinarme Phase ist nach ca. fünf Sekunden, wie aus dem Stopped-Flow Experiment (siehe S. 90) hervorgeht, abgeschlossen. In der proteinreichen Phase beginnen erste Strukturbildungsprozesse. Die einzelnen Phasen können, solange die β -faltblattreiche Struktur der finalen eADF4(C16)-Mikrokugeln noch nicht ausgebildet ist, miteinander verschmelzen. Die Strukturänderung zu β -Faltblatt nimmt über die Zeit zu, was nach einer ausreichenden Inkubationsdauer in Kaliumphosphat zu vollständig getrennten Mikrokugeln führt.

3.2.6 Assemblierung von eADF3((AQ)24)nr3

Während des Spinnprozesses spielen neben den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Faktoren wie Ionenverhältnis, Proteinkonzentration und pH-Wert Scherkräfte eine wichtige Rolle bei der Assemblierung der Spinnenseidenproteine zu einem Faden (Breslauer, Lee et al. 2009). Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden in einer Mikrofluidikkammer 300 mM bzw. 500 mM Kaliumphosphat und eine Senkung des pH-Wertes von 8,0 auf 6,0 mit einem Laminarfluss kombiniert und das Assemblierungsverhalten der rekombinanten Spinnenseidenproteine eADF3((AQ)24nr3) und eADF4(C16) unter diesen Bedingungen analysiert (Rammensee, Slotta et al. 2008).

Das Protein eADF4(C16) assemblierte unter allen in diesem Setup getesteten Bedingungen unabhängig von Scherkräften zu Mikrokugeln, wie sie im vorangegangenen Kapitel bereits gezeigt wurden (Abbildung 3.15). Die Ergebnisse einer detaillierten Analyse dieser Mikrokugeln befinden sich unter Abschnitt 3.2.6.

Auch das Protein eADF3((AQ)24nr3) assembliert unter Anwesenheit von mindestens 500 mM Kaliumphosphat zu kugelförmigen Assemblaten mit einem Durchmesser zwischen 1 und 5 μm . Diese Assemblate sind jedoch, anders als die Mikrokugeln aus eADF4(C16) chemisch nicht stabil sondern lösen sich, sobald das Salz durch Wasser ersetzt wird, wieder auf (Abbildung 3.16A). Scherkräfte und pH-Wertänderung von 8,0 auf 6,0 beeinflussen die Morphologie dieser Assemblate welche, abhängig von beiden Faktoren miteinander verschmelzen (Abbildung 3.16B) oder fadenförmige Strukturen bilden (Abbildung 3.16C).

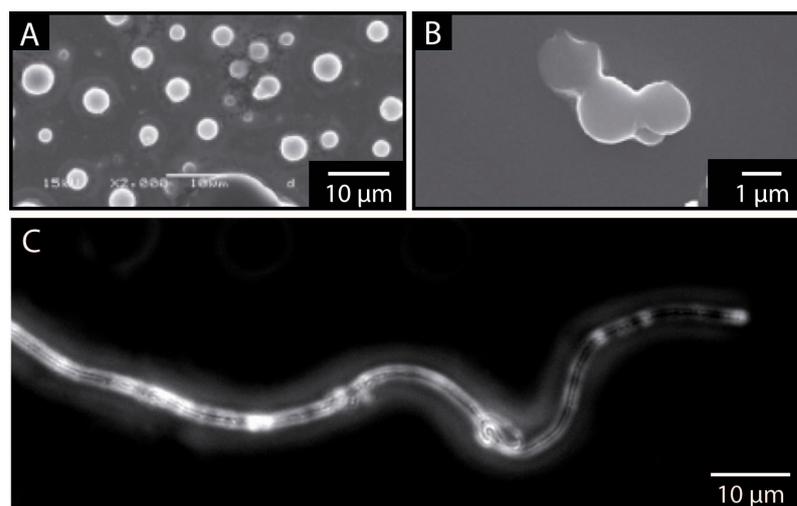


Abbildung 3.36: REM-Aufnahme kugelförmiger Assemblate von eADF3((AQ)24nr3) (A, B) und mikroskopische Aufnahme einer eADF4((AQ)24nr3)-Faser unter kreuzpolarisiertem Licht (C). Helle und dunkle Bereiche weisen hier auf Regionen mit höherer bzw. niedrigerer Ordnung hin (Rammensee, Slotta et al. 2008).

Die kugelförmigen Assemblate verschmelzen, wenn sie durch den Laminarfluß in engen Kontakt kommen (Abbildung 3.16B). Dies reicht jedoch nicht aus, um fadenförmige Strukturen, wie in Abbildung 1.16C gezeigt, zu bilden. Diese entstehen nur, wenn die Flußrate mindestens 600 $\mu\text{l}/\text{Stunde}$ beträgt und die Proteinlösung eine Konzentration von 20 mg/ml besitzt. Des Weiteren müssen pH-Wertänderung und Laminarfluss simultan auftreten. Ob die Kaliumphosphatkonzentration gleichzeitig oder zu einem früheren Zeitpunkt geändert wird, hat keinen Einfluss auf die Fadenentstehung. Die Faser kann nun nicht mehr in Wasser aufgelöst werden (Rammensee, Slotta et al. 2008).

Die Untersuchung der Sekundärstruktur der verschiedenen Assemblate mittels FTIR-Spektroskopie zeigte, dass die kugelförmigen Strukturen aus eADF3((AQ)24nr3) viele α -Helices (55 %) besitzen, während die fadenförmigen Strukturen einen hohen Anteil an β -Strukturen (β -Faltblatt: 45 %; β -Turn: 25 %) haben (Rammensee, Slotta et al. 2008).

Da die *Dragline*-Seide aus zwei Proteinkomponenten besteht, wurde im Folgenden die Fadenbildung ausgehend von Mischungen aus eADF3((AQ)24nr3) und eADF4(C16) unter den oben genannten Bedingungen getestet. Das Mischverhältnis der beiden Proteine betrug 10:1 bzw. 1:1. Um die Verteilung von eADF4(C16) im Assemblat zu bestimmen, wurden 10 % des eingesetzten Proteins mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert (Abbildung 3.17).

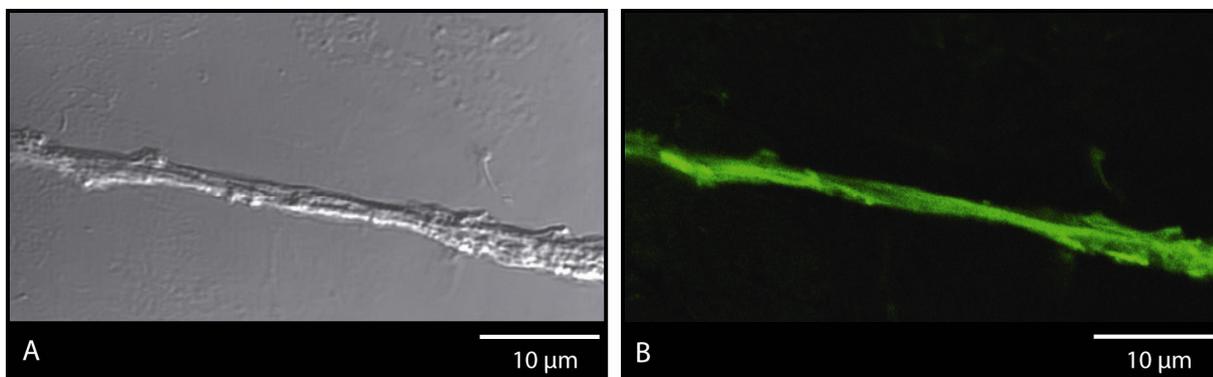


Abbildung 3.37: Aufnahme einer eADF3((AQ)24nr3)/eADF4(C16)-Mischfaser mit einem Differenzial-Interferenzmikroskop (A) und mit einem Fluoreszenzmikroskop (B) (Rammensee, Slotta et al. 2008).

Die mikroskopische Untersuchung der Fasern, die aus einer Mischung der beiden *Dragline*-Seidenproteine eADF3((AQ)24nr3) und eADF4(C16) in der Mikrofluidikkammer entstanden sind, ähneln morphologisch den Fasern, die nur aus eADF3((AQ)24nr3) gebildet wurden (Abbildung 3.17A). Die Untersuchung der Faser im Fluoreszenzmikroskop zeigt eine homogene Verteilung des Proteins eADF4(C16) im Faden (Abbildung 3.18B).

Die Sekundärstrukturanteile dieser Mischfaser wurde ebenfalls mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Es wurde berechnet, dass diese Faser 46 % α -Helices, 40 % β -Faltblätter und 13 % β -Turns enthält. Darin unterscheidet sich die Mischfaser von der Einzelproteinfaser, die einen wesentlich höheren Anteil an β -Strukturen besitzt (Rammensee, Slotta et al. 2008).

4 Diskussion

4.1 Assemblierungsformen aus rekombinanten Seidenproteinen

Spinnenseide besitzt herausragende mechanische Eigenschaften, was sie zu einem der interessantesten biologischen Materialien mit Anwendungspotenzial für medizinische, kosmetische und technische Bereiche macht.

Nicht nur Seidenfäden besitzen ein hohes Anwendungspotenzial, sondern auch verschiedene andere Morphologien, die von Spinnenseidenproteinen gebildet werden können. Für eine gezielte technische oder medizinische Anwendung der verschiedenen Morphologien ist es sehr wichtig, diese grundlegend zu charakterisieren.

Das in dieser Arbeit untersuchte rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) ist von dem Protein ADF4, das ein natürlicher Bestandteil des Abseilfadens der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* ist, abgeleitet und kann, abhängig von seiner Prozessierung, vielfältige Morphologien bilden. CD-Spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass eADF4(C16) in wässrigen Lösungen ein typisches *random coil*-Spektrum zeigt, weswegen es der Gruppe der nativ entfaltenen Proteine zugeordnet werden kann. Es konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, dass sich mit der Methode des Elektrosinnens Vliese herstellen lassen, die in ihren morphologischen und chemischen Eigenschaften variiert werden können. Spinnenseidenfilme aus verschiedenen rekombinant hergestellten Seidenproteinen entstehen durch Abdampfen des Lösungsmittels. Dabei bilden sich, abhängig vom verwendeten Lösungsmittel verschiedene Sekundärstrukturen aus, die besonders die chemische Stabilität beeinflussen. Aus eADF4(C16) selbstassemblieren des Weiteren Nanofibrillen, die in konzentrierter Form Hydrogele bilden (Rammensee, Huemmerich et al. 2005). Mikrokugeln können durch die Fällung von Proteinlösungen mit kosmotropen Salzen der Hofmeister-Serie gebildet werden. Diese beschriebenen Morphologien wurden hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur, ihrer chemischen Stabilität und ihres Assemblierungsmechanismus untersucht.

4.2 Filme aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen

Dünne Polymerfilme besitzen ein weitreichendes Anwendungsspektrum. Sie können eingesetzt werden, um maßgeschneiderte Interaktionen von Oberflächen mit ihrer Umgebung zu ermöglichen, um definierte Oberflächenstrukturen entstehen zu lassen oder um eine spezifische Biofunktionalität zu erreichen (Haynie, Zhang et al. 2005). Die Eigenschaften von Proteinfilmen lassen sich durch verschiedene Parameter kontrollieren und anpassen. Zu diesen Parametern gehören pH-Wert, Proteinkonzentration, Adsorptionszeit, Ionenstärke, Lösungsmittel und Temperatur. Eine weitere Anpassung kann durch eine gezielte Nachbehandlung der Filme erreicht werden (Hardy, Roemer et al. 2008). Seidenproteinfilme wurden bisher hauptsächlich aus der Kokonseide von *Bombyx mori* hergestellt und untersucht (Meinel, Hofmann et al. 2005). Ein besonderes Augenmerk wurde hier auf die Struktur und die immunogenen Eigenschaften gelegt, da diskutiert wird, dass Seidenfilme gerade im medizinischen Sektor ein hohes Anwendungspotenzial, zum Beispiel zur Beschichtung von Implantaten für eine bessere Biokompatibilität, besitzen. Bei den Untersuchungen wurde festgestellt, dass Fibroin welches der Hauptbestandteil der Raupenseide ist, an sich keine Immunantwort hervorruft (Sofia, McCarthy et al. 2001), jedoch muss dazu das Protein Sericin, welches ein weiterer Bestandteil des Kokons ist, vollständig entfernt werden (Soong and Kenyon 1984). Verschiedene der in dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten Spinnenseidenproteine können ebenfalls zu Proteinfilmen verarbeitet werden.

4.2.1 Einfluss des Lösungsmittels

Ein wichtiger Parameter für die Herstellung von homogenen Spinnenseidenfilmen ist das verwendete Lösungsmittel. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Hexafluoroisopropanol, Ameisensäure und wässrigem Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 8,0)) oder entionisiertem Wasser auf die Sekundärstruktur von eADF4(C16) in Lösung und im Proteinfilm untersucht. Der Effekt einer Nachbehandlung mit 100 % Methanol auf die Sekundärstruktur und auf die chemische Stabilität wurde ebenfalls genauer beleuchtet.

Es konnte gezeigt werden, dass eADF4(C16) in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedliche Sekundärstrukturanteile besitzt. Das Protein liegt in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) hauptsächlich ungefaltet vor, oder nimmt, wie für Proteine mit einem hohen Anteil an Glycinen oder Prolinen beschrieben, eine Polyprolin II (PPII)-helikale Struktur an (Bochicchio and Tamburro 2002; Pepe, Armenante et al. 2009), während es in

Hexafluoroisopropanol einen erhöhten α -helikalen Anteil besitzt. Dieser Einfluss von fluorierten Alkoholen wurde auch schon für andere Proteine beobachtet (Sonnichsen, Van Eyk et al. 1992; Gast, Siemer et al. 2001). Die Struktur, die das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) in den entsprechenden Lösungsmitteln annimmt, korreliert apparent mit den Sekundärstrukturanteilen im Proteinfilm, der nach Abdampfen des Lösungsmittels zurückbleibt. Aus Wasser gegossene Filme besitzen eine Mischung aus ungefalteten Bereichen und Regionen mit hohem β -Faltblattanteil, während Filme aus Hexafluoroisopropanol einen sehr hohen α -helikalen Anteil besitzen. Ameisensäurefilme besitzen in unbehandelter Form den größten strukturierten Anteil mit einer Mischung aus α -helikalen und β -faltblattreichen Bereichen oder Polyprolin II-Helices. Die Filme aus Ameisensäurelösungen sind als einzige der untersuchten Proteinfilme sofort wasserunlöslich. Eine Nachbehandlung aller Filme mit Methanol und Kaliumphosphatpuffer führt, unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel zur verstärkten Ausbildung von β -Faltblättern und damit verbunden zu einer höheren chemischen Stabilität gegen 6 M GdmCl oder 8 M Harnstoff (Abbildung 4.1).

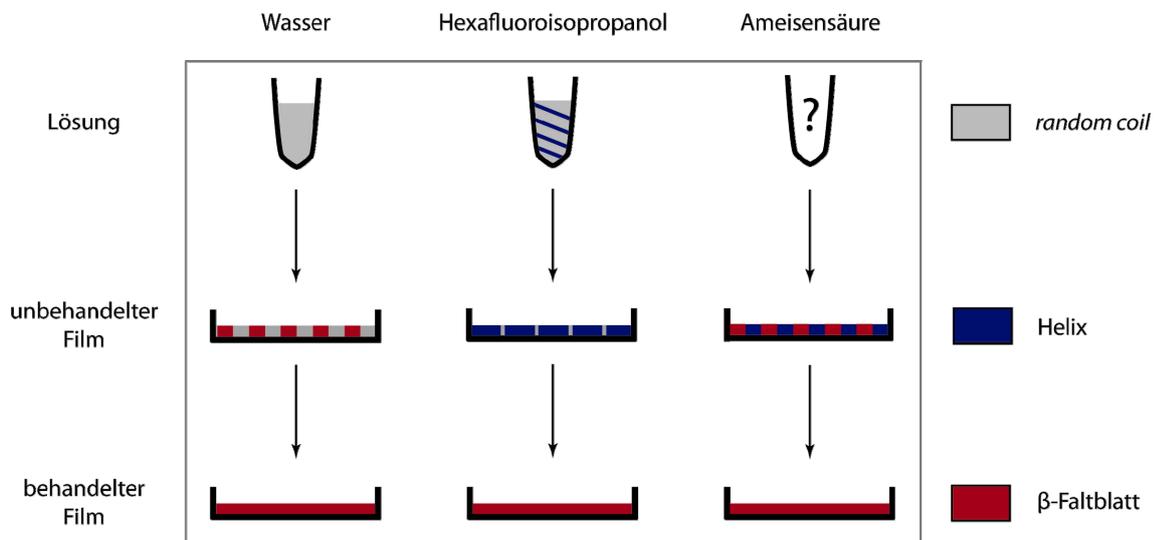


Abbildung 4.1: Schema der möglichen Filmstruktur basierend auf verschiedenen Lösungsmitteln. eADF4(C16) liegt in wässriger Lösung hauptsächlich als ungefaltetes Molekül (evtl. mit Anteilen an PPII-Helices) vor während es in Hexafluoroisopropanol einen hohen α -helikalen Anteil besitzt. Die Sekundärstruktur in Ameisensäure konnte aufgrund deren optischen Aktivität durch die hier verwendeten Methoden nicht bestimmt werden. Wird ein Film aus wässriger Lösung gegossen, entsteht eine Mischung aus ungefalteten und gefalteten Bereichen, die aus β -Faltblättern bestehen. Filme aus Hexafluoroisopropanol besitzen einen großen α -helikalen Anteil, Filme aus Ameisensäure eine Mischung aus α -Helices oder PPII-Helices und β -Faltblättern.

Alkohole wie Methanol können, abhängig vom Protein, sowohl strukturstabilisierend als auch destabilisierend wirken. Im Fall von rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteinen überwiegt der strukturbildende Effekt durch Entzug der Wasserhülle.

Eine Besonderheit der Filme, die aus Ameisensäurelösungen gebildet wurden liegt darin, dass die Sekundärstrukturänderung zu β -Faltblatt sogar durch eine Nachbehandlung mit entionisiertem Wasser induziert werden kann. Möglicherweise kann diese Beobachtung mit der Anwesenheit von PPII-Helices im unbehandelten Film erklärt werden. Von Shi et al. wurde bereits gezeigt, dass Proteine, die Proline enthalten und durch die Behandlung mit Säure denaturiert wurden, einen hohen Anteil an Polyprolin II-Helices in Lösung besitzen (Shi, Woody et al. 2002; Rath, Davidson et al. 2005). PPII-Helices stellen einen intermediären Zustand dar und können sehr leicht in β -Strukturen (β -Faltblatt und β -Turn) umgewandelt werden, da die Energiebarriere für diese Änderung sehr niedrig ist (Bochicchio and Tamburro 2002; Lefevre, Leclerc et al. 2007).

4.2.2 Einfluss des Proteins

Neben dem verwendeten Lösungsmittel hat auch die Primärstruktur der verwendeten Spinnenseidenproteine einen Einfluss auf die Filmeigenschaften, vor allem aber auf deren Löslichkeit. Filme aus Hexafluoroisopropanol, die nur aus einer einzigen Proteinspezies (im Folgenden Einzelproteinfilme genannt) bestehen, sind unbehandelt in allen getesteten Lösungsmitteln wie Wasser, 8 M Harnstoff, 6 M GdmCl oder 6 M GdmSCN löslich. Werden diese Filme mit Methanol oder Kaliumphosphat nachbehandelt erfolgt eine Strukturänderung zu β -Faltblatt, was zu einer höheren chemischen Stabilität führt. Hier zeigt sich deutlich der Unterschied zwischen den verschiedenen eingesetzten Proteinen. Obwohl sich die Sekundärstruktur in Lösung wie auch im Film nicht auffällig unterscheidet, sind Einzelproteinfilme aus den hydrophileren rekombinanten Spinnenseidenproteinen eADF3((AQ)12) und eADF3((AQ)24nr3) lediglich in Wasser unlöslich, während die etwas hydrophoberen eADF4(C16) und eADF4(C16nr4) eine wesentlich höhere chemische Stabilität besitzen. Filme aus diesen Proteinen sind in 8 M Harnstoff und 6 M GdmCl unlöslich. Ein Einfluss der Kettenlänge auf die Sekundärstruktur oder die chemische Stabilität konnte bei den Proteinen eADF3((AQ)12) und eADF3((AQ)24nr3) nicht festgestellt werden. Der Unterschied in der chemischen Stabilität lässt sich möglicherweise wie folgt erklären: eADF3((AQ)12) und eADF3((AQ)24nr3) sind hydrophiler als eADF4(C16) und eADF4(C16nr4) (Huemmerich, Helsen et al. 2004). Eine Behandlung mit

Methanol oder Kaliumphosphat begünstigt die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb und zwischen Proteinmolekülen. Da die von ADF4 abgeleiteten rekombinanten Proteine einen höheren Anteil an hydrophoben Aminosäuren besitzen, können sich stärkere hydrophobe Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen ausbilden als zwischen Proteinmolekülen von eADF3((AQ)12) oder eADF3((AQ)24nr3), was eine größere chemische Stabilität nach sich ziehen kann.

Besonders bei Mischfilmen, die aus zwei unterschiedlichen Proteinspezies (eADF3((AQ)12) und eADF4(C16) bzw. eADF3((AQ)24nr3) und eADF4(C16nr4)) aufgebaut sind, zeigen sich Auswirkungen auf die Löslichkeit. Diese Filme besitzen nach der Behandlung mit Methanol oder Kaliumphosphat kombinierte chemische Eigenschaften der Einzelproteinfilme.

Dieser Effekt könnte möglicherweise auf Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Proteinspezies beruhen, die in Einzelproteinfilmen nicht ausgebildet werden können oder darauf, dass die Filmanteile, welche hauptsächlich aus dem chemisch stabileren Protein bestehen als amorphe Aggregate zurückbleiben. Bei Mischfilmen, in denen beide Proteine die nicht-repetitive Region und damit das einzige Cystein des Systems beinhalten, werden weitere Auffälligkeiten beobachtet. Schon in der unbehandelten Form bleiben amorphe Aggregate in Wasser und in der behandelten Form in 6 M GdmCl zurück. Hierfür sind Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und die Entstehung von Heterodimeren, die bereits in Lösung detektiert werden konnten, denkbar. Da dieser Effekt bei den Einzelproteinfilmen, die die nicht-repetitive Region enthalten und disulfidverbrückte Homodimere ausbilden, nicht gezeigt werden kann, könnten Heterodimere aus den rekombinanten Seidenproteinen eADF3((AQ)24nr3) und eADF4(C16) eine größere chemische Stabilität besitzen. Die Zugabe von 5% (v/v) des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol führt nicht zur Auflösung dieser Aggregate. Möglicherweise reicht diese Menge nicht aus, um die starken Disulfidbrücken, die ein sehr niedriges Redox-Potential besitzen (Huemmerich 2004), aufzulösen.

4.3 Abhängigkeit der Assemblierung von eADF4(C16) von verschiedenen Parametern

Im natürlichen Spinnprozess spielt die Änderung verschiedener Parameter, wie Ionenaustauschprozesse (Natrium gegen Kalium und Chlorid gegen Phosphat), eine pH-Wertänderung von 6,9 auf 6,3 und eine Erhöhung der Proteinkonzentration durch Resorption von Wasser, eine wichtige Rolle auf dem Weg zur Fadenassemblierung. Zusätzlich zu diesen Parametern werden Scherkräfte benötigt, um die Ausrichtung der Proteinmoleküle voranzutreiben und die finale Assemblierung zu starten.

In dieser Arbeit wurde die Aggregation von eADF4(C16) abhängig von diesen physiologischen Parametern untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die Tendenz von eADF4(C16) zu aggregieren durch Zugabe von Kaliumphosphat, Erhöhung der Temperatur, Verringerung des pH-Wertes, Erhöhung der Proteinkonzentration und in Abhängigkeit des Molekulargewichts verstärkt.

Bei Salzen haben besonders die Anionen einen strukturbildenden Effekt auf entfaltete Proteine. Dies steht im engen Zusammenhang mit der Hofmeister-Serie, die die Stärke des chaotropen (einsalzenden) oder kosmotropen (aussalzenden) Effekts auf Proteine beschreibt. Niedrige Salzkonzentrationen können die Abstoßungen zwischen den negativen Ladungen im Protein eADF4(C16), die auf Coulomb-Kräften beruhen, neutralisieren und damit die Interaktionen zwischen Proteinmolekülen verstärken, was letztlich zur Aggregation führt. Hohe Salzkonzentrationen hingegen stören die Interaktion zwischen Protein und Wasser (Hydrathülle) und bewirken einen Anstieg der hydrophoben Wechselwirkungen im Protein. Dadurch aggregiert das Protein und fällt aus der Lösung aus.

Die Phosphatkonzentration im Spinntrakt der Spinne *Nephila clavipes* beträgt zwischen 10 und 30 mM (Abgeleitet aus den Gewichtsprozenten) (Wong Po Foo, Bini et al. 2006). Dieser Bereich hat keine große Bedeutung für die *in vitro*-Aggregation von eADF4(C16) unter den gewählten Versuchsbedingungen. Zieht man jedoch die Beobachtungen hinzu, dass eine Steigerung der Proteinkonzentration und eine Erhöhung des Molekulargewichtes bewirken, dass das Protein schon bei niedrigeren Phosphatkonzentrationen nach der gleichen Inkubationsdauer vollständig aggregiert, rückt die physiologische Phosphatkonzentration wieder in den Fokus.

Auch die Temperatur hat einen Effekt auf die geordnete Wasserhülle, die gelöste Proteine umgibt (Uversky 2002; Hardy, Roemer et al. 2008). Bei steigender Temperatur nimmt die Hydrathülle und die Hydratisierung von hydrophoben Seitenketten ab. Intra- und

intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen werden verstärkt und das Protein aggregiert. In der Natur besteht ein Zusammenhang zwischen der Umgebungstemperatur und den mechanischen Eigenschaften des Seidenfadens. Vor allem die Viskosität der Seidenlösung spielt dabei die entscheidende Rolle. Als wechselwarme Tiere können Spinnen die Temperatur ihres Körpers nicht aktiv regulieren, weswegen die Seidenlösung die Umgebungstemperatur besitzt. Je niedriger die Temperatur desto höher die Viskosität und desto niedriger die Bruchdehnung der Seide (Vollrath and Knight 2001; Vollrath, Madsen et al. 2001).

Das Protein eADF4(C16) reagiert auf niedrige pH-Werte mit Aggregation. Der Übergangspunkt ab dem die Aggregation verstärkt auftritt liegt bei einem pH-Wert von 6,2 und somit im physiologisch relevanten Bereich (pH-Wertänderung im Spinntrakt von 6,9 auf 6,3). Diese Beobachtung kann durch die Protonierung der 16 negativ geladenen Glutamatseitenketten im Protein bei saueren pH-Werten erklärt werden. Dadurch wird die Nettoladung der Proteinmoleküle neutralisiert, was zu verminderten intra- und intermolekularen Abstoßungen führt. Damit wird eine stärkere Interaktion zwischen den Proteinmolekülen ermöglicht und Aggregate bilden sich. Die Untersuchung von kurzen Polyalanin-Sequenzen mit unterschiedlichen Glutamatanteilen zeigt, dass ein hoher Glutamatanteil im Polypeptid die Aggregationstendenz pH-abhängig steigert oder unterdrückt, da die Seitenketten entweder neutral oder geladen sind (Farmer, Top et al. 2008; Top, Kiick et al. 2008).

Um Rückschlüsse des Einflusses von verschiedenen Parametern aus den *in vitro*-Untersuchungen von rekombinanten Seidenproteinen auf den natürlichen Spinnprozess ziehen zu können, müssen einige Einschränkungen berücksichtigt werden.

Das rekombinante Seidenprotein repräsentiert lediglich eines der beiden Proteine aus denen der Abseilfaden der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* besteht. Des Weiteren besitzt es keine nicht-repetitiven Termini, die eine Rolle bei der Assemblierung der Seidenproteine im natürlichen System spielen (Jin and Kaplan 2003; Huemmerich, Helsen et al. 2004; Sponner, Unger et al. 2004). Auch Limitierungen im experimentellen Bereich müssen berücksichtigt werden. Die natürlichen Seidenproteine sind mit mehreren Hundert kDa wesentlich größer als die rekombinanten Proteine, die aufgrund des zur Herstellung des Proteins verwendeten Expressionssystems (*E. coli*) in ihrer Größe begrenzt sind. Außerdem ist die Proteinkonzentration im Spinntrakt deutlich höher (bis zu 50 % (w/v)) als in den experimentellen Ansätzen. Diese Konzentration kann *in vitro* nicht erreicht werden, da das Protein eADF4(C16) mit steigender Konzentration zeitabhängig eine starke Tendenz zur

Aggregatbildung besitzt. Die Methode, das verwendete Denaturierungsmittel (6 M GdmSCN) durch Dialyse des Ansatzes gegen 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) zu entfernen um wässrige Seidenproteinlösungen zu erhalten, dauert für Proteinkonzentrationen über 8 % (w/v) (Huemmerich, Helsen et al. 2004) zu lange.

Die Experimente zur Aggregation in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern zeigen, dass das von Huemmerich et al. entwickelte System rekombinanter Spinnenseidenproteine vielfältige Möglichkeiten bietet, um den natürlichen Fadenassemblierungsprozess durch eine geschickte Wahl der Versuchsparameter zu erforschen. Es bietet ein Set an verschiedenen rekombinanten Seidenproteinen, die die Bedeutung der beiden *Dragline*-Komponenten ADF3 und ADF4, eine Erhöhung der Kettenlänge oder die Anwesenheit oder Abwesenheit der nicht-repetitiven Region für den Spinnprozess zu untersuchen erlaubt. Basierend auf den Voruntersuchungen mit dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in Verbindung mit eADF3((AQ)24nr3) in einer Mikrofluidikkammer unter bestimmten Bedingungen und unter der Wirkung von Scherkräften fadenförmige Strukturen bildet (Rammensee, Slotta et al. 2008).

4.4 Nanofibrillen, Mikrokugeln und Seidenfäden

Sowohl die Aggregation als auch die Assemblierung von Proteinen erfolgt normalerweise über mehrstufige Prozesse. Ausgehend von der Konformationsänderung einzelner Proteinmonomere, die von mindestens einem Assemblierungsschritt begleitet wird, bilden sich daraus lösliche oder unlösliche Aggregate. Besonders Salze haben einen großen Effekt auf die Hydrathülle, die die Proteine umgibt, und auf die Proteine selbst. Die mikroskopischen Untersuchungen der in den salzabhängigen Aggregationsuntersuchungen gebildeten Morphologien des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) mit TEM, AFM und REM zeigen, dass abhängig von der Salzkonzentration entweder Nanofibrillen oder Mikrokugeln gebildet werden (Abbildung 4.2).

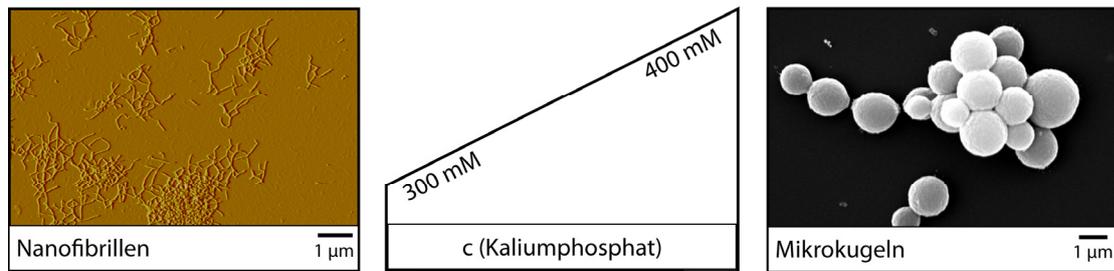


Abbildung 4.2: Abhängig von der zugegebenen Kaliumphosphatkonzentration bildet eADF(C16) Nanofibrillen oder Mikrokugeln. Die Bildungsprozesse unterscheiden sich in thermodynamischen und kinetischen Aspekten (Slotta, Rammensee et al. 2008).

Nanofibrillen und Mikrokugeln aus eADF4(C16) besitzen ähnliche Sekundärstrukturen mit einem hohen Anteil an β -Strukturen wie mittels FTIR-Spektroskopie festgestellt wurde. Da Mikrokugeln ausschließlich durch Fällung einer Proteinlösung (hier mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml) unter Verwendung von hohen Salzkonzentrationen (im Fall von Kaliumphosphat über 400 mM), aber die Nanofibrillen unabhängig von äußeren Faktoren entstehen und nur bis zu einer Kaliumphosphatkonzentration von 300 mM gebildet werden, kann vermutet werden, dass sich die Bildung dieser beiden Morphologien in thermodynamischer Hinsicht voneinander unterscheiden. Während für die Fibrillenassemblierung bereits einige experimentell gut untermauerte Modelle beschrieben wurden, gibt es für den Bildungsprozess von Mikrokugeln aus Proteinen nur sehr wenig Literatur, die sich hauptsächlich auf deren Charakterisierung beschränkt.

4.4.1 Assemblierung der Nanofibrillen

Amyloide Fibrillen werden in den verschiedensten biologischen Bereichen gefunden. Dort erfüllen sie eine Aufgabe als Strukturelement, wie das die Hyphenbildung unterstützende Protein Chaplin des filamentösen Bakteriums *Streptomyces coelicolor*, oder sind für verschiedene Krankheiten wie Alzheimer (Protein A β) verantwortlich. Ein sehr interessanter Aspekt ist, dass fibrilläre Strukturen mit amyloiden Eigenschaften auch im Zusammenhang mit Seide beschrieben wurden. Einige Insektenseiden, wie die Seide der Florfliege *Crysopa flava*, aus welcher deren Eierstiele bestehen, besitzen ebenfalls einige Charakteristika amyloider Fibrillen wie die charakteristische „cross- β “ Struktur, bei der die β -Faltblattstränge parallel zur Fibrillenachse verlaufen. Auch in der B-Zone der Spinndrüse der Spinne *Nephila edulis* konnten nanofibrilläre Strukturen mit amyloiden Eigenschaften

nachgewiesen werden (Kenney, Knight et al. 2002). Somit stellt sich die Frage, ob diese Nanofibrillen eine Zwischenstufe im Assemblierungsmechanismus der Seidenproteine zu einem Faden darstellen.

Auch das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) bildet *in vitro* unverzweigte Nanofibrillen mit einer Höhe von $3,3 \text{ nm} \pm 1$. Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese fibrillären Strukturen amyloide Eigenschaften besitzen. Die amyloid-spezifischen Farbstoffe Thioflavin T und Kongo Rot zeigen bei Inkubation mit eADF4(C16) charakteristische spektroskopische Signale, welche auch für klassische Amyloide beschrieben wurden. Der strukturelle Vergleich mit der Priondomäne NM des Hefeprions Sup35p mit CD- und FTIR-Spektroskopie, sowohl in gelöster als auch in fibrillärer Form, zeigte keine offensichtlichen Unterschiede. Analysen mittels Röntgenbeugungsanalyse zeigten für beide untersuchten Proteine charakteristische Signale einer *cross- β* -Struktur, welche typisch für amyloide Fibrillen ist. Mit dieser Methode konnten Unterschiede zwischen Fibrillen der beiden Proteinspezies festgestellt werden. Während Sup35p-NM den mit $9,4 \text{ \AA}$ für Amyloide typischen Abstand zwischen den β -Faltblättern aufweist, ist dieser bei eADF4(C16)-Fibrillen mit $5,3 \text{ \AA}$ wesentlich kleiner. Eine Erklärung für dieses Ergebnis liefert der hohe Anteil an den Aminosäuren wie Alanin und Glycin, die nur kleine Seitenketten besitzen und deshalb diese kurze Distanz der β -Faltblätter ermöglichen.

Die amyloiden Nanofibrillen, die aus eADF4(C16) gebildet werden, entstehen auch ohne äußere Einflüsse durch Selbstassemblierung. Ob der Nukleations-Aggregations-Mechanismus, durch den Fibrillen verschiedener klassischer amyloider Proteine gebildet werden, auch für eADF4(C16) gilt, wurde in dieser Arbeit ebenfalls analysiert. Bei dieser Selbstassemblierung wird zuerst, in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, ein Vorläufernukleus gebildet. An diesen lagern sich Proteinmoleküle an und es entstehen stabile Oligomere (Keime). Diese wachsen durch Anlagerung weitere Monomere oder anderer Oligomere weiter, bis der Gleichgewichtszustand zwischen gelöstem und assembliertem Protein erreicht ist. Wenn die Fibrille ihre kritische Größe erreicht hat, zerbricht sie und die Bruchstücke wachsen weiter.

Die Selbstassemblierung von eADF4(C16), die mittels Thioflavin T-Fluoreszenz untersucht wurde, beginnt mit einer Lag-Phase, die durch eine Temperaturerhöhung, eine Senkung des pH-Wertes oder der Zugabe von niedrigen Salzkonzentrationen verkürzt werden kann. Eine Zugabe von Keimen, die durch Ultraschallbehandlung von eADF4(C16)-Fibrillen hergestellt wurden, lässt die Lag-Phase verschwinden. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Fibrillenassemblierung von eADF4(C16) mit dem Nukleations-Aggregations-Mechanismus

für die Bildung amyloider Fibrillen beschrieben werden kann (Abbildung 4.3). Analysiert man die Fibrillenbildung mittels CD-Spektroskopie fällt auf, dass keine Lag-Phase detektiert werden kann. Dies bedeutet, dass Strukturänderungsprozesse unter Einfluss von 100 mM Kaliumphosphat sofort beginnen, obwohl sich das Thioflavin T-Signal noch nicht ändert. Somit existieren möglicherweise Übergangszustände, die durch die Bindung klassischer amyloidspezifischer Farbstoffe nicht detektiert werden können.

4.4.2 Assemblierung der Mikrokugeln

Mikrokugeln bilden sich, unabhängig von den oben genannten Faktoren, bei der Zugabe von hohen Salzkonzentrationen (im Fall von Kaliumphosphat über 400 mM). Für den Assemblierungsmechanismus von Proteinkugeln aus Lysozym und Ribonuklease wurden von Bohr et al. zwei verschiedene Möglichkeiten beschrieben (Bohr, Kühle et al. 1997). Im *bulk-growth*-Modell entstehen die Kugeln ausgehend von einem Aggregationskeim. Dabei induziert dieser Keim, ähnlich dem Fibrillenwachstum, die Konformationsänderung der umgebenden Proteinmoleküle. Jedoch liegt hier der Unterschied im kugelförmigen statt linearen Wachstum. Im *sheet-growth*-Modell bilden sich zweidimensionale Proteinhüllen, die sich ineinander lagern und dadurch eine zwiebelartige Kugel bilden. Äußerlich unterscheiden sich Proteinmikrokugeln, die auf den beiden verschiedenen Assemblierungswegen gebildet werden, nicht voneinander. Durch die Analyse der eADF4(C16)-Mikrokugeln mittels Gefrierbruch und Kryo-Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass diese dicht gepackt sind und keine innere Unterstruktur besitzen. Demnach kann das *bulk-growth*-Modell als Grundlage für die Assemblierung der eADF4(C16)-Mikrokugeln in Betracht gezogen werden.

Da eADF4(C16)-Mikrokugeln ausschließlich oberhalb einer kritischen Salzkonzentration gebildet werden basiert die Aggregation zu Mikrokugeln auf klassischen Aussalzprozessen. Diese können als Flüssig-Flüssig-Phasenseparation beschrieben werden. Dabei ist der anfängliche Einphasenzustand mit der wässrigen Lösung gleichzusetzen, in der die Seidenmoleküle ungefaltet vorliegen. Durch die Zugabe kosmotroper Salze in hohen Konzentrationen ändert sich die freie Energie des Systems und führt zu einem Zweiphasenzustand mit einer dichten, proteinreichen und einer lösungsmittelreichen Phase. Dieser phasenseparierte Zustand ist energetisch begünstigt aber reversibel. Durch Verdünnung der Salzkonzentration auf unter 166 mM löst sich der Zweiphasenzustand anfänglich vollständig auf. Wenn die Proteinkonzentration in der proteinreichen Phase einen

kritischen Punkt erreicht, bilden sich strukturierte Keime, die dann zu kugelförmigen Strukturen wachsen bis das Löslichkeitsgleichgewicht erreicht ist. Die Beobachtung, dass sich mit zunehmender Ausgangsproteinkonzentration der Durchmesser der Kugeln, vergrößert unterstützt diese Theorie (Abbildung 4.3).

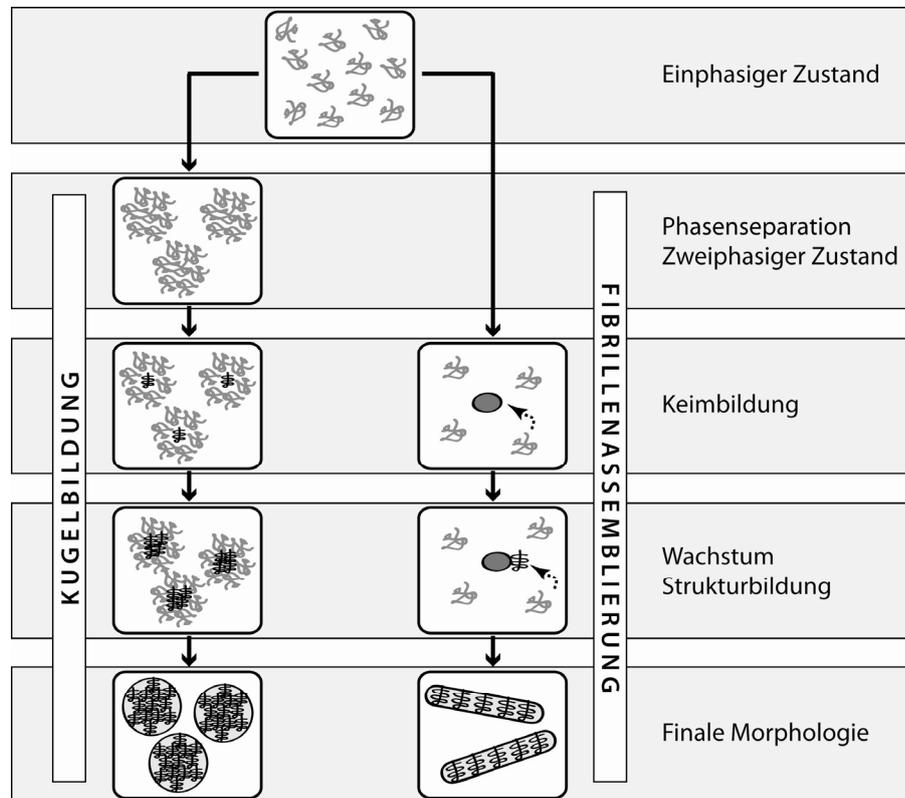


Abbildung 4.3: Assemblierungsprozesse von Nanofibrillen und Mikrokugeln aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16). Nanofibrillen entstehen durch den Nukleations-Aggregations-Mechanismus. Dabei wird zuerst ein Keim gebildet, der mit anderen oligomeren Assemblaten oder monomeren Proteinmolekülen interagiert und zu fibrillären Strukturen wächst. Bei der Entstehung von Mikrokugeln ist der erste Schritt eine Phasenseparation, die durch die Zugabe kosmotroper Salze induziert wird. In der proteinreichen Phase wird eine kritische Proteinkonzentration erreicht. Es entstehen Keime, die eine Strukturänderung der sie umgebenden Proteinmoleküle bewirken. Diese Keime wachsen daraufhin zu kugelförmigen Strukturen.

Es könnte des Weiteren gezeigt werden, dass abhängig von den chaotropen Eigenschaften der Substanz, die zur Verdünnung der Salzkonzentration verwendet wird, der phasenseparierte Zustand für verschiedene Zeiträume aufgelöst werden kann. Wasser besitzt keinen Hofmeister-Effekt und führt lediglich zur Verdünnung der Salzkonzentration, während Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid zusätzlich chaotrope, einsalzende Eigenschaften besitzen. Demnach kann angenommen werden, dass die Entstehung der finalen

Sekundärstruktur der Mikrokugeln mindestens ein zweistufiger Prozess ist. Die erste Strukturänderung ist mit Wasser, die zweite mit chaotropen Denaturierungsmitteln wieder auflösbar (Abbildung 4.4).

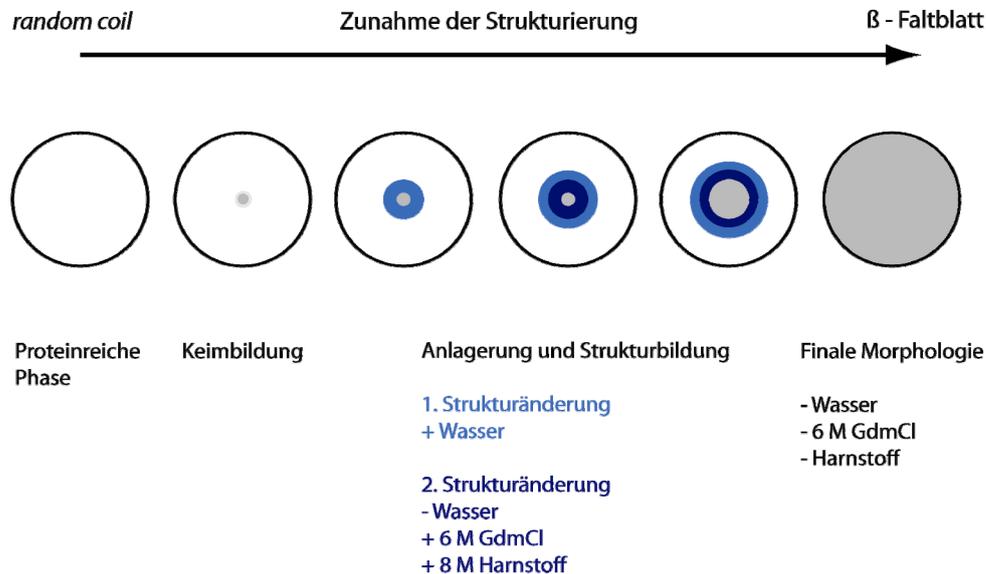


Abbildung 4.4: Entstehung von Mikrokugeln aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16). Die Strukturbildung ist mindestens ein zweistufiger Prozess. Die Proteinmoleküle die sich an den Keim, der in der proteinreichen Phase entsteht anlagern, nehmen zuerst eine Struktur an die sich durch die Verdünnung mit Wasser wieder auflöst. Danach erfolgt ein weiterer Faltungsprozess, der nicht mehr mit Wasser, aber noch mit chaotropen Denaturierungsmitteln wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid wieder aufgelöst werden kann. (+ = löslich, - = unlöslich)

4.4.3 Assemblierung der Seidenfäden

Die Bildung von Mikrokugeln aus eADF4(C16) über mehrere Zwischenstufen, welche strukturell unterschiedlich sind, könnte in direktem Zusammenhang mit der Fadenentstehung stehen. Eine ähnliche Beobachtung konnte mit dem rekombinant hergestellten Protein eADF3((AQ)24nr3) aus der *Dragline*-Komponente ADF3 gemacht werden.

Unter Einfluss von 500 mM Kaliumphosphat bildet dieses Protein ebenfalls kugelförmige Assemblate, welche, im Gegensatz zu eADF4(C16), einen großen α -helikalen Anteil aufweisen, chemisch nicht stabil sind und sich nach Verdünnung der Salzkonzentration wieder auflösen. Die Assemblate können, wenn sie in räumliche Nähe kommen, miteinander verschmelzen, was durch hydrophile Bereiche an der Oberfläche begünstigt werden könnte. Diese Interaktionen zwischen den Assemblaten führen weder zu einer Änderung der

Sekundärstruktur noch zur Entstehung eines Fadens. Auch eine Erhöhung der Kaliumphosphatkonzentration oder eine Senkung des pH-Wertes reichen dazu nicht aus. Wir konnten zeigen, dass eine bestimmte Kombination der getesteten Faktoren nötig ist, damit aus den eADF3((AQ)24nr3)-Assemblaten fadenförmige Strukturen entstehen (Rammensee, Slotta et al. 2008). Dazu müssen die pH-Wertänderung von 8,0 auf 6,0 gleichzeitig mit der Dehnströmung im Mikrofluidikkanal vorhanden sein. Ob die Erhöhung der Kaliumphosphatkonzentration auf 500 mM zuerst oder zusammen mit den oben genannten Faktoren auftritt, spielt dabei keine Rolle. Die auftretenden Scherkräfte haben nicht nur Auswirkungen auf die Morphologie, sondern auch auf die Sekundärstruktur. Der resultierende Faden ist β -faltblattreich und chemisch ähnlich stabil wie der natürliche Seidenfaden der Spinne. Das rekombinante Seidenprotein eADF4(C16) bildet unter den getesteten Bedingungen im Mikrofluidikkanal lediglich in Kombination mit eADF3((AQ)24nr3) fadenförmige Strukturen aus und ist dann homogen über den gesamten Faden verteilt.

Möglicherweise spielen hierfür die in der Kugelassemblierung diskutierten Zwischenstufen eine wichtige Rolle. Das Protein eADF4(C16) kann seine Struktur, im Gegensatz zu eADF3((AQ)24nr3) unabhängig von einer Dehnströmung von *random coil* in Lösung über verschiedene Zwischenstufen zu β -Faltblatt ändern. Durch den Zeitfaktor der Strukturbildung über diese Zwischenstufen wird es möglich, dass eADF4(C16) mit dem hauptsächlich an der Fadenentstehung beteiligten eADF3((AQ)24nr3) interagiert und sich durch die angelegten Scherkräfte elongiert und ausrichtet, was letztendlich zu einem Seidenfaden führt.

Diese Beobachtungen stimmen mit der Fadenassemblierungstheorie in *Bombyx mori* von Jin und Kaplan überein (Jin and Kaplan 2003). Hier wird die Phasenseparation in eine proteinreiche und eine proteinarmer Phase als Voraussetzung für die Fadenentstehung und die Wirkung von Scherkräften, die durch Zug am Faden entstehen zur Fertigstellung diskutiert.

5 Zusammenfassung

Spinnenseide ist aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften eine der interessantesten Naturfasern. Die gut erforschte *Dragline*-Seide der Europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* bildet Rahmen und Speichen des Netzes und dient als Abseilfaden und Sicherungsleine. Diese Seide besteht hauptsächlich aus den beiden Proteinkomponenten ADF3 und ADF4, welche einen hochrepetitiven Charakters besitzen. In dieser Arbeit wurde, neben einer Analyse der Proteine in Lösung, das Assemblierungsverhalten von rekombinant hergestellten Seidenproteine eADF3 und eADF4 (engineered Araneus Diadematus Fibroin) sowohl zu einem Faden als auch zu Vliesen, Filmen, Nanofibrillen und Mikrokugeln grundlegend untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das rekombinante Seidenprotein eADF4(C16) aus dem organischen Lösungsmittel Hexafluoroisopropanol mit der Methode des Elektrosinnens zu Vliesen verarbeiten lässt. Der Durchmesser der Einzelfäden kann durch Veränderung der Proteinkonzentration variiert werden. Als weitere Morphologie können Filme, basierend auf unterschiedlichen organischen und wässrigen Lösungsmitteln, hergestellt werden. Dazu wird die Proteinlösung auf eine Oberfläche aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das verwendete Lösungsmittel als auch die Proteinspezies und eine Nachbehandlung mit Methanol oder Kaliumphosphatpuffer einen Einfluss auf die Sekundärstruktur und damit einhergehend die chemische Stabilität des resultierenden Proteinfilms haben. Die Analyse von gemischten Filmen, welche aus beiden Proteinspezies hergestellt wurden, besitzen hinsichtlich ihrer Löslichkeit gemischte Eigenschaften.

Die Entstehung eines Seidenfadens wird in der Natur von komplexen, exakt aufeinander abgestimmten Prozessen begleitet. Dabei spielen Ionenverteilung und -konzentration, pH-Wert, Proteinkonzentration und Scherkräfte eine entscheidende Rolle. Das Aggregations- bzw. Assemblierungsverhalten rekombinant hergestellter Seidenproteine wurde hinsichtlich dieser Faktoren untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass eADF4(C16) abhängig von der Kaliumphosphatkonzentration unterschiedliche Morphologien bildet. Bei Salzkonzentrationen unter 300 mM entstehen Nanofibrillen, bei Salzkonzentrationen über 400 mM bilden sich Mikrokugeln. Diese beiden unterschiedlichen Morphologien wurden in dieser Arbeit sowohl hinsichtlich grundlegender Charakteristika wie Sekundärstruktur und chemischer Stabilität als auch hinsichtlich ihrer Bildung genauer analysiert.

Um den Charakter der eADF4(C16)-Nanofibrillen zu analysieren, wurden diese hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften mit Fibrillen des Modellamyloids Sup35-NM verglichen. Dabei zeigte sich, dass sich die Fibrillen beider Proteine nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Da die Bildung amyloider Fibrillen dem Nukleations-Aggregations-Mechanismus folgt, wurde dieser auch zur Beschreibung des Assemblierungsmechanismus der eADF4(C16)-Fibrillen herangezogen.

Nanofibrillen selbstassemblieren auch ohne den Einfluss von äußeren Faktoren, aber deren Bildung kann durch geringe Mengen (bis 300 mM) kosmotroper Salze, Verringerung des pH-Wertes sowie Erhöhung der Proteinkonzentration und der Temperatur beschleunigt werden. Auch die Zugabe von Keimen beschleunigt die Fibrillenassemblierung deutlich. Die Fibrillenbildungskinetiken in Abhängigkeit dieser verschiedenen Faktoren wurde mittels Thioflavin T-Bindung und Sekundärstrukturänderung (CD-Spektroskopie) verfolgt. Mikrokugeln aus eADF4(C16) wurden morphologisch detailliert analysiert. Dabei zeigt sich, dass die finalen Kugeln eine ebene Oberfläche besitzen und komplett gefüllt sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kugelentstehung auf einer Phasenseparation basiert, die von Strukturbildungsprozessen gefolgt wird.

Um neben den Einzelparametern auch den Einfluss von Scherkräften auf die Assemblierung der rekombinanten Spinnenseidenproteine zu untersuchen wurden die Proteine eADF3((AQ)24nr3) und eADF4(C16) in einer Mikrofluidikkammer untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass das Spinnenseidenprotein eADF3((AQ)24nr3) unter Einfluss von 500 mM Kaliumphosphat und Scherkräften, welche simultan zu einer pH-Wertänderung von 8,0 auf 6,0 auftreten müssen, zu einer fadenförmigen Struktur assembliert. Ohne die Wirkung von Scherkräften oder bei ungeeigneten Kombinationen der Parameter konnten stattdessen kugelförmige Assemblate detektiert werden, welche sich bei Verdünnung der des Salzes auflösten. Im Gegensatz dazu assembliert das Protein eADF4(C16) unter diesen Versuchsbedingungen, unabhängig von Scherkräften zu chemisch stabilen Mikrokugeln. Diese Beobachtung konnte mit Aggregationsuntersuchungen unter Betrachtung der Einzelparameter bestätigt werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass auch das Protein eADF3((AQ)24nr3) proteinreiche kugelförmige Phasen bilden kann, diese aber nicht stabil sind, kann geschlossen werden, dass eine Phasenseparation in eine lösungsmittelreiche und eine proteinreiche Phase eine wichtige Voraussetzung für die Fadenentstehung ist.

6 Literatur

- Ahmad, A., V. N. Uversky, et al. (2005). "Early events in the fibrillation of monomeric insulin." J Biol Chem **280**(52): 42669-75.
- Altman, G. H., F. Diaz, et al. (2003). "Silk-based biomaterials." Biomaterials **24**(3): 401-16.
- Andrews, J. M. and C. J. Roberts (2007). "A Lumry-Eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: 1. Aggregation with pre-equilibrated unfolding." J Phys Chem B **111**(27): 7897-913.
- Arrondo, J. L. and F. M. Goni (1999). "Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy." Prog Biophys Mol Biol **72**(4): 367-405.
- Ayub, Z. H., M. Arai, et al. (1993). "Mechanism of the Gelation of Fibroin Solution." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **57**(11): 1910-1912.
- Baldwin, R. L. (1996). "How Hofmeister ion interactions affect protein stability." Biophys J **71**(4): 2056-63.
- Beckwitt, R. and S. Arcidiacono (1994). "Sequence conservation in the C-terminal region of spider silk proteins (Spidroin) from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae)." J Biol Chem **269**(9): 6661-3.
- Bianchi, E., G. Conio, et al. (1967). "The role of pH, temperature, salt type, and salt concentration on the stability of the crystalline, helical, and randomly coiled forms of collagen." J Biol Chem **242**(7): 1361-9.
- Binning G., Q. F., Gerber C. (1986). "Atomic Force Microscope." Phys Rev Lett **56**: 930-933.
- Bochicchio, B. and A. M. Tamburro (2002). "Polyproline II structure in proteins: identification by chiroptical spectroscopies, stability, and functions." Chirality **14**(10): 782-92.
- Bohr, H., A. Kühle, et al. (1997). "Hierarchical organization in aggregates of protein molecules." Z. Phys. D. **40**: 513-515.
- Breslauer, D. N., L. P. Lee, et al. (2009). "Simulation of flow in the silk gland." Biomacromolecules **10**(1): 49-57.
- Cacace, M. G., E. M. Landau, et al. (1997). "The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena." Quarterly Reviews of Biophysics **30**(3): 241-277.
- Cantor, C. R. and P. R. Schimmel (1980). Biophysical Chemistry. San Francisco, Freeman & Co.
- Chen, X., D. P. Knight, et al. (2002). "Conformation transition in silk protein films monitored by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy: effect of potassium ions on *Nephila* spidroin films." Biochemistry **41**(50): 14944-50.

- Chi, E. Y., S. Krishnan, et al. (2003). "Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation." Pharm Res **20**(9): 1325-36.
- Coddington, J., G. Giribet, et al. (2004). Arachnida. In Assembling the Tree of Life. New York, Oxford University Press.
- Craig, C. L. (1997). "Evolution of arthropod silks." Annu Rev Entomol **42**: 231-67.
- Creighton, T. E. (1990). "Protein folding." Biochem J **270**(1): 1-16.
- DeLellis, R. L. and M. C. Bowling (1970). "The use of Sirius red and Congo red staining in routine histopathology." Hum Pathol **1**(4): 655.
- Dicko, C., D. Knight, et al. (2004). "Structural conformation of spidroin in solution: a synchrotron radiation circular dichroism study." Biomacromolecules **5**(3): 758-67.
- Dobson, C. M. (2003). "Protein folding and misfolding." Nature **426**(6968): 884-90.
- Dobson, C. M. (2004). "Principles of protein folding, misfolding and aggregation." Semin Cell Dev Biol **15**(1): 3-16.
- Epple, M. (2003). Biomaterialien und Biomineralisation, Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Wiesbaden, B. G. Teubner Verlag.
- Exler, J. H. (2006). Analyse der Polymereigenschaften rekombinanter Spinnenseidenproteine und deren Phasenverhalten während des Spinnprozesses. Lehrstuhl für Biotechnologie. Garching, TU München. Master.
- Exler, J. H., D. Hummerich, et al. (2007). "The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning." Angew Chem Int Ed Engl **46**(19): 3559-62.
- Fahnestock, S. R. and L. A. Bedzyk (1997). "Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*." Appl Microbiol Biotechnol **47**(1): 33-9.
- Fandrich, M. (2007). "On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates." Cell Mol Life Sci **64**(16): 2066-78.
- Fandrich, M. and C. M. Dobson (2002). "The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation." EMBO J **21**(21): 5682-90.
- Farmer, R. S., A. Top, et al. (2008). "Evaluation of conformation and association behavior of multivalent alanine-rich polypeptides." Pharm Res **25**(3): 700-8.
- Fink, A. L. (2005). "Natively unfolded proteins." Curr Opin Struct Biol **15**(1): 35-41.
- Fling, S. P. and D. S. Gregerson (1986). "Peptide and Protein Molecular-Weight Determination by Electrophoresis Using a High-Molarity Tris Buffer System without Urea." Analytical Biochemistry **155**(1): 83-88.

- Gaines, W. A. and W. R. Marcotte (2008). "Identification and characterization of multiple Spidroin 1 genes encoding major ampullate silk proteins in *Nephila clavipes*." *Insect Molecular Biology* **17**(5): 465-474.
- Gast, K., A. Siemer, et al. (2001). "Fluoroalcohol-induced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions." *Eur Biophys J* **30**(4): 273-83.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, et al. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. J. M. Walker, Humana Press: 571-607.
- Gatesy, J., C. Hayashi, et al. (2001). "Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences." *Science* **291**(5513): 2603-5.
- Gill, S. C. and P. H. Vonnippel (1989). "Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data." *Analytical Biochemistry* **182**(2): 319-326.
- Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, et al. (1994). Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. III Secondary Structures. *Subcellular Biochemistry*. H. J. Hilderson and G. B. Ralston. New York, Plenum Press. **23**: 405-450.
- Gosline, J. M., P. A. Guerette, et al. (1999). "The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function." *J Exp Biol* **202**(Pt 23): 3295-303.
- Greiner, A. and J. H. Wendorff (2007). "Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers." *Angew Chem Int Ed Engl* **46**(30): 5670-703.
- Grigsby, J. J., H. W. Blanch, et al. (2001). "Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions: effect of salt type, salt concentration and pH." *Biophys Chem* **91**(3): 231-43.
- Guehrs, K. H., B. Schlott, et al. (2008). "Environmental conditions impinge on dragline silk protein composition." *Insect Molecular Biology* **17**(5): 553-564.
- Guerette, P. A., D. G. Ginzinger, et al. (1996). "Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family." *Science* **272**(5258): 112-5.
- Gurau, M. C., S. M. Lim, et al. (2004). "On the mechanism of the Hofmeister effect." *J Am Chem Soc* **126**(34): 10522-3.
- Ha, S. W., A. E. Tonelli, et al. (2005). "Structural studies of *Bombyx mori* silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning." *Biomacromolecules* **6**(3): 1722-31.
- Hardy, J., L. M. Roemer, et al. (2008). "Polymeric materials based on silk proteins." *Polymer* **49**(20): 4309-4327.
- Hayashi, C. Y., T. A. Blackledge, et al. (2004). "Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family." *Mol Biol Evol* **21**(10): 1950-9.

- Haynie, D. T., L. Zhang, et al. (2005). "Polypeptide multilayer films." Biomacromolecules **6**(6): 2895-913.
- Hedhammar, M., A. Rising, et al. (2008). "Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthennops australis*: implications for fiber formation." Biochemistry **47**(11): 3407-17.
- Heim, M., D. Keerl, et al. (2009). "Spider Silk: From Soluble Protein to Extraordinary Fiber." Angew Chem Int Ed Engl.
- Hermanson, K. D., M. B. Harasim, et al. (2007). "Permeability of silk microcapsules made by the interfacial adsorption of protein." Phys Chem Chem Phys **9**(48): 6442-6.
- Heukeshoven, J. and R. Dernick (1988). "Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in Phastsystem Development Unit .1. Staining of Sodium Dodecyl-Sulfate Gels." Electrophoresis **9**(1): 28-32.
- Hijirida, D. H., K. G. Do, et al. (1996). "¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland." Biophys J **71**(6): 3442-7.
- Hinman, M. B. and R. V. Lewis (1992). "Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber." J Biol Chem **267**(27): 19320-4.
- Hofmeister, F. (1888). "Zur Lehre von der Wirkung der Salze (Dritte Mittheilung)." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **25**(1): 1-30.
- Hu, X., K. Vasanthavada, et al. (2006). "Molecular mechanisms of spider silk." Cell Mol Life Sci **63**(17): 1986-99.
- Huemmerich, D. (2004). Design, Synthese und Analyse von Spinnenseidenproteinen. Fakultät für Chemie. München, Technische Universität München.
- Huemmerich, D., C. W. Helsen, et al. (2004). "Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility." Biochemistry **43**(42): 13604-12.
- Huemmerich, D., T. Scheibel, et al. (2004). "Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins." Curr Biol **14**(22): 2070-4.
- Huemmerich, D., U. Slotta, et al. (2006). "Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins." Appl Phys A **82**: 219-222.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton (1994). "A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins." Protein Sci **3**(12): 2207-16.
- Jin, H. J., S. V. Fridrikh, et al. (2002). "Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide)." Biomacromolecules **3**(6): 1233-1239.
- Jin, H. J. and D. L. Kaplan (2003). "Mechanism of silk processing in insects and spiders." Nature **424**(6952): 1057-61.

- Kang, G. D., J. H. Nahm, et al. (2000). "Effects of poloxamer on the gelation of silk fibroin." Macromolecular Rapid Communications **21**(11): 788-791.
- Karatzas, C. N., J. D. Turner, et al. (1998). Production of biofilaments in transgenic animals. U. Patent. USA, Nexia Biotechnologies, Inc. **7157615**
- Kenney, J. M., D. Knight, et al. (2002). "Amyloidogenic nature of spider silk." Eur J Biochem **269**(16): 4159-63.
- Khurana, R., C. Coleman, et al. (2005). "Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils." J Struct Biol **151**(3): 229-38.
- Khurana, R., V. N. Uversky, et al. (2001). "Is Congo red an amyloid-specific dye?" J Biol Chem **276**(25): 22715-21.
- Klunk, W. E., R. F. Jacob, et al. (1999). "Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay." Methods Enzymol **309**: 285-305.
- Klunk, W. E., J. W. Pettegrew, et al. (1989). "Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation." J Histochem Cytochem **37**(8): 1273-81.
- Knight, D. P., M. M. Knight, et al. (2000). "Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk." Int J Biol Macromol **27**(3): 205-10.
- Knight, D. P. and F. Vollrath (2001). "Changes in element composition along the spinning duct in a Nephila spider." Naturwissenschaften **88**(4): 179-82.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4." Nature **227**(5259): 680-&.
- Lammel, A., M. Schwab, et al. (2008). "Processing conditions for the formation of spider silk microspheres." ChemSusChem **1**(5): 413-6.
- Lazaris, A., S. Arcidiacono, et al. (2002). "Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells." Science **295**(5554): 472-6.
- Lefevre, T., S. Boudreault, et al. (2008). "Conformational and orientational transformation of silk proteins in the major ampullate gland of Nephila clavipes spiders." Biomacromolecules **9**(9): 2399-407.
- Lefevre, T., J. Leclerc, et al. (2007). "In situ conformation of spider silk proteins in the intact major ampullate gland and in solution." Biomacromolecules **8**(8): 2342-4.
- Lewis, R. V. (2006). "Spider silk: ancient ideas for new biomaterials." Chem Rev **106**(9): 3762-74.
- Lewith, S. (1888). "Ueber die Fällbarkeit von Eiweissstoffen Durch Salze." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **27**(1): 408.

- Li, G., P. Zhou, et al. (2001). "The natural silk spinning process. A nucleation-dependent aggregation mechanism?" Eur J Biochem **268**(24): 6600-6.
- Liu, Y., A. Spöner, et al. (2008). "Proline and processing of spider silks." Biomacromolecules **9**(1): 116-21.
- Lottspeich F., Z. H. H. (1998). Bioanalytik. Heidelberg, Deutschland, Spektrum Akademischer Verlag.
- Madsen, B., Z. Z. Shao, et al. (1999). "Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual." Int J Biol Macromol **24**(2-3): 301-6.
- Meinel, L., S. Hofmann, et al. (2005). "The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo." Biomaterials **26**(2): 147-55.
- Metwalli, E., U. Slotta, et al. (2007). "Structural changes of thin films from recombinant spider silk proteins upon post-treatment." Appl Phys A **89**: 655-661.
- Moy, R. L., A. Lee, et al. (1991). "Commonly used suture materials in skin surgery." Am Fam Physician **44**(6): 2123-8.
- Naiki, H., K. Higuchi, et al. (1989). "Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1." Anal Biochem **177**(2): 244-9.
- Ohgo, K., C. H. Zhao, et al. (2003). "Preparation of non-woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method." Polymer **44**(3): 841-846.
- Pace, C. N. and F. Schmid (1997). How to determine the molar absorption coefficient of a protein. Protein Structure: A Practical Approach. T. E. Creighton. Oxford, IRL Press.
- Parkhe, A. D., S. K. Seeley, et al. (1997). "Structural studies of spider silk proteins in the fiber." J Mol Recognit **10**(1): 1-6.
- Pepe, A., R. M. Armenante, et al. (2009). "Formation of nanostructures by self-assembly of an elastin peptide." Soft Matter **5**: 104-113.
- Porter, D., F. Vollrath, et al. (2005). "Predicting the mechanical properties of spider silk as a model nanostructured polymer." Eur Phys J E Soft Matter **16**(2): 199-206.
- Rammensee, S., D. Hümmerich, et al. (2005). "Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk." Applied Physics A **82**(2): 261-264.
- Rammensee, S., U. Slotta, et al. (2008). "Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6590-5.
- Rath, A., A. R. Davidson, et al. (2005). "The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition." Biopolymers **80**(2-3): 179-85.

- Riekkel, C., C. Branden, et al. (1999). "Aspects of X-ray diffraction on single spider fibers." Int J Biol Macromol **24**(2-3): 179-86.
- Rising, A., G. Hjalml, et al. (2006). "N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindriform spider silk proteins." Biomacromolecules **7**(11): 3120-4.
- Rising, A., H. Nimmervoll, et al. (2005). "Spider silk proteins--mechanical property and gene sequence." Zoolog Sci **22**(3): 273-81.
- Romer, L. and T. Scheibel (2008). "The elaborate structure of spider silk: Structure and function of a natural high performance fiber." Prion **2**(4): 1-8.
- Sambrook, J. and D. Russel (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Scheibel, T. (2004). "Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins." Microbial Cell Factories **3**(14).
- Scheibel, T., J. Bloom, et al. (2004). "The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2287-92.
- Scheller, J., K. H. Guhrs, et al. (2001). "Production of spider silk proteins in tobacco and potato." Nat Biotechnol **19**(6): 573-7.
- Schmid, F. (1997). Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. . Protein Structure: A practical approach. Oxford, UK, In Creighton TE: 261-297.
- SenGupta, S. and T. Scheibel (2007). Folding, Self-assembly and conformational switches of proteins. Protein folding-misfolding : some current concepts of protein chemistry J. P. Zilbut and T. Scheibel. New York, Nova Science Publishers.
- Shi, Z., R. W. Woody, et al. (2002). "Is polyproline II a major backbone conformation in unfolded proteins?" Adv Protein Chem **62**: 163-240.
- Simmons, A. H., C. A. Michal, et al. (1996). "Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk." Science **271**(5245): 84-7.
- Slotta, U. (2005). Charakterisierung der Interaktion von synthetischen Spinnenseidenproteinen in vivo und Analyse ihrer Assemblierung in vitro. Lehrstuhl für Biotechnologie. Garching, TU München. Diplom.
- Slotta, U., S. Hess, et al. (2007). "Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison." Macromol Biosci **7**(2): 183-8.
- Slotta, U., M. Tammer, et al. (2006). "Structural analysis of spider silk films." Supramolecular Chemistry **18**(5): 465-471.
- Slotta, U. K., S. Rammensee, et al. (2008). "An Engineered Spider Silk Protein Forms Microspheres." Angew Chem Int Ed Engl.

- Sofia, S., M. B. McCarthy, et al. (2001). "Functionalized silk-based biomaterials for bone formation." J Biomed Mater Res **54**(1): 139-48.
- Sonnichsen, F. D., J. E. Van Eyk, et al. (1992). "Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide." Biochemistry **31**(37): 8790-8.
- Soong, H. K. and K. R. Kenyon (1984). "Adverse reactions to virgin silk sutures in cataract surgery." Ophthalmology **91**(5): 479-83.
- Sponner, A., E. Unger, et al. (2004). "Conserved C-termini of Spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread." Biomacromolecules **5**(3): 840-5.
- Sponner, A., E. Unger, et al. (2005). "Differential polymerization of the two main protein components of dragline silk during fibre spinning." Nat Mater **4**(10): 772-5.
- Sponner, A., W. Vater, et al. (2007). "Composition and hierarchical organisation of a spider silk." PLoS ONE **2**(10): e998.
- Stephens, J. S., S. R. Fahnestock, et al. (2005). "Effects of electrospinning and solution casting protocols on the secondary structure of a genetically engineered dragline spider silk analogue investigated via Fourier transform Raman spectroscopy." Biomacromolecules **6**(3): 1405-13.
- Sunde, M. and C. Blake (1997). "The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction." Adv Protein Chem **50**: 123-59.
- Teramoto, H. and M. Miyazawa (2005). "Molecular orientation behavior of silk sericin film as revealed by ATR infrared spectroscopy." Biomacromolecules **6**(4): 2049-57.
- Thiering, R., F. Dehghani, et al. (2000). "The influence of operating conditions on the dense gas precipitation of model proteins." J. Chem. Technol. Biotechnol. **75**: 29-41.
- Top, A., K. L. Kiick, et al. (2008). "Modulation of self-association and subsequent fibril formation in an alanine-rich helical polypeptide." Biomacromolecules **9**(6): 1595-603.
- Townley, M. A., E. K. Tillinghast, et al. (2006). "Changes in composition of spider orb web sticky droplets with starvation and web removal, and synthesis of sticky droplet compounds." J Exp Biol **209**(Pt 8): 1463-86.
- Um, I. C., H. Y. Kweon, et al. (2001). "Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid." Int J Biol Macromol **29**(2): 91-7.
- Urry, D. W., C. H. Luan, et al. (1995). "Molecular biophysics of elastin structure, function and pathology." Ciba Found Symp **192**: 4-22; discussion 22-30.
- Uversky, V. N. (2002). "Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics." Protein Sci **11**(4): 739-56.

- Uversky, V. N. (2002). "What does it mean to be natively unfolded?" Eur J Biochem **269**(1): 2-12.
- Uversky, V. N. and A. L. Fink (2004). "Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded." Biochim Biophys Acta **1698**(2): 131-53.
- Uversky, V. N., J. R. Gillespie, et al. (2000). "Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?" Proteins **41**(3): 415-27.
- van Beek, J. D., S. Hess, et al. (2002). "The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10266-71.
- van Beek, J. D., J. Kummerlen, et al. (1999). "Supercontracted spider dragline silk: a solid-state NMR study of the local structure." Int J Biol Macromol **24**(2-3): 173-8.
- Vassar, P. S. and C. F. Culling (1959). "Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues." Arch Pathol **68**: 487-98.
- Vendrely, C., C. Ackerschott, et al. (2008). "Molecular Design of Performance Proteins with Repetitive Sequences: Recombinant Flagelliform Spider Silk as Basis for Biomaterials." Methods in Molecular Biology **474**: 3-14.
- Vendrely, C. and T. Scheibel (2007). "Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications." Macromol Biosci **7**(4): 401-9.
- Vollrath, F. (1999). "Biology of spider silk." Int J Biol Macromol **24**(2-3): 81-8.
- Vollrath, F. (2000). "Strength and structure of spiders' silks." J Biotechnol **74**(2): 67-83.
- Vollrath, F. and D. P. Knight (1999). "Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*." Int J Biol Macromol **24**(2-3): 243-9.
- Vollrath, F. and D. P. Knight (2001). "Liquid crystalline spinning of spider silk." Nature **410**(6828): 541-8.
- Vollrath, F., B. Madsen, et al. (2001). "The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk." Proc Biol Sci **268**(1483): 2339-46.
- Vollrath, F. and D. Porter (2006). "Spider silk as archetypal protein elastomer." Soft Matter **2**: 377-385.
- Wang, W. (2005). "Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics." Int J Pharm **289**(1-2): 1-30.
- Wang, X., E. Wenk, et al. (2007). "Silk microspheres for encapsulation and controlled release." J Control Release **117**(3): 360-70.
- Wilson, R. S. (1962). "The control of drag-line in certain spiders." Am. Zool. **9**: 103-111.

- Wilson, R. S. (1962). "The control of dragline spinning in the garden spider." Q. J. Microsc. Sci. **104**: 557-571.
- Winkler, S. and D. L. Kaplan (2000). "Molecular biology of spider silk." J Biotechnol **74**(2): 85-93.
- Wong Po Foo, C., E. Bini, et al. (2006). "Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders." Appl Phys A **82**: 223-233.
- Xu, M. and R. V. Lewis (1990). "Structure of a protein superfiber: spider dragline silk." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 7120-4.
- Yeo, J.-H. L., K.-G.; Lee, Y.-W.; Kim S. Y. (2003). "Simple preparation and characteristics of silk fibrion microsphere." European Polymer Journal **39**: 1195-1199.
- Zandomenoghi, G., M. R. Krebs, et al. (2004). "FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils." Protein Sci **13**(12): 3314-21.
- Zhang, Y. and P. S. Cremer (2006). "Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series." Curr Opin Chem Biol **10**(6): 658-63.
- Zhang, Y., S. Furyk, et al. (2005). "Specific ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series." J Am Chem Soc **127**(41): 14505-10.
- Zhao, C., J. Yao, et al. (2003). "Structural characterization and artificial fiber formation of Bombyx mori silk fibroin in hexafluoro-iso-propanol solvent system." Biopolymers **69**(2): 253-9.
- Zimm, B. H. (1948). "The dependence of the scattering of light on angle and concentration in linear polymer solutions." J Phys Colloid Chem **52**(1): 260-7.

7 Abkürzungen

| | |
|--------------------------------|---|
| ADF | <i>Araneus diadematus</i> Fibroin |
| AFM | <i>Atomic force microscopy</i> (Rasterkraftmikroskopie) |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATR | <i>Attenuated total reflection</i> |
| AU | <i>Arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten) |
| BHK | <i>Baby hamster kidney</i> |
| CD | Circulardichroismus |
| CR | Kongo Rot |
| CRBB | <i>Congo red binding buffer</i> (Kongo Rot Bindepuffer) |
| Da | Dalton |
| ε | Extinktionskoeffizient |
| E | Extinktion |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| engl. | englisch |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FPLC | <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> |
| FTIR | Fouriertransformiertes Infrarot |
| g | Erdbeschleunigung |
| GdmCl | Guanidiniumhydrochlorid |
| GdmSCN | Guanidiniumthiocyanat |
| GPa | Gigapascal |
| H ₂ O _{MQ} | Reinstwasser |
| HFIP | 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalactosid |
| λ | Wellenlänge |
| LMW | <i>low molecular weight</i> (Molekulargewichtsstandard) |
| M | Molar |
| MAC-T | <i>Mammary epithelial alveolar-Zelllinie</i> |
| MaSp | <i>Major ampullate</i> Spidroin |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |

| | |
|---------------|---|
| μl | Mikroliter |
| mM | Millimolar |
| μM | Mikromolar |
| MW | relative Molekülmasse |
| MWCO | <i>molecular weight cut off</i> (Ausschlussgröße) |
| nm | Nanometer |
| NR | nicht-repetitiv |
| OD | Optische Dichte |
| p. a. | pro analysis |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| pH | <i>pondus Hydrogenii</i> |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Sf9 | <i>Spodoptera frugiperda</i> -Zelllinie |
| T | Temperatur |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| ThT | Thioflavin T |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Trp | Tryptophan |
| Tyr | Tyrosin |
| üN | über Nacht |
| UV | ultraviolett |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| VIS | visuell |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| w/w | Gewicht pro Gewicht |

8 Publikationen

D. Hümmerich, U. Slotta, T. Scheibel: “Processing and modification of films made from recombinant spider silk”, 2006, *Applied Physics A* **82**, 219-222

U. Slotta, M. Tammer, F. Kremer, P. Koelsch, T. Scheibel: „Structural analysis of films cast from recombinant spider silk proteins“, 2006, *Supramolecular Chemistry* **18**, 465-471

U. Slotta, S. Hess, K. Spiess, T. Stromer, T. Scheibel: “Spider silk and amyloid fibrils – a structural comparison”, 2007, *Macromolecular Bioscience* **7**, 183-188

E. Metwalli, U. Slotta, C. Darko, S. Roth, T. Scheibel, C. Papadakis: “Structural changes of thin films from recombinant spider silk proteins upon post treatment”, 2007, *Applied Physics A* **89**, 655-661

D. Horinek, A. Serr, M. Geisler, T. Pirzer, U. Slotta, S. Q. Lud, J.A. Garrido, T. Scheibel, T. Hugel, R. R. Netz, “Peptide adsorption on a hydrophobic surface results from an interplay of solvation, surface, and intrapeptide forces”, 2008, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Feb **26**;105(8):2842-2847

S. Rammensee, U. Slotta, T. Scheibel, A. R. Bausch, “Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins”, 2008, *Proc Natl Acad Sci U S A*, May 6, 105(18), 6590-6595

U. K. Slotta, S. Rammensee, S. Gorb, T. Scheibel, “An Engineered Spider Silk Protein Forms Microspheres”, 2008, *Angew Chem Int Ed Engl.*, May 6, 47(24), 4592-4594.

A. Lammel, M. Schwab, U. Slotta, G. Winter, T. Scheibel, “Processing Conditions for the Formation of Spider Silk Microspheres”, 2008, *Chem Sus Chem*, May 1(5)

U. Slotta, K. Spiess, T. Scheibel; S. P. Jarvis & A. S. Mostaert (eds), “Functional amyloids and silks”, 2008, *The Functional Fold. Useful Amyloid Structures in Nature*, Pan Stanford Publishing, Singapore

Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Johannes Buchner, der mich herzlich an seinem Lehrstuhl aufgenommen hat, und vor allem an meinen Betreuer und Ansprechpartner Prof. Dr. Thomas Scheibel.

Für die Hilfe bei den REM- und TEM-Aufnahmen möchte ich mich bei Bettina Richter sehr bedanken. Ebenso geht mein Dank an Dr. Stanislav Gorb, der die REM-Analyse der gefriergebrochenen Mikrokugeln durchführte.

Für die nette Kooperation zur Analyse der Spinnenseidenfilme mittels FTIR-Spektroskopie möchte ich mich bei Dr. Michael Tammer bedanken.

Für die Unterstützung bei den rheologischen Messungen und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen danke ich Sebastian Rammensee.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden und Kollegen des *Fiberlabs* und der späteren Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Biomaterialien an der Universität Bayreuth bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in jeder Situation unterstützt hat.