

Department Chemie  
Lehrstuhl für Biotechnologie

## **Design, Synthese und Analyse von Spinnenseidenproteinen**

Daniel Hümmerich

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. Horst Kessler

Prüfer der Dissertation

1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff
3. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief

Die Dissertation wurde am 26. Oktober 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 8. Dezember 2004 angenommen.



<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1	Spinnenseiden	2
1.2	Komponenten der MAS	5
1.2.1	Allgemeine Komponenten	5
1.2.2	MAS-Proteine	6
1.3	Struktur des Seidenfadens	8
1.3.1	Kristalline Regionen	9
1.3.2	Amorphe Matrix	10
1.3.3	Unterstruktur von Seidenfäden	13
1.4	Spinnprozess	13
1.5	Rekombinante Seidenproteine	18
1.6	Artifizielle Spinnversuche	21
1.7	Fragestellung	22
<b>2</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>24</b>
2.1	Materialien	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Größenstandards und Kits	25
2.1.3	Proteine und Antikörper	25
2.1.4	Oligonukleotide	26
2.1.5	Plasmide	27
2.1.6	Bakterienstämme	27
2.1.7	Sonstige Materialien	27
2.1.8	Geräte	28
2.2	Molekularbiologische Arbeitstechniken	29
2.2.1	Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i>	29
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.2.3	Präparation, Reinigung und Sequenzierung von DNA	31

2.2.4	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	31
2.2.5	PCR-Amplifikation	32
2.2.6	Enzymatische Modifikation von DNA	32
2.2.7	Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden	33
2.2.8	Klonierung authentischer Seidengene	33
2.2.9	Klonierung synthetischer Seidengene	34
2.3	Expression und Reinigung	36
2.3.1	Expression authentischer Seidengenfragmente in Insektenzellen	36
2.3.2	Bestimmung der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen nach Synthese Insektenzellen	36
2.3.3	Reinigung rekombinanter Seidenproteine aus Insektenzellen	37
2.3.4	Kinetik der Expression in <i>E.coli</i>	37
2.3.5	Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter Proteinen nach Synthese in <i>E.coli</i>	37
2.3.6	Anzucht, Induktion und Ernte der Bakterien	38
2.3.7	Reinigung der von <i>Araneus diadematus</i> abgeleiteten Konstrukte und NR-Domänen	38
2.3.8	Chromatographische Reinigung von NC1S	40
2.4	Proteinanalytik	41
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.4.2	Färbung nach Fairbanks	42
2.4.3	Silberfärbung	42
2.4.4	Immunoblotting (Western Blot)	43
2.4.5	Carboxymethylierung	44
2.4.6	Redoxtitration	45
2.4.7	Löslichkeitsbestimmung	45
2.4.8	Aggregationsassay	46
2.4.9	UV-Absorptionsspektroskopie	46
2.4.10	Fluoreszenzspektroskopie	47
2.4.11	CD-Spektroskopie	48
2.4.12	Feldflußfraktionierung (FFF) und Statische Lichtstreuung	48
2.4.13	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	50
2.4.14	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	51
2.4.15	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	51

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	Rekombinante Herstellung von Spinnenseidenproteinen	53
3.1.1	Expression authentischer Seidengenfragmente	54
3.1.2	Entwicklung einer Klonierungsstrategie zur Herstellung synthetischer Gene	56
3.1.3	Design und Konstruktion synthetischer Spinnenseiden	59
3.1.4	Reinigung und Ausbeute der synthetischen Spinnenseidenproteine	61
3.1.5	Das <i>Nephila clavipes</i> MaSp1-Derivat NC1S	64
3.2	Charakterisierung des löslichen Zustandes	65
3.2.1	Sekundärstruktur	65
3.2.2	Thermische Stabilität	67
3.2.3	Dimerisierung der NR-Domänen	69
3.2.4	Redoxpotentiale der NR-Cystine	70
3.2.5	Ursachen für das negative Redoxpotential der NR-Cystine	72
3.2.6	Einflüsse der Disulfidbrücke auf die Struktur und Stabilität der NR-Domänen	73
3.2.7	Dynamik und Selektivität der NR-Dimerisierung	74
3.2.8	Löslichkeit	76
3.2.9	Aggregation der synthetischen Seidenproteine	77
3.3	Assemblierung	80
3.3.1	Selbstassemblierung	81
3.3.2	Herstellung seidenähnlicher Fäden aus synthetischen Seidenproteinen	88
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1.1	Herstellung von Seidenproteinen	90
4.1.2	Funktion der NR-Regionen	91
4.1.3	Löslichkeit der Seidenproteine	92
4.1.4	Wirkung assoziationsfördernder Faktoren	94
4.1.5	Assemblierungsverhalten der Seidenproteine	96
4.1.6	Artübergreifende Gemeinsamkeiten der Seidenassemblierung	98
4.1.7	Herstellung neuer Materialien	99

<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>Literatur</b>	<b>102</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>111</b>
<b>Publikationen</b>	<b>112</b>
<b>Anhang</b>	<b>113</b>

# 1 Einleitung

Im Allgemeinen versteht man unter dem Begriff "Seide" den aus dem Kokon des Seidenspinners *Bombyx mori* gewonnenen Faden und daraus gefertigte Stoffe. Bereits etwa 3000 v. Chr. wurden in China Seidenraupen gezüchtet und Seidestoffe hergestellt. Von dort aus gelang das Wissen nach Japan, wo sich um 300 v. Chr. eine bedeutende Seidenindustrie etablierte. Über die Seidenstraße, einem Netz von Karawanenstraßen, die ab dem 2. Jahrhundert v. Chr. von China durch Zentralasien bis zum Mittelmeer und zum Schwarzen Meer führten, gelangte die Seide in das Römische Reich. Dort waren Seidestoffe begehrte Luxusgüter, die zum Teil mit Gold aufgewogen wurden. Erst um 600 n. Chr. gelang es Mönchen, Eier des *Bombyx mori* und Samen des Maulbeerbaumes, der bevorzugten Futterpflanze der Seidenspinner, von China in das heutige Istanbul zu schmuggeln und damit die Seidenproduktion in Europa zu begründen. Bis heute ist die Seide des *Bombyx mori* die einzige natürliche Seidenart, die in großem Maßstab produziert wird.

Tatsächlich ist der Begriff Seide aber viel weiter gefasst. Eine Definition wurde von C. Craig (Craig, 1997) formuliert: "Seiden sind Proteine, die hoch repetitive Aminosäuresequenzen enthalten und im Tier in einer flüssigen Form gespeichert werden. Bei der Sekretion entsteht daraus durch Scherung oder Verspinnen Fasern." Im Tierreich findet man Seidenproduktion in den Klassen Insecta (Insekten), Arachnida (Spinnentiere) und Myriapoda (Tausendfüßler). Seiden können verschiedenste Funktionen beim Schutz vor Feinden, bei der Fortpflanzung, beim Beutefang und bei der Verbreitung der Nachkommen ausüben (Craig, 1997). Entsprechend vielfältig sind ihre strukturellen und physikalischen Eigenschaften. Es gab viele Versuche, neben der Seide des Seidenspinners auch die Seiden anderer Tierarten, insbesondere die stabilen Seiden der Spinnen, für verschiedene Zwecke zu nutzen. Es wird von Fischern in Madagaskar berichtet, die mit Spinnennetzen kleine Fische fangen. Ende des 19. Jahrhunderts versuchte eine Firma bei Paris Seile aus Spinnenseide zu produzieren. Die territorialen Verhaltensweisen und kannibalischen Tendenzen von Spinnen verhinderten jedoch bis heute eine wirtschaftliche Produktion von natürlicher Spinnenseide.

Die besonderen Eigenschaften dieser Fäden weckten Anfang des letzten Jahrhunderts das Interesse der Wissenschaft. 1907 konnte nachgewiesen werden, dass Spinnenseiden hauptsächlich aus Proteinen bestehen (Fischer, 1907). Die systematische Analyse von

Spinnenseide begann in den 50er Jahren. Zunächst versuchte man vor allem die genaue Aminosäurezusammensetzung und die Struktur des Fadens zu bestimmen (Warwicker, 1954; Braunitzer & Wolff, 1955). Man hoffte dabei wertvolle Informationen zu bekommen, die bei der Weiterentwicklung und Verbesserung von Kunstfasern hilfreich sein könnten. Bis in die 80er Jahre folgten weitere Untersuchungen der mechanischen und strukturellen Eigenschaften der Seidenfäden, sowie die Charakterisierung der Spinnlösung. Ein Meilenstein in der Spinnenseidenforschung wurde mit der ersten Aufklärung einer partiellen Spinnenseidengensequenz 1990 gesetzt (Xu & Lewis, 1990). Die bis dahin gemachten Beobachtungen konnten ab diesem Zeitpunkt auf molekularer Ebene interpretiert werden. Zudem begannen mit der Isolierung von cDNAs Versuche, Spinnenseidenproteine rekombinant zu produzieren und künstliche Seiden daraus herzustellen. Neben unterschiedlichen Forschergruppen waren an dieser Arbeit auch Firmen wie DuPont oder Nexia Biotechnologies Inc. beteiligt. Die so gewonnenen stabilen Proteinfäden sollten als Nahtmaterial in der Nerven- und Augenchirurgie, als Angelschnüre oder in stabilen Geweben z.B. für schusssichere Westen und in der Freizeitindustrie eingesetzt werden.

## 1.1 Spinnenseiden

Die meisten Spinnen können mehrere Arten von Seidenfäden produzieren, wobei für jede Art eine eigene spezialisierte Drüse verwendet wird. Die Fäden werden für verschiedene Zwecke, wie z.B. Netzbau, Beutefang, Schutz der Nachkommen (Kokon) oder als Sicherungsfaden eingesetzt und besitzen entsprechend dieser Verwendungen unterschiedliche mechanische Eigenschaften. Wie weit sich die Eigenschaften verschiedener Fäden voneinander unterscheiden, kann am besten am Beispiel eines Radnetzes gezeigt werden. Für die Speichen, den Rahmen und die Aufhängung des Netzes verwenden Spinnen die gleiche Seide, die auch als Sicherheitsleine oder Abseilfaden verwendet und von der *major ampullate* Drüse gebildet wird. Häufig wird diese Seide auch "*major ampullate* Seide" (MAS) genannt. Um einerseits der gesamten Netzkonstruktion Stabilität zu verleihen und andererseits einen Sturz der Spinne abfangen zu können, ist diese Seidenart sehr steif und zugfest (Definitionen der mechanischen Eigenschaften Box 1.1). Die Fangspirale eines Spinnennetzes dient dagegen dazu, fliegende Insekten einzufangen.



Damit das Netz unter der Wucht des Aufpralls nicht zerreißt, besteht die Fangspirale aus einer sehr dehnbaren Seidenart.

Zugkraft	Um Fäden mit unterschiedlichen Durchmessern vergleichen zu können, werden angelegte Kräfte auf die Querschnittsfläche des Fadens im entspannten Zustand bezogen (Einheit: $\text{N/m}^2$ bzw. Pa).
Dehnung	Die Dehnung entspricht dem Quotient aus gedehnter Fadenlänge und Fadenlänge im entspannten Zustand minus Eins (dimensionslos).
Belastungskurve	Beim Dehnen eines Fadens bis zum Zerreißen wird die angelegte Kraft gegen die Dehnung des Fadens aufgetragen.
Steifheit	Die Steifheit entspricht der Anfangssteigung der Belastungskurve. Vergleichbar mit der Federkonstanten des Hookschen Gesetzes gibt sie die Änderung der Zugkraft mit Änderung der Dehnung an. (Einheit: $\text{N/m}^2$ bzw. Pa).
Zugfestigkeit	Die Zugfestigkeit gibt die Kraft an, die für das Zerreißen eines Fadens aufgebracht werden muss (Einheit: $\text{N/m}^2$ bzw. Pa).
Dehnbarkeit	Die Dehnbarkeit entspricht der Dehnung die zum Zerreißen eines Fadens führt (dimensionslos).
Zähigkeit	Die Zähigkeit entspricht der Fläche unter der Belastungskurve und damit der Energie (bezogen auf Querschnitt und Länge des Fadens), die aufgebracht werden muss um einen Faden zu zerreißen (Einheit: $\text{J/m}^3$ )

**Box 1.1 Definitionen einiger bei der mechanischen Charakterisierung von Spinnenseidenfäden wichtiger Begriffe und Messgrößen.**

Verglichen mit anderen biologischen Materialien weisen Spinnenseiden die besten mechanischen Eigenschaften auf. Die MAS ist zum Beispiel zugfester als Kollagen oder Knochen. Dagegen ist die Seide der Fangspirale dehnbarer als Elastin (Tabelle 1.1). Vergleicht man Spinnenseiden mit industriell gefertigten Werkstoffen, so findet man sowohl zugfestere (Kevlar und Hochleistungsstahl) als auch dehnbarere Materialien (Gummi). Während jedoch die zugfesten künstlichen Materialien bereits bei geringer Ausdehnung reißen und dehnbare synthetische Materialien nur geringen Zugkräften standhalten, vereinen sowohl die MAS, als auch die Fäden der Fangspirale Zugfestigkeit und Dehnbarkeit. Die dadurch resultierende Zähigkeit dieser Seiden ist der aller anderen

Materialien überlegen (Gosline *et al.*, 1999). Die in Tabelle 1.1 für Spinnenseiden angegebenen Werte sind allerdings keine fixen Größen, sondern variieren zwischen den verschiedenen Arten, aber auch zwischen Individuen innerhalb einer Art. Selbst die Fäden eines Tieres können abhängig z.B. vom Ernährungszustand unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (Madsen *et al.*, 1999).

	Steifheit [GPa]	Zugfestigkeit [GPa]	Dehnbarkeit	Zähigkeit [MJ/m <sup>3</sup> ]
Abseilfaden ( <i>A.d.</i> )	10	1,1	0,27	160
Fangspiralfaden ( <i>A.d.</i> )	0,003	0,5	2,7	150
Sehnenkollagen	1,5	0,15	0,12	7,5
Knochen	20	0,16	0,03	4
Elastin	0,001	0,002	1,5	2
Kevlar	130	3,6	0,027	50
Hochleistungsstahl	200	1,5	0,008	6
Gummi	0,001	0,05	8,5	100

**Tabelle 1.1 Mechanische Eigenschaften von Spinnenseiden und einigen natürlichen und synthetisch hergestellten Materialien (Gosline *et al.*, 1999) *A.d.*: *Araneus diadematus* (Gartenkreuzspinne)**

Die in Tabelle 1.1 aufgeführten Eigenschaften werden durch Belastungsexperimente bestimmt, die jeweils zum Zerreißen der untersuchten Fäden führen. Wird der Faden vor dem Zerreißen wieder entspannt, so können Belastungszyklen durchgeführt werden, die Aufschluss über die Art der Dehnbarkeit geben. Nehmen Belastungs- und Entlastungskurve einen identischen Verlauf, so spricht man von einem elastischen Verhalten. Zeigen die beiden Kurven dagegen eine Hysterese, so handelt es sich um ein viskoelastisches Material. Kann der Faden nach einer Dehnung nicht mehr in den Ausgangszustand zurückkehren, so hat eine plastische Verformung stattgefunden. Durch entsprechende Experimente konnte gezeigt werden, dass Spinnenseiden viskoelastische Eigenschaften besitzen. Die durch Dehnung geleistete Energie wird nicht gespeichert, sondern dissipiert zu 65 % (Denny, 1976). Dies verhindert, dass ein aus vollem Flug abgefangenes Insekt wieder aus dem Netz herauskatapultiert wird. Die Eigenschaften von

viskoelastischen Materialien hängen nicht nur vom momentanen Zustand, wie z.B. Temperatur und Dehnung, sondern auch von der Geschichte des Materials ab. Als Konsequenz variieren die mechanischen Eigenschaften der Spinnenseiden mit Dehnraten (Dehnung pro Zeit) oder der Frequenz von Dehnungszyklen (Denny, 1976; Cunniff *et al.*, 1994).

## 1.2 Komponenten der MAS

Die MAS ist die bisher am besten untersuchte Seidenart. Dies liegt einerseits an der hohen Zugfestigkeit der Fäden, deren Ursachen man ergründen und imitieren möchte. Zum anderen lässt sich die MAS im Vergleich zu anderen Seidenarten relativ einfach durch Melken der Spinnen gewinnen (Work, 1976).

### 1.2.1 Allgemeine Komponenten

Bereits 1907 konnte nachgewiesen werden, dass die MAS der Spinne *Nephila madagascariensis* zum größten Teil aus Proteinen besteht (Fischer, 1907). Neben Proteinen wurde eine Reihe weiterer Stoffe in den Spinnenseiden nachgewiesen, wenngleich in deutlich geringeren Mengen. Auf der Oberfläche der MAS konnte eine Schicht von Glykoproteinen detektiert werden, die jedoch leicht mechanisch oder durch Abwaschen entfernt werden konnte (Weiskopf *et al.*, 1996; Augsten *et al.*, 2000). In einer Analyse aller in einem Netz von *Nephila clavipes* verwendeter Seiden konnte ein Anteil von 3 -5 % Lipiden festgestellt werden. Allerdings wurde die Verteilung der Lipide auf die unterschiedlichen Seidenarten nicht untersucht (Schulz, 2001). Des Weiteren wurde Phosphat in unterschiedlichen Verbindungsformen in der MAS von *Nephila clavipes* entdeckt. Dort fand man sowohl ungebundenes ortho-Phosphat, als auch kovalent an Tyrosine und Zucker gebundene Phosphatreste (Michal *et al.*, 1996). Außerdem wurde Natrium, Kalium, Calcium und Schwefel in Drüseninhalt und Fäden gefunden (Thiel *et al.*, 1994; Knight & Vollrath, 2001). Bisher ist nur wenig über die Funktionen dieser Stoffe bekannt. Einige der Ionen spielen bei der Seidenassemblierung eine wichtige Rolle (siehe 1.4). Besonders die an der Oberfläche der Seidenfäden lokalisierten Komponenten könnten

Schutz vor mikrobiellen Angriffen bieten oder als Matrix für Pheromone (Schulz, 1996) dienen, die beim Fortpflanzungsverhalten der Spinnen eine wichtige Rolle spielen (Watson, 1986).

### 1.2.2 MAS-Proteine

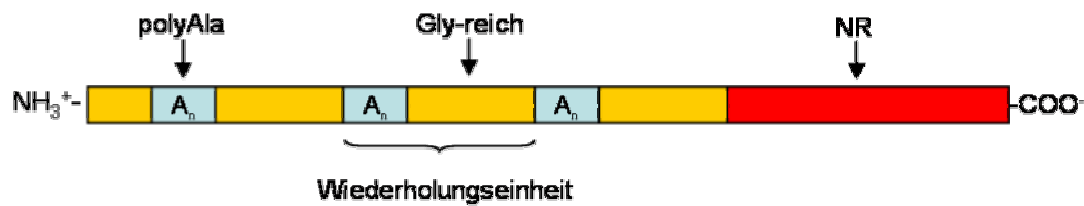
Erste quantitative Untersuchungen der MAS-Proteine wurden 1955 durchgeführt. Eine Aminosäureanalyse zeigte, dass MAS-Proteine einen außergewöhnlich hohen Gehalt an Glycin und Alanin aufweisen (Braunitzer & Wolff, 1955). Zu den molaren Massen der MAS-Proteine wurden bisher sehr unterschiedliche Werte publiziert. Je nach Analyse-methode und abhängig davon, ob der flüssige Drüseninhalt oder aufgelöste Seide untersucht wurde, reichten die Werte von 30 kDa bis 740 kDa (Braunitzer & Wolff, 1955; Candelas *et al.*, 1983; Mello *et al.*, 1994; Jackson & O'Brien, 1995). Während Werte von 740 kDa, die mittels Größenausschlusschromatographie ermittelt wurden, wahrscheinlich durch die Bildung eines nichtkovalenten Komplexes von mehreren Proteinmolekülen zustande kamen (Jackson & O'Brien, 1995), wurden mittels SDS-Page Größen zwischen 190 und 320 kDa festgestellt. Da sich das Laufverhalten der Proteine in Anwesenheit von Reduktionsmitteln änderte, ist es wahrscheinlich, dass die Bildung von Disulfidbrücken bei der Interaktion von MAS-Proteinen eine Rolle spielt (Mello *et al.*, 1994; Sponner *et al.*, 2004b).

Die meisten Informationen über die Aminosäuresequenzen von MAS-Proteinen wurden bisher durch die partielle Sequenzierungen von entsprechenden Genen bzw. cDNAs erhalten. Die strukturellen Besonderheiten der Seidengene verhinderten jedoch bisher die Aufklärung einer vollständigen Gensequenz. Eine Besonderheit liegt in der außergewöhnlichen Größe der Seidengene. Durch Northern Blot Analysen konnten mRNAs von 7 bis 12 kb nachgewiesen werden (Xu & Lewis, 1990; Guerette *et al.*, 1996). Außerdem erschwert der hoch repetitive Aufbau der Gene die systematische Sequenzierung nach herkömmlichen Methoden. Bis heute sind daher nur Teilabschnitte der repetitiven Regionen und die 3'-Termini der MAS-Gene verschiedener Spinnenarten bekannt (Xu & Lewis, 1990; Hinman & Lewis, 1992; Guerette *et al.*, 1996; Gatesy *et al.*, 2001). Aus den vorhandenen Informationen lässt sich jedoch ein relativ genaues Bild über den strukturellen Aufbau der Aminosäuresequenz konstruieren. Die Wiederholung von

Variationen einer bis zu 60 Aminosäure umfassenden Wiederholungseinheit stellt den größten Teil der bekannten MAS-Proteinsequenzen dar (Abbildung 1.1). Aufgrund von quantitativen Aminosäureanalysen geht man davon aus, dass sich diese repetitive Region auch im unbekanntem Teil der MAS-Proteine fortsetzt (Guerette *et al.*, 1996). Die Wiederholungseinheiten sind im Wesentlichen aus einer kleinen Anzahl von Peptidmotiven aufgebaut. Ein Motiv, das man in allen MAS-Wiederholungseinheiten findet, ist ein Block aus normalerweise 6 bis 9 Alaninen. Daneben gibt es glycinreiche Motive wie GGX oder GPGXX (Hayashi *et al.*, 1999). Bei diesen Motiven wird insbesondere der Aminosäure Prolin eine besondere Bedeutung zugemessen, da sie die Ausbildung der für die Fadenstruktur wichtigen  $\beta$ -Faltblätter erschwert (Thiel *et al.*, 1997). Da nur ein Teil der MAS-Proteine das GPGXX-Motiv enthält, wurde dieses Merkmal für die Unterteilung in zwei Klassen verwendet. In Anlehnung an die beiden MAS-Proteine MaSp1 und MaSp2 der Spinne *Nephila clavipes* wurden MAS-Proteine ohne das GPGXX-Motiv der MaSp1 Klasse, und MAS-Proteine mit diesem Motiv der MaSp2 Klasse zugeordnet (Gatesy *et al.*, 2001). Sowohl molekularbiologische Experimente (Hinman & Lewis, 1992; Gosline *et al.*, 2002), als auch immunochemische Nachweise (Fahnestock *et al.*, 2000; Sponner, 2003; Sponner *et al.*, 2004b) weisen darauf hin, dass die Abseilfäden der Radnetzspinnen jeweils aus zwei Hauptproteinkomponenten bestehen. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um ein Protein aus der MaSp1-Klasse und ein zweites Protein aus der MaSp2 Klasse (Gatesy *et al.*, 2001). Eine Ausnahme stellt hier jedoch die Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* dar. Deren beide MAS-Proteine ADF-3 und ADF-4 enthalten GPGXX-Motive und wurden daher der MaSp2 Klasse zugeordnet. Da diese Spinne aus diesen beiden Proteinen einen Faden spinnen kann, der in seinen physikalischen Eigenschaften mit anderen MAS-Fäden durchaus vergleichbar ist, scheint die Anwesenheit eines prolinarmen Proteins nicht zwingend notwendig zu sein.

Am carboxylterminalen Ende der MAS-Proteine befindet sich eine ca. 100 Aminosäuren lange Region, die keine repetitiven Muster erkennen lässt. Diese so genannte nichtrepetitive (NR) Region ist in allen MAS-Proteinen sowohl klassen- als auch artübergreifend stark konserviert (Beckwitt & Arcidiacono, 1994; Beckwitt *et al.*, 1998; Sponner *et al.*, 2004a). Durch immunochemischen Nachweis mit NR-spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass diese Regionen sowohl in der Spinnlösung als auch im gesponnenen Faden vorhanden sind (Sponner *et al.*, 2004b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein in allen NR-Regionen vorkommendes Cystein an der Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei NR-Regionen beteiligt ist (Sponner

*et al.*, 2004b). Da es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass die NR-Regionen eine signifikante Rolle in der Struktur und Stabilität des gesponnenen Fadens spielen (siehe 1.3), ist es wahrscheinlich, dass ihnen eine Funktion bei der Fadenassemblierung zukommt. Während für Seidenproteine, die in anderen Drüsen gebildet werden, am aminoterminalen Ende ebenfalls nichtrepetitive Regionen gefunden wurden (Hayashi & Lewis, 1998), konnten diese bisher nicht für MAS-Proteine nachgewiesen werden.



**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung des carboxylterminalen Bereichs eines MAS-Proteins. Die repetitive Region stellt den größten Teil des Proteins dar. Sie ist aus Wiederholungseinheiten aufgebaut, die ein Polyalanin-Motiv sowie glycinreiche Bereiche enthält. Der hier dargestellte Teil setzt sich aminoterminal fort. Carboxylterminal endet die Sequenz mit einer nichtrepetitiven Region (NR).

### 1.3 Struktur des Seidenfadens

Die durch die partielle Sequenzierung unterschiedlicher Seidengene gewonnenen Informationen über die Primärstruktur der Seidenproteine erlaubten den Vergleich mit messbaren Parametern der entsprechenden Seidenfäden. Dabei konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Häufigkeit bestimmter Peptidmotive und den mechanischen Eigenschaften der Seidenarten festgestellt werden. Ein hoher Anteil des GPGXX Motivs ist z.B. in besonders dehnbaren Seiden wie dem Faden der Fangspirale anzutreffen (Hayashi & Lewis, 1998). Dagegen scheint das Polyalanin-Motiv für die Steifheit und Zugfestigkeit der MAS mitverantwortlich zu sein (Hinman *et al.*, 2000). Versucht man diese Zusammenhänge zu verstehen, so stellt sich die Frage nach den Strukturen, die von den unterschiedlichen Peptidmotiven gebildet werden und die für die mechanischen Eigenschaften verantwortlich sind. Aus der modernen Polymerchemie kennt man die strukturellen Voraussetzungen für bestimmte Materialeigenschaften. Besonders zugfeste und steife Fasern, wie z.B. Kevlar, besitzen ein hohes Maß an Kristallinität (Rao *et al.*, 2001). Dagegen sind elastische Materialien wie Gummi durch zufällig verknäulte

Polymerketten gekennzeichnet. Durch Zug werden diese Ketten orientiert, was zu einer reversiblen Zunahme der freien Energie führt, die so im Material gespeichert wird (Mark, 1992). Die Zugfestigkeit und Elastizität sind also durch sehr unterschiedliche Strukturen bedingt. Der Kombination aus Zugfestigkeit und Dehnbarkeit entsprechend findet man in Spinnenseiden verschiedene Strukturelemente wieder. Die ersten Hinweise, dass Spinnenseide eine Art Verbundwerkstoff ist, erhielt man mittels Röntgenbeugung. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Seidenfäden kristalline Regionen in eine weniger strukturierte "amorphe Matrix" eingebettet sind (Warwicker, 1954; Warwicker, 1956; Warwicker, 1960).

### 1.3.1 Kristalline Regionen

Während zunächst angenommen wurde, dass die kristallinen Regionen aus glycinreichen Sequenzen geformt werden (Dong *et al.*, 1991), besteht inzwischen ein allgemeiner Konsensus, dass die Polyalanin-Motive der MAS-Proteine im Seidenfaden  $\beta$ -Faltblätter bilden, die zu sehr stabilen Nanokristallen aufeinander gestapelt werden (Simmons *et al.*, 1994; Simmons *et al.*, 1996; Thiel *et al.*, 1997; Grubb & Jelinski, 1997; Riekel *et al.*, 2000). Da an der Ausbildung eines Kristalls wahrscheinlich verschiedene Polypeptidketten beteiligt sind, führt dies zu einer effizienten nichtkovalenten Quervernetzung der Proteine und damit zur Zugfestigkeit des Fadens (Lewis, 1992). Über die Größe der Kristalle und den Anteil von glycinreichen Regionen an der Ausbildung der  $\beta$ -Faltblätter gibt es verschiedene Vorstellungen. Simmons *et al.* zeigten mittels NMR-Spektroskopie, dass 40 % der MAS-Alanine, (d.h. 10% der gesamten Aminosäuren)  $\beta$ -Faltblattkristalle ausbilden, wobei die Faltblattstränge exakt parallel zur Fadenachse verlaufen (Simmons *et al.*, 1996). Damit übereinstimmend konnten Grubb und Jelinski mittels Röntgenbeugung Kristalle von  $5 \times 2 \times 7$  nm nachweisen, die etwa 12% des gesamten Fadenvolumens ausmachten und ebenfalls parallel zur Fadenachse ausgerichtet waren (Grubb & Jelinski, 1997). Des Weiteren wurden von beiden Arbeitsgruppen weniger orientierte Regionen festgestellt, die sich jedoch deutlich von den vollkommen ungeordneten amorphen Bereichen unterschieden. Sowohl Grubb als auch Simmons hielten die Inkorporation einiger Glycine in die Faltblattkristalle für wahrscheinlich, schlossen allerdings eine weiterreichende Beteiligung der glycinreichen Regionen an der

Kristallbildung aus. Thiel et al. beobachteten dagegen mittels TEM kristalline Bereiche deren Größe von 70 nm bis 500 nm angegeben wurde. Um diese Beobachtung zu erklären, schlugen sie das so genannte *non-periodic-lattice* (NPL) Modell vor, bei dem sowohl die Polyalanin-Motive als auch die glycinreichen Regionen der Seidenproteine an der Kristallbildung beteiligt sind (Thiel *et al.*, 1994; Thiel & Viney, 1996; Thiel *et al.*, 1997). Aufgrund der besonderen Molekülgeometrie würden prolinhaltige Aminosäuresequenzen den geordneten Aufbau eines Faltblattkristalls erheblich stören. Daher wurde postuliert, dass am Aufbau der Kristalle ausschließlich Proteine der MaSp1 Klasse beteiligt sind, während die amorphe Matrix von Proteinen der MaSp2 Klasse gebildet wird. Dieses durchaus interessante Modell weist jedoch einige Schwächen auf. Zum einen konnten die diesem Modell zugrunde liegende großen Dimensionen der kristallinen Regionen von anderen Arbeitsgruppen nicht nachgewiesen werden (Simmons *et al.*, 1996; Grubb & Jelinski, 1997; Frische *et al.*, 1998). Außerdem erklärt dieses Modell nicht die mit anderen Seiden durchaus vergleichbaren Eigenschaften der *Araneus diadematus*-MAS. Deren beide Hauptkomponenten ADF-3 und ADF-4 weisen in den repetitiven Regionen einen Prolingehalt von 15% bzw. 17% Prolin auf (Guerette *et al.*, 1996) und können entsprechend dieser Theorie keine NPL-Kristalle ausbilden.

### 1.3.2 Amorphe Matrix

Im Gegensatz zu den kristallinen Regionen, über die man mittels Röntgenbeugung schon früh Informationen erhalten konnte, gestaltete sich die strukturelle Untersuchung der "amorphen Matrix" schwieriger. Ein wichtiges Phänomen, das mit der Struktur der glycinreichen Regionen im Faden zusammenhängt, und dessen Untersuchung zum Verständnis der "amorphen Matrix" beigetragen hat, ist die so genannte Superkontraktion. Durch Benetzen von MAS mit Wasser oder chaotropen Lösungsmitteln wie Harnstofflösungen verkürzt sich der Faden auf bis zu 55% der ursprünglichen Länge, wobei der Durchmesser zunimmt (Work, 1977a; Work & Morosoff, 1982; Shao & Vollrath, 1999). Dabei ändern sich die mechanischen Eigenschaften: die superkontrahierte Seide ist dehnbarer und weniger steif als die unbehandelte Seide (Gosline *et al.*, 1984; Shao & Vollrath, 1999). Die Superkontraktion ist ein reversibler Prozess. Getrocknete und auf ihre ursprüngliche Länge gedehnte Seide zeigt das normale Verhalten unbehandelter Seide (Work, 1985). Wird die Seide während der Benetzung an den Enden festgehalten,



wie dies in einem gespannten Netz zum Beispiel der Fall ist, so baut sich eine Zugspannung auf (Bell *et al.*, 2002; Savage *et al.*, 2004). Darin könnte auch die Funktion der Superkontraktion liegen: Sie könnte dafür sorgen, dass das Netz immer wieder z.B. durch Tautropfen in einem straff gespannten Zustand versetzt wird (Lewis, 1992; Gosline *et al.*, 1999). Allerdings wird auch in Betracht gezogen, dass die Superkontraktion, die unter bestimmten Bedingungen bei fast allen Polymeren beobachtet werden kann (Work, 1977a; Work, 1977b), lediglich eine Konsequenz der molekularen Struktur der Seidenfäden ist und keine weitere Funktion besitzt (Gosline *et al.*, 1999).

Auf der Suche nach den molekularen Ursachen der Superkontraktion konnte gezeigt werden, dass während die kristalline Struktur der Polyalanin-Regionen erhalten bleibt (Work & Emerson, 1982; Simmons *et al.*, 1996; Parkhe *et al.*, 1997), sich die Orientierung der Kristalle ändert (Lewis, 1992; Parkhe *et al.*, 1997; van Beek *et al.*, 1999). Gleichzeitig werden in der glycinreichen "amorphen Matrix" durch das Wasser bzw. chaotrope Reagenzien Wasserstoffbrücken aufgebrochen (Shao *et al.*, 1999). Im superkontrahierten Zustand entspricht die "amorphe Matrix" einem elastischen Netzwerk, in dem die glycinreichen Regionen in einem vollständig zufällig verknäulten Zustand vorliegen (Gosline *et al.*, 1984) (Abbildung 1.2A). Durch die Entfernung des Wassers aus der superkontrahierten Seide bilden sich zunehmend Wasserstoffbrücken in der "amorphen Matrix". Termonia entwickelte ein theoretisches Modell, das versucht, diesen Zustand der trockenen Seide zu berechnen. Die damit errechneten Werte für Steifheit, Dehnbarkeit und Zugfestigkeit stimmten gut mit den experimentell bestimmten Werten überein (Termonia, 1994). Um diese Werte zu erhalten musste jedoch eine Volumenfraktion der Kristalle von 45% angenommen werden. Dieser Wert weicht stark von den durch Röntgenbeugungsexperimenten oder NMR-Spektroskopie bestimmten Werten ab.

Direkte experimentelle Hinweise auf die Struktur der "amorphen Matrix" wurden in der Gruppe von B.H. Meier mittels NMR-Spektroskopie erhalten. Entgegen des oben beschriebenen *random coil* Modells konnte dabei gezeigt werden, dass die glycinreiche Region der *Nephila clavipes*-MAS und *Nephila madagascariensis*-MAS eine  $3_1$ -helikale Struktur parallel zur Fadenachse ausbildet (Kummerlen *et al.*, 1996; van Beek *et al.*, 2002). Diese Helices sind dabei wenig beweglich und bilden mit benachbarten Helices Kontakte über Wasserstoffbrücken aus. Diese Konformation wurde für beide am Aufbau der MAS beteiligten Proteine angenommen. Nach diesem Modell ist also die Sekundärstruktur der glycinreichen Region unabhängig vom Prolingehalt der MAS-Proteine. Van Beek ging davon aus, dass parallel angeordnete Helices zusammen mit Polyalanin-Kristallen

Nanofibrillen bilden (Abbildung 1.2B). Davon ausgehend entwickelten Knight und Vollrath ein Modell, in dem verschiedene Nanofibrillen über Vernetzungspunkte zu einem Netzwerk, einem so genannten *liquid crystal elastomer* (LCE), verknüpft sind. Dieses Netzwerk ist in der Lage bei Dehnung Energie aufzunehmen. Die Gesamteigenschaften des Fadens werden dabei sowohl von den Eigenschaften der Nanofibrillen und deren Sekundärstruktur als auch von den Eigenschaften des LCE-Netzwerkes bestimmt (Knight & Vollrath, 2002).

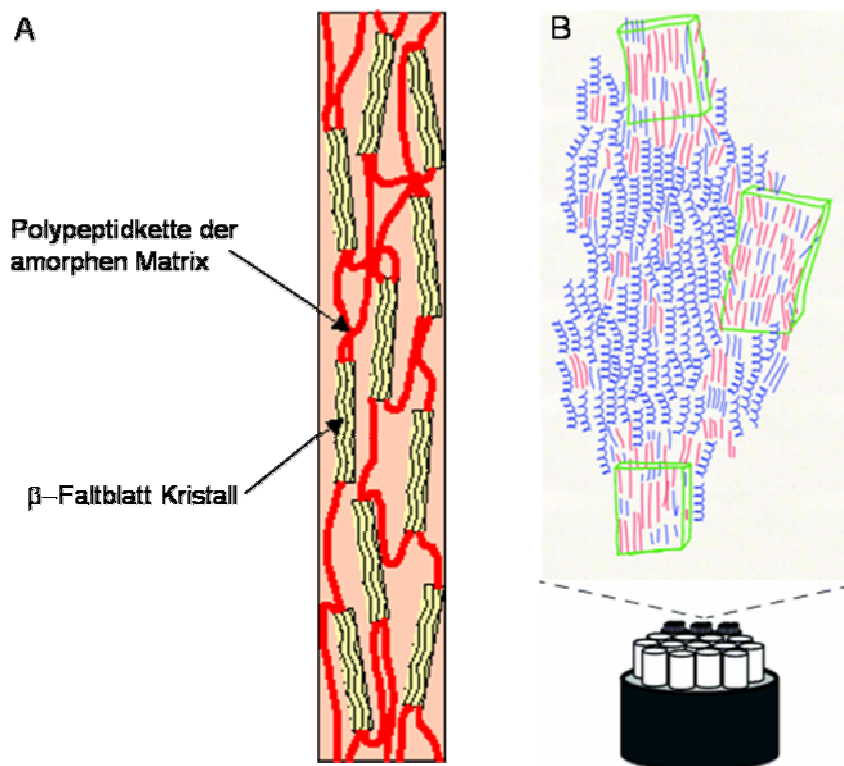


Abbildung 1.2 Modelle der Fadenstruktur (A) Nach dem *random coil* Modell sind im Seidenfaden die kristallinen Regionen durch wenig strukturierte, glycinreiche Polypeptidketten verbunden (aus Gosline *et al.*, 1999). (B) Im Modell von B.H. Meier sind die Polypeptidketten entlang der Fadenachse orientiert und zu Nanofibrillen zusammengefasst. Glycinreiche Regionen (blau) bilden vorzugsweise 3<sub>1</sub>-Helices, während Polyalanin-Regionen (rot) in β-Faltblattstrukturen wieder zu finden sind. Eine Ansammlung von Polyalanin-Motiven führt zur Ausbildung von β-Faltblatt-Kristallen (grün), in die z.T. auch glycinreiche Abschnitte integriert werden können (aus van Beek *et al.*, 2002).

### 1.3.3 Unterstruktur von Seidenfäden

Wie bereits beim LCE-Modell erwähnt, hängt die Eigenschaften eines Fadens oder Seils nicht nur von der molekularen Struktur seiner Komponenten ab, sondern auch vom Aufbau der inneren Fadenstruktur. Während es für die Nanofibrillen des LCE-Modell bisher keinen direkten experimentellen Beweis gibt, konnten fibrilläre Unterstrukturen mit Durchmessern von 100 – 300 nm mittels AFM und *small angle X-ray scattering* (SAXS) detektiert werden (Li *et al.*, 1994; Gould *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999; Riekel & Vollrath, 2001). Des Weiteren wurde 1984 von Work eine Unterteilung in eine Kern und eine Mantelregion vorgeschlagen (Work, 1984). Seither wurden unterschiedliche Einteilungen des Fadenquerschnitts publiziert. Die meisten Autoren beobachteten eine ca. 100 nm dünne äußere Schicht (Li *et al.*, 1994; Vollrath *et al.*, 1996; Frische *et al.*, 1998), wobei Vollrath *et al.* diese Schicht als ein Netzwerk sich kreuzender Nanofibrillen beschrieb. Das darunter liegende Material wurde meist in zwei weitere Zonen aufgeteilt (Li *et al.*, 1994; Vollrath *et al.*, 1996; Frische *et al.*, 1998). Immunochemische Nachweise an Querschnitten von *Nephila clavipes* MAS-Fäden ergaben, dass sich die Proteinzusammensetzung dieser beiden Zonen unterscheidet. Während in der Kernregion die beiden Seidenproteine MaSp1 und MaSp2 detektiert werden konnten, wurde in der darüberliegenden Schicht nur MaSp1 nachgewiesen (Sponner, 2003). Die Strukturierung der Seidenfäden bleibt jedoch umstritten. Es gibt mehrere elektronenmikroskopische Untersuchungen, die keinerlei fibrilläre Unterstruktur (Frische *et al.*, 1998), oder Kern-Mantel-Struktur (Thiel *et al.*, 1994; Thiel *et al.*, 1997) feststellen konnten.

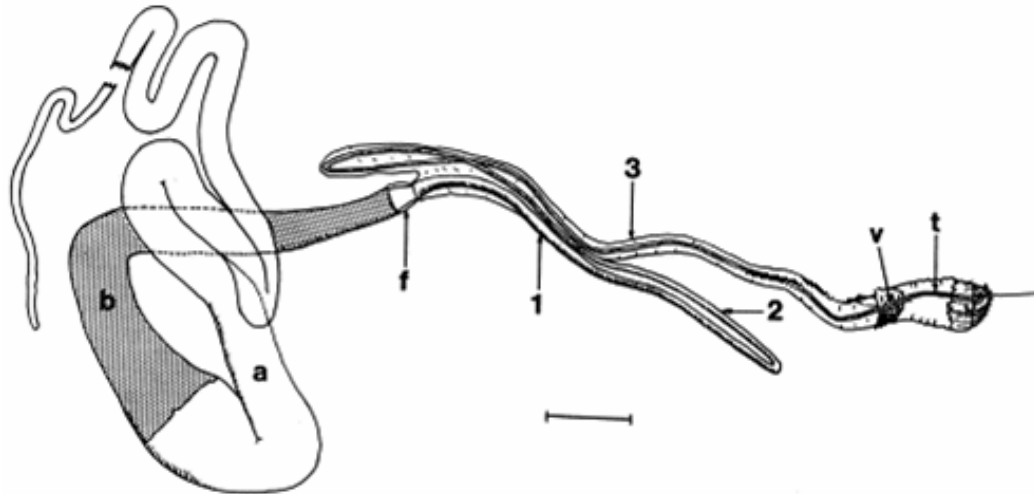
## 1.4 Spinnprozess

Wie in den Kapiteln 1.2 und 1.3 beschrieben besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Aminosäuresequenz der MAS-Proteine, der Struktur, die diese Proteine im Faden annehmen, und den makroskopischen Eigenschaften eines Seidenfadens. Dem Faden Zugfestigkeit und Dehnbarkeit zu verleihen ist jedoch nur eine Funktion, die die MAS-Proteine erfüllen müssen. Daneben müssen sie Eigenschaften aufweisen, die eine einfache und über mehrere Wochen andauernde Speicherung in der Drüse sowie ein effizientes Verspinnen erlauben. Das heißt, die Proteine müssen in der Lage sein, zwei völlig unterschiedliche Konformationen mit entsprechend unterschiedlichen Eigenschaften

anzunehmen. In der Spinndrüse liegen MAS-Proteine in einer hochkonzentrierten Lösung vor, die bis zu 50% w/v Protein enthalten kann (Hijirida *et al.*, 1996). Strukturelle Untersuchungen mittels NMR und Circular dichroismus-Spektroskopie ergaben, dass MAS-Proteine in dieser löslichen Form vorwiegend wenig strukturiert sind (Kenney *et al.*, 2002; Hronska *et al.*, 2004; Dicko *et al.*, 2004a). Während des Spinnprozesses lagern sich diese wenig strukturierten löslichen Proteine zu der bereits beschriebenen Fadenstruktur zusammen. Der Assemblierungsprozess ist dabei maßgeblich an der Qualität der finalen Struktur beteiligt (Knight & Vollrath, 1999). Der Spinnapparat einer Radnetzspinne, der für die Entstehung eines Abseilfadens verantwortlich ist, wird im Wesentlichen von einer Spinndrüse und dem sich daran anschließenden Spinnkanal gebildet (Abbildung 1.3). Die Seidenproteine werden von den Epithelzellen der Spinndrüse sezerniert und im Lumen gespeichert (Vollrath & Knight, 2001). Histologisch kann die Spinndrüse in zwei klar voneinander abgegrenzte Bereiche A und B unterteilt werden (Vollrath & Knight, 1999). Auch das in den beiden Zonen abgesonderte Sekret kann mikroskopisch durch unterschiedliche Farbe und die An- bzw. Abwesenheit kleiner tropfenförmiger Einschlüsse unterschieden werden. Man geht deshalb davon aus, dass schon in der Drüse während des Transportes in Richtung Spinnkanal die Spinnlösung der Zone A von einer Schicht der Spinnlösung aus Zone B umgeben wird, wodurch die bereits beschriebene Kern - Mantel Struktur entsteht (Vollrath & Knight, 1999). Die Spinndrüse wird von keiner Muskelschicht umgeben, die die Spinnlösung durch den folgenden Spinnkanal pressen könnte. Der Transport durch den Spinnapparat erfolgt vielmehr durch äußeren Zug an dem fertigen Faden. Von der Spinndrüse gelangt die Spinnlösung über einen Trichter in den sich verjüngenden S-förmigen Spinnkanal (Abbildung 1.3). Die Geometrie des Kanals sorgt dafür, dass die Spinnlösung gleichmäßig in die Länge gezogen wird. Dieser Kanal wird, bezogen auf die Entfernung zur Drüse, in einen proximalen, mittleren und distalen Bereich unterteilt. Im Spinnkanal werden Natrium- und Chloridionen gegen die lyotropen Kalium- und Phosphationen ausgetauscht (Tillinghast *et al.*, 1984; Knight & Vollrath, 2001). Außerdem wird der Spinnlösung Wasser entzogen (Tillinghast *et al.*, 1984). Änderungen des pH-Wertes der Spinnlösung scheinen ebenfalls eine Rolle bei der Fadenassemblierung zu spielen. Allerdings gibt es zum Verlauf des pH-Gradienten unterschiedliche Angaben. Histologische Untersuchungen ergaben Hinweise auf Protonenpumpen im distalen Teil des Spinnkanals (Vollrath *et al.*, 1998). Entsprechend konnte eine Abnahme des pH-Wertes von 6,9 in der Spinndrüse auf 6,3 am distalen Ende des Spinnkanals festgestellt werden (Knight & Vollrath, 2001). Andere Untersuchungen zeigten eine

Abnahme des pH-Wertes von 7,3 auf 6,3 bereits in der Spinndrüse zwischen der A-Zone und dem Beginn des Spinnkanals (Dicko *et al.*, 2004b). Die jeweiligen Experimente wurden mit unterschiedlichen Spinnenarten durchgeführt. Ob es tatsächlich artspezifische Unterschiede der Säureregulation gibt oder ob die verschiedenen Ergebnisse durch die verwendeten Präparations- und Messmethoden bedingt sind bleibt unklar.

Durch die beschriebenen Veränderungen wird die Spinnlösung für den eigentlichen Assemblierungsvorgang vorbereitet. Durch Zug am fertigen Faden löst sich die Spinnlösung ca. 4 mm vor dem Ausgang des Spinnkanals von der Kanalwand. Diese Stelle wird auch als *internal drawdown taper* bezeichnet. Dadurch entsteht eine "Dehnströmung", die zu einer Phasentrennung führt. Die feste Phase bildet den eigentlichen Faden und wird von einer wässrigen Phase umgeben (Vollrath & Knight, 1999). Kurz vor dem Ausgang befindet sich noch eine irreführenderweise als Ventil bezeichnete Struktur. Sie dient im Wesentlichen als Brems- und Arretiermechanismus und ermöglicht wahrscheinlich nach einem internen Fadenbruch den Transport des neuen Fadenendes nach außen um so die Ausgangssituation für den Spinnprozess wieder herzustellen (Vollrath & Knight, 1999).



**Abbildung 1.3** Spinnapparat für MAS der Spinne *Nephila clavipes*. Die Spinndrüse setzt sich aus der A-Zone (a) und der B-Zone (b) zusammen und mündet in den Trichter (f). Daran schließt sich der S-förmig gewundene Spinnkanal an, der in einen proximalen (1), mittleren (2) und distalen (3) Teil untergliedert werden kann. Der assemblierte Faden wird über das Ventil (v) und den terminalen Kanal (t) nach außen geführt (aus Vollrath & Knight, 1999). Balken 1 mm.

Während die anatomischen Merkmale des Spinnapparates und die äußeren Bedingungen während des Spinnprozesses bereits gut untersucht sind, ist über die

molekularen Mechanismen der Seidenassemblierung wenig bekannt. Theoretische Überlegungen führten zu der Vermutung, dass die Spinnlösung während des Spinnprozesses zumindest kurzfristig einen flüssigkristallinen Zustand annimmt (Kerkam *et al.*, 1991). Dieser Zustand ist einerseits durch die freie Beweglichkeit der gelösten Proteinmoleküle und andererseits durch eine gemeinsame Orientierung gekennzeichnet. Aus der Polymerchemie ist bekannt, dass die Zugfestigkeit einer gesponnenen Kunstfaser eng mit dem Grad der Orientierung einzelner Polymermoleküle entlang der Fadenachse zusammenhängt. Diese Orientierung wird in der Regel während des Spinnprozesses und durch anschließendes Ziehen des Fadens, dem so genannten *post spin draw* erreicht (Billmeyer, 1984). Besteht schon in der Spinnlösung eine Orientierung, d.h. die Spinnlösung liegt in einem flüssigkristallinen Zustand vor, so erhöht das die Orientierung und damit die Zugfestigkeit der gesponnenen Faser erheblich. Ein Beispiel dafür liefern die beiden Polyamide Nylon und Kevlar. Während Nylon aus einer isotropen flüssigen Phase heraus gesponnen wird, bildet Kevlar im gelösten Zustand aufgrund seiner starren Molekülstruktur eine flüssigkristalline Phase, was letztendlich zu einer im Vergleich zu Nylon 30-fach zugfesteren Faser führt (Collings, 2002). In Anlehnung an diese Tatsachen wurde vermutet, dass die hohe Reißfestigkeit der Spinnenseiden ebenfalls auf eine hohe Orientierung der Proteinmoleküle zurückzuführen sei. Da der Spinnapparat der Spinnen ohne den aufwendigen *post spin draw* auskommt, lag die Vermutung nahe, dass die Orientierung der Proteinmoleküle durch eine flüssigkristalline Spinnlösung ermöglicht wird (Kerkam *et al.*, 1991).

Überlegungen aus der Rheologie weisen ebenfalls auf einen flüssigkristallinen Zustand der Spinnlösung hin. Die Viskosität isotroper Lösungen nimmt mit der Konzentration zu. Um eine hochkonzentrierte isotrope Proteinlösung durch den Spinnkanal ziehen zu können, wären Kräfte notwendig, die von der Spinne nicht aufgebracht werden können (Vollrath & Knight, 2001). Die Viskosität von flüssigkristallinen Polymeren nimmt bei hohen Verdünnungen zwar ebenfalls mit der Konzentration zu, fällt aber ab einer kritischen Konzentration wieder ab, so dass eine flüssigkristalline Proteinlösung ohne großen Kraftaufwand durch den Spinnapparat transportiert werden könnte.

Es gibt unterschiedliche experimentelle Daten zum flüssigkristallinen Zustand der Spinnlösung. Während Knight & Vollrath 1999 eine molekulare Orientierung sowohl in der Spinndrüse als auch im Spinnkanal beobachteten, konnte Hronska *et al.* 2004 für den Inhalt der Spinndrüse einen isotropen Zustand nachweisen. Andere *in vitro* durchgeführte Experimente ergaben einen flüssigkristallinen Zustand der Spinnlösung nur nach

Verdunstung eines Teil des Wassers aus der Lösung (Kerkam *et al.*, 1991). Ein Modell, das alle theoretische Überlegungen und fast alle experimentelle Daten in Einklang bringen könnte, beinhaltet einen isotropen Zustand der Spinnlösung in der Spinnrüse. Durch Wasserentzug im Spinnkanal entsteht ein flüssigkristalliner Zustand, der den Transport durch den sich verjüngenden Kanal vereinfacht und die Ausrichtung der Seidenproteine parallel zur Fadenachse ermöglicht.

Ungeklärt bleibt jedoch weiterhin, wodurch eine flüssigkristalline Phase im Spinnapparat gebildet werden kann. Eine Voraussetzung, damit die Moleküle einer Polymerlösung eine Orientierung annehmen können, ist die Präsenz länglicher, starrer Elemente (Collings, 2002). Bei Proteinen könnten zum Beispiel  $\alpha$ -Helices als solche Elemente fungieren. Des Weiteren wäre die Ausbildung einer flüssigkristallinen Phase durch die von van Beek und Knight vorgeschlagenen Nanofibrillen denkbar (siehe 1.3). Alternativ wurden auch die Bildung stäbchenförmige Proteinoligomere vorgeschlagen, die in Lösung eine Orientierung annehmen können (Viney, 1997). Bisher konnte jedoch kein experimenteller Beweis für die Existenz solch starrer Elemente in der Spinnlösung erbracht werden.

Die Auswirkungen der lyotropen Ionen Kalium und Phosphat sowie der Ansäuerung auf molekularer Ebene sind bisher nicht bekannt. Es konnte lediglich *in vitro* gezeigt werden, dass die Zugabe von Kalium zu natürlicher Spinnlösung eine Assemblierung von Nanofibrillen verursacht (Chen *et al.*, 2002), während eine Ansäuerung eine Zunahme  $\beta$ -faltblattreicher Strukturen in der Spinnlösung nach sich zieht (Dicko *et al.*, 2004b). *In vivo* dagegen konnte eine Änderung der Sekundärstruktur erst im Bereich des *internal drawdown taper* nachgewiesen werden. Erst dort scheinen die Seidenproteine aus ihrer löslichen Konformation in eine unlösliche,  $\beta$ -faltblattreiche Konformation zu wechseln (Knight *et al.*, 2000). Die  $\beta$ -Faltblatt-Kristalle sind bei Verlassen des Spinnkanals bereits ausgebildet. Allerdings wird der finale Kristallgehalt erst einige Millimeter außerhalb des Kanalausgangs erreicht (Riekel *et al.*, 2000).

## 1.5 Rekombinante Seidenproteine

Im Gegensatz zur Seide des Seidenspinners *Bombyx mori* kann natürliche Spinnenseide nicht in großen Mengen gewonnen werden. Dies liegt vor allem am territorialen Verhalten von Spinnen, die bei zu hoher Populationsdichte ein kannibalistisches Verhalten zeigen. Deshalb wurden Versuche unternommen rekombinante Seidenproteine herzustellen und diese zu Seidenfäden zu verspinnen. Da bis heute kein vollständiges Seidengen isoliert werden konnte, verwendete man dafür bisher kürzere Genfragmente. Die Expression authentischer Genfragmente in Prokaryoten gestaltete sich aus mehreren Gründen schwierig. Seidengene enthalten viele Kodons, die von Bakterien nur sehr selten verwendet werden. Damit ist die Translation aufgrund mangelnder tRNAs erschwert. Die repetitive Natur der Gene führt zusätzlich zur Verkürzung der Gene durch homologe Rekombination, wodurch verkürzte Varianten der Seidenproteine entstehen. Entsprechend konnten auf diese Weise nur geringe Mengen rekombinanten Proteins hergestellt werden (Arcidiacono *et al.*, 1998). Ein Teil der Probleme, die bei der prokaryotischen Expression von Spinnenseidengenen auftreten, kann durch einen Wechsel zu einem eukaryotischen Expressionssystem umgangen werden. Mitarbeiter der Firma Nexia berichteten von der erfolgreichen Expression von *adf-3* in Hamsterzellen (BHK) und Rinderzellen (MAC-T). Das Protein wurde von diesen Zellen in das Zellmedium abgegeben, konnte gereinigt und zu Fäden versponnen werden (Lazaris *et al.*, 2002) (siehe 1.6). Die Firma erklärte außerdem, Seidenproteine in der Milch transgener Ziegen herstellen und daraus gewinnen zu können ([www.nexia.com](http://www.nexia.com)).

Ein Problem für die systematische Untersuchung der Spinnenseiden stellt die molekularbiologische Handhabbarkeit der Seidengene dar. Durch die extreme Repetitivität der DNA-Sequenz ist die Durchführung von Standardtechniken wie PCR und Mutagenese erschwert. Ohne diese Techniken ist die Generierung und der experimentelle Vergleich von verschiedenen Mutanten jedoch kaum möglich. Ein Ansatz, der die Generierung verschiedener Proteinvarianten ermöglicht, beinhaltet die Verwendung synthetischer Gene. Die repetitive Natur der Seidenprotein-Primärsequenzen erlaubt die Herstellung synthetischer Gene aus chemisch synthetisierten Oligonukleotiden, die für Proteine kodieren, die zwar nicht identisch mit den authentischen Proteinen sind, jedoch wesentliche Merkmale mit diesen teilen. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Methode besteht darin, dass beim Entwurf der synthetischen Gene die Kodons frei gewählt werden können. Es ist also möglich synthetische Gene zu konstruieren, die im Gegensatz zu den



authentischen Genen in Bakterien exprimiert werden können. Die Produktion der synthetischen Seidenproteine kann entsprechend einfacher und billiger durchgeführt werden, als die oben beschriebene Expression der authentischen Genfragmente.

Auf diese Weise wurden bisher in mehreren Laboren "synthetische Seidenproteine" erhalten (Winkler & Kaplan, 2000). Alle Klonierungsstrategien teilten ein gemeinsames Grundprinzip: synthetische Oligonukleotide wurden mit molekularbiologischen Techniken aneinandergereiht und bildeten damit ein repetitives synthetisches Gen. Die Unterschiede lagen dagegen in der Komplexität des fertigen Gens und der Möglichkeit, verschiedene Module unterschiedlich miteinander zu verknüpfen. Ein sehr einfaches Konstruktionsprinzip wurde in der Gruppe von Fukushima verwendet. Kopien eines Oligonukleotidmoduls wurden durch unkontrollierte Oligomerisierung miteinander verknüpft. Dabei entstanden Modulmultimere und entsprechend synthetische Gene unterschiedlicher Länge (Fukushima, 1998). Im Gegensatz dazu entwickelte die Gruppe von Conrad eine komplexe Klonierungsstrategie mit 18 unterschiedlichen Oligonukleotiden. Damit konnte ein Gen synthetisiert werden, das für ein Protein kodierte, das dem natürlichen Vorbild auf Primärsequenzebene stark ähnelte. Allerdings war dieses System streng auf die Konstruktion dieses einen Gens ausgerichtet und ermöglichte kaum Variationen. Am häufigsten wurden synthetische Gene durch die sukzessive Verdopplung von Modulen konstruiert (Prince *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996; Fahnestock & Irwin, 1997). Dabei kann sowohl die Größe des synthetischen Gens als auch die Abfolge verschiedener Module kontrolliert werden. Die Verknüpfung zweier Module erfolgt dabei über von Restriktionsenzymen generierte, komplementäre Einzelstrang DNA-Überhänge (siehe auch 3.1.2). Die genannten Strategien unterscheiden sich unter anderem in der Auswahl der Restriktionsenzyme, die für die Modulmultimerisierung verwendet werden. Von einer Arbeitsgruppe wurden die Erkennungssequenzen für diese Enzyme an die entworfene Modulsequenz angehängt. Dies führte jedoch zur Insertion von Aminosäuren in die Primärsequenz der seidenähnlichen Proteine, die in der natürlichen Seide nicht vorkommen (Prince *et al.*, 1995). Andere Arbeitsgruppen wählten Enzyme aus, deren Erkennungssequenzen so in das synthetische Gen integriert werden konnten, dass die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins keine "fremden" Aminosäuren enthielt (Lewis *et al.*, 1996; Fahnestock & Irwin, 1997). Bei diesen Strategien war die Gestaltungsmöglichkeit der Module durch die Auswahl der Restriktionsschnittstellen eingegrenzt.

Alle beschriebenen Klonierungsstrategien hatten die Proteine MaSp1 und MaSp2 aus *Nephila clavipes* zum Vorbild. Dabei wurden ausschließlich repetitive Sequenzen

konstruiert - die Integration der nichtrepetitiven Sequenzen in die synthetischen Konstrukte wurde bisher nicht unternommen. Verschiedene Zielsetzungen, die die Gruppen verfolgten, führten zu Unterschieden zwischen den finalen Ausführungen der synthetischen Proteine. Einige versuchten mit ihrem Proteindesign möglichst nah an die natürlichen Proteine heranzukommen (Fahnestock & Irwin, 1997; Scheller *et al.*, 2001). Dagegen verwendeten andere Gruppen ihre Klonierungssysteme, um spezielle Fragestellungen zu untersuchen. Zum Beispiel wurden Proteine generiert, die lediglich glycinreiche Sequenzen ohne Polyalanin-Motive enthielten. Damit konnte gezeigt werden, dass auch diese Regionen unter bestimmten Umständen  $\beta$ -Faltblätter ausbilden können (Fukushima, 1998). In andere synthetische Proteine wurde versucht Trigger einzubauen, mit denen die Assemblierung der Proteine gesteuert werden sollte. Die Idee dabei war, neben die Polyalanin-Motive Aminosäuresequenzen einzufügen, die reversibel mit großvolumigen Resten modifiziert werden konnten. In diesem Zustand sollte die Modifikation eine Assemblierung der Polyalanin-Kristalle durch sterische Effekte verhindern und das Protein so in seiner löslichen Form stabilisiert werden. Durch Entfernen der Modifikation sollte das Protein dann in einen assemblierungsfähigen Zustand überführt werden. Tatsächlich wurde durch die Phosphorylierung eingebauter Serine bzw. durch Oxidation des Schwefels von integrierten Methioninen zum Sulfoxid die Tendenz der Proteine zur Bildung von  $\beta$ -Faltblättern vermindert und gleichzeitig die Löslichkeit verbessert (Winkler *et al.*, 1999; Szela *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2000). Eine gezielte Steuerung der Proteinassemblierung durch diese Mechanismen konnte jedoch nicht erreicht werden.

Die mit dem Design der synthetischen Seidenproteine verknüpften Hoffnungen, schnell große Mengen rekombinanten Proteins zu gewinnen und damit Materialien zu produzieren, die ähnliche außergewöhnliche Eigenschaften wie natürliche Spinnenseide aufweisen, wurden nicht erfüllt. Obwohl die Proteinausbeute bei der bakteriellen Expression der synthetischen Gene verglichen mit der Expression authentischer Gene von 4 mg/l auf 5 - 45 mg/l verbessert werden konnte (Winkler & Kaplan, 2000), ist sie für eine wirtschaftliche Großproduktion wahrscheinlich zu gering. Fäden, die aus synthetischen Seidenproteinen gesponnen wurden, zeigten zudem nur minderwertige mechanische Eigenschaften (Arcidiacono *et al.*, 2002).

## 1.6 Artificielle Spinnversuche

Neben der rekombinanten Herstellung der Seidenproteine ist das Verspinnen dieser Proteine zu einem Faden, der die erwünschten Eigenschaften aufweist, ein weiterer kritischer Schritt bei der Produktion künstlicher Spinnenseide. Wie beim natürlichen Spinnprozess müssen bei künstlichen Spinnversuchen die Seidenproteine von einer löslichen Form in eine unlösliche fibrilläre Form überführt werden, deren Struktur dem authentischen Faden möglichst gleich kommen soll. Die Arbeitsgruppe von Jelinski entwickelte dazu einen Mikrospinnapparat, der die Verspinnung weniger Milligramm Seidenprotein zu mehreren Meter langen Seidenfäden erlaubte (Liivak *et al.*, 1998). Als Ausgangsmaterial wurde in Hexafluoroisopropanol gelöste Seide der Spinne *Nephila clavipes* verwendet. Das so gelöste Protein wurde durch eine Spinndüse in ein Fällungsbad aus Aceton gespritzt. So erhaltene Fäden waren jedoch sehr spröde und wiesen kaum strukturelle Ähnlichkeit mit natürlichen Seidenfäden auf (Seidel *et al.*, 1998; Seidel *et al.*, 2000). Erst durch Behandlung mit Wasser und durch nachträgliches Ziehen des Fadens (*post spin draw*) konnten sowohl mechanische als auch strukturelle Parameter verbessert werden. Die Eigenschaften der natürlichen Seide wurden allerdings nicht erreicht (Seidel *et al.*, 2000). Eine andere Gruppe entwickelte eine Spinnmethode, in der ein Methanol / Wasser Gemisch als Fällungsbad zum Einsatz kam. Damit konnten ein synthetisches Seidenprotein und rekombinantes MaSp1 der Spinne *Nephila clavipes* aus einer harnstoffhaltigen Lösung heraus zu Fäden versponnen werden. Diese waren jedoch ebenfalls spröde (Arcidiacono *et al.*, 2002). Mit der gleichen Methode konnte rekombinantes, ohne chaotrope Reagenzien gelöstes, ADF-3 zu Fäden versponnen werden. Auch in diesem Fall konnten die Eigenschaften des Fadens durch *post spin draw* verbessert werden (Lazaris *et al.*, 2002). Obwohl die Bedingungen während dieses Spinnprozesses durch die Verwendung wässriger Lösungen sowohl für die Spinnlösung als auch dem Fällungsbad näher an authentischen Bedingungen lagen, wurde die Zugfestigkeit natürlicher Fäden nicht erreicht. Allerdings bleibt hier die Frage offen, ob die mangelnde Zugfestigkeit durch den Spinnprozess bedingt war, oder ob die Verwendung nur einer Spinnenseidenkomponente (ADF-3) eventuell nicht ausreicht, um die stabile Struktur des natürlichen Fadens zu erhalten.

## 1.7 Fragestellung

Um aus rekombinanten Seidenproteinen neuartige Materialien mit definierten Eigenschaften generieren zu können, muss der gesamte Prozess der Seidenassemblierung vom löslichen Protein bis hin zur finalen Fadenstruktur detailliert verstanden werden. Inzwischen ist einiges über die Struktur von Spinnenseide und die Bedingungen, die zur Assemblierung der Spinnenseide führen, bekannt. Dagegen fehlen immer noch wesentliche Informationen über die molekularen Mechanismen des Assemblierungsvorgangs.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung unterschiedlicher Seidenproteine und Seidenproteinvarianten, die eine systematische Untersuchung einzelner Komponenten erlaubte. Um natürlichen Proteinsequenzen untersuchen zu können, sollte zunächst ein geeignetes Expressionssystem für authentische Seidengenfragmente gefunden werden. Zusätzlich sollte eine Klonierungsstrategie entwickelt werden, um verschiedene Seidengenvarianten zu generieren, die in *E.coli* exprimiert werden können. Anschließend sollte ein Reinigungsprotokoll für die Seidenproteine entwickelt werden. Sowohl die Expression als auch die Reinigung der synthetischen Proteine sollte dabei in Hinblick auf eine mögliche industrielle Verwertung möglichst effizient und ökonomisch gestaltet werden.

Durch die Charakterisierung des löslichen Zustandes der unterschiedlichen Proteinvarianten sollten Erkenntnisse über den Einfluss einzelner Sequenzen auf die strukturelle Organisation der Proteine gewonnen werden. Des Weiteren sollten Interaktionen zwischen den Seidenproteinen untersucht und die daran beteiligten Proteinelemente identifiziert werden. Die Kontrolle der Löslichkeit der Seidenproteine ist einer der Schlüsselprozesse während der Seidenassemblierung. Deshalb sollte die Löslichkeit der verschiedenen Proteinvarianten eingehend untersucht werden. Dies sollte Aufschluss darüber geben, welche Proteinsequenzen die Löslichkeit der Proteine bestimmen. In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss von Faktoren auf die Löslichkeit der Seidenproteine untersucht werden, die bei der natürlichen Seidenassemblierung eine Rolle spielen. Schließlich sollte die Untersuchung der Assemblierungseigenschaften der Seidenproteine weitere Informationen über den Entstehungsprozess der stabilen Seidenfadenstruktur liefern.

Bisher wurde dem in den meisten Spinnenarten vorhandenen unterschiedlichen Prolingehalt der beiden MAS-Proteinkomponenten eine große Bedeutung bei der Seidenassemblierung und Fadenstruktur zugemessen. Durch die Untersuchung des

*Araneus diadematus* MAS-Systems, das zwei prolinreiche Komponenten für die Fadenproduktion verwendet, sollten Erkenntnisse gewonnen werden, die ein artübergreifendes Verständnis der grundlegenden Vorgänge beim Spinnprozess erweitern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol, zur Synthese	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz, >99%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Agar	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chelating Sepharose fast flow	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
D(+)-Glucose-Monohydrat, f. biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), >98%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), electrophoresis grade	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Formaldehyd 37%, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin, 99%	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Guanidiniumhydrochlorid, >99%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Guanidiniumthiocyanat, zur Synthese	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff, f. biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt, f. die Biotechnologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Imidazol, p.a.	Fluka, Buchs, Schweiz
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Isopropylthiogalactosid (IPTG), >99%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS), >85%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Serva Blue R	Serva, Heidelberg, Deutschland
SP Sepharose fast flow	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA

Superdex 200	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian (oxidiertes DTT)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrat (Rubpy)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (TCEP-HCl)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20, molecular biology grade	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol, f. die Elektrophorese	Serva, Heidelberg, Deutschland

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

### 2.1.2 Größenstandards und Kits

DNA Längenstandard 1 kb Leiter	Peqlab, Erlangen, Deutschland
DNA Längenstandard 100 bp Leiter	Peqlab, Erlangen, Deutschland
DNA Längenstandard $\lambda$ /BstE II	New England Biolabs, Beverly, USA
ECL <sub>plus</sub> western blot detection kit	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Low-Range-Molekulargewichtstandard (LMW)	BioRad, München, Deutschland
Multimark Multi-Colored Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Precision Protein Standard Broad Range	BioRad, Hercules, CA, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rainbow coloured protein molecular weight markers	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA

### 2.1.3 Proteine und Antikörper

$\alpha$ Maus-IgG monoklonales IgG-POD Konjugat	Sigma, St. Louis, USA
$\alpha$ -His <sub>6</sub> monoklonaler Antikörper (Maus)	Sigma, St. Louis, USA
$\alpha$ -T7-Tag monoklonaler Antikörper (Maus)	Novagen, Madison, WI, USA
Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche, Mannheim, Deutschland
DNaseI	Roche, Mannheim, Deutschland
Lysozym (chicken egg white)	Sigma, St. Louis, USA
Mung Bean Nuclease	New England Biolabs, Beverly, USA

Pwo-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, USA
S-Protein-POD-Konjugat	Novagen, Madison, WI, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, USA

#### 2.1.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
A1	TCCGTACGGCCCAGGTGCTAGCGCCGCAGCGGCAGCGGCTGGTGGCTACGGTCCG GGCTCTGGCCAGCAGGG
A2	CTGCTGGCCAGAGCCCCGACCGTAGCCACCAGCCGCTGCCGCTGCGGCGCTAGCA CCTGGGCCGTACGGACC
AZL-fwd	TTCACACCGCAGACCAGC
AZL-rev	CTACAAATGTGGTATGGCTG
C1	TTCTAGCGCGGCTGCAGCCGCGGCAGCTGCGTCCGGCCCCGGTGGCTACGGTCCG GAAAACCAGGGTCCATCTGGCCCCGGTGGCTACGGTCTGGCGGTCCGGG
C2	CGGACCGCCAGGACCGTAGCCACCCGGGCCAGATGGACCCTGGTTTTCCGGACCG TAGCCACCCGGGCCGGACGCAGCTGCCGCGGCTGCAGCCGCGCTAGAACC
CC1	GATCGAGGAGGATCCATGGGACGAATTCACGGCTAATGAAAGCTTACTGCAC
CC2	AGCTGTGCAGTAAGCTTTCATTAGCCGTGAATTCGTCCCATGGATCCTCCTC
NR3f	GAAAAACCATGGGTGCGGCTTCTGCAGCTG TATCTG
NR3r	GAAAAGAAGCTTTCATTAGCCAGCAAGGGCTTGAGCTACAGATTG
NR4f	GAAAAACCATGGGAGCATATGGCCCATCTCCTTC
NR4r	GAAAAGAAGCTTTCATTAGCCTGAAAGAGCTTGGCTAATCATTG
Q1	TCCGGGCCAGCAGGGCCCCGGTCAACAGGGTCCTGGCCAGCAAGGTCCGGGCCA GCAGGG
Q2	CTGCTGGCCCCGACCTTGCTGGCCAGGACCCTGTTGACCCGGGCCCTGCTGGCCC GGACC
S-fwd	CTAGCCCCGGGATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGA CAGCGGTCCG
S-rev	GATCCCGACCGCTGTCCATGTGCTGGCGTTCGAATTTAGCAGCAGCGGTTTCTTTC ATCCCGGG

Die Synthese der Oligonukleotide wurde bei der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) in Auftrag gegeben.



### 2.1.5 Plasmide

pBluescriptSK(+)-ADF3	J.Gosline, Vancouver, BC, Canada
pBluescriptSK(+)-ADF4	J.Gosline, Vancouver, BC, Canada
pET21a	Novagen, Madison, WI, USA
pET21b	Novagen, Madison, WI, USA
pET30-NC1S	S.Winkler, Medford MA, USA
pFasBacDual	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pFastBac1	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pFastBacHTa	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.6 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Firma
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK λ- rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>E. coli</i> BLR (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>recA</i> <sup>-</sup>	Novagen, Madison, WI, USA
<i>E. coli</i> Rosetta-Blue <sup>TM</sup> (DE3)pLacI	<i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>K12</sub> <sup>-</sup> m <sub>K12</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac</i> [F <sup>'</sup> <i>proA+B+ lacI<sup>q</sup>Z</i> Δ M15::Tn10(tet <sup>R</sup> )] (DE3) pLacIRARE (Cm <sup>R</sup> )	Novagen, Madison, WI, USA

*E. coli* DH10B kam als Klonierungsstamm zur Vervielfältigung der eingesetzten Plasmide zum Einsatz; *E. coli* BLR (DE3) und *E. coli* Rosetta-Blue<sup>TM</sup>(DE3)pLacI] wurden zur Expression von rekombinanten Proteinen unter dem T7- Promotorsystem verwendet.

### 2.1.7 Sonstige Materialien

Glimmer	Veeco Instruments Inc., Woodbury NY, USA
Immobilon-P (PVDF) Membran	Millipore, Bedford, USA
Kupfer Grids Square 300 Mesh	Plano W Planet GmbH Wetzlar, Deutschland
Leitsilber	Plano W Planet GmbH Wetzlar, Deutschland
Membran (regenerierte Cellulose, MWCO 5 kDa)	Microdyn-Nadir GmbH, Wuppertal, Deutschland
Novex Tricine Gel 10% - 20%	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Novex Tris-Glycine Gel 4% - 12%	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Omega Membran (Polyethersulfon, MWCO 5 kDa)	Pall Life Science, East Hills, NY, USA

Quarzglas Suprasil Küvetten (unterschiedliche Ausführungen)	Hellma, Müllheim, Deutschland
Spectrapore Dialysemembran 1 (MWCO 6-8 kDa)	Spectrum Laboratories Inc. Rancho Dominguez, CA, USA
Spectrapore Dialysemembran 3 (MWCO 3,5 kDa)	Spectrum Laboratories Inc. Rancho Dominguez, CA, USA
Spectrapore Float-A-Lyzer (MWCO 300 kDa)	Spectrum Laboratories Inc. Rancho Dominguez, CA, USA
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thermanox® plastic cover slips	Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA
Vivaspin 20 (Polyethersulfon, MWCO 10 kDa)	Vivascience AG, Hannover, Deutschland
Vivaspin 500 ((Polyethersulfon, MWCO 10 kDa)	Vivascience AG, Hannover, Deutschland
X-Omat AR Film	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA

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

### 2.1.8 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Firma</b>
Absorptionsspektrophotometer	Cary 50 Bio	Varian, Darmstadt, Deutschland
Analysenwaage	BP 121 S	Satorius, Göttingen, Deutschland
Blottingapparatur	Fast Blot B34	Biometra, Göttingen, Deutschland
Brechungsindexdetektor	RI-71	Shodex, Tokyo, Japan
Chromatographieanlage	ÄktaFPLC UPC900 + P920	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Circulardichroismus-Spektropolarimeter	Jasco J-715 mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit	Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japan
Feldflußfraktionierung	Eclipse F	Waytt Technology, Santa Barbara, CA, USA
Fermenter	Biostat C	B.Braun Biotech Inc. Allentown, PA, USA
Filmentwickler	Optimax Typ MR	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenz-Spektrophotometer	Spex FluoroMax-3	Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA
<i>French Press</i>	GAULIN-Labor-Homogenisator	APV Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland
Geldokumentationssystem	BiodocII	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur (für Agarosegele)	HU10	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur (für SDS-PAGE)	Hoefer SE250 Mighty Small II	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Halbmikrowaage	BL 310	Satorius, Göttingen, Deutschland

HPLC-Pumpensystem mit Pumpe, Entgaser, UV-Detektor, Probengeber, Temperiereinheit	Series 1100	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Kühlzentrifuge	Avanti J-25 Rotoren: JA10 + JA25.50	Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA
Lichtmikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Lichtstreuendetektor	DawnEOS	Waytt Technology, Santa Barbara, CA, USA
Lyophilie	Unikat	Med. Techn. Laborgeräte, J.H. Schrader, Friedland, Deutschland
pH-Meter	pH 538	WTW Weilheim Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	JSM-5900LV	Jeol Ltd., Tokyo, Japan
Rasterkraftmikroskop	Multimode SPM	Veeco Instruments Inc., Woodbury NY, USA
Thermocycler	Primus	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop	100 CX	Jeol Ltd., Tokyo, Japan
Ultraschallgenerator	HD/UW2200 Sonde KE76	Bandelin, Berlin, Germany
Ultrazentrifuge	Optima MAX-E Rotor: TLA-45	Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA

## 2.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

### 2.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*

Ausstrichkulturen von *E. coli* auf Agarplatten wurden für 16 Stunden bei 37°C inkubiert und zur Lagerung im Kühlschrank unter Luftabschluss aufbewahrt. Die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen in LB-Medium erfolgte wahlweise unter Zugabe von Ampicillin. Einzelkolonien wurden zur Überimpfung von 4 ml Kulturen verwendet. Größere Volumina wurden mit entsprechenden Vorkulturen überimpft. Die Bakterien aus den entsprechenden Vorkulturen wurden vor der Überimpfung 5 min bei 4°C und 5000 × g sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert um in das Medium sezernierte β-Lactamase zu entfernen und dem vorzeitigen Abbau des Ampicillins vorzubeugen. Volumina bis zu 4 ml wurden im Reagenzglasroller inkubiert, Kulturen über 10 ml im Umluftschüttelinkubator. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei 600 nm beobachtet. Dabei entspricht eine OD<sub>600</sub> von eins etwa 2,5 × 10<sup>8</sup> Zellen/ml (Sambrook & Russell, 2001).

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 300 µl 50%-igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

LB <sub>0</sub> Medium	10 g/l Bacto Trypton
	5 g/l Yeast Extract
	5 g/l NaCl
	einstellen auf pH 7,2 1 M NaOH
	15 g/l Bacto Agar (für Platten)
Antibiotika	100 µg/ml Ampicillin

### 2.2.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden die zu transformierenden Stämme nach Sambrook & Russell (2001) kompetent gemacht. Dazu wurde eine frische 100 ml *E. coli*-Flüssigkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.5-1.0 mit 2 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> versetzt und 10 min weiter bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 60 min auf Eis gekühlt, 5 min bei 4°C und 5000 × g abzentrifugiert, das Sediment in 20 ml Lösung A resuspendiert und weitere 60 min auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4°C wurde das Sediment in 2 ml Lösung A - Glycerin aufgenommen und die Zellen in Aliquots zu je 200 µl aliquotiert. Diese Aliquots wurden entweder direkt mit Plasmid-DNA transformiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden je 200 µl kompetente Zellen mit maximal 10 % (v/v) der zu transformierenden DNA vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend einem einminütigen Hitzeschritt bei 42°C unterzogen, wieder auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 500 µl LB<sub>0</sub> 40 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden ca. 100 µl der Bakteriensuspension auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und diese bei 37°C ü.N. bebrütet.

Lösung A:	13 ml 3 M NaAc pH 5.5
	100 ml 1 M CaCl <sub>2</sub>
	25 ml 2.8 M MnCl <sub>2</sub>
	862 ml H <sub>2</sub> O
	sterilfiltriert

Lösung A - Glycerin:	69 ml Glycerin (87%)
	331 ml Lösung A

### 2.2.3 Präparation, Reinigung und Sequenzierung von DNA

Für die Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurden folgende Kits den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Plasmidpräparation aus E.coli	<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i>
DNA-Isolierung aus Agarosegelen	<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>
Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten	<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>

Molekularbiologisch veränderte Vektoren wurden vor ihrer Weiterverwendung sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland). Soweit im Folgenden nicht anders beschrieben, wurden die Standardprimer der Firma verwendet.

### 2.2.4 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Proben wurden diese in Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wurde die in 1 × TAE-Puffer gelöste Agarose aufgekocht; nach Abkühlung unter 60°C wurden 0.4 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, und die Lösung zum Polymerisieren in die Laufapparatur gegossen. Nach Auftrag der DNA-Lösung in 1 × Laufpuffer wurde für 30 min eine Spannung von 110 V angelegt. Das System BioDocII wurde zur Dokumentation der Auftrennung verwendet. Als Längenstandard diente mit *BstEII* geschnittene λ-DNA, die 100bp oder 1kb DNA-Leiter.

TAE (50×):	2 M Tris/Acetat pH 8.0 50 mM EDTA pH 8.0
Gelauftragspuffer (10×):	50% (v/v) Glycerin 10 mM EDTA pH 8.0 0.2% (w/v) Bromphenolblau 0.2% (w/v) Xylencyanol
Ethidiumbromid-Lsg:	0.04% (w/v) Ethidiumbromid

### 2.2.5 PCR-Amplifikation

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) von Mullis & Faloona (1987) wurden in dieser Arbeit gezielt DNA-Bereiche aus cDNAs amplifiziert. Diese wurden in der Folge für die Klonierung in verschiedene Plasmide verwendet. Um die Fehlerrate bei der PCR zu minimieren, wurden Polymerasen mit 3'-5' Exonukleaseaktivität (*proof reading*-Aktivität) verwendet. Als amplifizierendes Enzym wurde in dieser Arbeit die Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* verwendet. Die Reaktion fand in Zyklen von (I) DNA-Denaturierung, (II) Primer-Anlagerung und (III) DNA-Synthese statt und wurde 35-mal wiederholt. Zum Abschluss wurden eventuell unvollständige Amplifikate in einer verlängerten Synthesephase komplettiert.

Standardreaktionsansatz (100 µl)	1 µl <i>forward</i> -Primer (100 pmol/µl)
	1 µl <i>reverse</i> -Primer (100 pmol/µl)
	1 µl <i>Template</i> DNA (20ng/µl)
	2 µl dNTP-Mix ( je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	10 µl 10 × Reaktionspuffer (mit 2 mM MgCl <sub>2</sub> )
	0.5 µl <i>Pwo</i> -Polymerase (2.5 U)
	84.5 µl H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Temperaturprogramm	5 min 95°C initiale Denaturierung
	45 s 95°C I Denaturierung
	45 s 55°C – 62°C II Primer-Anlagerung
	45 s – 2 min 72°C III DNA-Synthese
	35 × Wiederholung der Schritte I - III
	10 min 72°C verlängerte Extension
	∞ 4°C Lagerung

### 2.2.6 Enzymatische Modifikation von DNA

Enzymatische Modifikationen von DNA wurden den Herstellerangaben entsprechend mit folgenden Enzymen durchgeführt.

DNA-Spaltung an spezifischen Sequenzen	Restriktionsendonukleasen
Verdau von Einzelstrang DNA-Überhängen	<i>mung bean nuclease</i>

Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
Ligation von DNA-Enden	T4-DNA-Ligase

Die Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren wurde zur Vermeidung der Selbstligation standardmäßig durchgeführt. Angaben über die Verwendung weiterer Modifikationen sind in den Beschreibungen der einzelnen Klonierungen zu finden (siehe 2.2.8 und 2.2.9).

### 2.2.7 Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden

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

### 2.2.8 Klonierung authentischer Seidengene

Für die Expression authentischer Fragmente von *adf-3* und *adf-4* in *E.coli* und Insektenzellen wurden die folgenden Plasmide konstruiert:

pET21-ADF3	pET21b: <i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i> ; pBS-ADF3: <i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>
pET21-ADF4	pET21a: <i>BamHI</i> , MBN; <i>XhoI</i> ; pBS-ADF4: <i>EcoRI</i> , MBN; <i>XhoI</i>
pET21-ADF3(S-Tag)	pET21-ADF3: <i>NheI</i> , <i>BamHI</i> ; S-Tag: Hybridisierung der Oligonukleotide Sfd + Srev
pFB1-ADF3	pFB1: <i>BamHI</i> , <i>XhoI</i> ; pET21-ADF3: <i>BglII</i> , <i>XhoI</i>
pFB1-ADF4	pFB1: <i>BamHI</i> , <i>XhoI</i> ; pET21-ADF4: <i>BglII</i> , <i>XhoI</i>
pFBHTa-ADF3	pFBHTa: <i>BamHI</i> , <i>XhoI</i> ; pBS-ADF3: <i>BamHI</i> , <i>XhoI</i>
pFBHTa-ADF4	pFBHTa: <i>BamHI</i> , <i>XhoI</i> ; pBS-ADF4: <i>SpeI</i> , <i>XhoI</i>
pFBDual-ADF4	pFBDual: <i>BamHI</i> , <i>Sall</i> ; pET21-ADF4: <i>BglII</i> , <i>XhoI</i>
pFBDual-ADF3/ADF4	pFBDual-ADF4: <i>XmaI</i> , <i>XhoI</i> ; pET21-ADF4: <i>XmaI</i> , <i>XhoI</i>

Das Klonierungsschema gibt den Zielvektor und den inserttragenden Donorvektor an, die jeweils in der angegebenen Reihenfolge mit den aufgelisteten Enzymen behandelt wurden. Abkürzungen: BS: BluescriptSK(+); FB: FastBac; MBN: *mung bean nuclease*. Die MBN bewirkt den selektiven Abbau von Einzelstrangüberhängen in 5'→3' und 3'→5' Richtung.

## 2.2.9 Klonierung synthetischer Seidengene

Eine durch Hybridisierung der Oligonukleotide CC1 und CC2 erhaltene Klonierungskassette mit *Bgl*III- bzw. *Hind*III-kompatiblen DNA-Überhängen wurde in einen mit *Bgl*III und *Hind*III geschnittenen Vektor pFastbac1 kloniert. Die Erkennungssequenzen der beiden Restriktionsendonukleasen wurden dabei zerstört. Der resultierende Klonierungsvektor wurde pAZL genannt. Drei von den Sequenzen der MAS-Proteine ADF-3 und ADF-4 abgeleitete Aminosäuremodule wurden unter Berücksichtigung der bakteriellen *codon usage* (Medigue *et al.*, 1991) in DNA-Sequenzen rückübersetzt. Durch Hybridisierung der Oligonukleotide A1 / A2; Q1 / Q2 und C1 / C2 wurden die doppelsträngigen DNA-Module A, Q und C generiert und anschließend in den mit *Bsg*I und *Bse*RI geschnittenen Vektor pAZL eingefügt. Die NR-Regionen von *adf-3* und *adf-4* wurden durch PCR mit den Primerpaaren NR3f / NR3r bzw. NR4f / NR4r amplifiziert und mit *Nco*I und *Hind*III in den Vektor pAZL kloniert. Für die Verknüpfung zweier Genbausteine wie z.B. Module, Modulmultimere oder NR-Regionen wurde der pAZL-Vektor, der den designierten 5'-Baustein enthielt mit *Bsa*I and *Bsg*I geschnitten, während der Vektor mit dem späteren 3'-Baustein entsprechend mit *Bse*RI und *Bsa*I verdaut wurde (Abbildung 3.2). Die Ligation der richtigen Fragmente führte zur Wiederherstellung des Ampicillin-Resistenzgens und vereinfachte damit die Identifizierung der korrekt ligierten Konstrukte. Die synthetischen Seidengene wurden durch die sequentielle Multimerisierung der Module aufgebaut und wahlweise durch die NR-Regionen ergänzt. Die fertigen Gene wurden anschließend mit *Bam*HI and *Hind*III aus dem Vektor pAZL herausgeschnitten und in einen gleichermaßen behandelten Vektor pET21a eingefügt. Den Genen wurde dadurch eine für den T7-Peptidtag (MASMTGGQQMGR) kodierende Sequenz angehängt (Kroll *et al.*, 1993).



Im Rahmen der Gensynthese wurden dabei folgende Plasmide generiert:

pAZL	pAZL-(AQ)	pAZL-Q <sub>2</sub>	pAZL-A <sub>2</sub>
pAZL-A	pAZL-(AQ) <sub>2</sub>	pAZL-(QA)	pAZL-A <sub>4</sub>
pAZL-Q	pAZL--(AQ) <sub>4</sub>	pAZL-(QAQ)	pAZL-A <sub>8</sub>
pAZL-C	pAZL-(AQ) <sub>8</sub>	pAZL-(QAQ) <sub>2</sub>	pAZL-A <sub>16</sub>
pAZL-C <sub>2</sub>	pAZL-(AQ) <sub>12</sub>	pAZL-(QAQ) <sub>4</sub>	pAZL-A <sub>24</sub>
pAZL-C <sub>4</sub>	pAZL-(AQ) <sub>16</sub>	pAZL-(QAQ) <sub>8</sub>	pAZL-A <sub>24</sub> NR3
pET21-C <sub>16</sub>	pAZL-(AQ) <sub>12</sub> (NR3)	pAZL-(QAQ) <sub>8</sub> NR3	pET21-A <sub>24</sub>
pET21-C <sub>16</sub> NR4	pET21-(AQ) <sub>12</sub>	pET21-(QAQ) <sub>8</sub>	pET21-A <sub>24</sub> NR3
pET21-C <sub>16</sub> NR4m	pET21-(AQ) <sub>12</sub> NR3	pET21-(QAQ) <sub>8</sub> NR3	
	pET21-(AQ) <sub>12</sub> NR3m	pET21-(QAQ) <sub>8</sub> NR3m	
pAZL-NR3	pAZL-NR4	pAZL-NR3m	pAZL-NR4m
pET21-NR3	pET21-NR4	pET21-NR3m	pET21-NR4m

Von Christopher Helsen wurden während seiner Bachelorarbeit folgende in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte angefertigt: pAZL-C<sub>8</sub>; pAZL-C<sub>16</sub>; pAZL-C<sub>16</sub>NR4

Von Susanne Quedzuweit wurden folgende in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte angefertigt: pAZL-(AQ)<sub>24</sub>; pAZL-(AQ)<sub>24</sub>NR3m; pAZL-(QAQ)<sub>16</sub>; pAZL-(QAQ)<sub>16</sub>NR3m; pAZL-C<sub>32</sub>; pAZL-C<sub>32</sub>NR4m

## 2.3 Expression und Reinigung

### 2.3.1 Expression authentischer Seidengengfragmente in Insektenzellen

Die Expression der authentischen Seidengene wurde von S. Itah und U. Gat an der Hebrew University in Givat Ram, Israel entsprechend des *BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System Instruction Manual* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Zunächst wurden die partiellen cDNAs *adf-3* und *adf-4* aus den Transfervektoren pFBHTa-ADF3, pFBHTa-ADF4 und pFBDual-ADF3/ADF4 durch Transposition in DH10BAC *E.coli* Zellen in ein doppelsträngiges Baculovirus DNA-Genom integriert (Bacmid). Durch Transfektion der rekombinanten Bacmide in Sf9-Zellen aus dem Heerwurm *Spodoptera frugiperda* wurden infektiöse Baculoviren erhalten. Nach Infektion von Sf9-Zellen mit diesen rekombinanten Viren erfolgte die Proteinsynthese. Die Zellen wurden 3 Tage nach der Infektion geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und in diesem Zustand von der israelischen Arbeitsgruppe für weiterführende Experimente zur Verfügung gestellt.

### 2.3.2 Bestimmung der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen nach Synthese

#### Insektenzellen

Für die Bestimmung der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen nach der Synthese im Cytosol von Insektenzellen wurden  $16 \times 10^7$  Zellen in 4 ml 20 mM Hepes pH 7,5; 100 mM NaCl resuspendiert anschließend durch Ultraschall zerstört ( $3 \times 15$  s bei 20% Leistung mit dem Ultraschallgenerator HD/UW2200; Sonde: KE76). Anschließend wurden lösliche und unlösliche Zellbestandteile durch Sedimentation bei  $100000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 30 min getrennt. Um auch chemisch stabile Aggregate für die Analyse durch SDS-Page zugänglich zu machen, wurden unlösliche Bestandteile in 6 M GdmSCN aufgenommen und gegen 8 M Harnstoff dialysiert. Anschließend wurden die unlösliche und lösliche Fraktion mit  $1 \times$  Auftragspuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

### 2.3.3 Reinigung rekombinanter Seidenproteine aus Insektenzellen

Während die zur Verfügung stehende Menge an ADF-3 produzierenden Zellen nicht für die Entwicklung eines Reinigungsprotokolls ausreichte, konnte aufgrund der besonderen chemischen Stabilität und homogenen Zusammensetzung der in ADF-4 produzierenden Zellen entstehenden Aggregate (siehe 3.1.1 und 3.2.8) eine einfache Reinigungsstrategie entwickelt werden. Dazu wurden  $5 \times 10^7$  Zellen in 5 ml 2 % SDS bei 95°C für 5 min lysiert. Nach Zugabe von 5 ml  $H_2O_{\text{bidest}}$  wurden unlösliches ADF-4 für 10 min bei  $15000 \times g$  sedimentiert, mit 3 ml 8 M Harnstoff und 3 ml  $H_2O_{\text{bidest}}$  gewaschen.

### 2.3.4 Kinetik der Expression in *E.coli*

Eine Expressionskinetik kann wichtige Hinweise zur Optimierung der Kulturbedingungen für größere Produktionsansätze liefern. Hierzu wurden 200 ml LB (siehe 2.2.1), mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einer in stationärer Phase befindlicher ü.N.-Kultur auf eine optische Dichte  $OD_{600}$  von ca. 0.05 eingestellt und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Als weiterer Parameter wurde der Zeitpunkt der IPTG Zugabe variiert. Anschließend wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben genommen und die  $OD_{600}$  bestimmt. Zur Analyse mittels SDS-PAGE wurde das Pellet von 1 ml Bakterienkultur mit 160  $\mu$ l  $1 \times$  Auftragspuffer (siehe 2.4.1) je 1  $OD_{600}$  aufgenommen.

### 2.3.5 Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter Proteinen nach Synthese in *E.coli*

Für die Bestimmung der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen nach der Synthese im Cytosol von *E.coli* wurden die Zellen einer 100 ml Kultur geerntet, in 10 ml 20 mM HEPES pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,2 mg/ml Lysozym resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend durch Ultraschall zerstört ( $5 \times 20$  s bei 20% Leistung mit dem Ultraschall-generator HD/UW2200; Sonde: KE76). Anschließend wurden lösliche und unlösliche Zellbestandteile durch Sedimentation bei  $50000 \times g$  und 4°C für 30 min getrennt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

### 2.3.6 Anzucht, Induktion und Ernte der Bakterien

Nachdem mit Hilfe der Expressionsanalyse optimale Bedingungen zur Produktion von rekombinantem Protein gefunden wurden, wurde die Großanzucht mit 4 - 8 l LB-Medium (siehe 2.2.1) in Schüttelkolben (2 l pro Kolben) durchgeführt. LB-Medien mit den entsprechenden Antibiotika wurden mit ü.N.-Kulturen angeimpft. Die Kulturen wuchsen bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0.5. Dann wurde die Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert, und die Kulturen je nach synthetisiertem Protein für 4 - 16 h bei 25°C - 30°C inkubiert (siehe Tabelle 2.1). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 × g, 10 min, 4°C) geerntet.

Für die Fermentation der Bakterien wurden 6 - 8 l Vollmedium mit entsprechenden Antibiotika mit 200 ml einer ü.N.-Kultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Der pH Wert des Mediums wurde durch Zugabe von 10 % KOH (w/v) bzw. 10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (w/v) auf einem konstanten Wert von pH 7,2, der Sauerstoffgehalt bei einer Sättigung von 20 - 40 % gehalten. Nach der vollständigen Metabolisierung der Glucose wurde dem Medium ca. 2,5 ml/min *Feeding* Lösung zugegeben. Beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 40 - 50 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für 4 h bei 25°C- 30°C inkubiert (siehe Tabelle 2.1). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 × g, 10 min, 4°C) geerntet.

Vollmedium:

50 g/l	Yeast Extract
5 g/l	Glucose
11 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×3H <sub>2</sub> O
0,5 g/l	NH <sub>4</sub> Cl
0,68 g/l	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O

*Feeding* Lösung:

30 % w/v	Yeast Extract
25 % v/v	Glycerin

### 2.3.7 Reinigung der von *Araneus diadematus* abgeleiteten Konstrukte und NR-Domänen

Um die in den Bakterien löslich hergestellten Proteine nachfolgenden Reinigungsschritten zugänglich zu machen, mussten diese aus der Zelle heraus- und von anderen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Dazu wurden die geernteten Bakterien mit 5 ml/g 20 mM

Hepes pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,2 mg/ml Lysozym resuspendiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Scherkräfte zerstört. Dies erfolgte bei kleinen Volumina ( $< 50$  ml) mittels Ultraschall ( $5 \times 20$  s bei 60% Leistung mit dem Ultraschallgenerator HD/UW2200 / Tellersonde) bei größeren Volumina mittels einer French Press (GAULIN-Labor-Homogenisator; 600 bar, 3 Durchläufe). Durch die Zugabe von 3 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,1 mg/ml DNase I und Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 60 min wurde genomische DNA in der Lösung verdaut. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei  $50,000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 min aus der Lösung entfernt. Lösliche *E. coli* Proteine wurden durch Hitzedenaturierung für 20 min ausgefällt (Temperatur siehe Tabelle 2.1.). Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei  $50,000 \times g$  für 30 min aus der Lösung entfernt. Die Seidenproteine, die während der Hitzefällung löslich blieben, wurden mit Ammoniumsulfat aus der Lösung gefällt (Ammoniumsulfatkonzentrationen siehe Tabelle 2.1) und durch Zentrifugation bei  $10,000 \times g$  für 10 min geerntet. Die Proteinpellets wurden gewaschen und in denaturierenden Agenzien wieder gelöst (Waschlösungen und Lösungsmittel siehe Tabelle 2.1) Alle Proteine wurden gegen 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  dialysiert. Protein, das während der Dialyse präzipitierte, wurde durch Sedimentation bei  $50000 \times g$  für 30 min entfernt. Die verbleibenden löslichen Seidenproteine wurden aliquotiert und lyophilisiert.

	NC1S	(QAQ) <sub>8</sub> (QAQ) <sub>8</sub> NR3 (QAQ) <sub>16</sub> NR3	(AQ) <sub>12</sub> (AQ) <sub>12</sub> NR3 (AQ) <sub>24</sub> NR3	C <sub>16</sub> C <sub>16</sub> NR4 C <sub>32</sub> NR4	NR3 NR4
Expressionstemperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	25	30	30	25	25
Expressionsdauer [h]	3	4	4	4	16
Temperatur der Hitzedenaturierung [ $^{\circ}\text{C}$ ]	-	80	80	80	70
Ammoniumsulfatkonzentration [%]	-	20	20	20	30
Waschlösung	-	20 % AS	20 % AS	8 M HST	30 % AS
Lösungsmittel für AS-Präzipitat bzw. Lyophilisat	-	6 M GdmHCl	6 M GdmHCl	6 M GdmSCN	6 M GdmHCl

**Tabelle 2.1 Parameter für Expression und Reinigung synthetischer Spinnenseidenproteine.**  
AS = Ammoniumsulfat; HST = Harnstoff; GdmHCl = Guanidiniumhydrochlorid

### 2.3.8 Chromatographische Reinigung von NC1S

Aufgrund der starken Tendenz des Seidenproteins NC1S zu aggregieren und mit unterschiedlichen Säulenmaterialien zu interagieren, wurden alle chromatographischen Trennschritte in Anwesenheit von 8 M Harnstoff ausgeführt. Der Reinigungserfolg wurde nach jedem Schritt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kontrolliert.

Die geernteten Zellen wurden mit 5 ml Puffer SPA pro Gramm Zellmasse aufgenommen und durch Ultraschall ( $5 \times 20$  s bei 60% Leistung mit dem Ultraschall-generator HD/UW2200 / Tellersonde) zerstört. Nach Sedimentierung der unlöslichen Zellbestandteile bei  $50,000 \times g$  für 30 min, konnte das Zellysate für nachfolgende Reinigungsschritte verwendet werden. Unter neutralen pH-Bedingungen ist das Protein NC1S, das einen pI von 10.2 aufweist, negativ geladen. Als erster Reinigungsschritt wurde deshalb eine Anionenaustauschchromatographie verwendet. Das Zellysate wurde auf eine in Puffer SPA äquilibrierte SP-Sepharose Säule aufgetragen, mit Puffer SPA gewaschen und mit einem Gradienten von 0 - 35 % Puffer SPB eluiert. Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Das Protein NC1S enthält einen His<sub>6</sub>-Tag und kann über dessen Affinität zu Nickel an Säulenmaterial gebunden werden, das über eine Nitrilotriacetatgruppe (NTA) komplexierte Nickelionen gebunden hat. Die gepoolten Fraktionen aus dem ersten Reinigungsschritt wurden entsprechend auf eine Ni-NTA Säule (Chelating Sepharose) aufgetragen, die zuvor mit Puffer NA äquilibriert worden war. Die Säulenmatrix wurde mit Puffer NA gewaschen und das Protein mit einem linearen Gradienten von 0 - 50% Puffer NB eluiert, wobei steigende Imidazolkonzentrationen mit dem His<sub>6</sub>-Tag um die Ni-Bindestellen konkurrieren und das Protein so von der Säule verdrängen. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration mit einer 10000 MWCO PES-Membran (Vivaspin 20) aufkonzentriert und auf eine Superdex 200 Prep Grade Gelfiltrationssäule aufgetragen. Als Laufpuffer wurde Puffer GFB verwendet. Dabei wurden die noch in der Probe enthaltenen Proteine ihrem Hydrodynamischen Radius entsprechend aufgetrennt. Die gereinigten Proteinfractionen wurden vereinigt, gegen 20 mM Ammoniumacetat dialysiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, lyophilisiert und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Puffer SPA	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,8
	20 mM KCl
	8 M Harnstoff

Puffer SPB	10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6,8 1 M KCl 8 M Harnstoff
Puffer NA	20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6,8 20 mM Imidazol 8 M Harnstoff
Puffer NB	20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6,8 500 mM Imidazol 8 M Harnstoff
Puffer GFB	50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0 150 mM NaCl 8 M Harnstoff

## 2.4 Proteinanalytik

### 2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. In dieser Arbeit wurden SDS-Gele der Größe 10 x 8 x 0,075 cm mit 10-, 12.5- und 15%-igem Trenngel und 3%-igem Sammelgel verwendet (Fling & Gregerson, 1986). Für die Gele wurden Lösungen mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt:

Trenngel: 1 × Trenngelpuffer; 10% - 15% Acrylamid, 0,2% SDS, 0,065% (w/v) APS  
0,033% (v/v) TEMED

Sammelgel: 1 × Sammelgelpuffer; 3% Acrylamid, 0,2% SDS, 0,13% (w/v) APS  
0,066% (v/v) TEMED

Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Gellösung zur Polymerisierung in eine entsprechende Vorrichtung gegossen. Die Proben wurden in 1 × Auftragspuffer für 5 min auf 95°C erhitzt und aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurden Proteinstandards mit auf die SDS-PAGE aufgetragen. Die Laufzeiten der Gele bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel variierten zwischen 45 min bei 10%-igen Gelen bis 55 min Laufzeit bei 15%-igen Gelen.

Trenngelpuffer (4x)	0.8% SDS 5 M Tris/HCl, pH 8.8
Sammelgelpuffer (2x):	0.4% SDS 0.25 M Tris/HCl, pH 6.8
10x Laufpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 8.8 2 M Glycin 1% SDS
5x Auftragspuffer	300 mM Tris/HCl, pH 6.8 10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin 0.05% (w/v) Bromphenolblau 5%(v/v) 2-Mercaptoethanol (optional)
Acrylamid (Rotiphorese)	38% (w/v) Acrylamid 2% Bisacrylamid

### 2.4.2 Färbung nach Fairbanks

Für die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit dem Farbstoff Coomassie Blau wurde das Gel in Lösung A aufgekocht und 5 min inkubiert. Nichtgebundener Farbstoff wurde durch anschließendes mehrmaliges Aufkochen in Lösung D entfernt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 50 ng des betreffenden Proteins (Fairbanks *et al.*, 1971).

Lösung A	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure (technisch) 0.05% (w/v) Serva Blue R
----------	---------------------------------------------------------------------------------------

Lösung D	10% (v/v) Essigsäure (technisch)
----------	----------------------------------

### 2.4.3 Silberfärbung

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



Fixierer 1:	30% (v/v) Ethanol (technisch) 10% (v/v) Essigsäure (technisch)
Fixierer 2:	0,4 M Natriumacetat 0,5% (v/v) Essigsäure (technisch) 30% (v/v) Ethanol (technisch) 0,5% (v/v) Glutaraldehyd 0,1% (w/v) Natriumthiosulfat
Färbelösung:	6 mM Silbernitrat 0,01% (w/v) Formaldehyd
Entwickler:	3,75% (w/v) Natriumcarbonat 0,022% (w/v) Formaldehyd
Stopplösung:	50 mM EDTA, pH7,5
Protokoll:	15 min Fixierer 1; schwenken 40 min Fixierer 2; schwenken 3 × 10 min mit H <sub>2</sub> O bidest. waschen 45 min Färbelösung; schwenken ca. 2-5 min Entwickler bis Proteinbanden gut sichtbar sind, dann in Stopplösung inkubieren

#### 2.4.4 Immunoblotting (Western Blot)

Der spezifische Nachweis der in dieser Arbeit verwendeten Proteine erfolgte durch Immunoblotting. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zunächst auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Polyacrylamidgel und eine entsprechend den Herstellerangaben vorbereitete PVDF Membran für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurden eine *Sandwich*-Anordnung bestehend aus drei Lagen Whatman<sup>®</sup>-Papier (in Transferpuffer getränkt) der Membran, dem Gel und drei weiteren getränkten Lagen Whatman<sup>®</sup>-Papier zwischen zwei Elektroden angebracht. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> in 90 min auf die Membran übertragen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine enthielten einen T7-, His<sub>6</sub>- oder S-Tag. Der Nachweis der T7- und His<sub>6</sub>-Tags erfolgte durch spezifische Bindung eines primären Antikörpers gefolgt von einem gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper durch Schwenken der Membran in den unten angegebenen Lösungen. Der Nachweis des S-Tags erfolgte durch die spezifische Bindung des S-Poteins. Der sekundäre

Antikörper bzw. das S-Protein war mit dem Enzym Peroxidase konjugiert, das über eine Lichterzeugende Reaktion mit dem ECL<sup>plus</sup> *western blot detection kit* entsprechend den Herstellerangaben detektiert wurde.

WB-Transferpuffer	50 mM Tris, pH 8.0 105 mM Glycin 1.3 mM SDS 20 % (v/v) MeOH
PBS	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 115 mM NaCl
PBS-Tween	0.1 % (v/v) Tween 20 in PBS-Puffer
Protokoll Antikörperbindung	2 × 10 min PBS-Tween + 5 % Milchpulver 90 min Primärer Antikörper in PBS-Tween <sup>20</sup> + 5 % Milchpulver 3 × 10 min PBS-Tween 45 min Sekundärer Antikörper in PBS-Tween <sup>20</sup> + 5 % Milchpulver 3 × 10 min PBS-Tween Detektion
Antikörperverdünnungen	1 : 10.000 α-His <sub>6</sub> monoklonaler Antikörper 1 : 10.000 α-T7-Tag monoklonaler Antikörper 1 : 5.000 α-Maus-IgG-POD 1 : 5.000 S-Protein-POD

#### 2.4.5 Carboxymethylierung

Um Cysteine in Proteinen dauerhaft und unabhängig vom Redoxpotential des Puffers an der Ausbildung von Disulfidbrücken zu hindern, kann die Thiolgruppe des Cysteins carboxymethyliert werden. Ein dazu häufig verwendetes Reagenz ist Iodacetamid. Durch eine nukleophile Substitution wird das Iod des Iodacetamids durch das Thiolation eines deprotonierten Cysteins ersetzt, was zur Bildung eines unter neutralen Bedingungen stabilen Thioethers führt. Dazu wurde 1 mg/ml Protein in Carboxymethylierungspuffer gelöst und durch Zugabe von 20 mM TCEP und Inkubation für 30 min bei 40°C reduziert. Anschließend wurde 100 mM Jodacetamid zugegeben. Nach weiteren 30 min bei 40°C im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 2% β-Mercaptoethanol gestoppt. Für die

Analyse des carboxymethylierten Proteins wurden die zugegebenen Agenzien durch Dialyse entfernt.

Carboxymethylierungspuffer:           200 mM Tris/HCl pH 8,0  
                                                   2 mM EDTA  
                                                   6M GdmHCl

#### 2.4.6 Redox Titration

Mit Hilfe einer Redox Titration wurden die Redoxpotentiale eines Cystins bestimmt. Dazu wurden proteinhaltige Titrationslösungen mit DTT<sub>red</sub> bzw. DTT<sub>ox</sub> aus entgasten Lösungen hergestellt und in den unten aufgeführten Verhältnissen gemischt. Die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden freie Thiolgruppen durch Zugabe von 100 mM Jodacetamid carboxymethyliert und die Proteine mit einem 10 - 20%-igen Tricine Gel (Novex) den Herstellerangaben entsprechend aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Silberfärbung.

Titrationenlösung                       0,3 mg/ml Protein  
                                                   100 mM Kaliumphosphat pH 7,0  
                                                   1 mM EDTA  
                                                   20 mM DTT (oxidiert bzw. reduziert)

Redoxpotential [mV]	DTT <sub>red</sub>	DTT <sub>ox</sub>
-0.25	0.18	99.82
-0.26	0.39	99.61
-0.27	0.86	99.14
-0.28	1.87	98.13
-0.29	4.04	95.96
-0.30	8.51	91.49
-0.31	17.03	82.97
-0.32	31.18	68.82
-0.33	50.00	50.00
-0.34	68.82	31.18

#### 2.4.7 Löslichkeitsbestimmung

Für die *in vitro* Bestimmung der maximalen Löslichkeit der Seidenproteine wurden 1 mg/ml Proteinlösungen in 10 mM Tris pH 8,0 durch Ultrafiltration mit einer

10000 MWCO Polyethersulfonmembran (Vivaspin 500) aufkonzentriert. In regelmäßigen Intervallen wurden der Lösung Aliquots entnommen und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.4.9). Die Aufkonzentrierung wurde bis zur Ausbildung sichtbarer Aggregate fortgesetzt.

### 2.4.8 Aggregationsassay

Für die Bestimmung der durch verschiedene Faktoren induzierten Proteinaggregation wurden 1 mg/ml Proteinlösungen in 10 mM Tris mit den entsprechenden Zusätzen versehen und für 1 h bei RT inkubiert. Die Endkonzentration zugegebener Salze betrug dabei 300 mM; HCl wurde mit einer Endkonzentration von 100 mM zugegeben (pH1). Anschließend wurden entstandene Aggregate durch Sedimentation für 25 min bei  $125000 \times g$  entfernt und die Proteinkonzentration des Überstandes photometrisch bestimmt (siehe 2.4.9). Da die Summe des löslichen und des aggregierten Proteins der ursprünglich eingesetzten Proteinmenge entsprechen musste, konnte der prozentuale Anteil des aggregierten Proteins durch die Subtraktion der löslichen Proteinmenge von der ursprünglich eingesetzten Proteinmenge erhalten werden.

### 2.4.9 UV-Absorptionsspektroskopie

Die UV-Absorptionsspektroskopie wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinlösungen verwendet. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann bei bekanntem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$  die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei der Wellenlänge  $\lambda$  errechnet werden.

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

Dabei entspricht  $E_\lambda$  der Absorption bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $\epsilon_\lambda$  dem molaren Extinktionskoeffizienten,  $c$  der Proteinkonzentration in mol/l und  $d$  der Schichtdicke der Küvette in Zentimetern. Der Extinktionskoeffizient lässt sich für Proteine aus der Aminosäurezusammensetzung ermitteln. Dazu wurde das Programm ProtParam

(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) verwendet, das den Extinktionskoeffizienten basierend auf der Methode nach Gill und Hoppel (1989) aus den bekannten Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin und Cystinen und deren Vorkommen im Protein berechnet:

$$\epsilon_{\lambda}(\text{Protein}) = \epsilon_{\lambda}(\text{Trp}) \times n_{(\text{Trp})} + \epsilon_{\lambda}(\text{Tyr}) \times n_{(\text{Tyr})} + \epsilon_{\lambda}(\text{Cystin}) \times n_{(\text{Cystin})}$$

Die Werte, die für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine berechnet wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. In allen UV-Absorptionsexperimenten wurden Quarzglas Suprasil Küvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet.

#### 2.4.10 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 (Cantor & Schimmel, 1980; Schmid, 1997b). Daher ergeben sich relative Empfindlichkeiten für die Fluoreszenz zu etwa:

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

Die Fluoreszenz wurde im Wesentlichen für die Überprüfung der Reinheit der Seidenproteine verwendet. Dazu wurden 0,1 mg/ml Proteinlösungen in 10 mM Tris pH 8,0 mit einem FluoroMax Spectrofluorometer bei Raumtemperatur vermessen. Die Integrationszeit betrug 1 s und die Bandbreiten für Anregung und Emission waren auf jeweils 5 nm eingestellt.

### 2.4.11 CD-Spektroskopie

Die Fern-UV CD-Spektroskopie wurde dazu verwendet, um Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen zu erhalten. Im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 250 nm (Absorption der Peptidbindung) erzeugt die Polypeptidkette ein CD-Signal, das von der Sekundärstruktur des Proteins abhängig ist. Die Auswertung kann durch den Vergleich mit Spektren von Modellstrukturen wie z.B. Polylysin erfolgen, das in  $\alpha$ -helikaler,  $\beta$ -faltblatt- oder *random coil*-Konformation vorkommen kann (Greenfield & Fasman, 1969). Eine andere Auswertemethode erfolgt über Computerprogramme die unter Verwendung einer Proteinstrukturdatenbank die Sekundärstrukturanteile eines Proteins anhand von dessen CD-Spektrum berechnen (Andrade *et al.*, 1993). Für die Durchführung der Messungen wurden 0,15 mg/ml Proteinlösungen in 5 mM Tris pH 8,0 und Quarzküvetten mit 0,1 cm Schichtdicke verwendet. Dabei wurde ein Jasco 715 Spectropolarimeter mit folgenden Geräteeinstellungen verwendet:

Wellenlängenbereich	190 nm - 250 nm
Auflösung	0.2 nm
Geschwindigkeit	20 nm/min
Response	1.0 s
Akkumulation	4

Aus der gemessenen Elliptizität  $\Theta$  (in Grad) wurde die molare Elliptizität  $\Theta_{MRW}$ , d.h. die auf den durchschnittlichen Beitrag einer Peptidbindung bezogene Elliptizität mit Hilfe

der Formel  $\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M}{c \cdot d \cdot N_{AS}}$  (Schmid, 1997a; Schmid, 1997b) berechnet. Dabei ist  $\Theta$

die gemessene Elliptizität, M das Molekulargewicht des Proteins, c die Proteinkonzentration, d die Schichtdicke der Küvette in Zentimeter und  $N_{AS}$  die Anzahl der Aminosäuren im Protein. Für die Verfolgung des Einflusses von Temperaturänderungen auf die Sekundärstruktur wurde die Küvette mit einer Rate von 1°C/min aufgeheizt bzw. abgekühlt und die molare Elliptizität bei 220 nm bestimmt.

### 2.4.12 Feldflussfraktionierung (FFF) und Statische Lichtstreuung

Um das Dimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsverhalten der Seidenproteine zu untersuchen, wurde die molare Masse der Proteinpartikel mittels Feldflussfraktionierung

und statischer Lichtstreuung untersucht. Die Feldflussfraktionierung ist eine matrixfreie Chromatographiemethode, bei der Partikel in einem Feld aufgetrennt und durch einen parabolischen Fluss im Trennkanal sukzessiv eluiert werden (Colfen & Antonietti, 2000). Während eines Experiments wird zunächst die Probe in den Trennkanal injiziert (Abbildung 2.1A). Durch ein Flussfeld werden die in der Probe enthaltenen Partikel aufgetrennt. Dabei wird ein Fluss durch die porösen Kanalwände senkrecht zum Kanal von der Decke zum Kanalboden angelegt (*crossflow*). Eine Membran am Kanalboden erlaubt dabei den Durchtritt des Puffers, nicht aber der zu analysierenden Partikel. Diesem Flussfeld wirkt die Diffusion der Probenpartikel entgegen. Dadurch entsteht eine, mit zunehmender Höhe über dem Kanalboden exponentiell abnehmende Verteilung der Teilchen. Die durchschnittliche Aufenthaltshöhe hängt dabei neben dem *crossflow* und der Viskosität des Lösungsmittels von dem Stokesradius der Teilchen ab. Kleine Partikel halten sich durchschnittlich weiter in der Kanalmitte auf als größere (Abbildung 2.1B). Anschließend wird ein laminarer Fluss längs des Kanals angelegt, der ein parabolisches Flussprofil ausbildet (*channel flow*). Dadurch erfahren die Partikel abhängig von der durchschnittlichen Aufenthaltshöhe über dem Kanalboden eine unterschiedliche Flussrate in Richtung des Kanalausgangs was zu verschiedenen Retentionszeiten der einzelnen Partikelspezies führt (Abbildung 2.1B).

Um Proteine im nativen Zustand zu analysieren, wurde eine 10 mM Tris pH 8,0 enthaltende Lösung als Laufpuffer verwendet. Für die Analyse des denaturierten Zustandes wurden 8 M Harnstoff bzw. 6 M GdmHCl als Laufpuffer eingesetzt. Die Kanalhöhe betrug 470  $\mu\text{m}$ , als Membranmaterial wurde für "native" Messungen regenerierte Zellulose, für "denaturierende" Messungen Polyethersulfon jeweils mit einer Ausschlussgröße von 5 kDa verwendet. Für jedes Protein wurden die optimalen Flussraten (*crossflow*, *channelflow*) neu bestimmt. Für eine Messung wurden 100  $\mu\text{l}$  einer 1 mg/ml Proteinlösung injiziert.

Die Bestimmung der molaren Masse der aufgetrennten Proteine erfolgte durch den an den Kanalausgang angeschlossenen Lichtstredetektor DawnEOS (Wyatt Technologies). Die Lichtstreuung ist direkt proportional zur molaren Masse eines Partikels und kommt daher ohne die Verwendung von Proteinstandarts aus (Zimm, 1948). Die für die Berechnung der molaren Masse eines Proteins aus der statischen Lichtstreuung benötigte Proteinkonzentration wurde durch die Messung des Brechungsindex der Proteinlösung mit Hilfe des RI-Detektors 71 (Shodex) bestimmt. Alternativ wurde die Proteinkonzentration über die UV-Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Auswertung der

Daten erfolgte mit Hilfe des Astra Computerprogramms (Wyatt Technologies). Folgende Parameter wurden bei der Berechnung der molaren Masse der Proteine verwendet:

Protein in 10 mM Tris	$dn/dc = 0,185 \text{ cm}^3/\text{g}$
10 mM Tris	$n = 1,330$
Protein in 8 M Harnstoff	$dn/dc = 0,137 \text{ cm}^3/\text{g}$
8 M Harnstoff	$n = 1,397$
Protein in 6 M GdmHCl	$dn/dc = 0,113 \text{ cm}^3/\text{g}$
6 M GdmHCl	$n = 1,430$

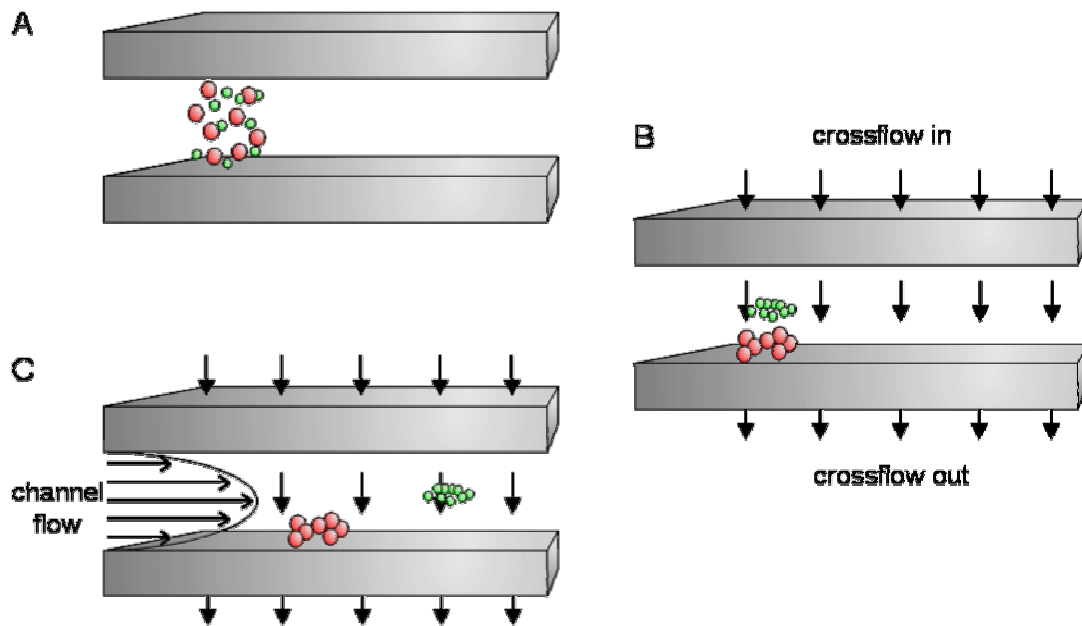


Abbildung 2.1 Trennprinzip der FFF. (A) Injektion der Probe (B) Durch Anlegen eines Flussfeldes (*crossflow*) werden Partikel in Abhängigkeit des Stokesradius aufgetrennt. Die gezeigten Kugeln geben die durchschnittliche Aufenthaltshöhe über dem Kanalboden an. (C) Durch das parabolische Flussprofil des *channel flow* werden Partikel mit unterschiedlicher Aufenthaltshöhe zeitlich versetzt eluiert (Wyatt Technologies).

### 2.4.13 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Untersuchung von Seidenproteinassemblaten im Nanometerbereich wurde die Transmissionselektronenmikroskopie 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 Hoch-



vakuum bei hoher Spannung kurzfristig einen hydrophilen Charakter verliehen bekamen. 10 µl der Probe wurden für 1 min auf dem Grid inkubiert und der Überstand mit einem Filterpapier entfernt. Anschließend wurden 10 µl einer 1-2%-igen wässrigen Uranylacetat Lösung pH 3,5-4,5 für 1 min auf dem Grid inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde die Probe getrocknet. Bei diesem Verfahren lagert sich das Schwermetallsalz an die Proteine an und ermöglicht aufgrund seiner stark elektronenstreuenden Eigenschaften die Darstellung der Probe im TEM (Negativkontrastierung). Die Proben wurden in einem Jeol 100 CX bei einer Anodenspannung von 100 kV betrachtet bzw. auf Film abgeleuchtet.

#### **2.4.14 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Das Rasterelektronenmikroskop liefert Abbildung von Oberfläche bei hoher Vergrößerung und Tiefenschärfe. Für die Analyse von Proben müssen diese zunächst mit einer leitenden Schicht aus Gold bedampft werden. Anschließend wird die Oberfläche mit einem Elektronenstrahl abgetastet. Sekundärelektronen, die dadurch aus der Oberfläche herausgeschlagen werden, werden von einem Detektor registriert und das Signal in eine Bildinformation umgewandelt.

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden Proteinassemblee in  $H_2O_{\text{bidest}}$  suspendiert und für 3 min auf *Thermanox® plastic cover slips* inkubiert. Anschließend wurde das Wasser abgenommen und die Probe getrocknet. Makroskopische Proben (z.B. Fäden) wurden mit Leitsilber auf *cover slips* geklebt. 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 jeweils von Bettina Richter durchgeführt.

#### **2.4.15 Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird ein Bild von der Oberfläche einer Probe durch das mechanische Abtasten mit einer feinen Nadel erhalten. Die Bewegung der Probe in alle drei Raumkoordinaten wird dabei durch Piezzokristalle vermittelt. Während des Scannens

über die Probe wird die Auslenkung der Nadel durch die Reflektion 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-Piezzokristalles zu korrigieren. Das berechnete Signal für den Z-Piezzo (Höhe) kann wie die Auslenkung abgebildet werden und vermittelt so einen optischen Eindruck von der Probe.

Für die Probenpräparationen wurden suspendierte Proteinassemblate auf frisch gespaltene Glimmerplättchen aufgetragen und für 3 min inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurde die Probe noch drei Mal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in einem Multimode SPM im Kontakt-Modus vermessen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Rekombinante Herstellung von Spinnenseidenproteinen

Um die Eigenschaften von Spinnenseiden systematisch untersuchen zu können, wurden sowohl authentische Proteine, als auch unterschiedliche Varianten synthetischer Seidenproteine generiert.

	M [kDa]	$\epsilon_{276}$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	$E_{276;0,1\%;1cm}$
ADF-3	61,9	45095	0,728
ADF-4	60,5	50895	0,842
(QAQ) <sub>8</sub>	47,5	23200	0,488
(AQ) <sub>12</sub>	48,1	34800	0,724
C <sub>16</sub>	47,7	46400	0,859
(QAQ) <sub>8</sub> NR3	59,3	27550	0,655
(AQ) <sub>12</sub> NR3	59,8	39150	0,465
C <sub>16</sub> NR4	58,1	47850	0,824
(QAQ) <sub>16</sub> NR3	105,1	50760	0,482
(AQ) <sub>24</sub> NR3	106,3	73950	0,696
C <sub>32</sub> NR4	104,1	94250	0,905
NR3	13,3	4423	0,332
NR4	11,9	1523	0,128
NC1S	54,6	23345	0,427

**Tabelle 3.1** Rekombinante Seidenproteine (incl. Peptidtags) mit berechneter relativer Molekülmasse (M), molarem Extinktionskoeffizienten für die Absorption bei 276 nm ( $\epsilon_{276}$ ) und der Absorption einer 1 mg/ml Lösung bei 276 nm gemessen in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke ( $E_{276;0,1\%;1cm}$ ).

### 3.1.1 Expression authentischer Seidengenfragmente

Die freundlicherweise von J. Gosline (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) zur Verfügung gestellten partiellen cDNAs von *adf-3* und *adf-4* wurden zu Beginn der Arbeit auf die Übereinstimmung mit den publizierten Sequenzen überprüft (Genbank Einträge U47855 and U47856). Die Sequenzierung des 5'- und 3'-Endes der *adf-3* cDNA bestätigte die Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz bis auf die im Anhang aufgeführten Mutationen. Auf eine Sequenzierung des mittleren Teils der cDNA von 0,6 kb Länge wurde verzichtet, da davon ausgegangen werden kann, dass auch diese Sequenz den publizierten Daten entspricht. Die Größe der *adf-4* cDNA war mit 2,2 kb jedoch deutlich größer als die publizierte Sequenz. Aufgrund dieser Abweichung wurde diese cDNA vollständig sequenziert. Da innerhalb der repetitiven Sequenz keine einzigartigen Primerbindestellen gefunden werden konnten, wurde das Genfragment durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI in verschiedene Stücke zerlegt. Diese Fragmente wurden in einen Klonierungsvektor eingefügt und mit Hilfe von vektorspezifischen Primern sequenziert. Die Gesamtsequenz wurde aus den Ergebnissen der einzelnen Sequenzierungsreaktionen zusammengefügt und ist im Anhang zu finden. Die Sequenz kodiert für ein Protein, das prinzipiell aus den gleichen Wiederholungseinheiten aufgebaut ist, die auch in der Sequenz des publizierten ADF-4 enthalten sind. Allerdings unterscheidet sich deren Anordnung. Als weitere Differenzen sind mehrere Polyalanin-Motive zu nennen, die jeweils aus nur drei Alaninen bestehen, sowie eine Mutation von 10 Aminosäuren in der nichtrepetitiven Region des Proteins (siehe Anhang). Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich diese Variante des ADF-4 verwendet wurde, beziehen sich im Folgenden alle Angaben - sofern nicht anders vermerkt - auf die hier bestimmte Sequenz.

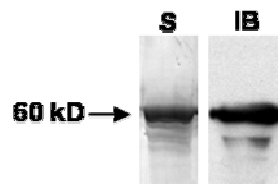
Bisher gibt es lediglich eine Publikation über die erfolgreiche Expression eines authentischen Spinnenseidengens in *E.coli* (Arcidiacono *et al.*, 1998). Dabei konnte ein 47 kDa carboxylterminales Fragment des MaSp1 Proteins aus *Nephila clavipes* in *E.coli* synthetisiert und anschließend gereinigt werden. Die Ausbeute lag bei 4 mg gereinigtem Protein pro Liter Medium. In dieser Arbeit wurden die cDNAs von *adf-3* und *adf-4* in Expressionsvektoren kloniert und in *E.coli* exprimiert. Um eine Verkürzung der Genfragmente durch homologe Rekombination und zu vermeiden, wurden die Bakterienstämme BLR [DE3] und Rosetta Blue [DE3] verwendet, in denen der entsprechende Rekombinationsmechanismus ausgeschaltet ist (*recA*<sup>-</sup>). Der Stamm Rosetta Blue [DE3]

exprimiert zusätzliche tRNAs für die effizientere Translation eukaryotischer Gene (siehe auch 1.5). Zwar konnten Expressionsbedingungen gefunden werden, bei denen eine durch *Immunoblotting* nachweisbare Proteinsynthese im Schüttelkolben stattfand, jedoch wurde die Menge an produziertem Protein als zu gering erachtet, um die Etablierung eines Reinigungsprotokolls zu erlauben. Versuche von C. Helsen, die Ausbeute von ADF-3 durch Fermentation unter kontrollierten Bedingungen zu verbessern, schienen erfolgreich. Allerdings konnte nachfolgend keine effektive Reinigung des Proteins weder durch chromatographische Verfahren (Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie), noch durch die selektive Fällung des Proteins aus dem Rohextrakt mit verschiedenen lyotropen Agenzien (Ammoniumsulfat, Kaliumphosphat, Methanol) erreicht werden.

Aufgrund der Probleme bei der bakteriellen Expression von *adf-3* und *adf-4* wurde alternativ die Expression in Insektenzellen untersucht. Dieses System wurde zum einen ausgewählt, weil es ein gut etabliertes System zur heterologen Genexpression darstellt. Zum anderen sind Insekten und Spinnen phylogenetisch sehr nahe verwandt, wodurch Probleme durch mangelnde Kompatibilität der Seidengene mit dem Transkriptions- / Translationsapparat der Wirtszelle minimiert werden sollten. Als Vektor für den Transfer der Gensequenzen in die Zellen diente dabei ein rekombinantes Baculovirus. Die partiellen Seidengene *adf-3* und *adf-4* wurden in die Transfervektoren pFasbachTα kloniert. Dadurch wurde den Seidengensequenzen eine für einen His<sub>6</sub>-Tag codierende Sequenz angefügt. Die resultierenden Plasmide wurden von U. Gat und S. Itah (Hebrew University, Givat Ram, Israel) dazu verwendet, durch Transposition rekombinante Virusgenome herzustellen. Mit diesen so genannten Bacmiden wurden infektiöse rekombinante Viren generiert. Drei Tage nach Infektion von Sf9-Zellen aus dem Heerwurm *Spodoptera frugiperda* mit diesen Viren war die Seidenproteinsynthese abgeschlossen. Die Zellen wurden geerntet, eingefroren und in diesem Zustand von der Israelischen Arbeitsgruppe für weiterführende Experimente zur Verfügung gestellt.

Nach der Synthese lag ADF-3 in den Insektenzellen in einer löslichen Form vor (siehe 3.2.8). Da die zur Verfügung gestellten Zellmengen nicht für die Etablierung eines Reinigungsprotokolls ausreichten, beschränkte sich die Analyse auf Untersuchungen des Proteins im zellulären Kontext. Im Gegensatz dazu lag das Protein ADF-4 in den Insektenzellen in einer SDS-unlöslichen Form vor (siehe 3.2.8). Dadurch konnte eine einfache Reinigung des Proteins durchgeführt werden. Die Zellen wurden unter Hitzeeinwirkung bei 95°C für 5 min in 2% SDS lysiert. Das unlösliche ADF-4 wurde

durch Sedimentation von den löslichen Bestandteilen getrennt. Untersuchungen ergaben, dass das ADF-4 auch in Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid unlöslich blieb (siehe 3.3.1). Dagegen konnte es in Guanidiniumthiocyanat gelöst und durch Dialyse gegen 8 M Harnstoff in Lösung gehalten und weiter untersucht werden. Immunoblotting und SDS-PAGE gefolgt von Silberfärbung bestätigten die Identität und Sauberkeit des Proteins (Abbildung 3.1). Durch Messung der Absorption der proteinhaltigen Harnstofflösung wurde die Konzentration des Proteins und damit die Ausbeute der Proteinsynthese bestimmt. Aus einem Liter Kulturmedium konnten demnach 30 mg gereinigtes ADF-4 gewonnen werden.



**Abbildung 3.1** Analyse des gereinigten und gelösten ADF-4 durch SDS-PAGE gefolgt von Silberfärbung (S) und *Immunoblotting* mit einem  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-Antikörper (IB).

### 3.1.2 Entwicklung einer Klonierungsstrategie zur Herstellung synthetischer Gene

Ein Ziel dieser Arbeit war es, unterschiedliche repetitive Einheiten sowie die nichtrepetitiven carboxylterminalen Regionen von Spinnenseidenproteinen zu charakterisieren. Um die dazu notwendigen unterschiedlichen Proteinvarianten herstellen zu können, wurde ein Klonierungssystem entworfen, das im Unterschied zu den bisher verwendeten Strategien (siehe 1.5) eine kontrollierte Assemblierung synthetischer Seidengene bei minimalen Einschränkungen des Moduldesigns ermöglichte. Dazu wurden Elemente bekannter Strategien zur Herstellung synthetischer Spinnenseidengene mit einer *seamless cloning strategy* (Padgett & Sorge, 1996) kombiniert. Das Konzept des "nahtlosen Klonierens" erlaubt das Zusammenfügen zweier DNA-Fragmente ohne die Notwendigkeit, Restriktionserkennungssequenzen an der Nahtstelle unterbringen zu müssen. Dies wird durch die Verwendung von Restriktionsenzymen erreicht, die einen DNA-Doppelstrang außerhalb der Erkennungssequenz schneiden. Auf diese Weise können

unabhängig vom verwendeten Enzym beliebige kompatible DNA-Einzelstrang-Überhänge generiert werden (siehe auch Abbildung 3.2).

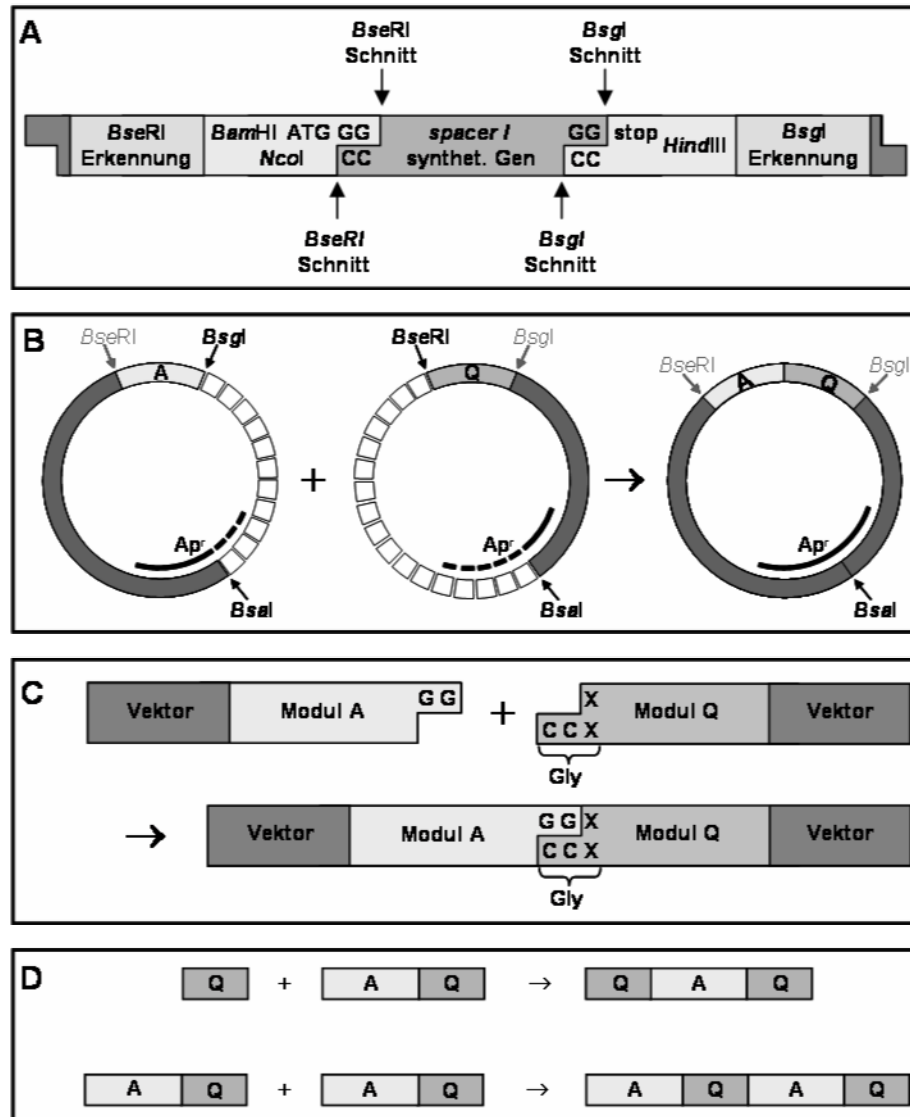


Abbildung 3.2 Klonierungsstrategie für die Konstruktion synthetischer Spinnenseidengene. (A) Die Klonierungskassette enthält Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, die für die Multimerisierung der Module (*BsgI* und *BseRI*) und das Ausschneiden des fertigen Gens (*NcoI*, *BamHI*, *HindIII*) notwendig waren. An die Stelle des *Spacers* wurden zunächst einzelne Module und später synthetische Gene gesetzt. (B) Die Verknüpfung zweier Module in einer definierten Reihenfolge wurde durch die Ligation zweier geeigneter Plasmidfragmente erreicht. Das zuvor zerschnittene Ampicilligen ( $Ap^r$ ) wurde dabei wieder zusammengefügt. (C) Für die Verknüpfung zweier Module wurden zwei komplementäre Nukleotidpaare benötigt. Mit der Wahl von GG bzw. CC wurde das erste Kodon eines jeden Moduls auf Glycin festgelegt. (D) Modulmultimere konnten wie einzelne Module miteinander verknüpft werden, was eine kontrollierte Assemblierung der synthetischen Gene ermöglichte.

Der Entwurf des Klonierungssystems beinhaltete zunächst die Konstruktion des Klonierungsvektors pAZL. Als Grundgerüst für diesen Klonierungsvektor diente der gut amplifizierende Vektor pFastbac1. Die *multiple cloning site* sowie entbehrliche Teile des Vektors wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Hind*III entfernt und durch eine Klonierungskassette ersetzt. Diese Klonierungskassette beinhaltete einen Platzhalter (*Spacer*) an dessen Stelle im Verlauf der Klonierung zunächst einzelne Module und später die entstehenden synthetischen Gene gesetzt wurden. Begrenzt wurde der *Spacer* durch die Nukleotide GG bzw. CC. Diese Nukleotide kennzeichneten gleichzeitig die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bse*RI und *Bsg*I deren Erkennungssequenzen jeweils 8 bzw. 12 Nukleotide davon entfernt lagen. Der Bereich zwischen den Erkennungssequenzen und den Schnittstellen der beiden Enzyme konnte für die Positionierung von Start- und Stopkodons direkt vor bzw. nach dem synthetischen Gen genutzt werden. Außerdem konnten dort Schnittstellen für die spätere Umklonierung der synthetischen Gene vom Klonierungsvektor in einen Expressionsvektor untergebracht werden (Abbildung 3.2A). Der erste Schritt bei der Konstruktion synthetischer Seidengene war das Ersetzen des *Spacers* durch ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid, das entsprechende CC und GG 3'-Einzelstrang-Überhänge aufwies (genauere Angaben zu den einzelnen Klonierungsschritten siehe 2.2.9).

Da die Handhabung kleiner DNA-Fragmente (< 100 Basenpaare) mit gängigen, in der Molekularbiologie verwendeten Standardmethoden (z.B. Reinigung) schwierig ist, wurden für die Verknüpfung zweier Module jeweils Vektorfragmente, bestehend aus einem Teil des pAZL-Vektors und dem entsprechenden Modul, verwendet. Der Vektor wurde dabei mit *Bsa*I im Ampicillin-Resistenzgen geschnitten. Nur korrekt ligierte Fragmente ergaben anschließend Plasmide mit intaktem Resistenzgen, das nach der Transformation von *E.coli* das Wachstum auf ampicillinhaltigen Nährplatten ermöglichte. Alternativ zu *Bsa*I kann das Restriktionsenzym *Alw*NI verwendet werden, das den Vektor im Replikationsursprung schneidet. Auch damit konnte die Selektion korrekt ligierter Plasmide vereinfacht werden.

Module, die mit *Bsg*I ausgeschnitten wurden, lagen nach der Moduldimersierung an der 5'-Position. Die Verwendung von *Bse*RI bewirkte entsprechend eine 3'-Positionierung (Abbildung 3.2B). Die durch Verwendung von *Bsg*I und *Bse*RI entstehenden komplementären GG bzw. CC DNA-Einzelstrang-Überhänge wurden für die Verknüpfung von zwei Modulen benutzt, d.h. die DNA-Sequenz, die für die Ligationen notwendig war, beschränkte sich auf ein Glycinkodon (GGX) (Abbildung 3.2C). Da Glycin sehr häufig in

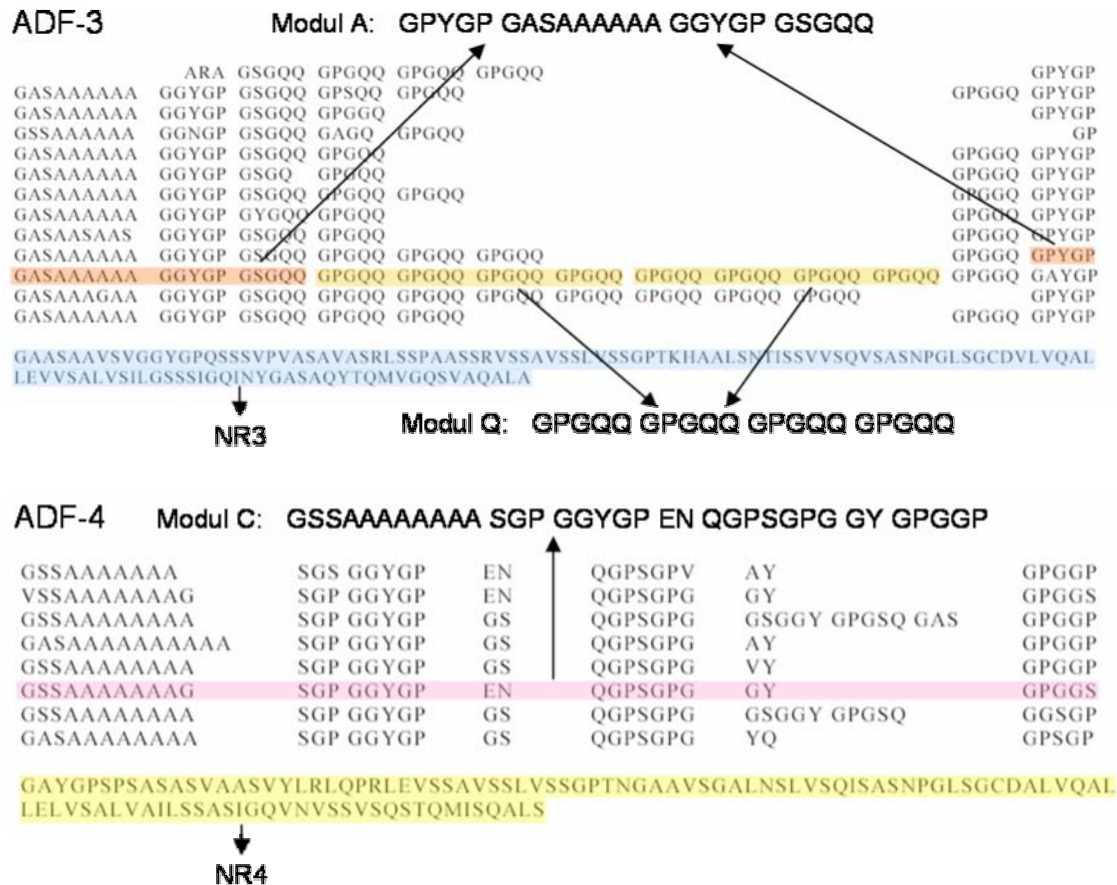


natürlichen Spinnenseiden vorkommt (ca. 30%) konnten die Module weitgehend frei entworfen werden, ohne in der natürlichen Sequenz nach geeigneten Stellen für mögliche Schnittstellen suchen zu müssen. Da die Grundstruktur der Klonierungskassette während der einzelnen Klonierungsschritte erhalten bleibt, kann mit Hilfe des Vektors pAZL eine große Vielfalt unterschiedlicher Modulkombinationen erzeugt werden (Abbildung 3.2D). Die Anordnung der Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI, *Nco*I und *Hind*III erlaubt die Umklonierung der fertig gestellten Gene in unterschiedliche Expressionsvektoren wie z.B. die pQE Vektoren (Quiagen) oder pET Vektoren (Novagen). Durch die Wahl der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme konnten die entsprechende Seidenproteine wahlweise mit einem T7-Peptidtag, einem His<sub>6</sub>-Tag oder ohne zusätzliche Peptidsequenzen synthetisiert werden.

### 3.1.3 Design und Konstruktion synthetischer Spinnenseiden

Als Vorbild für die synthetischen Seidenproteine dienten die MAS-Proteine der Spinne *Araneus diadematus* ADF-3 und ADF-4. Die bislang bekannte Primärsequenz von ADF-3 besteht zum größten Teil aus Wiederholungseinheiten, die alle eine Konsensussequenz mit einem Polyalanin-Motiv beinhalten. Die Länge der einzelnen Wiederholungseinheiten wird durch eine unterschiedliche Anzahl des GPGQQ Motivs bestimmt. Um diese repetitive Sequenz zu imitieren, wurden zwei unterschiedliche Module, genannt A und Q, entworfen. Die Sequenz des Moduls A wurde von der Polyalanin-enthaltenden Konsensussequenz abgeleitet. Die Sequenz des Moduls Q enthielt vier Wiederholungen des GPGQQ-Motivs (Abbildung 3.3). Um die Eigenschaften unterschiedlich langer Wiederholungseinheiten untersuchen zu können, wurden jeweils ein bzw. zwei Module Q mit einem Modul A verknüpft. Die daraus resultierenden Wiederholungseinheiten (AQ) und (QAQ) wurden zu synthetischen Genen multimerisiert, die für die repetitiven Proteine (rep-Proteine) (AQ)<sub>12</sub> und (QAQ)<sub>8</sub> kodierten. Der repetitive Teil des Proteins ADF-4 besteht grundsätzlich aus Wiederholungen einer einzigen Konsensussequenz mit nur kleinen Variationen. Diese Konsensussequenz diente als Vorlage für ein Modul C (Abbildung 3.3). 16 Kopien dieses Moduls wurden aneinandergereiht, um das ADF-4 analoge C<sub>16</sub> Protein zu erhalten. Um bei späteren vergleichenden Experimenten Einflüsse der Molekülgröße auf das Verhalten der Proteine zu minimieren, wurde die Anzahl der

Wiederholungseinheiten in allen Fällen so gewählt, dass die Proteine etwa die gleiche molare Masse aufwiesen (Tabelle 3.1).



**Abbildung 3.3** Die Aminosäuresequenzen der Proteine ADF-3 und ADF-4 (Genbank Einträge U47855 and U47856) und davon abgeleitete Module A, Q und C. Die Anordnung der Aminosäuresequenz wurde in der dargestellten Weise gewählt, um Sequenzähnlichkeiten und -unterschiede hervorzuheben.

Sowohl ADF-3 als auch ADF-4 weisen an ihrem carboxylterminalen Ende eine nichtrepetitive Region (NR-Region) mit je 124 bzw. 109 Aminosäuren auf. Um die Funktion dieser Regionen analysieren zu können, sollten diese sowohl isoliert, als auch in Verbindung mit den repetitiven Regionen hergestellt und untersucht werden. Die dafür kodierenden Gensequenzen weisen im Gegensatz zu den repetitiven Sequenzen kaum Kodons auf, die problematisch bei der Expression in Prokaryoten sind. Deshalb konnten diese Sequenzen neben den synthetischen Modulen in die synthetischen Seidengene integriert werden. Dazu wurden die Sequenzen mittels PCR amplifiziert und in den Vektor

pAZL kloniert. Um Probleme bei der Translation dieser Regionen in Bakterien zu vermeiden, wurde das Kodon AGA (Arg) mittels PCR-Mutagenese sowohl in NR3 als auch in NR4 zu CGT (Arg) mutiert, welches von *E.coli* besser translatiert werden kann. Die Auswirkung dieser Mutation auf die Proteinsynthese wurde jedoch nicht näher untersucht. Die NR-Regionen wurden jeweils mit den entsprechenden repetitiven Sequenzen kombiniert (repNR-Konstrukte: (AQ)<sub>12</sub>NR3, (QAQ)<sub>8</sub>NR3 und C<sub>16</sub>NR4) aber auch einzeln exprimiert. Zusätzlich wurden von Susanne Quedzuweit repNR-Konstrukte mit verdoppelten repetitiven Regionen hergestellt ((AQ)<sub>24</sub>NR3, (QAQ)<sub>16</sub>NR3 und C<sub>32</sub>NR4) und zur Verfügung gestellt. Alle synthetischen Gene wurden in den Vektor pET21 kloniert, wodurch eine für den T7-Peptidtag kodierende Sequenz angefügt wurde. Die Expression erfolgte in *E.coli* B BLR [DE3] (siehe 2.3.6).

### 3.1.4 Reinigung und Ausbeute der synthetischen Spinnenseidenproteine

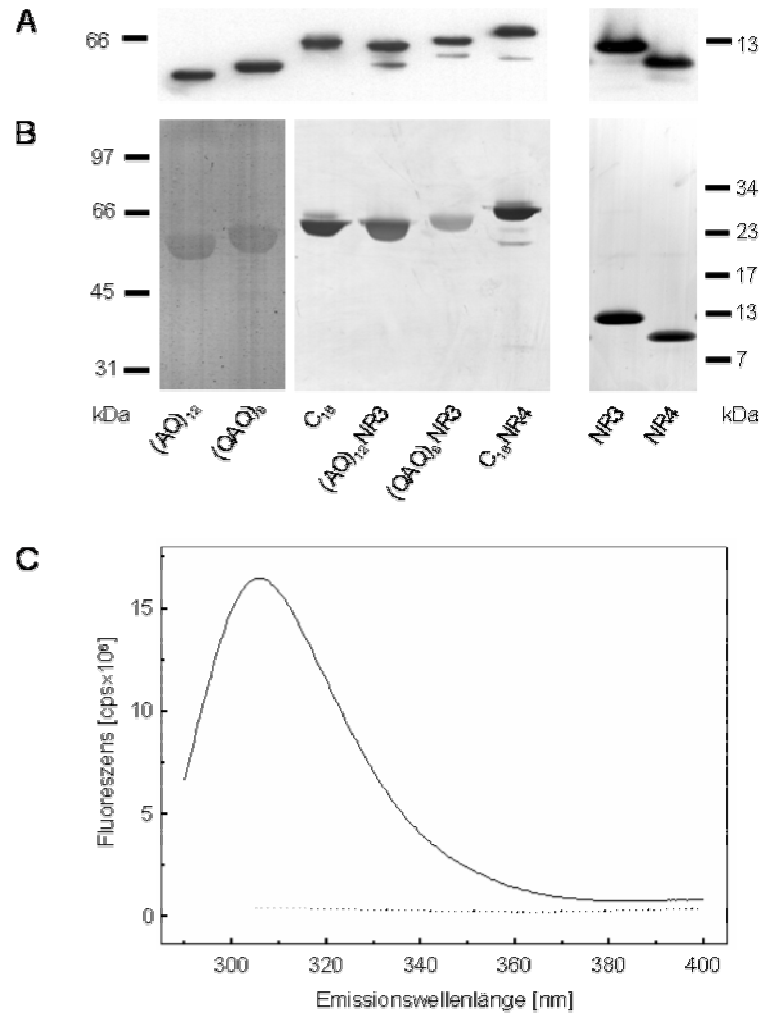
Die Reinigung von Proteinen durch die üblicherweise verwendeten chromatographischen Trennverfahren ist zeitaufwendig, teuer und oft ineffizient, da bei jedem Reinigungsschritt durch unvollständige Bindung des Proteins und das Verwerfen unsauberer Fraktionen viel Protein verloren gehen kann. Bei Proteinen, die in katalytischen Mengen aktiv sind, wie z.B. Enzymen, und von denen daher bei praktischen Anwendungen nur geringe Mengen benötigt werden, ist ein solches Reinigungsverfahren sinnvoll. Spinnenseidenproteine dagegen stellen potentielle Vorstufen von Materialien, wie z.B. Fäden oder Geweben, dar und werden deshalb in großen Mengen benötigt. Für den wirtschaftlichen Einsatz dieser Proteine ist es daher notwendig, neben einem effizienten Expressionssystem auch eine schnelle und einfache Reinigungsstrategie zu finden. In Anlehnung an ein 2002 publiziertes Protokoll für die Isolierung von synthetischen Spinnenseidenproteinen aus Pflanzen (Scheller *et al.*, 2001) wurde ein Protokoll für die Reinigung synthetischer Seidenproteine nach Synthese in *E.coli* entwickelt.

Die synthetischen Proteine lagen nach der Synthese größtenteils in einer löslichen Form im Cytosol der Bakterien vor. Deshalb wurde die Reinigung in "nativen" Puffern, d.h. wässrigen Puffern ohne Zusatz chaotroper Agenzien durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss wurde ein Großteil der zellulären Proteine durch Hitzedenaturierung aus dem Lysat gefällt. Die Seidenproteine blieben dabei in Lösung und wurden anschließend

mit Ammoniumsulfat ausgefällt (siehe 2.3.7). Die Identität der Proteine wurde mittels Immunoblot mit einem gegen den T7-Tag gerichteten Antikörper überprüft (Abbildung 3.4A). Obwohl einige der Proteine jeweils gleiche Molekulargewichte aufweisen (siehe Tabelle 3.1), wurden unterschiedliche Laufverhalten bei SDS-PAGE festgestellt. Insbesondere die Positionen der C<sub>16</sub> und C<sub>16</sub>NR4-Proteinbanden ließen scheinbar auf eine höhere Molekülmasse als die theoretisch berechnete schließen. massenspektrometrische Untersuchungen des Proteins C<sub>16</sub>, die von C. Helsen durchgeführt wurden (Helsen, 2003), zeigten jedoch, dass dieses Protein eine Masse aufweist, die der theoretisch berechneten entspricht. Das ungewöhnliche Laufverhalten bei SDS-PAGE könnte durch eine vom normalen SDS-Protein Bindungsverhältnis (Gewichtsverhältnis SDS zu Protein 1:1.4; Laemmli, 1970) abweichende SDS-Bindung an die Seidenproteine aufgrund von deren Aminosäurezusammensetzung bedingt sein, wodurch die Migration im elektrischen Feld deutlich beeinflusst wäre. Neben den vollständigen Proteinen wurde durch Immunoblot in den repNR-Proteinpräparationen jeweils eine kleinere Bande detektiert. Da diese Bande positiv mit einem gegen den aminoterminalen T7-Tag gerichteten Antikörper reagierte, ist es wahrscheinlich, dass es sich dabei um carboxylterminal verkürzte Seidenproteine handelt. Die Reinheit der Proteine wurde mit SDS-PAGE gefolgt von einer Silberfärbung überprüft (Abbildung 3.4B). Außer den schon mittels Immunoblotting nachgewiesenen Proteinen konnten keine weiteren signifikanten Proteinbanden detektiert werden. Zusätzlich wurde die Reinheit der Seidenproteine mittels Fluoreszenzspektroskopie überprüft. Keines der verwendeten synthetischen Seidenproteine enthielt die Aminosäure Tryptophan, während Tyrosine jeweils vorhanden waren. Dagegen ist Tryptophan mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von 1.5% in Proteinen von *E.coli* vorhanden (Blattner *et al.*, 1997). Durch Fluoreszenzspektroskopie kann die Anwesenheit von Tryptophanen in einer Proteinprobe und damit von Verunreinigungen in den Spinnenseidenproteinpräparationen selektiv nachgewiesen werden. Während durch Licht der Wellenlänge 280 nm sowohl Tyrosine als auch Tryptophane angeregt werden, führt Licht mit 295 nm ausschließlich zur Anregung von Tryptophan. Alle Proben zeigten eine für Tyrosin typische Fluoreszenz, während kein Anzeichen für die Anwesenheit von Tryptophan detektierbar war (Abbildung 3.4C). Dies war ein weiterer Hinweis auf die hohe Reinheit der Seidenproteine.

Durch die Expression der synthetischen Seidengene im Schüttelkolben bei einer Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 konnten für alle Proteine ungefähr gleiche Ausbeuten erzielt werden, die zwischen 10 und 30 mg gereinigtem Protein pro Liter Medium lagen. In

Zusammenarbeit mit Jan Oschmann wurden am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Halle die Bakterien in 8-Liter Ansätzen fermentiert. Durch die deutlich höhere Produktion an Zellmasse ( $OD_{600} = 40$ ), die unter kontrollierten Bedingungen erzielt werden konnte, steigerte sich die Ausbeute an gereinigtem Protein auf 0,3 bis 0,6 g/l.



**Abbildung 3.4** Analyse der gereinigten synthetischen Seidenproteine. (a) Die T7-Tags der Proteine wurden durch einen Immunoblot mit einem  $\alpha$ -T7-Antikörper nachgewiesen. (b) Die Reinheit der Proteine wurde durch SDS-PAGE und Silberfärbung untersucht. Aufgrund der schwachen Färbung der Proteine (AQ)<sub>12</sub> und (QAQ)<sub>8</sub> wurde der Kontrast des Bildes elektronisch verstärkt. (c) Gezeigt ist exemplarisch das Fluoreszenzspektrum des Proteins C<sub>16</sub>NR<sub>4</sub> bei Anregung mit 280 nm (—) und 295 nm (·····). Die Spektren der anderen synthetischen Proteine zeigten einen vergleichbaren Verlauf.

### 3.1.5 Das *Nephila clavipes* MaSp1-Derivat NC1S

Um die prolinhaltigen Proteine des *Araneus diadematus* Systems mit einem prolinfreien Seidenprotein vergleichen zu können, wurde ein von D. Kaplan (Tufts University, Medford, MA, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestelltes, vom MaSp1 der Spinne *Nephila clavipes* abgeleitetes synthetisches Konstrukt verwendet. In der Literatur wurde dieses Konstrukt aufgrund seiner Zusammensetzung aus 16 mit "A" bezeichneten DNA-Modulen "16A" genannt (Winkler *et al.*, 1999; Szela *et al.*, 2000). Um Verwechslungen mit ähnlichen Namen der in dieser Arbeit generierten Gene und Proteine zu vermeiden wird im Folgenden für dieses Konstrukt der Name NC1S (*Nephila clavipes*; MaSp1; synthetisches Derivat) verwendet. Das Expressionsplasmid pET30-NC1S kodierte für ein repetitives synthetisches Protein, das aus 16 Wiederholungen der in Abbildung 3.5 dargestellten Sequenz aufgebaut ist. Das Modul enthält ein Polyalanin-Motiv sowie mehrere GGX-Motive. Neben der Polyalanin-Sequenz wurden Methionine eingebaut, die nicht in der natürlichen Seidensequenz vorkommen und die als Assemblierungstrigger dienen sollten (siehe 1.5).

```

NC1S:           SGRGGLGGQGAGMAAAAAMGGAGQGGYGGGLGSQGT
MaSp1:         SGRGGLGGQGAGAAAAAA-GGAGQGGYGGGLGSQG
  
```

**Abbildung 3.5 Vergleich der Aminosäuresequenz eines Moduls aus dem Protein NC1S und einer Konsensussequenz, die aus Motiven zusammengestellt wurde, die im MaSp1 Protein der Spinne *Nephila clavipes* vorkommen. In die NC1S Sequenz wurden zwei Methionine integriert (rot), die als Redoxtrigger dienen sollten. Die für die Verknüpfung der DNA-Module verwendeten Restriktionserkennungssequenzen kodierten für ein zusätzliches Threonin (rot).**

Durch Vorarbeiten von Oliver Roßmann war bekannt, dass bei der bakteriellen Expression von NC1S in *E.coli* B BLR [DE3] im Schüttelkolben der größte Teil des Proteins in einer unlöslichen Form in der Zelle vorlag. Das für die von *Araneus diadematus* abgeleiteten synthetischen Proteine verwendete Reinigungsprotokoll konnte daher nicht verwendet werden. Stattdessen erfolgte der Aufschluss der Zellen, sowie die nachfolgende chromatographische Reinigung unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 8 M Harnstoff. Die Reinigung erfolgte in drei Schritten und beinhaltete eine Ionenaustauschchromatographie, eine Affinitätschromatographie und eine Gelfiltrationschromatographie. Die Ausbeuten an gereinigtem Protein waren mit

durchschnittlich 1 bis 5 mg pro Liter Kulturmedium vergleichbar mit den publizierten Werten ähnlicher Proteine, die im Labor von D. Kaplan hergestellt wurden (Prince *et al.*, 1995). Verglichen mit den Ausbeuten der von *Araneus diadematus* abgeleiteten synthetischen Seidenproteine ist dies jedoch eine geringe Ausbeute.

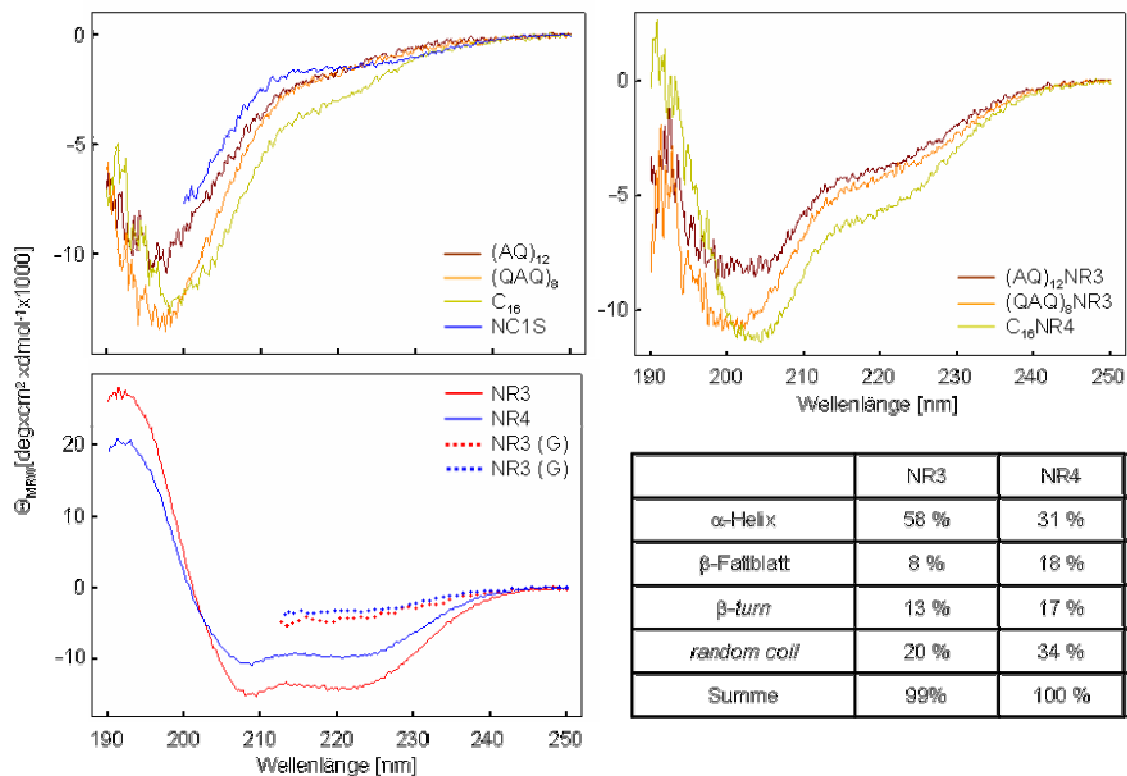
## 3.2 Charakterisierung des löslichen Zustandes

Um verstehen zu können, wie Seidenproteine während des Assemblierungsvorgangs die stabilen Strukturen der Seidenfäden bilden können, müssen deren Eigenschaften im löslichen Zustand erforscht werden. Dazu wurde bisher meist die natürliche Spinnlösung als Ganzes untersucht. Man kennt jedoch weder das genaue Verhältnis der beiden Proteinhauptkomponenten in dieser Lösung, noch besteht Klarheit welche sonstigen Komponenten darin enthalten sind. Die gewonnenen Daten konnten deshalb bisher nicht bestimmten Einzelkomponenten der Spinnlösung zugeordnet werden. Die vergleichende Charakterisierung der verschiedenen synthetischen Proteine sollte Aufschluss über die Funktion einzelner Proteinelemente geben.

### 3.2.1 Sekundärstruktur

Um die Sekundärstruktur der synthetischen Seidenproteine zu untersuchen, wurden Messungen des Circular dichroismus im fern-UV Bereich durchgeführt. Die rep-Proteine (QAQ)<sub>8</sub>, (AQ)<sub>12</sub> und NC1S zeigten dabei Spektren, die auf einen weitgehend unstrukturierten Zustand hindeuteten. Das CD-Spektrum des C<sub>16</sub> zeigt einen prinzipiell ähnlichen Verlauf wie das der anderen rep-Proteine, wobei jedoch eine etwas negativere Elliptizität bei 220 nm auf einen geringen strukturierten Anteil in der Proteinlösung schließen lässt (Abbildung 3.6). Programme wie CDNN (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn>) können dazu verwendet werden, anhand eines CD-Spektrums den Anteil der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente an der Gesamtstruktur zu berechnen. Das Programm verwendet dazu eine Datenbank globulärer Proteine mit bekannter Struktur und kann deshalb über die Strukturelemente nichtglobulärer Proteine nur begrenzt Auskunft geben (Andrade *et al.*, 1993). Da die prozentualen

Sekundärstrukturanteile jeweils individuell berechnet werden, kann deren Gesamtsumme als Indikator für die Qualität der Berechnung dienen. Im Falle der rep-Proteine ergab diese Summe Werte von 110% bis 130%. Damit kann diese Art der Auswertung für diese Proteine nicht verwendet werden. Beide NR-Proteine zeigten CD-Spektren, die auf einen hohen Sekundärstrukturgehalt hinwiesen (Abbildung 3.6). Diese Spektren ließen sich gut mit dem Programm CDNN auswerten. Trotz der großen Ähnlichkeit der beiden Proteine auf Ebene der Primärsequenz (81% ähnlich und 67% identisch) zeigte der Sekundärstrukturgehalt deutliche Unterschiede. Während die Struktur des größeren NR3 von  $\alpha$ -Helices dominiert wird, weist das kleinere NR4 ungefähr gleiche Anteile von  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblattstrukturen und *random coil* Regionen auf. Beide Proteine konnten in 6 M Guanidiniumhydrochlorid chemisch entfaltet werden (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6** Untersuchung der Seidenproteine durch Messung des Circular dichroismus im fern-UV Bereich. NR-3 und NR-4 wurden im nativen und denaturierten (G = 6 M GdmHCl) Zustand vermessen. In der Tabelle sind die mit dem Programm CDNN berechnete Sekundärstrukturanteile der NR-Domänen angegeben.



Die CD-Spektren der repNR-Proteine entsprechen in grober Annäherung einer Addition von entsprechend gewichteten Spektren der rep- und NR-Proteine (Abbildung 3.6). Man kann daher davon ausgehen, dass die repetitiven und nichtrepetitiven Regionen in den repNR-Proteinen eine ähnliche Sekundärstruktur besitzen wie im "getrennten" Zustand. Eine geringfügige gegenseitige Beeinflussung der beiden Komponenten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (siehe auch 3.2.2). Die repNR-Proteine, deren Primärstruktur den authentischen Proteinsequenzen am ähnlichsten ist, bestehen damit aus einem weitgehend unstrukturierten repetitiven Teil dem eine gefaltete, nichtrepetitive Proteindomäne carboxylterminal angefügt ist. Die Spektren der repNR-Proteine zeigen eine große Ähnlichkeit mit den Spektren die durch CD-Messungen mit natürlichen Spinnlösung erhalten wurden (Kenney *et al.*, 2002). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch nach chemischer Denaturierung während der Reinigung die Struktur der synthetischen Seidenproteine dem natürlichen Zustand in der Spinnlösung entspricht.

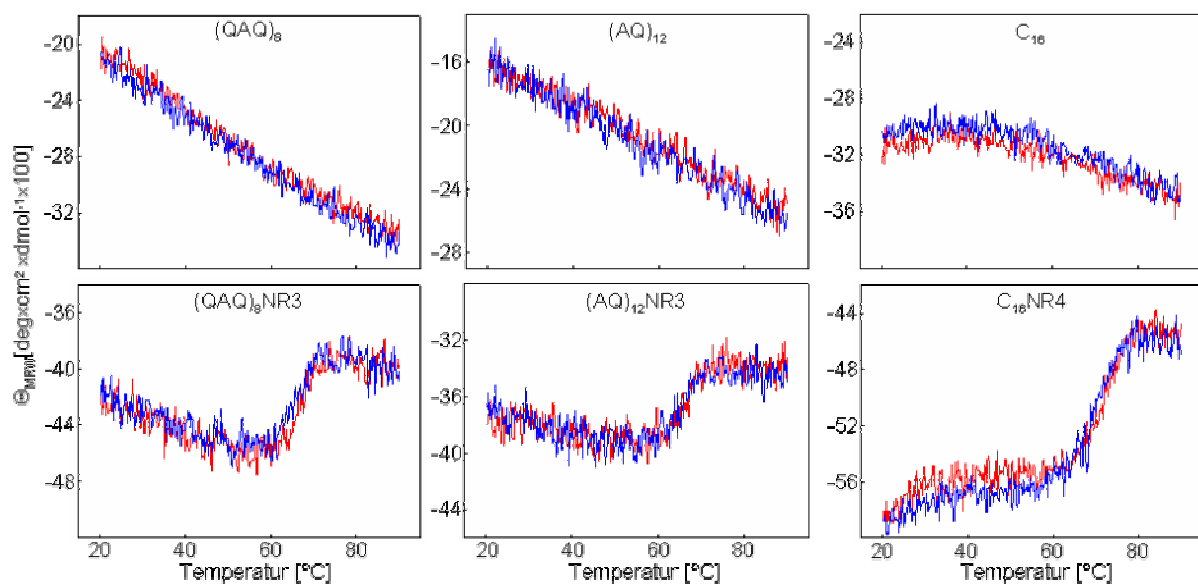
### 3.2.2 Thermische Stabilität

Bei der Erhitzung der rep-Proteine von 20°C auf 90°C wurden mittels CD-Spektroskopie keine kooperativen Temperaturübergänge beobachtet (Abbildung 3.7). Der vollständig reversible Abfall der Elliptizität von (QAQ)<sub>8</sub> und (AQ)<sub>12</sub> bei 220 nm mit zunehmender Temperatur ist vergleichbar mit dem Temperaturverhalten intrinsisch entfalteter Proteine (Kim *et al.*, 2000; Uversky *et al.*, 2001). Neben den in 3.2.1 beschriebenen CD-Spektren ist dies ein weiteres Indiz für einen geringen Sekundärstrukturgehalt dieser Proteine.

Der Verlauf der Elliptizität des C<sub>16</sub> bei zunehmender Temperatur weicht im Bereich zwischen 20°C und 45°C vom Verhalten der anderen rep-Proteine ab. Möglicherweise findet in diesem Bereich eine Entfaltung des bereits in 3.2.1 vermuteten strukturierten Anteils statt. Oberhalb 45°C zeigt das Protein ein den anderen Proteinen entsprechendes Verhalten.

Es konnte erwartet werden, dass der gefaltete Zustand der NR-Domänen ab einer bestimmten Temperatur in einen entfalteten Zustand übergeht. Entsprechend wurden kooperative thermische Übergänge beobachtet. Die Mittelpunkttemperaturen der Übergänge lagen bei 64°C (NR3) and 69°C (NR4) (Abbildung 3.11). RepNR-Proteine

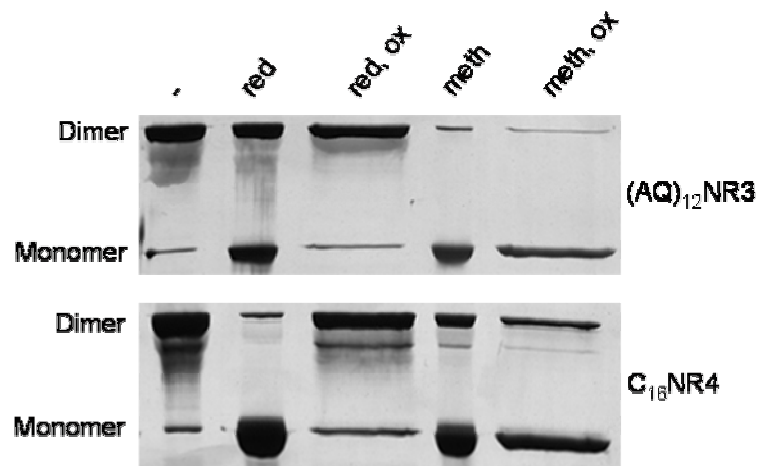
zeigten ebenfalls kooperative Entfaltung, wobei die Mittelpunkttemperaturen jeweils zwei bis drei Grad höher lagen als die der entsprechenden NR-Domänen. Dies deutet darauf hin, dass die thermische Entfaltung der repNR-Proteine im wesentlichen von den NR-Domänen bestimmt wird, wobei diese durch die Verknüpfung mit der repetitiven Sequenz geringfügig stabilisiert zu werden scheinen. Alle durch Temperaturerhöhung induzierten Veränderungen, die mittels CD gemessen wurden, waren vollständig reversibel. Dies erklärt die hohe Ausbeute an löslichem Protein, die nach Durchführung eines Hitzeschrittes während der Reinigung erzielt wurden. Alle Experimente wurden in mit Tris gepufferten Lösungen durchgeführt, da diese Puffersubstanz sowohl gute optische Eigenschaften aufweist, als auch wenig aggregationsfördernd auf die Seidenproteine wirkt (siehe 3.2.9). Aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit des pK-Wertes von Tris konnte angenommen werden, dass der pH-Wert der Lösungen durch die Erhitzung auf 90°C von pH 8 auf pH 6 sank (Sambrook & Russell, 2001). Temperaturübergänge, die in einer Phosphatlösung mit pH 8 durchgeführt wurden, deren pH Wert weitgehend temperaturunabhängig ist, zeigten gleiche Mittelpunkttemperaturen. Allerdings waren diese Übergänge, wahrscheinlich durch phosphatinduzierte Aggregation (siehe 3.2.9), nicht vollständig reversibel. Durch dieses Kontrollexperiment kann jedoch geschlossen werden, dass die thermische Entfaltung der Seidenproteine nicht durch den sich ändernden pH des Tris-Puffers beeinflusst wurde.



**Abbildung 3.7** Strukturänderung synthetischer Seidenproteine bei Temperaturänderung. Gemessen wurde die Elliptizität bei 220 nm während des Aufheizens (rot) und Abkühlens (blau) der Proteinproben.

### 3.2.3 Dimerisierung der NR-Domänen

Bei der Analyse von *E.coli* Zellysaten nach der Synthese von repNR und NR-Proteinen durch SDS-PAGE und Immunoblotting wurde beobachtet, dass diese unter nicht reduzierenden Bedingungen als Dimere vorlagen, während die Zugabe von Reduktionsmitteln wie  $\beta$ -Mercaptoethanol eine Aufspaltung in einzelne Monomere verursachte. Da jede NR-Domäne ein Cystein enthält und diese Aminosäure in den repetitiven Regionen nicht vorkommt, konnte daraus geschlossen werden, dass die Cysteine zweier NR-Domänen im Cytosol eine intermolekulare Disulfidbrücke ausbilden.



**Abbildung 3.8** Reduktion, Reoxidation und Carboxymethylierung von repNR-Proteinen analysiert mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. Die Proteine  $(AQ)_{12}NR3$  und  $C_{16}NR4$  wurden unbehandelt aufgetragen (-), mit 10 mM TCEP reduziert (red), nach Reduktion mit 100 mM GSSG reoxidiert (red, ox), mit 100 mM Iodacetamid carboxymethyliert (meth), und nach Carboxymethylierung versucht zu reoxidieren (meth, ox).

Um die Funktion dieser Disulfidbrücke untersuchen zu können, war es notwendig, Proteine im reduzierten Zustand mit Proteinen im oxidierten Zustand vergleichen zu können. Sowohl repNR- als auch NR-Proteine lagen nach der Aufreinigung in einem weitgehend oxidierten Zustand vor. Durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie TCEP, DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol konnten ein Grossteil der Proteine reduziert werden. Ein Überschuss des Oxidationsmittels GSSG wiederum führte zur Reoxidation der Proteine (in Abbildung 3.8 gezeigt anhand der repNR-Proteine  $(AQ)_{12}NR3$  und  $C_{16}NR4$ ). Um Proteine mit sehr negativen Redoxpotentialen im reduzierten Zustand zu halten, ist die permanente Anwesenheit eines Reduktionsmittels notwendig. Da Reduktionsmittel jedoch Messungen

beeinflussen können, wird der reduzierte Zustand der Cysteine häufig durch eine kovalente Modifikation arretiert, die eine erneute Ausbildung der Disulfidbrücke verhindert. Die Thiolgruppen der repNR- und NR-Proteine konnten entsprechend mit Iodacetamid carboxymethyliert werden. Die Effizienz der Carboxymethylierung konnte durch Zugabe von GSSG zu den Proteinen bestätigt werden, da diese sich im Gegensatz zu reduzierten Proteinen nicht reoxidieren ließen (Abbildung 3.8).

### 3.2.4 Redoxpotentiale der NR-Cystine

Das Redoxpotential im Cytosol von *E.coli* ist mit Werten zwischen -260 mV und -280 mV (Gilbert, 1990; Hwang *et al.*, 1992) in vielen Fällen stärker negativ als die Redoxpotentiale von Cystinen in Proteinen. Daher liegen die meisten Proteine im Cytosol in einem reduzierten Zustand vor (Kosower & Kosower, 1978; Gilbert, 1990). Der disulfidverbrückte Zustand der NR-Domänen ließ auf ein überdurchschnittlich negatives Redoxpotential der Cysteine in diesen Proteinen schließen. Um diese Vermutung zu überprüfen, sollte dieses Redoxpotential experimentell bestimmt werden. In der Literatur gibt es mehrere Beispiele für solche Bestimmungen, die mit unterschiedlichen Proteinen durchgeführt wurden. Dazu wurden auf die jeweiligen Proteine zugeschnittene Experimente durchgeführt, die unterschiedliche Redox-Puffersysteme und Methoden zur Detektion und Auswertungen des Redoxzustandes verwendeten (Loferer *et al.*, 1995; Aslund *et al.*, 1997; Inaba & Ito, 2002). Die Grundlage aller diese Versuche bildete jedoch die Nernstsche Gleichung, die einen Zusammenhang zwischen dem Redoxpotential in der Lösung und dem Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Protein herstellt. Für die Bestimmung des Redoxpotentials des Cystins in den NR-Domänen wurde entsprechend ein Versuchsprotokoll für eine Redoxtitration entwickelt. Bei Redoxtitrationen werden mit Hilfe eines Redox-Puffersystems in den Proteinlösungen bestimmte Redoxpotentiale eingestellt, was zu einer Einstellung eines Gleichgewichts zwischen der oxidierten und reduzierten Form des Proteins führt. Das Verhältnis dieser beiden Formen wird anschließend bestimmt und mit Hilfe der Nernstschen Gleichung ausgewertet. Bei der Wahl des Redox-Puffersystems ist dessen Standardpotential entscheidend. Gemäß der Nernstschen Gleichung weisen Redox-Puffer im Bereich ihres Standardpotentials die größte Pufferkapazität auf und nur in diesem Bereich können Redoxpotentiale mit hinreichender Genauigkeit eingestellt werden. Da das Potential der NR-Domänen

vermutlich unter -280 mV lag, wurde DTT als Puffersubstanz gewählt, das bei pH 7 ein Standardpotential von  $E_0' = -332$  mV aufweist (Cleland, 1964). Bei der Reduktion eines Cystins mit thiolhaltigen Reduktionsmitteln wird zunächst ein Cystein reduziert, während das andere ein gemischtes Disulfid ausbildet. Erst in einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des zweiten Cysteins durch eine weitere Thiolgruppe. Im Falle des DTT liegt die Gleichgewichtskonstante des zweiten Reaktionsschrittes um den Faktor  $10^4$  höher als die des ersten (Cleland, 1964). Dadurch verläuft die Reduktion quantitativ, was die Auswertung der Redoxtitration erleichtert, da mögliche Zwischenprodukte nicht berücksichtigt werden müssen. Durch unterschiedliche Verhältnisse von  $DTT_{red} / DTT_{ox}$  wurde das Redoxpotential von NR3- und NR4-Lösungen auf Werte zwischen -250 mV bis -340 mV eingestellt. Der Einfluss des NR-Cystins auf das Redoxpotential konnte aufgrund der geringen Konzentration (ca. 12  $\mu$ M) vernachlässigt werden. Nach Einstellung des Redoxgleichgewichtes wurde dieser Zustand durch Carboxymethylierung aller freien Thiolgruppen fixiert. Die Auswertung des Redoxzustandes in einzelnen Proben erfolgte durch die Auftrennung der reduzierten Proteine (Monomere) und oxidierten Proteine (kovalent verknüpfte Dimere) durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

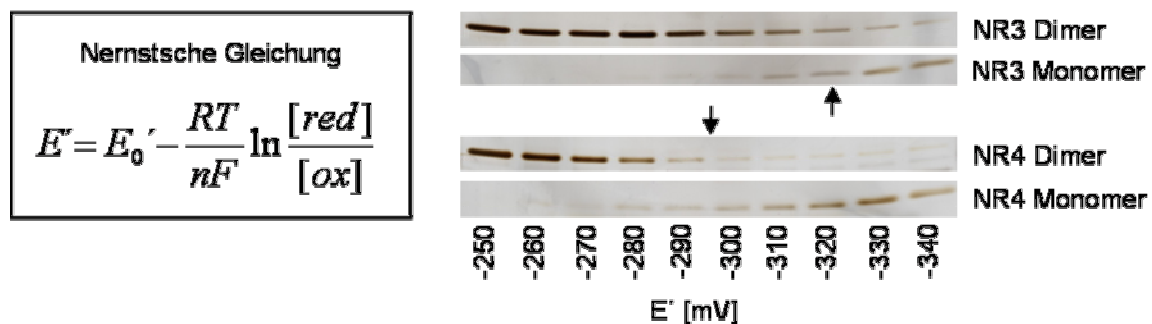


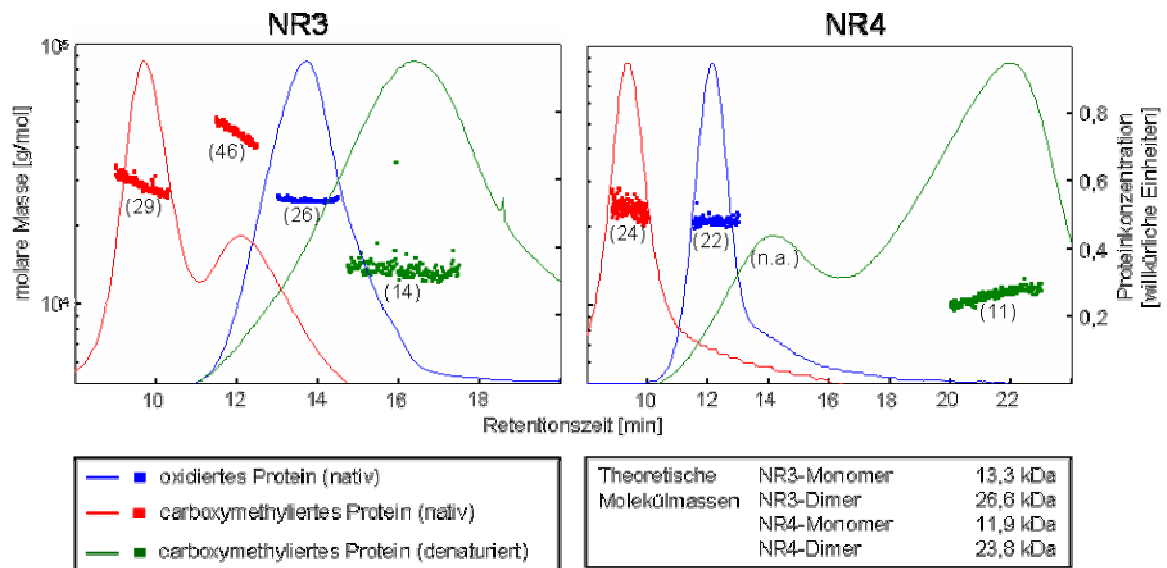
Abbildung 3.9 Redoxtitration von NR3 und NR4. Um die angezeigten Redoxpotentiale einzustellen, wurde mit Hilfe der Nernstschen Gleichung das Mischungsverhältnis von  $DTT_{red} / DTT_{ox}$  berechnet ( $E'$  = Redoxpotential bei pH 7,0;  $E_0'$  = Standardpotential bei pH 7,0; R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur; n = Anzahl der Elektronenübergänge, F = Faradaykonstante; [red], [ox] Konzentration der reduzierten bzw. oxidierten Spezies). Das Redoxpotential der Cystine in den NR-Domänen entspricht dem Potential der Probe in der zu gleichen Teilen oxidiertes und reduziertes Protein vorliegt (Pfeil).

Für eine exakte Bestimmung des Redoxpotentials wäre die quantitative Bestimmung des Verhältnisses von reduziertem zu oxidiertem Protein in jeder Probe und eine anschließende mathematische Auswertung der Daten notwendig. Da die Silberfärbung

jedoch keine genaue Quantifizierung der Proteinmengen erlaubt und andere quantitative Verfahren nicht durchgeführt werden konnten, wurden die Redoxpotentiale der NR-Domänen mit dieser Methode lediglich grob eingeschätzt. Dabei wurde entsprechend der Nernstschen Gleichung das Redoxpotential der Probe als Standardpotential der NR-Cystine angenommen, bei der die oxidierte und reduzierte Form der Proteine zu gleichen Teilen vorlag. Auf diese Weise wurden für NR3 das Potential -320 mV und für NR4 ein Wert zwischen -290 mV und -300 mV bestimmt (Abbildung 3.9).

### 3.2.5 Ursachen für das negative Redoxpotential der NR-Cystine

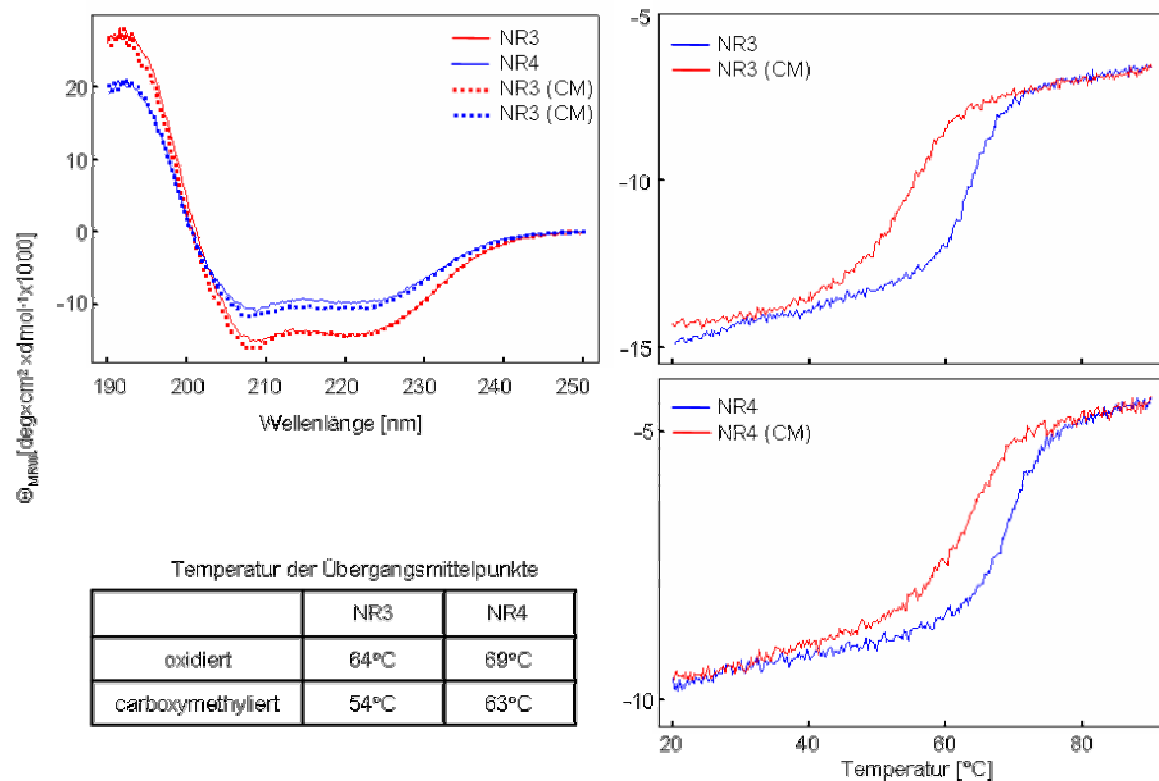
Das Redoxpotential der Cystine in den NR-Dimeren erlaubt Schlüsse auf deren Struktur. Solch stark negative Redoxpotentiale kommen dann zustande, wenn die Umgebung der Cysteine innerhalb des Proteins eine Oxidation der beiden Thiolgruppen, z.B. durch räumliche Nähe, begünstigt (Creighton, 1988; Holmgren, 1989). Im Falle der NR-Domänen kann demnach geschlossen werden, dass die gefalteten, nach der Translation zunächst reduziert vorliegenden NR-Domänen bereits Dimere ausbilden, die die Cysteine optimal für die Oxidation positionieren. Diese Hypothese wurde durch die Messung der molaren Massen von oxidierten und carboxymethylierten NR-Proteinen mittels Feldflussfraktionierung und statischer Lichtstreuung untersucht. Dabei wurden sowohl für die oxidierten als auch die carboxymethylierten NR-Proteine molaren Massen bestimmt, die mit den Werten der theoretisch berechneten Molekülmassen der Dimere gut übereinstimmten (Abbildung 3.10). Folglich bildeten sowohl oxidierte, als auch carboxymethylierte Proteine im gefalteten Zustand Dimere. Daneben konnte eine geringfügige Tetramerisierung des carboxymethylierten NR3 festgestellt werden. Um sicher zu gehen, dass die Dimerbildung der carboxymethylierten Proteine auf nichtkovalenten Bindungen basierte, wurden die carboxymethylierten Proben unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 8 M Harnstoff (NR3) bzw. 6 M GdmHCl (NR4) untersucht. Im Gegensatz zu nativen Bedingungen zeigten carboxymethylierte Proben hierbei molare Massen die den theoretischen Werten der jeweiligen Monomere entsprachen. Durch die Denaturierung der NR-Domänen wurden also die Interaktionen, die unter nativen Bedingungen zur Dimerisierung führten, zerstört.



**Abbildung 3.10** Analyse der NR-Proteine mittels Feldflussfraktionierung und statischer Lichtstreuung. Als Laufpuffer wurde 10 mM Tris (nativ), 8 M Harnstoff (NR3 denaturiert) und 6 M GdmHCl (NR4 denaturiert) verwendet. Die Elution der Proteine aus dem FFF-Kanal wurde durch Messung des Brechungsindex (nativ) bzw. der UV-Absorption (denaturiert) zeitlich verfolgt (durchgezogene Linie). Die Retentionszeiten der Proteine waren von den für jede Probe individuell optimierten Flussbedingungen abhängig und stehen damit nicht in direktem Zusammenhang mit der molaren Masse der Proteine. Aus der Konzentration und der Lichtstreuung wurde im Bereich der Peakmaxima jeweils für mehrere kurze Zeitintervalle die molare Masse der Proteine berechnet (Punkte). Die über den gepunkteten Bereich gemittelte molare Masse ( $M_w$ ) ist in Klammern angegeben [g/mol  $\times$  1000]. n.a. : Aufgrund des zu starken Rauschens des Lichtstreusignals nicht auswertbar.

### 3.2.6 Einflüsse der Disulfidbrücke auf die Struktur und Stabilität der NR-Domänen

Durch den Vergleich oxidiertes und carboxymethylierter NR-Proteine konnte der Einfluss der Disulfidbrücke auf strukturelle Eigenschaften und die thermische Stabilität der NR-Domänen untersucht werden. Die Messung von CD-Spektren zeigte dabei keine signifikante, durch die Carboxymethylierung bedingte Änderung der Sekundärstruktur. Die Disulfidbrücke scheint demnach keinen wesentlichen Beitrag zur Faltung der NR-Domänen zu leisten. Ein Einfluss der eingeführten Acetamidgruppe auf die Struktur der NR-Domänen konnte dabei ebenso ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu war die thermische Stabilität der carboxymethylierten NR-Domänen deutlich niedriger als die der oxidierten Proteine (Abbildung 3.11). Die Disulfidbrücken scheinen daher einen stabilisierenden Einfluss auf die NR-Domänen auszuüben.



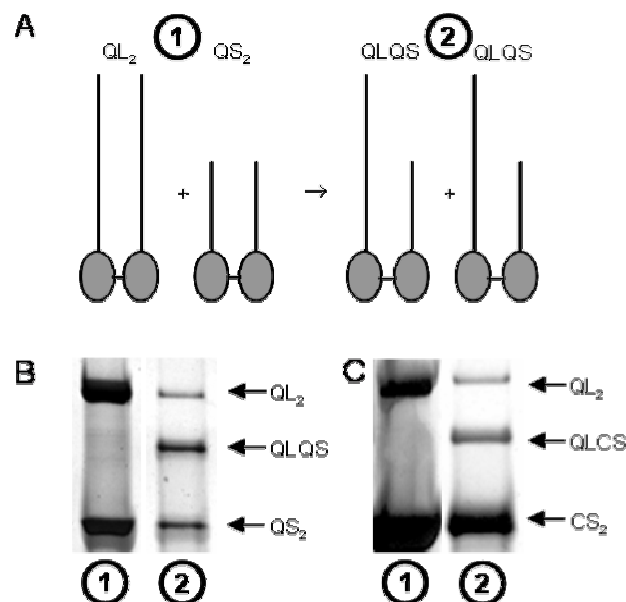
**Abbildung 3.11 Struktur und Stabilität oxidierter und carboxymethylierter (CM) NR-Proteine im Vergleich. Gemessen wurden Fern-UV CD-Spektren und thermische Entfaltung (molare Elliptizität bei 220 nm).**

### 3.2.7 Dynamik und Selektivität der NR-Dimerisierung

Das Cystein der NR-Domänen und dessen Position ist während der letzten 160 Millionen Jahren der Evolution konserviert geblieben (Sponner *et al.*, 2004a). Die kovalente Verknüpfung der im reduzierten Zustand gebildeten NR-Dimere scheint deshalb eine wichtige Funktion zu haben. Um Hinweise auf diese Funktion zu erhalten wurde versucht, weitere Unterschiede zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand zu finden. Oxidierte NR-Domänen stellen sowohl thermodynamisch als auch kinetisch stabile Dimere dar. Wie die Untersuchungen mit Feldflussfraktionierung und Lichtstreuung gezeigt hatten, befinden sich carboxymethylierte NR-Dimere ebenfalls in einem thermodynamisch stabilen dimeren Zustand. Um die kinetische Stabilität zu testen, wurde untersucht, ob ein dynamischer Austausch einzelner Monomere stattfinden kann. Dazu, wurden unterschiedlich lange Varianten der repNR-Proteine eingesetzt, die sich experimentell leicht voneinander unterscheiden ließen. Zu Beginn des Experiments wurde



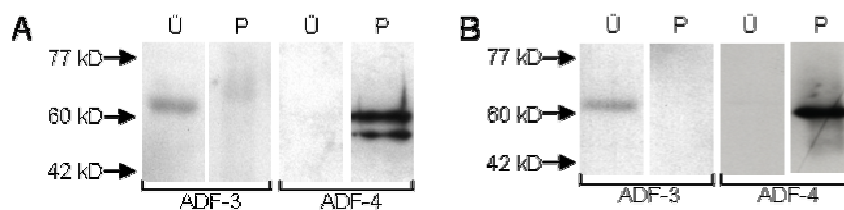
unbehandeltes  $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$  (QS) und  $(\text{QAQ})_{16}\text{NR3}$  (QL) gemischt. Beide Proteine lagen damit als oxidierte Homodimere vor (Abbildung 3.12). Anschließend wurden die Proteine reduziert und der Austausch der nichtkovalent verbundenen Dimere konnte stattfinden. Um den Dimerisierungszustand der Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt zu fixieren, wurden die Proteine anschließend reoxidiert und analysiert. Dabei zeigte sich, dass, während nichtreduzierte Proteine ihren stabilen homodimeren Status beibehielten, in der reduzierten Probe  $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$  /  $(\text{QAQ})_{16}\text{NR3}$  Heterodimere entstanden, und somit ein Austausch der NR-Domänen stattfand (Abbildung 3.12). Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen repNR-Proteinen erzielt. Bislang wurde in der Literatur kein direkter Nachweis einer Interaktion zwischen den beiden MAS-Proteinkomponenten beschrieben. Aufgrund der großen Ähnlichkeit von NR3 und NR4 könnte jedoch vermutet werden, dass diese in der Lage sind, Heterodimere auszubilden. Um diese Möglichkeit, sowie die Spezifität der Heterodimerisierung zu untersuchen, wurden in dem gleichen experimentellen Ansatz das ADF-3 analoge  $(\text{QAQ})_{16}\text{NR3}$  und das ADF-4 analoge  $\text{C}_{16}\text{NR4}$  (CS) eingesetzt. Auch hier konnte die Bildung eines  $(\text{QAQ})_{16}\text{NR3}$  /  $\text{C}_{16}\text{NR4}$  Heterodimers beobachtet werden. Auf diese Weise könnten demnach auch in der Spinne kovalent verknüpfte ADF-3 / ADF-4 Dimere entstehen.



**Abbildung 3.12** Austausch von NR-Domänen zwischen reduzierten Dimeren. (A) Schematische Darstellung: Homodimere unterschiedlich großer repNR-Proteine (z.B.  $\text{QL}_2 + \text{QS}_2$ ) werden gemischt (1) und reduziert. Findet ein Austausch statt, so entstehen Heterodimere ( $\text{QLQS}$ ) die anschließend durch Oxidation kovalent verknüpft werden (2). (B) Austausch zwischen den beiden ADF-3 analogen Proteinen QL und QS (C) Austausch zwischen dem ADF-3 analogen Protein QL und dem ADF-4 analogen Protein CS. Abkürzungen: QL:  $(\text{QAQ})_{16}\text{NR3}$ ; QS:  $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ ; CS:  $\text{C}_{16}\text{NR4}$ .

### 3.2.8 Löslichkeit

Um die hohen Proteinkonzentrationen der Spinnlösung erreichen zu können, müssen die Seidenproteine gut löslich sein. Um Faktoren zu bestimmen, die für diese Eigenschaft verantwortlich sind, wurde die Löslichkeit sowohl der authentischen als auch der synthetischen Seidenproteine bestimmt. ADF-3 lag in der Zelle in einer löslichen Form vor. ADF-4 konnte dagegen ausschließlich in der unlöslichen Fraktion der Zellkomponenten detektiert werden (Abbildung 3.13A). Wurden ADF-3 und ADF-4 gleichzeitig in Insektenzellen synthetisiert, lag ADF-3 ebenfalls ausschließlich in löslicher Form vor, während auch hier ADF-4 vollkommen unlöslich war (Abbildung 3.13B). In den Insektenzellen konnte also keine starke Interaktion zwischen den beiden Proteinen festgestellt werden.



**Abbildung 3.13** Löslichkeit von ADF-3 und ADF-4 nach Synthese in Sf9-Insektenzellen. Nach Lyse der Zellen wurden lösliche von unlöslichen Zellbestandteilen durch Sedimentation getrennt und durch Immunoblot im Überstand (Ü) und Pellet (P) nachgewiesen. (A) Unabhängige Synthese der einzelnen Proteine in getrennten Wirtszellen. Der Nachweis erfolgte jeweils mit einem  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-Antikörper. (B) Gleichzeitige Synthese von ADF-3 und ADF-4 in derselben Wirtszelle. Der Nachweis erfolgte mit einem S-Protein-Peroxidasekonjugat (ADF-3) und einem  $\alpha$ -T7-Antikörper (ADF-4).

Da in dieser Arbeit kein gereinigtes rekombinantes ADF-3 zur Verfügung stand, (siehe 3.1.1) konnte die Löslichkeit dieses Proteins *in vitro* nicht überprüft werden. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass rekombinantes ADF-3 *in vitro* in wässrigen Puffern ohne chaotropische Agenzien auch bei Konzentrationen bis zu 28 % w/v löslich ist (Lazaris *et al.*, 2002). Gereinigtes ADF-4 konnte *in vitro* dagegen nur durch stark chaotrope Agenzien wie 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidiniumthiocyanat in Lösung gehalten werden. Wurden diese durch Dialyse oder Verdünnung entfernt, aggregierte das Protein sofort.

Die maximale Konzentration, bei der rep- und repNR-Proteine noch löslich waren, wurde *in vitro* durch Aufkonzentrierung der Proteine bestimmt. Alle vom ADF-3

abgeleiteten, also aus den Modulen A und Q aufgebauten Proteine konnten unabhängig von der Anwesenheit einer NR-Domäne oder deren Redoxzustand, durch Ultrafiltration auf über 30 % w/v konzentriert werden, ohne dass dabei sichtbare Aggregate entstanden. Im Gegensatz dazu konnten die das C-Modul enthaltenden ADF-4 Derivate, lediglich auf 8% w/v ( $C_{16}$ ) und 9% w/v ( $C_{16}NR_4$ ) konzentriert werden. Die Löslichkeit der Seidenproteine wurde also ausschließlich durch die Komposition der repetitiven Regionen bestimmt und wurde nicht von den NR-Regionen beeinflusst. Bei weiterer Aufkonzentrierung von  $C_{16}$  und  $C_{16}NR_4$  nahmen Lösungen beider Proteine einen gelartigen Zustand an. Aufgrund der Ähnlichkeit dieses "Gels" mit aufkonzentrierten, aus  $C_{16}$  selbstassemblierten Nanofibrillen (siehe 3.3.1) wurde vermutet, dass dieser Zustand durch die Entstehung eines Nanofibrillennetzwerkes verursacht wurde.

Generell verhielten sich die Proteine in konzentrierten Lösungen ähnlich wie in verdünnten Lösungen. Die mittels Circular dichroismus-Spektroskopie untersuchte Sekundärstruktur der synthetischen Seidenproteine in 2%-igen oder 4%-igen Lösungen unterschieden sich zum Beispiel nicht von der in 0,015%-igen Proteinlösungen. Die natürliche Spinnlösung bildet während des Spinnvorgangs einen flüssigkristallinen Zustand aus (siehe 1.4). Um zu überprüfen, ob hohe Seidenproteinkonzentrationen eine hinreichende Bedingung für die Ausbildung einer flüssigkristallinen Phase darstellen, wurden hochkonzentrierte Lösungen der synthetischen Seidenproteine ( $C_{16}$  /  $C_{16}NR_4$ : 5% w/v;  $(AQ)_{12}$  /  $(AQ)_{12}NR_3$  /  $(QAQ)_8$  /  $(QAQ)_8-NR_3$ : 20 % w/v) im Lichtmikroskop zwischen zwei um  $90^\circ$  gegeneinander verdrehten Polarisatoren untersucht. Dünne Schichten flüssigkristalliner Lösungen zeigen unter diesen Bedingungen ein charakteristisches Muster (Collings, 2002). Da die synthetischen Seidenproteine ein vollkommen isotropes Verhalten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass zusätzliche Faktoren für die Ausbildung einer flüssigkristallinen Phase notwendig sind.

### 3.2.9 Aggregation der synthetischen Seidenproteine

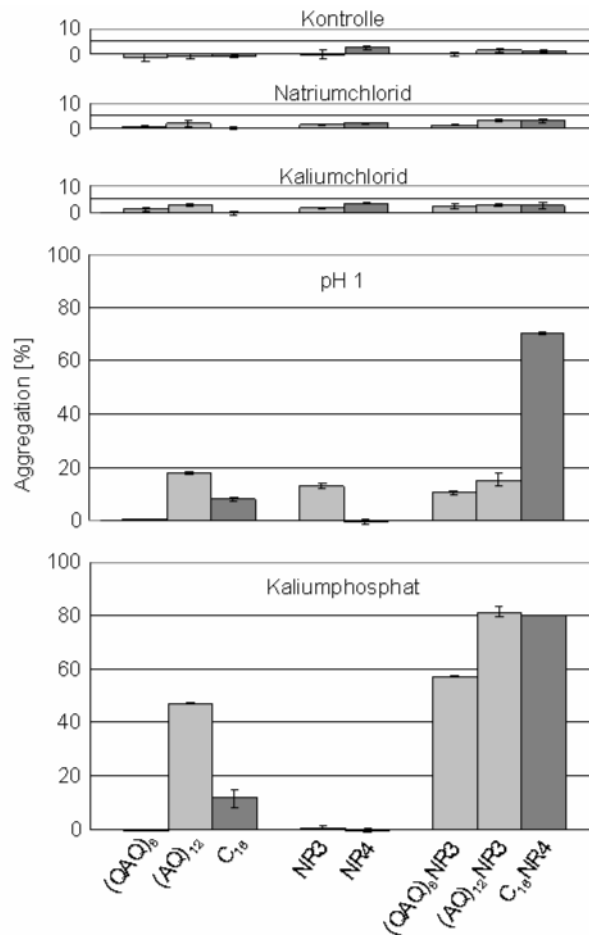
Es ist bekannt, dass bestimmte Faktoren, wie die Änderungen des pH-Wertes und bestimmter Ionenkonzentrationen, bei der natürlichen Assemblierung des Seidenfadens involviert sind. Dabei ist bis heute ungeklärt, wie diese Änderungen auf die Seidenproteine wirken. Dies sollte mit Hilfe der synthetischen Proteinvarianten untersucht werden. Bei der

natürlichen Seidenassemblierung spielen jedoch auch weitere Faktoren wie die Orientierung der Proteinmoleküle, sowie bestimmte Strömungsformen der Spinnlösung eine Rolle (siehe 1.4) die in dieser Arbeit experimentell nicht nachvollzogen werden konnten. Daher wurde anstelle der gerichteten Assemblierung die Aggregation von Proteinen in isotropen Lösungen untersucht. Keines der untersuchten Proteine zeigte eine signifikante Aggregation ( $< 5\%$ ) während der Inkubation einer 1 mg/ml Proteinlösung für eine Stunde in Tris-Puffer (Abbildung 3.14). Dies zeigte, dass die Proteine unter den Versuchsbedingungen intrinsisch löslich waren. Um herauszufinden, ob die Erhöhung der Ionenstärke die Aggregation der Proteine induzieren kann, wurden die Proteine mit 300 mM Natriumchlorid inkubiert. Es konnte jedoch keine erhöhte Aggregation beobachtet werden. In der Literatur wurde für 300 mM Kaliumchlorid eine spezifische Begünstigung der Aggregation von Seidenproteinen beschrieben (Chen *et al.*, 2002). Allerdings konnte in den hier durchgeführten Experimenten kein Einfluss von 300 mM KCl auf die Löslichkeit der synthetischen Seidenproteine beobachtet werden.

Die Konzentration von Phosphat wird in der Spinnlösung während der Passage durch den Spinnkanal erhöht. Im hier durchgeführten Assay führte die Inkubation von (QAQ)<sub>8</sub> in 300 mM Kaliumphosphat zu keiner Aggregation, während C<sub>16</sub> eine geringe (12%) und (AQ)<sub>12</sub> eine verstärkte Tendenz zur Aggregation zeigten (47%). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Natriumphosphat erzielt. Dies weist darauf hin, dass die Aggregation in beiden Fällen spezifisch durch Phosphat induziert wurde.

Als weiterer Faktor, der bei der natürlichen Seidenassemblierung eine Rolle spielt, wurde eine Ansäuerung der Spinnlösung beschrieben. Die genaue Funktion dieser Ansäuerung ist bis heute nicht bekannt. Allerdings erscheint es wahrscheinlich, dass dadurch negativ geladene chemische Gruppen protoniert werden, was zu einer Reduktion der negativen Ladung des Proteins führt. Die Phosphorylgruppen von Phosphoaminosäuren, die in der MAS gefunden wurden (Michal *et al.*, 1996), besitzen zum Beispiel pK<sub>A</sub>-Werte (Hoffmann *et al.*, 1994), die im Bereich der pH-Änderung liegen, die während des Spinnvorgangs stattfindet. Diese Modifikation könnte also eine wichtige Rolle bei der Seidenassemblierung spielen. Da allerdings in den synthetischen Seidenproteinen keine durch die natürliche pH-Änderung protonierbaren Gruppen vorhanden waren, wurde versucht die Ladungsreduktion durch die Protonierung der terminalen- und Seitenkettencarboxylgruppen zu imitieren. Dabei zeigten (QAQ)<sub>8</sub> und (AQ)<sub>12</sub>, die beide lediglich die terminalen Carboxylgruppen aufweisen, jeweils keine ( $< 5\%$ ) bzw. schwache (18%) Aggregation bei pH 1. Interessanterweise führte auch die

Protonierung der 16 Glutamate von C<sub>16</sub> nur zu einer schwachen Aggregation des Proteins (8%).



**Abbildung 3.14** Aggregation der synthetischen Seidenproteine nach 1 h Inkubation mit 300 mM der angegebenen Salze bzw. 100 mM HCl (pH1). Hellgrau: synthetische Derivate von ADF-3; dunkelgrau: synthetische Derivate von ADF-4.

Um den Einfluss der NR-Domänen auf die Aggregation zu untersuchen, wurden NR-Proteine und repNR-Proteine ebenfalls mit Phosphat und bei pH 1 inkubiert. Obwohl die beiden negativ geladenen Aminosäuren der NR-Domänen wahrscheinlich durch die Ansäuerung protoniert wurden, hatte dies keinen großen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der beiden Proteine (NR3: 13%; NR4: 0%). Die Ansäuerung von (QAQ)<sub>8</sub>NR3 and (AQ)<sub>12</sub>NR3 führte ebenfalls nur zu geringer Proteinaggregation die im Bereich der Werte der entsprechenden rep-Proteine lag (10% bzw. 15%). Interessanterweise zeigte dagegen C<sub>16</sub>NR4 eine stark ausgeprägte Aggregation (70%), obwohl keine der beiden Einzelkomponenten dieses Proteins C<sub>16</sub> und NR4 eine nennenswerte Aggregation zeigte. D.h. die Kombination dieser beiden Elemente führte zu einem Protein, das sehr sensitiv auf

die pH-Änderung reagierte. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Phosphat erzielt. Während weder NR3 noch NR4 in der Anwesenheit von Phosphat aggregierten (1% and 0%), führte die Kombination der NR-Domänen mit den repetitiven Regionen zu einer deutlich höheren Aggregation der repNR-Proteine verglichen mit den rep-Proteinen ((QAQ)<sub>8</sub>NR3: 57%, (AQ)<sub>12</sub>NR3: 81%, C<sub>16</sub>NR4: 80%).

Die Anwesenheit von NR-Regionen schien einen starken Einfluss auf die Aggregation der Seidenproteine auszuüben. Die Rolle der Disulfidbrücke bei diesem Einfluss wurde durch den Vergleich der Aggregation von oxidierten und carboxymethylierten repNR-Proteinen untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Aggregationsempfindlichkeit (Daten nicht gezeigt).

Neben den "natürlichen" Faktoren Phosphat und Ansäuerung wurde ein aggregationsfördernder Effekt auch bei Zugabe von Alkoholen wie Methanol oder Ethanol beobachtet (siehe auch 3.3.1). Methanol wurde als präzipitierendes Agens bereits für die Verspinnung von rekombinanten Seidenproteinen eingesetzt (Lazaris *et al.*, 2002; Arcidiacono *et al.*, 2002). Durch den Zusatz von diesen organischen Substanzen zu den Proteinlösungen wird die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels herabgesetzt. Dadurch werden polare Interaktionen zwischen Protein und Lösungsmittel geschwächt, was eine Zunahme von intermolekularen Interaktionen und damit der Aggregation bewirkt (Arakawa & Timasheff, 1985).

### 3.3 Assemblierung

Während des Assemblierungsprozesses wird aus einer wässrigen Proteinlösung innerhalb weniger Sekunden ein fester Faden geformt. Entsprechend der unterschiedlichen Modelle, die es für die Fadenstruktur gibt (siehe 1.3) sind verschiedene Mechanismen der Assemblierung vorstellbar. Um die homogene Struktur des *random coil* Modells zu erhalten (siehe 1.3), ist eine simultane Assemblierung der orientierten Proteinmoleküle innerhalb der flüssigkristallinen Lösung wahrscheinlich, ohne dass sich dabei größere Assemblierungsintermediate bilden. Dagegen lassen Seidenfäden, die dem LCE-Modell entsprechend aufgebaut sind (siehe 1.3), eine Beteiligung von Assemblierungsintermediaten wahrscheinlich erscheinen. Dabei könnten sich in der Spinnlösung zunächst Nanofibrillen bilden, die sich entlang der Fadenachse orientieren und anschließend zu

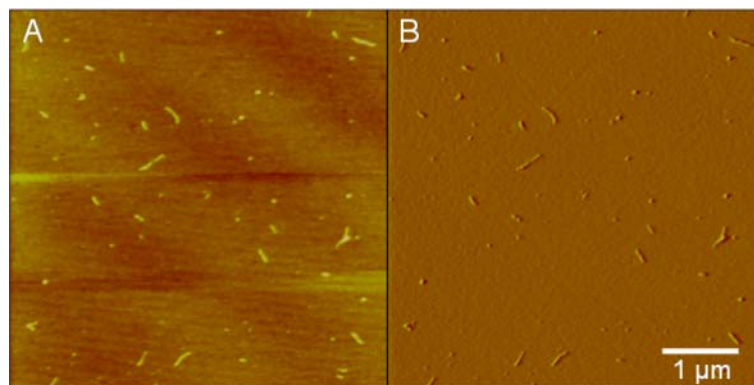
einem elastischen Netzwerk zusammenfügen. In diesem Zusammenhang stellte sich auch die Frage, ob es sich bei der Fadenbildung generell um einen Selbstassemblierungsmechanismus handelt. Dies würde bedeuten, dass die Information der Fadenbildung prinzipiell in den Seidenproteinen enthalten ist. Es könnte demnach möglich sein, dass sich ein Seidenfaden auch in verdünnten Proteinlösungen assembliert. Andererseits könnte die Proteinlösung auch als beliebig formbares Ausgangsmaterial dienen, das seine Form und Struktur allein durch den Spinnapparat und –prozess erhält. Um Antworten auf diese Fragen zu erhalten, wurde die Assemblierung der unterschiedlichen Seidenproteine eingehend untersucht.

### **3.3.1 Selbstassemblierung**

Selbstassemblierung bedeutet, dass ohne äußeres Einwirken aus Grundelementen übergeordnete Strukturen entstehen. Die Information für den Zusammenbau ist dabei in den Bausteinen enthalten. Um die Selbstassemblierungseigenschaften der Seidenproteine zu untersuchen, wurden verdünnte Proteinlösungen (0,25 mg/ml - 10 mg/ml jeweils in 10 mM Tris bei pH 8,0) mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Agenzien inkubiert, für die eine assoziationsfördernde Wirkung beobachtet worden war (siehe 3.2.9). Der Begriff Assoziation wird ab hier als Überbegriff für Assemblierung und Aggregation verwendet, die jeweils eine geordnete bzw. ungeordnete Form der Assoziation darstellen. Die Proteinlösungen wurden für unterschiedliche, von Stunden bis Tage dauernde, Zeiträume bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit mikroskopischen Techniken wie der Rasterkraftmikroskopie (AFM), der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) oder der Rasterelektronenmikroskopie (SEM) untersucht. Aufgrund der großen Anzahl der durchgeführten Experimente werden im Folgenden die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst dargestellt und anhand einiger typischer Beispiele veranschaulicht.

### ADF-3 Derivate

Grundsätzlich zeigten die vom Protein ADF-3 abgeleiteten synthetischen Seidenproteine eine geringe Tendenz zur Selbstassemblierung. Bei geringen Konzentrationen assoziationsfördernder Additiva (z.B. 100 mM Natriumphosphat) blieben die entsprechenden Proteine meist in Lösung oder assemblierten zu kurzen Nanofibrillen mit wenigen 100 nm Länge und einer mittels AFM bestimmten Höhe von 3 - 4 nm (Abbildung 3.15). Wurden die Konzentrationen der Additiva erhöht, so nahm der Anteil unspezifischer Aggregate zu, wobei keine höhere Tendenz zur Ausbildung fibrillärer oder anderer regelmäßiger Assemblate festzustellen war.



**Abbildung 3.15** Selbstassemblierung des ADF-3 Derivats (AQ)<sub>12</sub>. Eine 150 µg/µl Proteinlösung wurde 4 Tage in 100 mM Natriumphosphat inkubiert und anschließend mittels AFM analysiert. (A) Höhe (B) Auslenkung.

### ADF-4 und Derivate

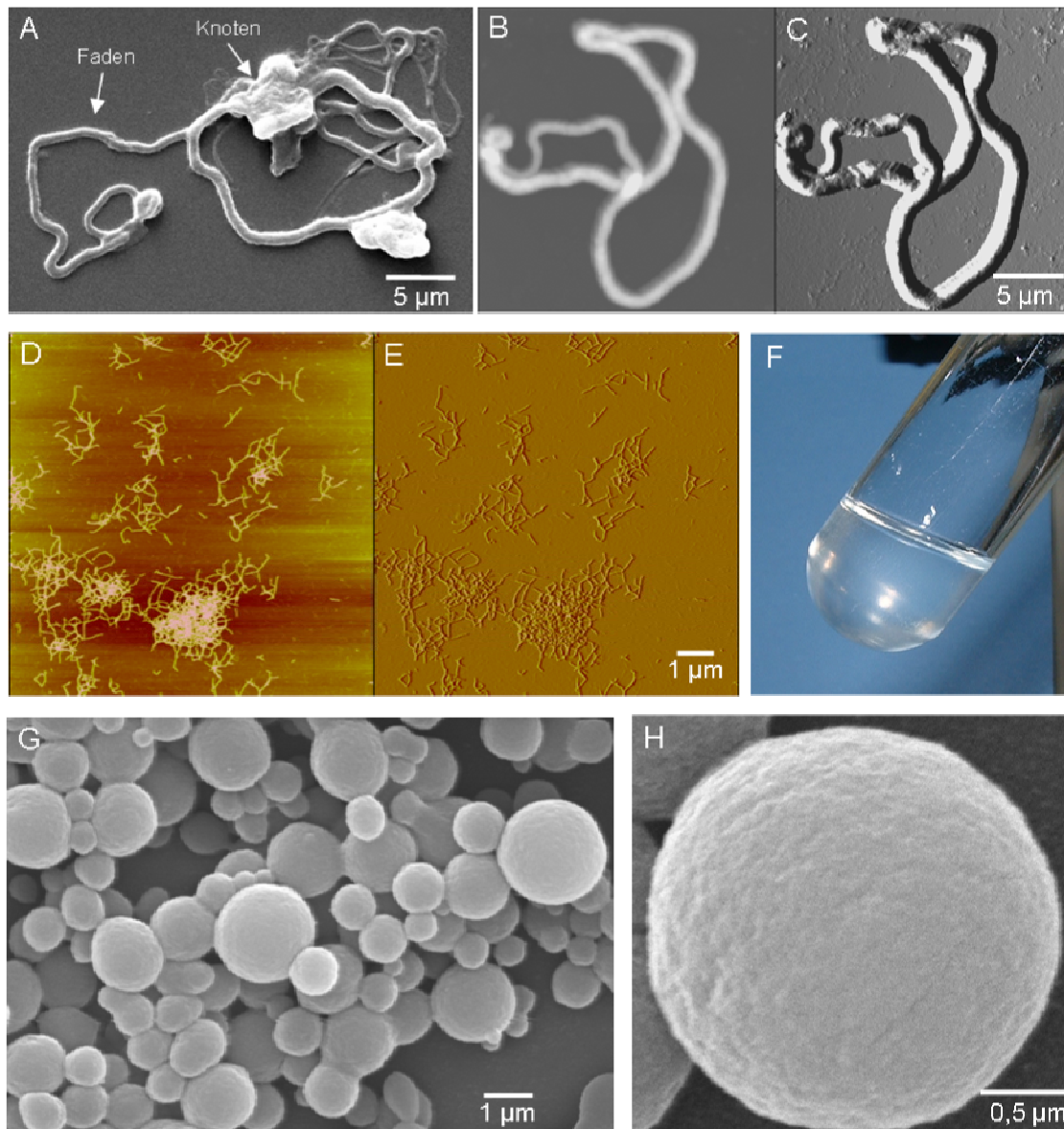
Das in Insektenzellen synthetisierte rekombinante ADF-4 assemblierte bereits im Cytosol der Zelle zu Filamenten mit einem Durchmesser von 0,2 - 1 µm, wobei der Durchmesser eines einzelnen Filaments jeweils konstant war. Die Filamente waren bis zu 100 µm lang und endeten häufig in Knoten oder Verzweigungen (Abbildung 3.16A-C). Neben den Filamenten konnten auch Nanofibrillen in den *adf-4* exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von U. Gat). In Zellen, die ADF-4 synthetisierten, an das kein His<sub>6</sub>-Tag angefügt war, entstanden Filamente gleicher Morphologie (nicht gezeigt). Ein Einfluss der Histidine auf das Assemblierungsverhalten



des ADF-4 konnte somit ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob die Fibrillisierung des ADF-4 eine intrinsische Eigenschaft des Proteins ist, wurden die Filamente in einem kleinen Volumen 6 M Guanidiniumthiocyanat gelöst. Anschließend wurde die Konzentration des Guanidiniumthiocyanat durch Verdünnen in 10 mM Tris pH 8,0 auf einen Wert unter 100 mM gesenkt. Das Protein assoziierte dabei sofort zu unspezifischen Aggregaten. Auch bei langsamer Entfernung des Denaturierungsmittels durch Dialyse konnte keine Bildung fibrillärer Strukturen detektiert werden.

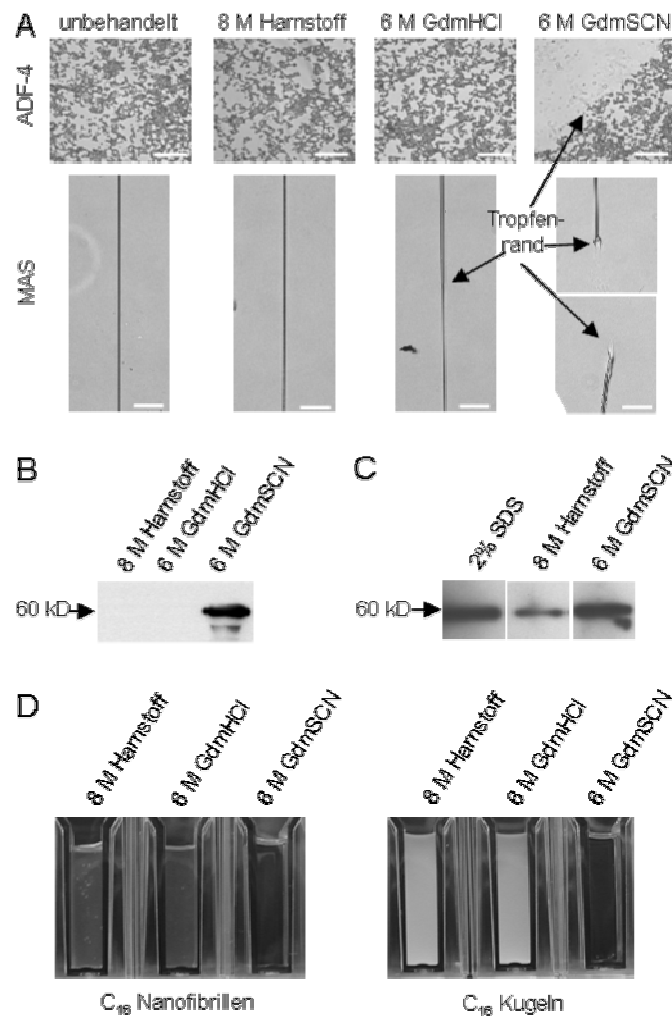
Das von der repetitiven Region des ADF-4 abgeleitete C<sub>16</sub> zeigte eine ausgeprägte Tendenz zur Selbstassemblierung. Bereits nach 2 Tagen bildeten sich in C<sub>16</sub>-Lösungen ohne assoziationsfördernde Zusätze Nanofibrillen. Bei der Untersuchung mehrerer C<sub>16</sub>-Präparationen ohne Additiva bzw. mit 5 oder 10% Methanol mittels AFM wurden ausschließlich einzelne oder zu Netzwerken zusammengesessene Nanofibrillen detektiert, die meist Längen von 0,5 µm - 2 µm aufwiesen (Abbildung 3.16D,E). Die mittels AFM bestimmte Höhe der Nanofibrillen lag dabei in der Regel zwischen 2 und 4 nm. Durch das Auftreten von nur einer Assemblierungsspezies konnte deren Menge durch einen in 3.2.9 verwendeten Sedimentationsassay bestimmt werden. Der Aggregatanteil entsprach in diesem Fall dem Anteil von Nanofibrillen. Durch die Quantifizierung der Nanofibrillen wurde ein deutlicher Einfluss der Proteinkonzentration auf die Fibrillisierungseffizienz nachgewiesen. Während in einer 1 mg/ml C<sub>16</sub>-Lösung ohne weitere Zusätze innerhalb von 10 Tagen lediglich ein Anteil von 11% in fibrillärer Form vorlag, konnte in einer 10 mg/ml Lösung unter gleichen Bedingungen ein Fibrillenanteil von 27% nachgewiesen werden. Durch den Zusatz von 5% Methanol zu der 10 mg/ml Lösung stieg der Anteil in der gleichen Zeit auf 95%, was zu einem gelartigen Zustand der Lösung führte (Abbildung 3.16F). Wurde das Protein C<sub>16</sub>NR4 unter gleichen Bedingungen wie C<sub>16</sub> untersucht, so konnte ein erheblich erhöhter Anteil an unspezifischem Aggregat nachgewiesen werden. Das Anfügen der NR4 Domäne an die repetitive Region schien demnach die Selbstassemblierung zu stören und die unspezifische Aggregation zu fördern.

Im Gegensatz zu der in verdünnten Proteinlösungen über Tage hinweg andauernden Fibrillisierung, konnte unter stark lyotropen Bedingungen die Entstehung einer vollständig anderen Assemblierungsform aus C<sub>16</sub>-Lösungen beobachtet werden. Durch Fällung des Proteins mit 20% Ammoniumsulfat aus einer 2 mg/ml Proteinlösung entstanden innerhalb von Sekunden regelmäßig geformte Kugeln von 0,5 bis 2 µm Durchmesser (Abbildung 3.16G,H).



**Abbildung 3.16** Assemblierungsformen von ADF-4 und abgeleiteten synthetischen Proteinen. (A-C) Gereinigte Filamente aus *adf-4* exprimierenden Insektenzellen (A) SEM (B) AFM-Höhe (C) AFM-Auslenkung. (D-F) 97% des Proteins einer 10 mg/ml C<sub>16</sub> Lösung mit 10% Methanol bildeten nach 10 Tagen Nanofibrillen (D) AFM-Höhe (E) AFM-Auslenkung (F) gelartiger Zustand der Fibrillenlösung. (G+H) Durch Zugabe von 20% Ammoniumsulfat assemblierte lösliches C<sub>16</sub> zu Kugeln. SEM.

Die mechanischen Eigenschaften der Nanofibrillen, Kugeln und Filamente konnten nicht bestimmt werden. Spinnenseiden weisen jedoch nicht nur hervorragende mechanische Eigenschaften auf, sondern besitzen auch eine außergewöhnlich hohe chemische Stabilität. Viele in der Proteinchemie verwendeten Denaturierungsmittel sind nicht in der Lage einen MAS-Faden aufzulösen (Lombardi & Kaplan, 1990).



**Abbildung 3.17** Chemische Stabilität der Assemblate aus ADF-4 und abgeleiteten C<sub>16</sub> im Vergleich mit natürlicher Spinnenseide (MAS). (A) ADF-4 Filamente und MAS-Fäden wurden mit den angegebenen Denaturierungsmitteln behandelt und mittels Lichtmikroskopie analysiert. Balken 25  $\mu$ m (B) ADF-4 Filamente und (C) *In vitro* gebildete ADF-4-Aggregate wurden mit den angegebenen Denaturierungsmitteln behandelt. Dadurch gelöstes Protein wurde mittels Immunoblot mit einem  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-Antikörper nachgewiesen. (D) C<sub>16</sub> Nanofibrillen (Gel) und Kugeln wurden in den angegebenen Denaturierungsmitteln resuspendiert und in Küvetten vor einen schwarzen Hintergrund fotografiert.

Genau wie die mechanischen Eigenschaften wird auch die chemische Stabilität durch die Struktur des Fadens und die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen bestimmt. Der Vergleich der chemischen Stabilität der verschiedenen Assemblierungsformen mit authentischer Spinnenseide könnte demnach Aufschluss über die Struktur in den Assemblaten geben. Deshalb wurde die chemische Stabilität sowohl der unterschiedlichen Assemblierungsformen von ADF-4 und C<sub>16</sub> als auch eines natürlicher MAS-Fadens der Spinne *Araneus diadematus* getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die

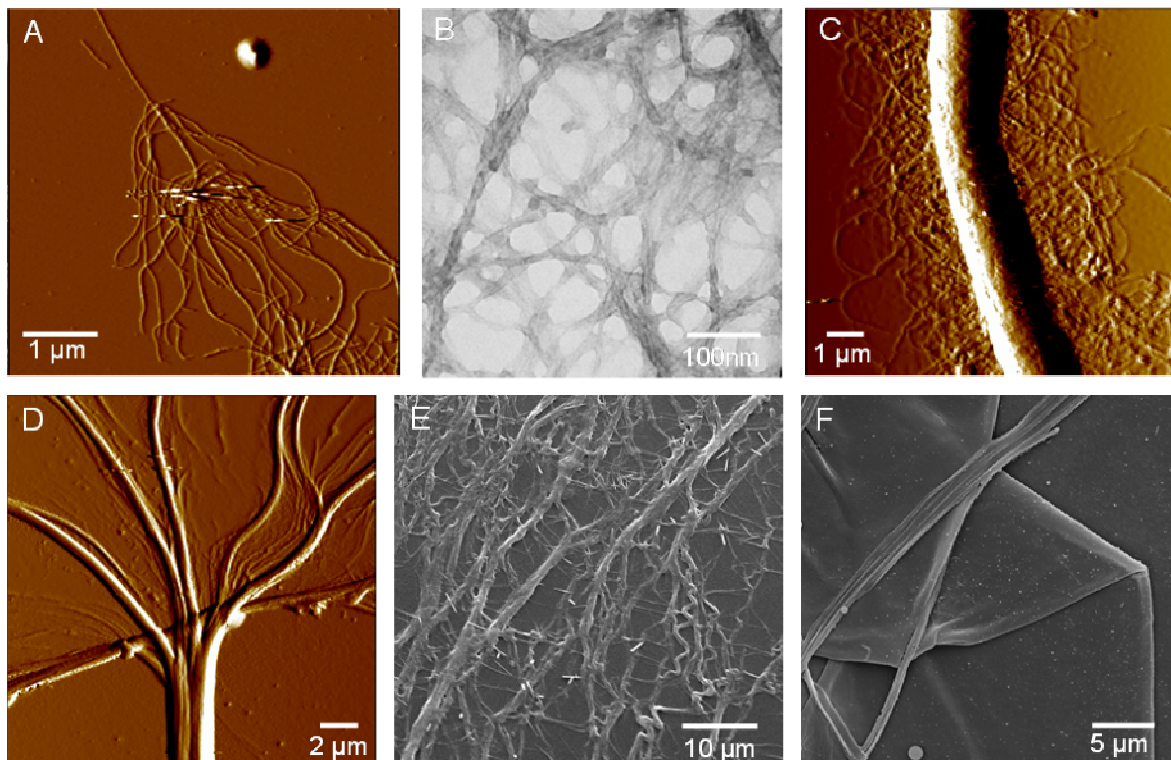
ADF-4-Filamente, die MAS, die C<sub>16</sub>-Nanofibrillen und die C<sub>16</sub>-Kugeln sowohl in Harnstoff als auch in Guanidiniumhydrochlorid stabil waren. Dagegen war Guanidiniumthiocyanat in der Lage diese Strukturen innerhalb weniger Sekunden aufzulösen (Abbildung 3.17). Lediglich die *in vitro* gebildeten amorphen ADF-4-Aggregate zeigten eine deutlich geringere chemische Stabilität und konnten bereits mit schwachen Denaturierungsmitteln wie SDS oder Harnstoff in Lösung gebracht werden (Abbildung 3.17C).

### NC1S

Wie C<sub>16</sub> zeigte auch das Protein NC1S eine starke Tendenz zur Selbstassemblierung. Auch hier konnte die Bildung von Nanofibrillen in 250 µg/ml Proteinlösungen ohne assoziationsfördernde Zusätze innerhalb von 4 - 7 Tage beobachtet werden. Wurde der Lösung 5 % Methanol oder Ethanol zugegeben, so beschleunigte sich die Fibrillenbildung. Die Nanofibrillen wiesen in der Regel Höhen von 2 - 7 nm auf und konnten bis 10 µm Länge erreichen (Abbildung 3.18A). In Anwesenheit von Phosphat entstanden dagegen kürzere und stark verzweigte Fibrillen (Abbildung 3.18B). Von T. Stromer wurden an der University of Sussex in Brighton, England Untersuchungen der NC1S-Fibrillen mittels Röntgenbeugung durchgeführt. Die Seidenfibrillen erzeugten demnach ein Beugungsmuster, das typisch für quer zur Fadenachse verlaufende β-Faltblattstrukturen ist (persönliche Mitteilung).

Neben den Nanofibrillen wurden in NC1S Präparationen gelegentlich auch Filamente mit Durchmessern bis zu 2 µm beobachtet (Abbildung 3.18C,D). Es konnten jedoch keine Bedingungen gefunden werden, die reproduzierbar zur Bildung dieses Filamenttyps führte. Oft waren mit diesen Filamenten Nanofibrillen assoziiert. Um zu überprüfen, ob die Nanofibrillen eine Vorstufe der Filamente darstellen, wurde versucht diese aus Nanofibrillen zu assemblieren. Dazu wurden aus einer nanofibrillenhaltigen Lösung unspezifische Aggregate durch Sedimentation für 5 min bei 2000 × g entfernt. Lösliches Protein und Proteinoligomere wurden mittels Dialyse mit einer 300 kDa *molecular weight cut off* Membran (Float-a-lyzer) entfernt. Die so gereinigten Nanofibrillen wurden wiederum unterschiedlichen assoziationsfördernden Bedingungen ausgesetzt. Eine

Assemblierung zu übergeordneten Strukturen konnte jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen beobachtet werden.



**Abbildung 3.18** Assemblierungsformen des NC1S. Die Proteinkonzentration in allen Assemblierungsansätzen betrug jeweils 250 µg/ml. Es wurden die folgende Zusätze, Inkubationszeiten und Analysemethoden verwendet: (A) 5% Methanol; 17 Tage; AFM-Auslenkung (B) 5% Methanol, 20 mM Kaliumphosphat; 24 h; TEM (C) 5% Methanol, 50 mM Natriumphosphat; 2 Tage; AFM-Auslenkung (D) 5% Ethanol, 50 mM Kaliumchlorid; 2 Tage; AFM-Auslenkung (E) 20 mM Kaliumphosphat; 6 h; SEM (F) 20 mM Kaliumphosphat; 3 Tage rotiert; SEM.

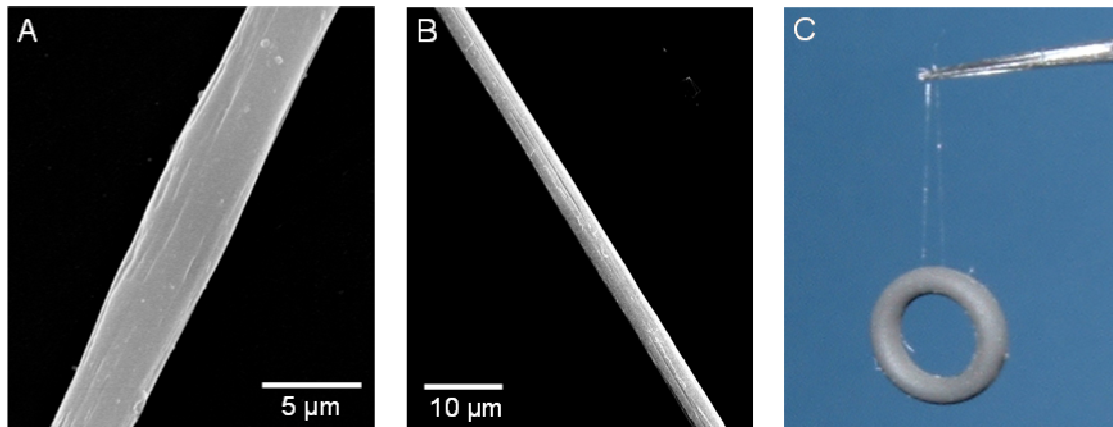
Als weitere morphologisch distinkte Assemblierungsform wurden Fibrillennetzwerke bestehend aus Fibrillen und Filamenten unterschiedlicher Durchmesser beobachtet (Abbildung 3.18E). Die Entstehung dieser Netzwerke schien an die Präsenz von Phosphat gekoppelt zu sein. Wie bei der Bildung von Filamenten konnten jedoch auch hier keine Bedingungen gefunden werden, die reproduzierbar zur Ausbildung dieser Assemblierungsform führte. Als weitere flächige Assemblierungsformen entstanden an der Grenzfläche zwischen Luft und Proteinlösung oftmals Filme, die sich unabhängig von der Anwesenheit von Additiven in der Lösung bildeten (Abbildung 3.18F).

### 3.3.2 Herstellung seidenähnlicher Fäden aus synthetischen Seidenproteinen

Neben der Selbstassemblierung wurde auch die Möglichkeit einer durch äußere Einflüsse induzierten Assemblierung eines Fadens aus Seidenproteinen getestet. Die Bedingungen dafür sollten dem natürlichen Spinnprozess so nahe wie möglich kommen. Aus diesem Grund wurden repNR-Proteine in hohen Konzentrationen als Spinnlösung eingesetzt ((QAQ)<sub>8</sub>NR3 / (AQ)<sub>24</sub>NR3: 20% w/v; C<sub>16</sub>NR4: 5% w/v). Als assoziationsförderndes Mittel wurde dem natürlichen Spinnprozess entsprechend Kaliumphosphat verwendet. Bei den Versuchen das Protein C<sub>16</sub>NR4 zu verspinnen stellte sich heraus, dass dieses Protein bei Kontakt mit einer 0,5 M oder 1 M Kaliumphosphatlösung sehr schnell assoziierte. Zwar konnten durch schnelle Injektion der Proteinlösung durch eine Kanüle in ein entsprechendes Fällungsbad Fäden gewonnen werden, jedoch handelte es sich hierbei wahrscheinlich aufgrund der fehlenden Orientierung der Proteinmoleküle um ein amorphes Aggregat in Form eines Fadens. Die so gewonnenen Fäden wiesen nach Trocknung entsprechend spröde Eigenschaften auf.

Lösungen des Proteins (AQ)<sub>24</sub>NR3 konnten dagegen mit einem einfachen Verfahren zu seidenähnlichen Fäden versponnen werden. Dazu wurden 5 - 10 µl Proteinlösung langsam in eine 1 M Kaliumphosphatlösung pH 7,0 pipettiert. Beim Austritt aus der Pipettenspitze bildete sich um den entstehenden Tropfen eine stabilisierende "Haut". Nach Inkubation des Tropfens Proteinlösung für ca. 30 sec im Phosphatpuffer konnte der Tropfen mit einer Pinzette aus dem Bad genommen werden. Nach einer weiteren Minute konnte mit einer zweiten Pinzette aus dem Tropfen so lange ein Faden gezogen werden, bis das Protein im Tropfen zu einem festen Proteinklumpen aggregierte. Bei einer ungefähren Spinnengeschwindigkeit von 2 cm/s wurden bis zu einem Meter lange Fäden mit einem relativ konstanten Durchmesser von 4 µm erhalten (Abbildung 3.19A,B). Die erhaltenen Fäden waren biegsam und konnten ein Gewicht von mindestens 18 mg tragen (Abbildung 3.19C). Bezieht man dessen Gewichtskraft auf die als kreisförmig angenommene Querschnittsfläche des Fadens, so entspricht dies einer Zugbelastung von ca. 0,01 GPa also einem Wert der um den Faktor 100 unter dem der natürlichen MAS liegt. Im Unterschied zu den selbstassemblierten Strukturen von ADF-4 und C<sub>16</sub> löste sich der (AQ)<sub>24</sub>NR3 Faden in 8 M Harnstoff und 8 M Guanidiniumhydrochlorid. Wurde versucht das Protein (QAQ)<sub>8</sub>NR3 mit der gleichen Methode zu verspinnen, so war die Assoziation der Proteine im Phosphatpuffer so langsam, dass sich keine stabilisierende "Haut" um den Proteintropfen bilden konnte, und dieser sich im Fällungsbad auflöste. Diese drei Beispiele

zeigten deutlich, dass die Assoziationsgeschwindigkeit der Proteine bei der Fadenbildung eine essentielle Rolle spielt. Die Proteine müssen langsam genug assemblieren, um ein Ausziehen des Fadens und damit eine Orientierung der Proteinmoleküle zu erlauben. Dagegen muss dieser Prozess schnell genug sein, um eine Assemblierung zu einem durchgehenden Faden zu ermöglichen.



**Abbildung 3.19** Aus einer 20% w/v (AQ)<sub>24</sub>NR3 Lösung gesponnener Faden. (A+B) SEM. (C) Die Zugfestigkeit des Fadens wurde durch Anhängen eines 18 mg Gummirings getestet.

## 4 Diskussion

### 4.1.1 Herstellung von Seidenproteinen

Für die Analyse natürlicher Seidenproteinsequenzen sollten authentische Genfragmente von *adf-3* und *adf-4* exprimiert werden. Da die bakterielle Expression der authentischen Seidengene ineffizient war, wurden in Kooperation mit S. Itah und U.Gat (Israel) die Gene erfolgreich im Baculovirus / Insektenzellsystem exprimiert. Für die Untersuchung der Funktionen einzelner Elemente der Seidenproteine, war zudem die Generierung unterschiedlicher Proteinvarianten und deren experimenteller Vergleich notwendig. Aufgrund der kritischen molekularbiologischen Handhabbarkeit authentischer Seidengene (siehe 1.5) wurde in dieser Arbeit eine Klonierungsstrategie entwickelt, die die Herstellung unterschiedlicher synthetischer Seidengene erlaubt. Basierend auf den beiden MAS-Proteinen der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* konnten verschiedene repetitive Proteine, NR-Regionen sowie Kombinationen der repetitiven und nichtrepetitiven Sequenzen generiert werden (Tabelle 3.1). Um zusätzlich den Vergleich zu Proteinen der MaSp1 Klasse ziehen zu können, wurde das ebenfalls synthetische Protein NC1S, ein Derivat des MaSp1 von *Nephila clavipes*, hergestellt.

Die Menge ADF-4, die pro Liter Insektenzellkultur gewonnen werden konnte, war vergleichbar mit der Ausbeute rekombinanter Spinnenseidenproteine, die mit anderen eukaryotischen Zellsystemen erzielt wurde (Lazaris *et al.*, 2002). Die Ausbeuten der synthetischen Proteine, die durch Anzucht der Bakterien im Schüttelkolben gewonnen wurden, lagen ebenfalls im Bereich der bisher für andere synthetische Proteine publizierten Werte (Winkler & Kaplan, 2000), konnten jedoch durch die Synthese bei hohen Zelldichten um mehr als das Zehnfache gesteigert werden. Daneben konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal eine für eingehende Untersuchungen ausreichende Menge der NR-Regionen hergestellt werden.



#### 4.1.2 Funktion der NR-Regionen

Obwohl die starke Konservierung der NR-Regionen im Laufe der Evolution dafür spricht, dass sie eine wichtige Funktion ausüben (Spohner, 2003), wurden bis heute kaum Untersuchungen mit diesen Domänen durchgeführt. Strukturuntersuchungen mittels Circular dichroismus-Spektroskopie zeigten, dass diese Regionen einen hohen Sekundärstrukturanteil aufweisen und daher als selbstständig faltende Proteindomänen aufgefasst werden können. Es konnte gezeigt werden, dass diese Domänen dimerisieren, wobei die darin enthaltenen Cysteine unter physiologischen Bedingungen zu Cystin oxidiert werden. Nur durch Reduktionsmittel mit einem Redoxpotential, das negativer als -320 mV (NR3) bzw. -300 mV (NR4) ist, konnten die Cystine reduziert werden. Aufgrund des stark negativen Redoxpotentials der NR-Cystine ist zu vermuten, dass sobald die Seidenproteine in einem oxidierten Zustand vorliegen, diese kovalente Verknüpfung nicht mehr rückgängig gemacht wird. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass MAS-Proteine in der Spinnndrüse in einem oxidierten Zustand vorliegen (Spohner *et al.*, 2004b). Die Zellkompartimente, die bei der Sekretion von Proteinen involviert sind, weisen ein vergleichsweise oxidatives Milieu mit einem Redoxpotential von -180 mV auf (Holmgren, 1989). Daher ist es wahrscheinlich, dass die NR-Domänen sofort nach der Synthese oxidiert werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass dabei prinzipiell Homodimere oder Heterodimere bestehend aus zwei unterschiedlichen MAS-Proteinen gebildet werden können. Über den Anteil von Homo- bzw. Heterodimeren in der Spinnlösung bzw. die Steuerung der Dimerisierung *in vivo* ist jedoch nichts bekannt.

Die Ausbildung der Disulfidbrücke zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Löslichkeit oder das Assemblierungsverhalten der repNR-Proteine. Möglicherweise ändern sich jedoch die Eigenschaften der beiden MAS-Komponenten, wenn sie in gemischten Dimeren kovalent miteinander verknüpft sind. Die Funktion der Disulfidverbrückung könnte demnach in der Fixierung eines bestimmten, für die Spinne optimalen Dimerisierungsstatus liegen.

Aus der Polymerchemie ist bekannt, dass die Zugfestigkeit von Fasern oder Kunststoffen von der Kettenlänge der eingesetzten Polymere abhängt (Crist, 1995). Die durch die NR-Domänen vermittelte kovalente Verknüpfung von zwei Seidenproteinen könnte durch die Verdopplung der Polypeptidkettenlänge zur Stabilität des Seidenfadens beitragen.

### 4.1.3 Löslichkeit der Seidenproteine

Die Kontrolle der Löslichkeit der Seidenproteine vor und während des Spinnvorgangs ist einer der wichtigsten Parameter während des Assemblierungsvorgangs. In der Spinnrinne sowie im Großteil des Spinnkanals müssen die Proteine stabil in einem löslichen Zustand vorliegen. Vorzeitige unspezifische Aggregationen könnten lokal zu Unregelmäßigkeiten in der Fadenstruktur und damit zu einer erheblichen Beeinträchtigung seiner Funktion führen. Aggregationen größeren Ausmaßes könnten durch Verstopfen der Spinnrinne oder des Spinnkanals sogar zu lebensbedrohlichen Situationen führen.

Um zu untersuchen, wodurch die Löslichkeit der Seidenproteine bestimmt wird, wurden sowohl die authentischen Seidenproteine als auch die synthetischen Konstrukte untersucht. Dabei zeigte sich, dass ADF-3 und die davon abgeleiteten Proteine hoch löslich waren. Im Gegensatz dazu zeigten ADF-4 und dessen Derivate eine deutlich geringere Löslichkeit (Tabelle 4.1).

	QAC <sub>5</sub>	AQ <sub>12</sub>	C <sub>16</sub>	NR3	NR4	(QAG) <sub>2</sub> NR3	(AQ) <sub>12</sub> NR3	C <sub>16</sub> NR4	ADF-3	ADF-4
geladene Aminosäuren (positiv / negativ) (A)	0 / 0	0 / 0	0 / 16	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 18	2 / 3	3 / 4
Hydrophobie (B)	-1.25	-0.99	-0.46	0.40	0.44	-0.92	-0.71	-0.29	-0.63	-0.237
normalisierte Hydrophobie und <i>boundary</i> Hydrophobie (C)	0.36 0.41	0.39 0.41	0.45 0.42	0.55 0.41	0.55 0.41	n.b.	n.b.	n.b.	0.40(D) 0.41(D)	0.46(D) 0.41(D)
Mittelpunkttemperatur der thermischen Entfaltung (E)	keine	keine	keine	64°C	69°C	67°C	66°C	72°C	n.b.	n.b.
Löslichkeit (w/v) (F)	> 30%	> 30%	8%	n.b.	n.b.	> 30%	> 30%	9%	> 28%	< 1%

**Tabelle 4.1** Ausgewählte Eigenschaften der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Seidenproteine. (A) Die Angabe der geladenen Aminosäuren bezieht sich auf die Seidensequenz exklusive der Peptidtags. (B) Die durchschnittliche Hydrophobie wurde nach Kyte & Doolittle (1982) berechnet. Hohe Hydrophobiewerte sind gleichbedeutend mit hoher Hydrophobizität der Proteine. (C) Die Hydrophobie wurde auf einen Wert zwischen 0 und 1 normalisiert. Die *boundary* Hydrophobie wurde nach Uversky (2000; 2002) berechnet. Wenn der normalisierte Hydrophobiewert unterhalb des *boundary* Wertes liegt, sollte es sich um ein intrinsisch entfaltetes Protein handeln. (D) Die Werte für ADF-3 und ADF-4 beziehen sich auf deren repetitive Region. (E) Die Übergangsmittelpunkttemperaturen wurden mittels CD-Spektroskopie bestimmt (siehe 3.2.1). (F) Die Werte für ADF-3 sind aus Lazaris *et al.* (2002) entnommen.

Da die NR-Domänen keinen Einfluss auf die Löslichkeit zeigten, muss diese von den Eigenschaften der repetitiven Regionen abhängig sein. Der lösliche Zustand der Seidenproteine ist kein thermodynamisch stabiler Zustand: Die Proteine zeigten unter allen gewählten Bedingungen bei hinreichend lang dauernder Inkubation eine Tendenz zur Assoziation. Außerdem konnten durch äußere Einflüsse wie Aufkonzentrierung oder Zugabe von Phosphat entstandene Aggregate oder Assemblate durch Aufheben der Assoziationsinduzierenden Einflüsse nicht wieder in den löslichen Ausgangszustand zurückversetzt werden. Die assoziierte Form der Proteine scheint demnach einen thermodynamisch stabileren Zustand darzustellen als die lösliche. Dies bedeutet, dass gelöste Seidenproteine sich in einem metastabilen Zustand befinden. Die Assemblierung erfolgt demnach über einen kinetischen Kontrollmechanismus.

Während die thermodynamische Löslichkeit von einigen globulären Proteinen noch ungefähr abgeschätzt werden kann (Arakawa & Timasheff, 1985), ist die Vorhersage einer kinetisch kontrollierten Proteinassoziation weitaus schwieriger. Für die Interpretation der Löslichkeit kann jedoch ein Konzept verwendet werden, das von Uversky et al. für die Vorhersage von intrinsisch entfaltenen Proteinen vorgestellt wurde. Mit empirischen Mitteln fand Uversky einen Zusammenhang zwischen dem Faltungszustand einer Polypeptidkette, der relativen Nettoladung und der durchschnittlichen Hydrophathie dieser Sequenz. Mit der relativen Nettoladung eines Proteins wird eine so genannte *boundary hydrophathicity* berechnet. Liegt die tatsächliche Hydrophathie über diesem Wert - ist das Protein also hydrophober als der Grenzwert - so handelt es sich laut dieser Theorie um ein gefaltetes Protein, wohingegen eine niedrigere reale Hydrophathie einen intrinsisch entfaltenen Zustand für das Protein vorhersagt (Uversky *et al.*, 2000; Uversky, 2002). Veranschaulicht bedeutet dies, dass die Aminosäureseitenketten eines hoch geladenen und hydrophilen Proteins Interaktionen mit dem Lösungsmittel gegenüber intramolekularen Wechselwirkungen bevorzugt und deshalb in einem entfaltenen Zustand verbleibt. Ersetzt man in diesem Konzept intramolekulare Wechselwirkungen durch intermolekulare Wechselwirkungen, so kann es gleichfalls für die Vorhersage der Seidenproteinassoziation verwendet werden. Für die Proteine(QAQ)<sub>8</sub>, (AQ)<sub>12</sub> und ADF-3, die eine sehr hohe Löslichkeit zeigten, wurde ein intrinsisch entfalteter Zustand vorhergesagt (Tabelle 4.1). Dazu passend zeigten CD-Messungen Resultate die typisch für intrinsisch entfaltete Proteine sind. Die Hydrophathie des C<sub>16</sub> liegt dagegen etwas über der *boundary hydrophathicity*. Mittels CD-Spektroskopie konnte eine im Vergleich zu den ADF-3 Derivaten stärkere Strukturausbildung festgestellt werden. Insbesondere bei hohen

Proteinkonzentrationen zeigte das C<sub>16</sub> eine erhöhte Tendenz zur Assoziation. Entsprechend der Vorhersage handelt es sich bei diesem Protein daher nicht mehr um ein typisches intrinsisch entfaltetes Protein. Für ADF-4 liegt die Hydrophathie deutlicher über der *boundary hydrophaticity* als beim C<sub>16</sub> dies der Fall ist. Damit übereinstimmend zeigte dieses Protein die höchste Tendenz zur Assoziation. Durch das Konzept von Uversky kann also ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Parametern Hydrophathie und Ladung und der Löslichkeit der Seidenproteine hergestellt werden, wobei aufgrund der geringen Gesamtladung der Proteine der Hydrophathie dabei wohl die entscheidende Rolle zukommt.

Während die Löslichkeiten der in dieser Arbeit analysierten Proteine damit gut erklärbar sind, lassen sich diese Erkenntnisse nicht vollständig auf den natürlichen Spinnprozess übertragen. In der Spinnlösung liegen sowohl ADF-3 als auch das *in vitro* unlösliche ADF-4 in einem stabilen, löslichen Zustand vor. Es müssen demnach weitere Mechanismen existieren, die die Löslichkeit der Seidenproteine *in vivo* beeinflussen. Für C<sub>16</sub> konnte gezeigt werden, dass dieses Protein nach der cytosolischen Synthese nicht signifikant modifiziert vorliegt (Helsen, 2003). Es kann davon ausgegangen werden, dass dies für die anderen verwendeten Seidenproteine ebenfalls zutrifft. Im Unterschied dazu durchlaufen die natürlichen Seidenproteine die zellulären Kompartimente, die bei der Sekretion von Proteinen involviert sind. Es ist wahrscheinlich, dass die Proteine dabei modifiziert werden und die Löslichkeit der Seidenproteine sich damit ändert. Neben der bereits erwähnten Phosphorylierung könnte dabei auch die Glykosylierung eine Rolle spielen. Es gibt inzwischen Hinweise, dass neben den Proteinen der äußersten Fadenschicht (siehe 1.2.1) auch die Proteine des Fadeninneren glykosyliert vorliegen (persönliche Mitteilung A. Spenner).

#### 4.1.4 Wirkung assoziationsfördernder Faktoren

Gleich wichtig wie die Löslichkeit bis kurz vor dem *internal draw down taper* ist die vollständige Assemblierung der Seidenproteine danach. Wird die MAS als Abseilfaden oder Sicherheitsleine verwendet, so erfährt der Seidenfaden direkt nach dem Ventil, das als Arretiermechanismus dient, die vollständige Zugbelastung, die durch das Eigengewicht der Spinne oder das Abfangen eines Sturzes auftritt. Ein unvollständig gebildeter Faden wäre kaum in der Lage dieser Belastung standzuhalten. Vermutlich liegt auch dem natürlichen

Spinnprozess ein kinetisch gesteuerter Assemblierungsmechanismus zugrunde. Dabei bewirken die Erhöhung der Kalium und Phosphatkonzentration, die Erniedrigung des pH-Wertes und mechanische Einflüsse wie die sog. Dehnströmung eine starke Beschleunigung der Proteinassemblierung. Beim Test der Wirkung dieser Faktoren auf synthetische Seidenproteine wurden unterschiedliche Effekte mit den verschiedenen Proteinen beobachtet. Die Neutralisierung der negativen Ladung von Carboxylgruppen durch Protonierung bewirkt entsprechend der in 4.1.3 angestellten Überlegungen eine Zunahme der intermolekularen Wechselwirkungen. Im Falle der Protonierung der 16 Glutamate des C<sub>16</sub> ist diese Veränderung jedoch nicht ausreichend, um eine signifikante Aggregation des Proteins auszulösen. Interessanterweise führte die Fusion von C<sub>16</sub> mit der NR4-Domäne, die selbst keinerlei Aggregation in Anwesenheit der Säure zeigte, zu einem Protein, das sehr sensitiv auf die Protonierung reagierte. D.h. in diesem Fall war die Kombination von Ladungsneutralisation in der repetitiven Region und der Anwesenheit der NR-Domäne notwendig, um eine effiziente Aggregation zu initiieren. Als Einschränkung dieses Ergebnisses muss erwähnt werden, dass, um den Effekt der Protonierung zu demonstrieren, ein pH-Wert gewählt wurde, der weit außerhalb der natürlichen Bedingungen in der Spinnlösung liegt. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass eine kleine Strukturänderung, die bei Ansäuerung der NR4-Domäne beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt) einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten des C<sub>16</sub>NR4 hatte.

Wie andere lyotrope Ionen bewirkt Phosphat eine Erhöhung der Oberflächenspannung des Wassers und fördert damit hydrophobe Interaktionen (Arakawa & Timasheff, 1985). Im Falle der Spinnenseiden ist es wahrscheinlich, dass die Zugabe von Phosphat Interaktionen zwischen den Polyalanin-Motiven initiiert und damit zur Proteinassoziation führt. Entsprechend war die Aggregation von (AQ)<sub>12</sub> stärker ausgeprägt als die von (QAQ)<sub>8</sub>, das im Vergleich ein Drittel weniger Polyalanin-Motive enthält. Allerdings zeigte C<sub>16</sub>, das Protein mit der größten Anzahl und Länge von Polyalanin-Motiven, nicht die stärkste Aggregation nach Phosphatbehandlung. Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Ergebnis könnte in der Abstoßung der Phosphationen durch die negativ geladenen Glutamatseitenketten liegen, die den lyotropen Effekt schwächen könnten. Obwohl beide NR-Domänen nicht auf die Zugabe von Phosphat reagierten, führte deren Verknüpfung mit repetitiven Regionen zu Proteinen die viel sensibler auf Phosphat reagierten als die jeweiligen Einzelkomponenten.

Sowohl bei der Ansäuerung, als auch bei der Phosphatzugabe scheint es, dass die NR-Domänen eine Reaktion der repetitiven Regionen verstärken. Da die NR-Domänen

selbst jeweils nur schwach auf die entsprechenden Faktoren reagierten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um einen unspezifischen Verstärkungsmechanismus handelt. Möglicherweise spielt dabei die NR-vermittelte Dimerisierung oder eine höhere Oligomerisierung der Seidenproteine eine Rolle.

#### 4.1.5 Assemblierungsverhalten der Seidenproteine

Wie bereits bei der Löslichkeit konnten auch bei der Assemblierung der Seidenproteine deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Proteinen gefunden werden. Von ADF-3 abgeleitete synthetische Proteine zeigten eine geringe Tendenz zur Selbstassemblierung, ließen sich aber gut zu Fäden verspinnen. Die Fäden zeigten dabei eine geringe chemische Stabilität. Sowohl ADF-4 und davon abgeleitete Derivate als auch das vom MaSp1 der Spinne *Nephila clavipes* abgeleitete NC1S zeigten eine höhere Tendenz zur Selbstassemblierung. Im Vergleich zu den ausschließlich repetitive Sequenzen enthaltenden C<sub>16</sub> und NC1S zeigten die Proteine C<sub>16</sub>NR4 und ADF-4, die eine carboxylterminale NR-Domäne beinhalteten, dabei eine vergleichsweise höhere Tendenz zur Ausbildung amorpher Aggregate. ADF-4 assemblierte zum Beispiel lediglich unter den besonderen Bedingungen der cytosolischen Synthese in Insektenzellen zu regelmäßig geformten Strukturen. Bei der Interpretation des Einflusses der NR-Regionen auf die Selbstassemblierungseigenschaften der Seidenproteine im Hinblick auf die natürliche Seidenassemblierung müssen die Proportionen der rekombinanten und natürlichen Proteine berücksichtigt werden. Während die NR-Domäne ca. einem Fünftel der rekombinanten Proteine entspricht, macht diese Domäne weniger als 4% der Sequenz eines natürlichen Proteins mit einem angenommenen Molekulargewicht von 320 kDa (siehe 1.2.2) aus. Die Selbstassemblierungseigenschaften der natürlichen Proteine entsprechen damit wahrscheinlich mehr den Eigenschaften der rekombinanten Proteine, die ausschließlich repetitive Sequenzen enthalten.

Die Proteine NC1S und C<sub>16</sub> zeigten eine ausgeprägte Tendenz zur Bildung von Nanofibrillen. Für die Geschwindigkeit der C<sub>16</sub>-Fibrillisierung konnte dabei eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden. Die quantitative Fibrillisierung einer 1%-igen C<sub>16</sub>-Lösung dauerte mehrere Tage. Dagegen verlief der gleiche Vorgang bei genügend hohen Proteinkonzentrationen wahrscheinlich innerhalb weniger Minuten oder

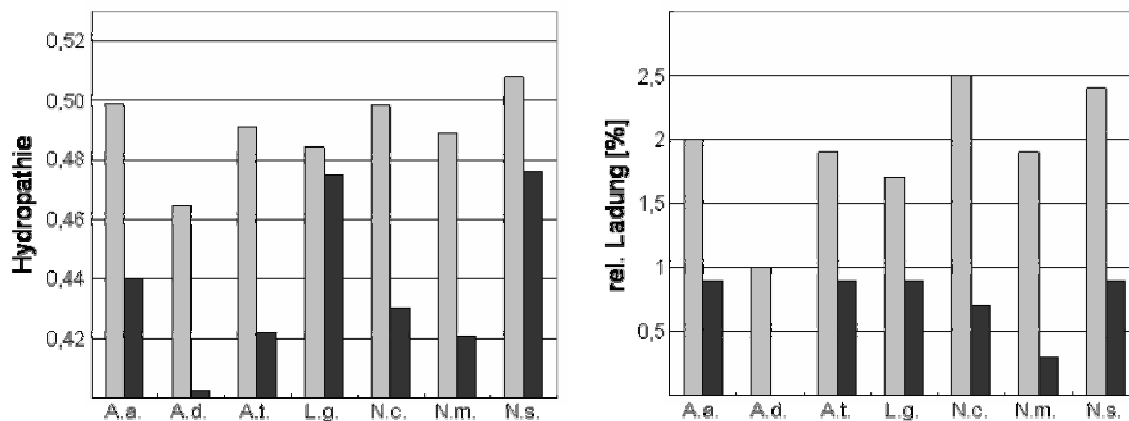
Sekunden (siehe 3.2.8). Diese *in vitro* gewonnenen Daten weisen also darauf hin, dass die Bildung von Nanofibrillen in den kurzen Zeiträumen möglich ist, in denen die Assemblierung der Spinnenseide stattfindet. Eine Funktion der beobachteten Nanofibrillen als Grundbaustein eines *liquid crystal elastomer* (Knight & Vollrath, 2002) ist jedoch unwahrscheinlich. Diesem Modell entsprechend müssten die  $\beta$ -Faltblätter innerhalb der Fibrillen parallel zu deren Achse ausgerichtet sein. Röntgenbeugungsexperimente von T. Stromer zeigten jedoch, dass NC1S-Nanofibrillen  $\beta$ -Faltblätter enthalten, die quer zur Fibrillenachse verlaufen.

Im Randbereich des Spinnkanals wurden wenige Millimeter vor dem *internal draw down taper* Nanofibrillen gefunden (Kenney *et al.*, 2002). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass während in der Spinnlösung beide MAS-Komponenten homogen verteilt vorliegen, der Randbereich des Fadens bei *Nephila clavipes* ausschließlich das Protein MaSp1 enthält. Der Fadenkern ist wiederum aus beiden MAS-Komponenten aufgebaut (Sponner, 2003). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für die Assemblierung des Seidenfadens eine Theorie erstellt (Sponner, 2003). Durch die Initiation der Assemblierung des MaSp1 am Rand des Spinnkanals assembliert diese Komponente und verdrängt das noch lösliche MaSp2 sowie löslich verbliebenes MaSp1 in die Kanalmitte. Durch den *internal draw down* assemblieren schließlich auch diese Proteine (Sponner, 2003). Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Assemblierungseigenschaften der unterschiedlichen Seidenproteine lassen darauf schließen, dass diese für den Assemblierungsvorgang der Spinne *Nephila clavipes* erstellte Theorie auch auf *Araneus diadematus* übertragen werden kann. ADF-4 ist als schnell assoziierende Komponente in der Lage innerhalb kurzer Zeit zu assemblieren. Wie bei der Coexpression in Insektenzellen gezeigt, kann dabei ADF-3 löslich bleiben. In der Spinne könnte so ADF-3 aus der äußeren Fadenschicht verdrängt werden.

Bei der Behandlung von MAS-Seidenfäden mit denaturierenden Agenzien wie 8 M Harnstoff löst sich ein Teil des Fadeninneren, während eine chemisch stabilere Außenhaut zurückbleibt (Sponner, 2003). Auch diese Beobachtungen decken sich mit der experimentell bestimmten hohen chemischen Stabilität der ADF-4- bzw. C<sub>16</sub>-Assemblate und der geringeren Stabilität eines (AQ)<sub>24</sub>NR3-Fadens, die nach diesem Modell dem Äußeren Mantel und dem inneren Kern eines natürlichen Seidenfadens entsprechen.

#### 4.1.6 Artübergreifende Gemeinsamkeiten der Seidenassemblierung

Obwohl ADF-3 und ADF-4 bisher der gleichen Kategorie von MAS-Proteinen zugeordnet wurden, zeigten die Löslichkeits- und Assemblierungsexperimente grundsätzlich unterschiedliche Eigenschaften zwischen den beiden Proteinen und deren abgeleiteten Konstrukten. Dabei hängt zumindest die Löslichkeit direkt mit der durchschnittlichen Hydrophobie der Proteine zusammen. Betrachtet man sowohl die Hydrophobie als auch die durchschnittliche Ladung von MAS-Proteinen verschiedener netzbauender Spinnenarten, so erkennt man eine generelle Tendenz in der Verteilung dieser Parameter, obwohl die absoluten Werte der Hydrophobie und Ladung bei den einzelnen Arten unterschiedlich sind und auch die Differenzen dieser Parameter zwischen den beiden Proteinkomponenten variieren (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1** Vergleich der repetitiven Regionen publizierter MAS-Komponenten einiger *araneoider* Spinnenarten. Die Hydrophobie wurde nach Kyte & Doolittle (1982) berechnet und auf einen Wert zwischen null und eins normalisiert; hohe Hydrophobiewerte sind gleichbedeutend mit hoher Hydrophobizität der Proteine. Die relative Ladung entspricht dem prozentualen Anteil aller geladenen Aminosäuren. *A.a.*: *Argiope aurantia*; *A.d.*: *Araneus diadematus*; *A.t.*: *Argiope trifasciata*; *L.g.*: *Latrodectus geometricus*; *N.c.*: *Nephila clavipes*; *N.m.*: *Nephila madagascariensis*; *N.s.*: *Nephila senegalensis*.

MaSp1 bzw. ADF-4 Proteine zeigen im Allgemeinen eine relativ hohe Hydrophobizität und einen Anteil von mindestens einem Prozent geladener Aminosäuren, während die entsprechenden MaSp2 bzw. ADF-3 Partnerproteine hydrophiler sind und weniger als ein Prozent Ladungsanteil besitzen. Interessanterweise zeigen die beiden Proteine NC1S und C<sub>16</sub>, die nach dieser Unterscheidungsmethode beide zur Gruppe der "hydrophoben geladenen" MAS-Proteine gehören ein sehr ähnliches



Assemblierungsverhalten, was darauf hindeutet, dass ihnen - in unterschiedlichen Spinnenarten - eine ähnliche Funktion bei der Fadenassemblierung zukommt. Es scheint somit wahrscheinlich, dass alle *araneoiden* Spinnenarten einen ähnlichen Assemblierungsmechanismus aufweisen, bei dem zwei Komponenten mit unterschiedlicher Hydrophobizität und Ladung spezifische Funktionen erfüllen (vergleiche 4.1.5).

#### **4.1.7 Herstellung neuer Materialien**

Die Generierung eines zugfesten und elastischen Fadens oder anderer Materialien ist letztendlich das Ziel vieler Forscher, die an Spinnenseide arbeiten. Eine wichtige Voraussetzung dafür konnte in dieser Arbeit mit der Etablierung des bakteriellen Expressionssystem geschaffen werden. Die Ausbeuten von bis zu 0,6 g / Liter zeigten, dass das *Upscaling* der Proteinsynthese und Reinigung möglich ist. Zusammen mit der kostengünstigen Reinigung durch Hitzedenaturierung und Ammoniumsulfatfällung stellt dieses Verfahren einen ersten Schritt in Richtung wirtschaftlich rentabler Produktion von rekombinanten Spinnenseidenproteinen dar. Durch die Untersuchung der Wirkung assoziationsfördernder Agenzien auf die unterschiedlichen Seidenproteine wurden zudem die Grundlagen für die Entwicklung einer Spinnmethode geschaffen, die auf den Einsatz nichtnatürlicher Fällungsmittel wie Methanol, Aceton etc. verzichtet. Stattdessen wurde für die Initiierung der Proteinasssemblierung Phosphat verwendet, das auch beim natürlichen Spinnprozess eine bedeutende Rolle spielt. Mit diesem Verfahren konnten zum ersten Mal aus synthetischen Seidenproteinen Fäden gewonnen werden, die eine nennenswerte Stabilität zeigten.

## Zusammenfassung

Die Seide, die Spinnen als Rahmen ihrer Netze und als Abseilfaden verwenden, ist ein faszinierendes, aus Proteinen aufgebautes Material, das eine Kombination aus Zugfestigkeit und Elastizität aufweist, die von keinem industriell gefertigten Material erreicht wird. Inzwischen weiß man, dass diese Eigenschaften durch eine semikristalline Fadenstruktur bedingt sind: Kristalline Regionen tragen zur Zugfestigkeit bei und sind in einer amorphen Matrix eingebettet, die für die elastischen Eigenschaften verantwortlich gemacht wird. Dabei besteht ein enger Zusammenhang zwischen dieser Struktur und bestimmten Aminosäuremotiven, die in den Spinnenseidenproteinen vorkommen. Neben der Primärstruktur spielt auch der Spinnprozess für die richtige Assemblierung der Seidenproteine eine wichtige Rolle. Während einige Faktoren bekannt sind, die bei diesem Prozess involviert sind, weiß man wenig über den molekularen Mechanismus, der zur Konvertierung von hoch löslichen Proteinen in der Spinnlösung zu einem unlöslichen Faden führt. Ebenso ist wenig über die unterschiedlichen Funktionen der beiden Hauptproteinkomponenten bzw. einzelner Proteinelemente bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung grundlegender Eigenschaften löslicher Spinnenseidenproteine. Für die systematische Untersuchung der Funktion einzelner Proteinbereiche wurden authentischen Gensequenzen und synthetische Seidene gene verwendet. Damit konnten unterschiedliche Proteinvarianten hergestellt und miteinander verglichen werden

Strukturuntersuchungen ergaben, dass der repetitive Großteil der Seidenproteine wenig strukturiert ist, während das nichtrepetitive (NR) carboxylterminale Ende des Proteins eine eigenständig faltende Proteindomäne darstellt. Diese Domäne vermittelt die Dimerisierung von zwei Seidenproteinen, wobei sich unter physiologischen Bedingungen eine intermolekulare Disulfidbrücke ausbildet.

Die Löslichkeit der Seidenproteine in neutralen Puffern wird von den repetitiven Regionen der Seidenproteine bestimmt und kann mit der durchschnittlichen Hydrophathie der Proteine korreliert werden. Die beiden Komponenten des Abseilfadens repräsentieren dabei ein intrinsisch lösliches und ein unlösliches Protein. Die Assoziation der Proteine konnte spezifisch mit Faktoren wie Phosphat und Ansäuerung initiiert werden, die auch bei der natürlichen Seidenassemblierung involviert sind. Dabei zeigten Proteine, die repetitive und nichtrepetitive Regionen enthielten eine deutlich höhere Empfindlichkeit, als die

jeweiligen Einzelkomponenten. Aus den unterschiedlichen Messungen wurde geschlossen, dass die NR-Domänen eine spezifische Reaktion der repetitiven Regionen auf die assoziationsfördernden Faktoren verstärken.

Die synthetischen Derivate der beiden Abseilfadenkomponenten zeigten ein unterschiedliches Assemblierungsverhalten. Dementsprechend kommen den beiden Proteinkomponenten bei der Seidenassemblierung wahrscheinlich unterschiedliche Aufgaben zu. Während eine schnellassoziierende Komponente die Assemblierung des Fadens beginnt und einen chemisch stabilen Mantel bildet, ist die zweite Komponente vermutlich für die Ausbildung des chemisch weniger stabilen Fadenkerns verantwortlich. Durch Vergleiche biophysikalischer Parameter der Seidenproteinkomponenten unterschiedlicher Spinnenarten konnten Hinweise darauf erhalten werden, dass es sich hierbei um einen artübergreifenden Assemblierungsmechanismus handelt.

## Literatur

- Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J. & Moran, F. (1993) Evaluation of Secondary Structure of Proteins from Uv Circular-Dichroism Spectra Using An Unsupervised Learning Neural-Network. *Protein Engineering* **6**: 383-90
- Arakawa, T. & Timasheff, S. N. (1985) Theory of protein solubility. *Methods Enzymol.* **114**: 49-77
- Arcidiacono, S., Mello, C., Kaplan, D., Cheley, S. & Bayley, H. (1998) Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in Escherichia coli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 31-8
- Arcidiacono, S., Mello, C. M., Butler, M., Welsh, E., Soares, J. W., Allen, A., Ziegler, D., Laue, T. & Chase, S. (2002) Aqueous processing and fiber spinning of recombinant spider silks. *Macromolecules* **35**: 1262-6
- Aslund, F., Berndt, K. D. & Holmgren, A. (1997) Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.* **272**: 30780-6
- Augsten, K., Muhlig, P. & Herrmann, C. (2000) Glycoproteins and skin-core structure in Nephila clavipes spider silk observed by light and electron microscopy. *Scanning* **22**: 12-5
- Beckwitt, R. & Arcidiacono, S. (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**: 6661-3
- Beckwitt, R., Arcidiacono, S. & Stote, R. (1998) Evolution of repetitive proteins: spider silks from Nephila clavipes (Tetragnathidae) and Araneus bicentenarius (Araneidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**: 121-30
- Bell, F. I., McEwen, I. J. & Viney, C. (2002) Fibre science: supercontraction stress in wet spider dragline. *Nature* **416**: 37
- Billmeyer, F. W. (1984) Textbook of Polymer Science, Wiley, New York
- Blattner, F. R., Plunkett, G., III, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**: 1453-74
- Braunitzer, G. & Wolff, D. (1955) Vergleichende chemische Untersuchungen über die Fibroine von *Bombyx mori* und *Nephila madagascariensis*. *Z. Naturforschg.* 404-8
- Candelas, G., Candelas, T., Ortiz, A. & Rodriguez, O. (1983) Translational pauses during a spider fibroin synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**: 1033-8
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980) Biophysical Chemistry. *Freeman & Co*, San Francisco

- Carmichael, S. & Viney, C. (1999) Molecular order in spider major ampullate silk (dragline): Effects of spinning rate and post-spin drawing. *Journal of Applied Polymer Science* **72**: 895-903
- Chen, X., Knight, D. P. & Vollrath, F. (2002) Rheological characterization of nephila spidroin solution. *Biomacromolecules*. **3**: 644-8
- Cleland, W. W. (1964) Dithiothreitol New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry* **3**: 480-&
- Colfen, H. & Antonietti, M. (2000) Field-flow fractionation techniques for polymer and colloid analysis. *New Developments in Polymer Analytics I* **150**: 67-187
- Collings, P. J. (2002) Liquid Crystals: Nature's delicate phase of matter. *Princeton University Press*, Princeton and Oxford
- Craig, C. L. (1997) Evolution of arthropod silks. *Annu. Rev. Entomol.* **42**: 231-67
- Creighton, T. E. (1988) Disulfide Bonds and Protein Stability. *Bioessays* **8**: 57-63
- Crist, B. (1995) The Ultimate Strength and Stiffness of Polymers. *Annual Review of Materials Science* **25**: 295-323
- Cunniff, P. M., Fossey, S. A., Auerbach, M. A., Song, J. W., Kaplan, D. L., Adams, W. W., Eby, R. K., Mahoney, D. & Vezie, D. L. (1994) Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila clavipes*. *Polymers for Advanced Technologies* **5**: 401-10
- Denny, M. (1976) Physical-Properties of Spiders Silk and Their Role in Design of Orb-Webs. *Journal of Experimental Biology* **65**: 483-506
- Dicko, C., Knight, D., Kenney, J. M. & Vollrath, F. (2004a) Structural conformation of spidroin in solution: a synchrotron radiation circular dichroism study. *Biomacromolecules* **5**: 758-67
- Dicko, C., Vollrath, F. & Kenney, J. M. (2004b) Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. *Biomacromolecules*. **5**: 704-10
- Dong, Z., Lewis, R. V. & Middaugh, C. R. (1991) Molecular mechanism of spider silk elasticity. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**: 53-7
- Fahnestock, S. R. & Irwin, S. L. (1997) Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 23-32
- Fahnestock, S. R., Yao, Z. & Bedzyk, L. A. (2000) Microbial production of spider silk proteins. *J. Biotechnol.* **74**: 105-19
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-17
- Fischer, E. (1907) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **53**: 126

Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**: 83-8

Frische, S., Maunsbach, A. B. & Vollrath, F. (1998) Elongate cavities and skin-core structure in Nephila spider silk observed by electron microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford* **189**: 64-70

Fukushima, Y. (1998) Genetically engineered syntheses of tandem repetitive polypeptides consisting of glycine-rich sequence of spider dragline silk. *Biopolymers* **45**: 269-79

Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. & Lewis, R. (2001) Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science* **291**: 2603-5

Gilbert, H. F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* **63**: 69-172

Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry* **182**: 319-26

Gosline, J., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C. & Savage, K. (2002) Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **357**: 121-32

Gosline, J. M., Denny, M. W. & Demont, M. E. (1984) Spider Silk As Rubber. *Nature* **309**: 551-2

Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S. & Savage, K. N. (1999) The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J. Exp. Biol.* **202 Pt 23**: 3295-303

Gould, S. A., Tran, K. T., Spagna, J. C., Moore, A. M. & Shulman, J. B. (1999) Short and long range order of the morphology of silk from *Latrodectus hesperus* (Black Widow) as characterized by atomic force microscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**: 151-7

Greenfield, N. & Fasman, G. D. (1969) Computed Circular Dichroism Spectra for Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* **8**: 4108-&

Grubb, D. T. & Jelinski, L. W. (1997) Fiber morphology of spider silk: The effects of tensile deformation. *Macromolecules* **30**: 2860-7

Guerette, P. A., Ginzinger, D. G., Weber, B. H. & Gosline, J. M. (1996) Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* **272**: 112-5

Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. (1998) Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *J. Mol. Biol.* **275**: 773-84

Hayashi, C. Y., Shipley, N. H. & Lewis, R. V. (1999) Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**: 271-5

- Helsen, C. W. (2003) Purification and characterization of novel synthetic spider silk proteins. Dissertation,
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**: 28-32
- Hijirida, D. H., Do, K. G., Michal, C., Wong, S., Zax, D. & Jelinski, L. W. (1996) <sup>13</sup>C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophys. J.* **71**: 3442-7
- Hinman, M. B., Jones, J. A. & Lewis, R. V. (2000) Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends Biotechnol.* **18**: 374-9
- Hinman, M. B. & Lewis, R. V. (1992) Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. *J. Biol. Chem.* **267**: 19320-4
- Hoffmann, R., Reichert, I., Wachs, W. O., Zeppezauer, M. & Kalbitzer, H. R. (1994) <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of phosphorylated model peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* **44**: 193-8
- Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 13963-6
- Hronska, M., van Beek, J. D., Williamson, P. T., Vollrath, F. & Meier, B. H. (2004) NMR characterization of native liquid spider dragline silk from *Nephila edulis*. *Biomacromolecules.* **5**: 834-9
- Hwang, C., Sinskey, A. J. & Lodish, H. F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**: 1496-502
- Inaba, K. & Ito, K. (2002) Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. *Embo Journal* **21**: 2646-54
- Jackson, C. L. & O'Brien, J. P. (1995) Molecular weight distribution of *Nephila clavipes* dragline silk. *Macromolecules* **28**: 5975-7
- Kenney, J. M., Knight, D., Wise, M. J. & Vollrath, F. (2002) Amyloidogenic nature of spider silk. *Eur. J. Biochem.* **269**: 4159-63
- Kerkam, K., Viney, C., Kaplan, D. & Lombardi, S. (1991) Liquid crystallinity of natural silk secretions. *Nature* **349**: 596-8
- Kim, T. D., Ryu, H. J., Cho, H. I., Yang, C. H. & Kim, J. (2000) Thermal behavior of proteins: heat-resistant proteins and their heat-induced secondary structural changes. *Biochemistry* **39**: 14839-46
- Knight, D. P., Knight, M. M. & Vollrath, F. (2000) Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *Int. J. Biol. Macromol.* **27**: 205-10
- Knight, D. P. & Vollrath, F. (1999) Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proc. R. Soc. Lond.* 519-23

- Knight, D. P. & Vollrath, F. (2001) Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Naturwissenschaften* **88**: 179-82
- Knight, D. P. & Vollrath, F. (2002) Biological liquid crystal elastomers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **357**: 155-63
- Kosower, N. S. & Kosower, E. M. (1978) The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* **54**: 109-60
- Kroll, D. J., Abdel-Malek Abdel-Hafiz, H., Marcell, T., Simpson, S., Chen, C. Y., Gutierrez-Hartmann, A., Lustbader, J. W. & Hoeffler, J. P. (1993) A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection. *DNA Cell Biol.* **12**: 441-53
- Kummerlen, J., vanBeek, J. D., Vollrath, F. & Meier, B. H. (1996) Local structure in spider dragline silk investigated by two-dimensional spin-diffusion nuclear magnetic resonance. *Macromolecules* **29**: 2920-8
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-32
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5
- Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J. F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E. A., Soares, J. W. & Karatzas, C. N. (2002) Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* **295**: 472-6
- Lewis, R. V. (1992) Spider Silk - the Unraveling of A Mystery. *Accounts of Chemical Research* **25**: 392-8
- Lewis, R. V., Hinman, M., Kothakota, S. & Fournier, M. J. (1996) Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins. *Protein Expr. Purif.* **7**: 400-6
- Li, S. F., McGhie, A. J. & Tang, S. L. (1994) New internal structure of spider dragline silk revealed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **66**: 1209-12
- Liivak, O., Blye, A., Shah, S. & Jelinski, L. W. (1998) A Microfabricated Wet-Spinning Apparatus To Spin Fibers of Silk Proteins. Structure-Property Correlations. *Macromolecules* **31**: 2947-51
- Loferer, H., Wunderlich, M., Hennecke, H. & Glockshuber, R. (1995) A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins. *J. Biol. Chem.* **270**: 26178-83
- Lombardi, S. & Kaplan, D. (1990) The amino acid composition of major ampullate gland silk (dragline) of *Nephila clavipes* (araneae, tetragnathidae). *J. Arachnol.* **18**: 297-306
- Madsen, B., Shao, Z. Z. & Vollrath, F. (1999) Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**: 301-6



- Mark, J. E. (1992) Molecular Aspects of Rubber-Like Elasticity. *Angewandte Makromolekulare Chemie* **202**: 1-30
- Medigue, C., Rouxel, T., Vigier, P., Henaut, A. & Danchin, A. (1991) Evidence for horizontal gene transfer in *Escherichia coli* speciation. *J. Mol. Biol.* **222**: 851-6
- Mello, C., Senecal, K., Yeung, B., Vouros, P. & Kaplan, D. (1994) Initial characterization of *Nephila clavipes* dragline protein. In: *Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology*, Ed: Kaplan, D., Adams, W., Farmer, B. & Viney, C.,
- Michal, C. A., Simmons, A. H., Chew, B. G., Zax, D. B. & Jelinski, L. W. (1996) Presence of phosphorus in *Nephila clavipes* dragline silk. *Biophys. J.* **70**: 489-93
- Miller, L. D., Putthararat, S., Eby, R. K. & Adams, W. W. (1999) Investigation of the nanofibrillar morphology in silk fibers by small angle X-ray scattering and atomic force microscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* **24**: 159-65
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-50
- Padgett, K. A. & Sorge, J. A. (1996) Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene* **168**: 31-5
- Parkhe, A. D., Seeley, S. K., Gardner, K., Thompson, L. & Lewis, R. V. (1997) Structural studies of spider silk proteins in the fiber. *J. Mol. Recognit.* **10**: 1-6
- Prince, J. T., McGrath, K. P., DiGirolamo, C. M. & Kaplan, D. L. (1995) Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry* **34**: 10879-85
- Rao, Y., Waddon, A. J. & Farris, R. J. (2001) Structure-property relation in poly(p-phenylene terephthalamide) (PPTA) fibers. *Polymer* **42**: 5937-46
- Riekell, C., Madsen, B., Knight, D. & Vollrath, F. (2000) X-ray diffraction on spider silk during controlled extrusion under a synchrotron radiation X-ray beam. *Biomacromolecules.* **1**: 622-6
- Riekell, C. & Vollrath, F. (2001) Spider silk fibre extrusion: combined wide- and small-angle X-ray microdiffraction experiments. *Int. J. Biol. Macromol.* **29**: 203-10
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- Savage, K. N., Guerette, P. A. & Gosline, J. M. (2004) Supercontraction stress in spider webs. *Biomacromolecules* **5**: 675-9
- Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F. & Conrad, U. (2001) Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat. Biotechnol.* **19**: 573-7
- Schmid, F. X. (1997a) *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Ed: Fink, A. L. & Goto, Y., Marcel Dekker, New York

- Schmid, F. X. (1997b) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: Protein Structure: a Practical Approach, Ed: Creighton, T. E., IRL Press, Oxford
- Schulz, S. (1996) Neuartige Lipide aus Spinnen und Insekten. *Bioforum* 294-6
- Schulz, S. (2001) Composition of the silk lipids of the spider *Nephila clavipes*. *Lipids* 36: 637-47
- Seidel, A., Liivak, O. & Jelinski, L. W. (1998) Artificial Spinning of Spider Silk. *Macromolecules* 31: 6733-6
- Seidel, A., Liivak, O., Calve, S., Adaska, J., Ji, G. D., Yang, Z. T., Grubb, D., Zax, D. B. & Jelinski, L. W. (2000) Regenerated spider silk: Processing, properties, and structure. *Macromolecules* 33: 775-80
- Shao, Z., Young, R. J. & Vollrath, F. (1999) The effect of solvents on spider silk studied by mechanical testing and single-fibre Raman spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 24: 295-300
- Shao, Z. Z. & Vollrath, F. (1999) The effect of solvents on the contraction and mechanical properties of spider silk. *Polymer* 40: 1799-806
- Simmons, A. H., Michal, C. A. & Jelinski, L. W. (1996) Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science* 271: 84-7
- Simmons, A. H., Ray, E. & Jelinski, L. W. (1994) Solid-State <sup>13</sup>C NMR of *Nephila clavipes* Dragline Silk Establishes Structure and Identity of Crystalline Regions. *Macromolecules* 27: 5235-7
- Sponner, A. (2003) Strukturelle und immunologische Charakterisierung der Spinnenseide von *Nephila clavipes*. Dissertation,
- Sponner, A., Grosse, F. & Weisshart, K. (2004a) Conservation of the C-termini of ampullate gland Spidroins in orb web spiders. *unpublished data*
- Sponner, A., Unger, E., Grosse, F. & Weisshart, K. (2004b) Conserved C-termini of Spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread. *Biomacromolecules*. 5: 840-5
- Szela, S., Avtges, P., Valluzzi, R., Winkler, S., Wilson, D., Kirschner, D. & Kaplan, D. L. (2000) Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk. *Biomacromolecules*. 1: 534-42
- Termonia, Y. (1994) Molecular Modeling of Spider Silk Elasticity. *Macromolecules* 27: 7378-81
- Thiel, B. L., Guess, K. B. & Viney, C. (1997) Non-periodic lattice crystals in the hierarchical microstructure of spider (major ampullate) silk. *Biopolymers* 41: 703-19
- Thiel, B. L., Kunkel, D. D. & Viney, C. (1994) Physical and chemical microstructure of spider dragline: A study by analytical transmission electron microscopy. *Biopolymers* 34: 1089-97

- Thiel, B. L. & Viney, C. (1996) Beta sheets and spider silk. *Science* **273**: 1480-1
- Tillinghast, E. K., Chase, S. F. & Townley, M. A. (1984) Water extraction by the major ampullate duct during silk formation in the spider, *Argiope aurantia* Lucas. *J. Insect Physiol.* **30**: 591-6
- Uversky, V. N. (2002) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* **11**: 739-56
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R. & Fink, A. L. (2000) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* **41**: 415-27
- Uversky, V. N., Lee, H. J., Li, J., Fink, A. L. & Lee, S. J. (2001) Stabilization of partially folded conformation during alpha-synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *J. Biol. Chem.* **276**: 43495-8
- van Beek, J. D., Hess, S., Vollrath, F. & Meier, B. H. (2002) The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**: 10266-71
- van Beek, J. D., Kummerlen, J., Vollrath, F. & Meier, B. H. (1999) Supercontracted spider dragline silk: a solid-state NMR study of the local structure. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**: 173-8
- Viney, C. (1997) Natural silks: archetypal supramolecular assembly of polymer fibres. *Supramolecular Science* **4**: 75-81
- Vollrath, F., Holtet, T., Thogersen, H. C. & Frische, S. (1996) Structural organization of spider silk. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263**: 147-51
- Vollrath, F., Knight, D. & Hu, X. W. (1998) Silk production in a spider involves acid bath treatment. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **265**: 817-20
- Vollrath, F. & Knight, D. P. (1999) Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**: 243-9
- Vollrath, F. & Knight, D. P. (2001) Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **410**: 541-8
- Warwicker, J. (1954) The Crystal Structure of Silk Fibroin. *Acta Crystallographica* **7**: 565-&
- Warwicker, J. (1956) The Crystal Structure of Silk Fibroins. *Transactions of the Faraday Society* **52**: 554-&
- Warwicker, J. (1960) Comparative studies of fibroins. II. The crystal structures of various fibroins. *J. Mol. Biol.* **2**: 350-62
- Watson, P. J. (1986) Transmission of a female sex pheromone thwarted by males in the spider *Linyphia litigiosa* (Linyphiidae). *Science* **233**: 219-21

- Weiskopf, A., Senecal, K., Vouros, P., Kaplan, D. & Mello, C. M. (1996) The carbohydrate composition of a spider silk: *Nephila clavipes* Dragline. *Glycobiology* **6**: 1703
- Winkler, S. & Kaplan, D. L. (2000) Molecular biology of spider silk. *J. Biotechnol.* **74**: 85-93
- Winkler, S., Szela, S., Avtges, P., Valluzzi, R., Kirschner, D. A. & Kaplan, D. (1999) Designing recombinant spider silk proteins to control assembly. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**: 265-70
- Winkler, S., Wilson, D. & Kaplan, D. L. (2000) Controlling beta-sheet assembly in genetically engineered silk by enzymatic phosphorylation/dephosphorylation. *Biochemistry* **39**: 12739-46
- Work, R. W. (1976) Force-Elongation Behavior of Web Fibers and Silks Forcibly Obtained from Orb-Web-Spinning Spiders. *Textile Research Journal* **46**: 485-92
- Work, R. W. (1977a) Dimensions, Birefringences, and Force-Elongation Behavior of Major and Minor Ampullate Silk Fibers from Orb-Web-Spinning Spiders - Effects of Wetting on These Properties. *Textile Research Journal* **47**: 650-62
- Work, R. W. (1977b) Mechanisms of Major Ampullate Silk Fiber Formation by Orb-Web-Spinning Spiders. *Transactions of the American Microscopical Society* **96**: 170-89
- Work, R. W. (1984) Duality in Major Ampullate Silk and Precursive Material from Orb-Web-Building Spiders (Araneae). *Transactions of the American Microscopical Society* **103**: 113-21
- Work, R. W. (1985) Viscoelastic Behavior and Wet Supercontraction of Major Ampullate Silk Fibers of Certain Orb-Web-Building Spiders (Araneae). *Journal of Experimental Biology* **118**: 379-404
- Work, R. W. & Emerson, P. D. (1982) An Apparatus and Technique for the Forcible Silking of Spiders. *Journal of Arachnology* **10**: 1-10
- Work, R. W. & Morosoff, N. (1982) A Physicochemical Study of the Supercontraction of Spider Major Ampullate Silk Fibers. *Textile Research Journal* **52**: 349-56
- Xu, M. & Lewis, R. V. (1990) Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 7120-4
- Zimm, B. H. (1948) Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering - Preliminary Results on Polystyrene Solutions. *Journal of Chemical Physics* **16**: 1099-116

## Abkürzungen

A	Ampere	ml	Milliliter
AA	Acrylamid	mm	Millimeter
ADF	<i>Araneus diadematus Fibroin</i>	mM	Millimolar
AFM	<i>atomic force microscopy</i>	$\mu$ M	Mikromolar
AK	Antikörper	$M_w$	relative Molekülmasse
Ala	Alanin	MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
Amp	Ampicillin	N	Newton
Ap <sup>r</sup>	Ampicillinresistenzgen	NaP	Natriumphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat	nm	Nanometer
AS	Ammoniumsulfat	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
ca.	circa	NPL	<i>non-periodic lattice</i>
CD	Circulardichroismus	NR	nicht repetitiv
cps	<i>counts per second</i>	OD	optische Dichte
Da	Dalton	p.a.	<i>pro analysis</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Pa	Pascal
DTT <sub>red</sub>	1,4-Dithiothreitol	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DTT <sub>ox</sub>	trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian (oxidiertes DTT)	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient	pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
E	Extinktion	pI	isoelektrischer Punkt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	POD	Peroxidase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PVDF	Polyvinylidenfluorid
FFF	Feldflußfraktionierung	rep	repetitiv
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>	RI	<i>Refractive Index</i>
g	Gramm	RT	Raumtemperatur
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )	s	Sekunde
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid	SDS	Natriumdodecylsulfat
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat	SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
Gly	Glycin	T	absolute Temperatur
GPa	Gigapascal	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
GSSG	Gluthathion (oxidiert)	TEM	Transmissions- elektronenmikroskopie
h	Stunde	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-2-ethansulfonsäure	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	Quarzbidestilliertes Wasser	Trp	Tryptophan
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Tyr	Tyrosin
HST	Harnstoff	üN	über Nacht
IgG	Immunglobulin G	UV	ultraviolett
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid	VIS	visuell
J	Joule	V	Volt
K	Kelvin	v/v	Volumen pro Volumen
kDa	Kilodalton	w/v	Gewicht pro Volumen
$\lambda$	Wellenlänge		
l	Liter		
LCE	<i>liquid crista elastomer</i>		
LMW	<i>low molecular weight</i>		
ln	natürlicher Logarithmus		
m	Meter		
M	Molar		
MAS	<i>Major ampullate</i> Seide		
MaSp	<i>Major ampullate Spidroin</i>		
mg	Milligramm		
min	Minute		

## Publikationen

Huemmerich, D., Helsen, C. W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R. & Scheibel, T. (2004) Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* **43**: 13604-12

Huemmerich, D.,\* Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U., Ittah, S.\* (2004) Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Current Biology* in Druck

\* gleichberechtigte Co-Autorenschaft

## Anhang

Mutationen des hier verwendeten *adf-3* im Vergleich zur publizierten Sequenz (*Genbank Accession Number* U47855)

Position (U47855)	Mutation DNA-Sequenz	Mutation Aminosäuresequenz
466	G → C	A → P
1514	G → T	G → V
1592	T → C	V → A
1610	T → C	V → A
1692	G → T	K → N
1695	T → A	H → Q
1779	T → G	stille Mutation

DNA-Sequenz des hier verwendeten *adf-4*

gcaggatcttcagcagcagcggccgaggcagcaagtggatctggaggatacggacctgaaaaccaaggacatctggacctgt  
agcatatggacctggtggaccgtatcttcagctgcagcagcagccgctgcaggaagtggacctggtggatacggacctgaaaa  
ccaaggacatctggaccggaggatatggacctggtggtccggatcttcagcagcagcagcagccgctgcagcaagtggac  
ctggaggatatggacctggaagccaaggacatctggacctggtggatccggaggatatggtcccgaagccaaggccatct  
ggacctggtgcatcttcggcagcagcagcagccgctgcagcaagtggacctggaggatatggacctggaagccaaggacatc  
tggacctggagcatatggacctggtggaccggatcttcagctgcagcaagtggacctggaggatatggacctggaagccaagg  
accatctggacctggtggatccggaggatatggtcccgaagccaaggccatctggacctggtggcctggtgcatctgcggc  
agcagcagcagccgctgcagcaagtggacctggaggatatggacctggaagccaaggacatctggacctggagcatatggac  
ctggtggaccggatcttcagctgcagcaagtggacctggaggatatggacctggaagccaaggacatctggacctggagcat  
atggacctggtggaccggatcttcagctgcagcagcagccgctgcaggaagtggacctggtggatacggacctggaaccaa  
ggacatctggaccggaggatatggacctggtggtccggatcttcagcagcagcagccgctgcagcaagtggacctggagg  
atatggacctggaagccaaggacatctggacctggagtatatggacctggtggaccggatcttcagctgcagcagcagccgct  
gcaggaagtggacctggtggatacggacctggaaccaaggacatctggaccggaggatatggacctggtggtccggatct

tcagcagcagcagcagccgctgcagcaagtggacctggaggatatggacctggaagccaaggaccatctggacctggtggatc  
cggaggatatggtcccgaagccaagggccatctggacctggtgcatcttcggcagcagcagcagccgctgcagcaagtggac  
ctggaggatatggacctggaagccaaggaccatctggacctggagcatatggacctggtggaccggatcttcagctgcagcaa  
gtggacctggaggatatggacctggaagccaaggaccatctggtcctggagcatatggacctggtggaccggatcttcagctgc  
agcagccgctgcagcaagtggacctggaggatatggacctggaagccaaggaccatctggacctggtggatcccaggatatg  
gtcccgaagccaaggacctggtggcctggagcatctgcggcagcagcagcagccgctgcagcaagtggacctggaggata  
tggacctggaagccaaggaccatctggacctggatatcaaggccctagtgtcctggagcatatggccatctccttctgctccgc  
atccgttcagcctctcgttatcttcgctgcagcctcgtctagagtgtctccgctgtatcgtctttagtgctagcggacctacgaat  
ggtgctgctgtttctggagcttgaatagtttagtatctcagattagtgcaagtaatccaggttatcgggatgtgatgctctgtgcagg  
cattattggaattagtgctgctcttggcaattcttcatctgcaagtattggccaagtcaacgtcagctctgtagtcagtcactcaa  
atgattagccaagctcttcataaacacttggtaaaatatagtcgtctagttcaaatgagttgtattgaaattcattgtaattttattgaa  
atgtattccaagtatgaatttaataaattgttgattgcaagtttaaaaaaaaaaaaaaaaa



Publizierte Aminosäuresequenz von ADF-4 (*Genbank accession number U47856*)

```
GSSAAAAAAAA  SGS GGYGP  EN  QGPSGPV  AY  GPGGP
VSSAAAAAAAAAG  SGP GGYGP  EN  QGPSGPG  GY  GPGGS
GSSAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  GSGY GPGSQ  GAS  GPGGP
GASAAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  AY  GPGGP
GSSAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  VY  GPGGP
GSSAAAAAAAAAG  SGP GGYGP  EN  QGPSGPG  GY  GPGGS
GSSAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  GSGY GPGSQ  GSGP
GASAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  YQ  GPSGP
GAYGPSASVAASVYLRLEQPRLEVVSSAVSSLVSSGPTNGAAVSGALNSLVSQISASNPGLSGCDALVQALLELV
SALVAILSSASIGQVNVSSVSTQMISQALS
```

## Sequenz der ADF-4 Variante, die in dieser Arbeit verwendet wurde

```
GSSAAAAAAAA  SGS GGYGP  EN  QGPSGPV  AY  GPGGP
VSSAAAAAAAAAG  SGP GGYGP  EN  QGPSGPG  GY  GPGGS
GSSAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  GSGY GPGSQ  GPSGP
GASAAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  AY  GPGGP
GSSAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  GSGY GPGSQ  GPS  GPGGP
GASAAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  AY  GPGGP
GSSAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  AY  GPGGP
GSSAAAAAAAAAG  SGP GGYGP  GN  QGPSGPG  GY  GPGGP
GSSAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  VY  GPGGP
GSSAAAAAAAAAG  SGP GGYGP  GN  QGPSGPG  GY  GPGGS
GSSAAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  GSGY GPGSQ  GPSGP
GASAAAAAAAAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  AY  GPGGP
GSSAAA  SGP GGYGP  GS  QGPSGPG  AY  GPGGP
GSSAAAAAAAAA  RLSPPAASRRVSSAVSSLVSSGPTNGAAVSGALNSLVSQISASNPGLSGCDALVQALLELV
SALVAILSSASIGQVNVSSVSTQMISQALS
```

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2001 bis Oktober 2004 am Department Chemie der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Biotechnologie angefertigt.

Bei Prof. Johannes Buchner möchte ich mich sehr herzlich für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl und sein Interesse an den Spinne(r)n bedanken. Mein besonderer Dank gilt vor allem Dr. Thomas Scheibel für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die vielen hilfreichen Gespräche und für seine vielseitige Unterstützung. Ein großes Dankeschön auch an Prof. Sevil Weinkauf und ihr Team für die vielen netten "Gastaufenthalte". Für die unkomplizierte und "produktive" Kooperation möchte ich mich bei Prof. Rainer Rudolf und Jan Oschman bedanken. Dr. Stefan Walter möchte ich herzlich für die Zwischenfinanzierung und die Antworten auf meine vielen Fragen bedanken. Vielen Dank auch an Anja Mialki, und Susanne Quedzuweit für die hervorragende Zusammenarbeit und an Bettina Richter für die schönen SEM-Aufnahmen. Simone Hess und Christian Ackerschott möchte ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Ihnen und allen anderen aktuellen und ehemaligen Fibers danke ich für die nette Atmosphäre beim Arbeiten und bei sonstigen Gelegenheiten. Dank auch an alle anderen Lehrstuhlmitglieder für die Unterstützung insbesondere zu Beginn der Arbeit und für das entspannte Arbeitsklima.

Der Stiftung Stipendien Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken.

Ein riesiger Dank gehört meinen Eltern, deren Unterstützung in allen Lebensbereichen ich mir zu allen Zeiten sicher sein konnte. Und schließlich das wichtigste:

**Danke Spatzl !**

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

Garching, im Oktober 2004