

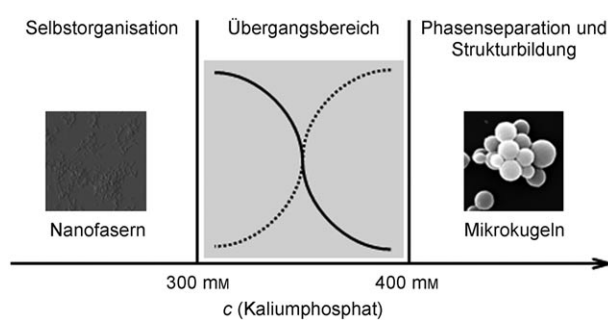
# Bildung von Mikrokugeln eines rekombinanten Spinnenseidenproteins\*\*

Ute K. Slotta,\* Sebastian Rammensee, Stanislav Gorb und Thomas Scheibel\*

Nativ entfaltete, d.h. intrinsisch unstrukturierte Proteine enthalten spezielle Aminosäuresequenzen und sind durch eine niedrige Hydrophobie und das Fehlen definierter lokaler Strukturen charakterisiert.<sup>[1]</sup> Hier beschreiben wir die Untersuchung eines Spinnenseidenproteins, das in hohen Konzentrationen im Lumen der großen Ampullendrüse der Spinne als teilweise nativ entfaltetes Protein vorliegt.<sup>[2]</sup> Der komplexe Prozess der Fadenbildung beginnt im Spinnkanal. Dort werden die chaotropen Ionen Natrium und Chlorid durch die mehr kosmotropen Ionen Kalium und Phosphat ersetzt. Die Seidenproteinlösung wird durch Resorption des Lösungsmittels weiter aufkonzentriert und leicht angesäuert. Der pH-Wert ändert sich von 6.9 auf 6.3.<sup>[3]</sup> Um die mechanischen Einzelheiten der dadurch bedingten Faltungs- und Assemblierungsschritte aufzuklären, wurde der Einfluss der Lösungsbedingungen auf das intrinsisch entfaltete und rekombinant hergestellte Spinnenseidenprotein eADF4(C16) (MW 47.7 kDa) untersucht. Die Primärstruktur dieses Seidenproteins basiert auf der bekannten Aminosäuresequenz eines Seidenproteins aus der großen Ampullendrüse der Spinne *Araneus diadematus*.<sup>[4,5]</sup>

Ionen können generell Proteine aussalzen und in ungefalteten Proteinen eine Strukturbildung induzieren. Die Aussalzeigenschaften sind in der Hofmeister-Serie beschrieben.<sup>[6,7]</sup> Da Kaliumphosphatpuffer eine wichtige Rolle im natürlichen Spinnprozess spielt,<sup>[8,9]</sup> wurde sein Einfluss auf die Strukturbildung von eADF4(C16) untersucht, und die Morphologie der entstandenen Aggregate wurde durch Rasterkraft(AFM)- und Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert. Niedrige Phosphatkonzentrationen (< 300 mM)

neutralisieren die Coulomb-Abstoßung zwischen den negativ geladenen Glutamaten und führen zur Selbstorganisation von eADF4(C16) zu Nanofasern mit Durchmessern zwischen 2 und 10 nm. Die Thermodynamik der Faserbildung wird nicht nur durch die Ionenstärke, sondern auch durch Faktoren wie Proteinkonzentration, Molekulargewicht und pH-Wert beeinflusst (siehe Hintergrundinformationen). Hohe Salzkonzentrationen (>400 mM) induzieren die Bildung von sphärischen Mikropartikeln (Mikrokugeln), indem die Wechselwirkungen zwischen Protein und Wasser beeinflusst werden (Abbildung 1).<sup>[1]</sup>



**Abbildung 1.** Nanofasern und Mikrokugeln: Niedrige Kaliumphosphatkonzentrationen führen zur Selbstorganisation von Nanofasern. Bei hohen Salzkonzentrationen bilden sich Mikrokugeln. In einem Übergangsbereich liegen beide Spezies vor.

In dieser Studie wurde ausschließlich die Bildung von Mikrokugeln aus eADF4(C16) untersucht. Die Mikrokugeln sind gegenüber Denaturierungsmitteln wie 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidiniumchlorid genauso stabil wie natürliche Spinnenseidenfäden,<sup>[10]</sup> sodass diese Eigenschaft genutzt wurde, um die Thermodynamik des Aussalzens und der Strukturbildung genauer zu untersuchen.

Das Aussalzen von eADF4(C16) kann als Flüssig-flüssig-Phasentrennung in eine lösungsmittelreiche und eine dichte proteinreiche Phase betrachtet werden. Dies wurde schon früher für andere Proteine beschrieben.<sup>[11]</sup> Im Fall von eADF4(C16) führt die Zugabe von 1 M Kaliumphosphatpuffer zu einer Steigerung des Lichtstreuensignals, das nach ca. 5 Sekunden ein Plateau erreicht (Abbildung 2), was darauf schließen lässt, dass die Phasentrennung in die lösungsmittelreiche und die proteinreiche Phase abgeschlossen ist. Es wurde beobachtet, dass die Verdünnung der Kaliumphosphatpuffer-Konzentration unter eine für die Phasentrennung kritische Ionenstärke zur Auflösung der Phasentrennung führt. Lediglich Mikrokugeln, die eine definierte Sekundärstruktur haben, sind stabil, während unstrukturierte Aggregate bei Verringerung der Kaliumphosphatpuffer-Konzen-

[\*] U. K. Slotta,<sup>[†]</sup> Prof. Dr. T. Scheibel<sup>[†]</sup>  
Department Chemie, Lehrstuhl Biotechnologie  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
E-Mail: thomas.scheibel@uni-bayreuth.de

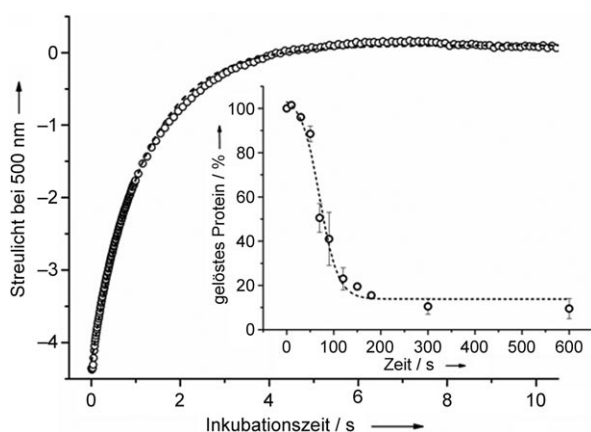
S. Rammensee  
Department Physik, Lehrstuhl Biophysik  
Technische Universität München  
James-Frank-Straße, 85747 Garching (Deutschland)

Dr. S. Gorb  
Forschungsgruppe Evolutionäre Biomaterialien  
Max-Planck-Institut für Metallforschung Stuttgart  
Heisenbergstraße 3, 70569 Stuttgart (Deutschland)

[†] Derzeitige Adresse: FAN, Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SCHE 603/4-2,4-3) und dem CIPSM unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



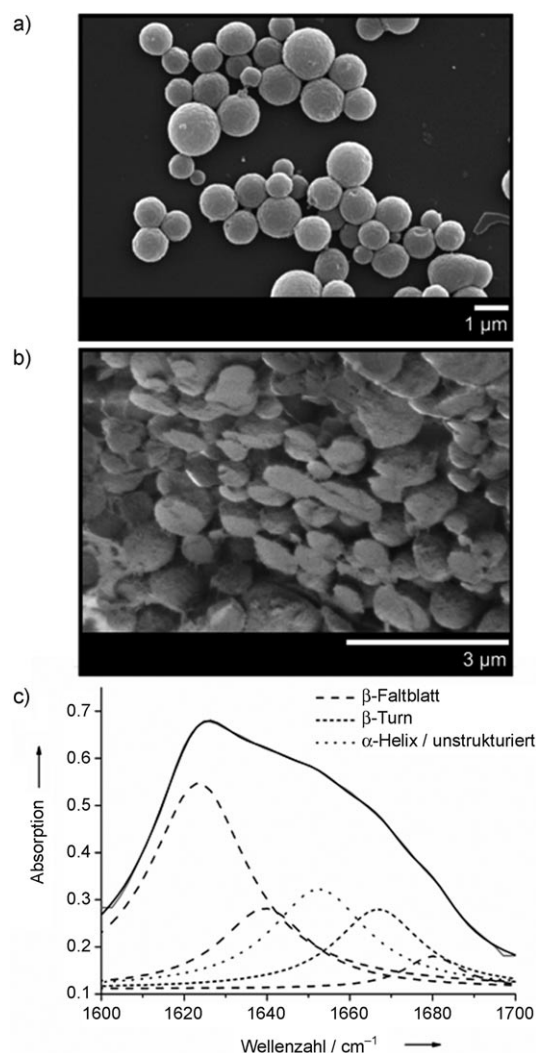
**Abbildung 2.** Zeitabhängigkeit und Reversibilität der Phasentrennung von eADF4(c16)-Lösungen. Gemessen wurde die Lichtstreuung nach Zugabe von 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8.0) und schneller Durchmischung in einem Stopped-Flow-Gerät. Das Streusignal erreicht nach 5 s ein Plateau (die Nachweisgrenze des Geräts wurde nicht erreicht). Nach dieser Zeitspanne ist die Trennung in eine proteinreiche und eine wässrige Phase beendet. Um die Reversibilität der Phasentrennung zu untersuchen, wurde die Probe mit Wasser an bestimmten Zeitpunkten verdünnt. Die Menge an löslichem Protein ist gegen den Zeitpunkt der Zugabe von Wasser aufgetragen.

tration (Endkonzentration 166 mM, was unter der benötigten Ionenstärke zum Aussalzen liegt) zerfallen. Die zeitaufgelöste Analyse des wieder in Lösung gebrachten Proteins ergab, dass die Strukturbildung der Mikrokugeln nach 120 Sekunden abgeschlossen ist (Abbildung 2).

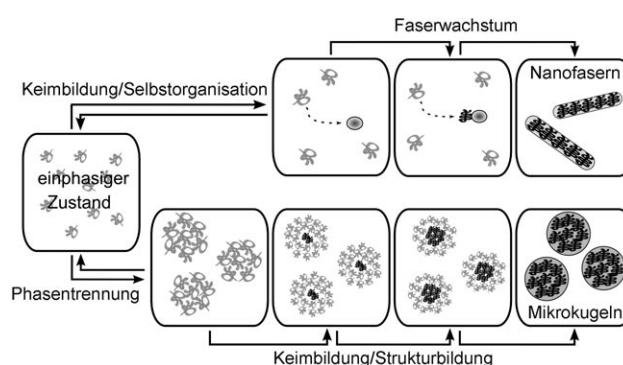
Die Untersuchung der Morphologie und Struktur der Mikrokugeln ergab, dass sie eine glatte Oberfläche haben, Vollkugeln sind und keine ersichtliche innere Mikrostrukturierung aufweisen (Abbildung 3a,b). Die Sekundärstruktur der Mikrokugeln wurde durch FTIR-Spektroskopie analysiert (Abbildung 3c). Ein Maximum bei  $1625\text{ cm}^{-1}$  deutet auf einen signifikanten Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen hin (der durch Dekonvolution bestimmte Anteil entspricht 64 %). Interessanterweise sind die Sekundärstrukturanteile von Nanofasern und Mikrokugeln, die von demselben Protein gebildet werden, vergleichbar.<sup>[12]</sup> Daraus kann geschlossen werden, dass die Bildung von Mikrokugeln und Nanofasern strukturell ähnlich verläuft, sich aber in der Bildungskinetik unterscheidet.

Es ist davon auszugehen, dass die Bildung der Nanofasern nach der Keimbildungs-Aggregations-Theorie erfolgt, wie sie für amyloide Fasern beschrieben wurde (Abbildung 4). Im ersten Schritt entsteht aus gelöstem, ungefaltetem Protein ein Keim, der mit weiterem Protein interagiert und letztendlich Fasern bildet.<sup>[12,13]</sup>

Für die Anordnung von Proteinen zu kugelförmigen Strukturen wurden in der Literatur verschiedene Modelle diskutiert. Unter anderem wurden von Bohr et al. zwei Modelle für die Bildung von kugelförmigen Strukturen aus Lysozym und Ribonuclease beschrieben. Das „Bulk-Growth“-Modell beschreibt das Wachstum von Kugeln ausgehend von einem Nucleationspunkt, an den sich weitere Proteinmoleküle kugelförmig anlagern. Im „Sheet-Growth“-Modell lagern sich Proteine nacheinander zu Schichten an,



**Abbildung 3.** Morphologie und Struktur von eADF4(C16)-Mikrokugeln. REM-Bilder von a) intakten und b) gefriergebrochenen Mikrokugeln zeigen eine glatte Oberfläche und ein massives Grundgerüst. c) FTIR-Spektren weisen auf einen großen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen hin.



**Abbildung 4.** Prozesse bei der Bildung von Nanofasern und Mikrokugeln. Der erste Schritt bei der Bildung von Nanofasern ist die Bildung eines Keims. Protein lagert sich an diesen Keim an, die Sekundärstruktur ändert sich, und die Faser beginnt zu wachsen. Der erste Schritt bei der Bildung von Mikrokugeln ist eine salzinduzierte Phasentrennung. Ein Keim wird in der proteinreichen Phase gebildet, dieser bewirkt einen Strukturübergang im angelagerten Protein, und die Mikrokugeln beginnen zu wachsen.

deren Krümmung von thermodynamischen Parametern vorgegeben wird, was zur Bildung einer Hülle führt, in der sich weitere Hüllen befinden.<sup>[14]</sup>

Wichtig ist, dass eADF4(C16)-Mikrokugeln nur ab einer bestimmten Kaliumphosphatpuffer-Konzentration gebildet werden. Der Mechanismus des Aussalzens kann als Flüssig-flüssig-Phasentrennung betrachtet werden, wobei der Ausgangszustand einphasig ist und aus einer Lösung von monomeren, intrinsisch entfalteten Proteinmolekülen besteht. Durch die Änderung der Ionenstärke, z. B. durch Zugabe von kosmotropen Ionen, ändert sich die freie Energie des Systems, was zur Trennung in eine proteinreiche und eine lösungsmittelreiche Phase führt. Dieser phasengetrennte Zustand ist energetisch begünstigt, und die Proteinkonzentration in der proteinreichen Phase steigt auf ein kritisches Niveau an. Sobald die Keimbildungskonzentration erreicht ist, bilden sich gleichzeitig mehrere strukturierte Keime in der proteinreichen Phase. Die Ergebnisse der Stopped-Flow-Experimente und der Kryo-REM-Untersuchungen belegen, dass es sich um Vollkugeln handelt, was eine Erklärung nach dem „Bulk-Growth“-Modell am wahrscheinlichsten macht. Nach dieser Theorie wachsen die Keime kugelförmig, indem sie mit zusätzlichen Monomeren interagieren. Das Wachstum ist beendet, wenn das Löslichkeitsgleichgewicht erreicht ist. Danach verändert sich der Kugeldurchmesser nicht mehr. Dieses Modell wird durch die Beobachtung, dass die Kugelgröße von Proteinkonzentration und Mischungsbedingungen abhängt, gestützt.<sup>[15]</sup>

Welcher der beschriebenen Assemblierungswege für den natürlichen Spinnprozess und die Fadenbildung relevant ist, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch wurden bereits Nanofasern und nanofasrige Strukturen in der B-Zone der Spinndrüse von Spinnen<sup>[16]</sup> sowie in Kokonseide von Insekten und Spinnen<sup>[17]</sup> gefunden. Auch wurde gezeigt, dass die Thermodynamik der Assemblierung von eADF4(C16)-Nanofasern stark von Faktoren wie pH-Wert, Salzkonzentration und Proteinkonzentration beeinflusst wird, was dafür sprechen könnte, dass die Bildung von Nanofasern ein erster Schritt zur Anordnung von strukturell übergeordneten Fäden ist. Allerdings ist es auch möglich, dass die schnellere Kinetik der Phasentrennung, wie sie bei der Kugelbildung beobachtet wurde, ebenfalls einen entscheidenden Beitrag zur Fadenbildung leistet.

## Experimentelles

Probenpräparation: Herstellung und Reinigung von eADF4(C16) wurden wie beschrieben durchgeführt.<sup>[8]</sup> Für wässrige Lösungen wurde lyophilisiertes Protein in 6 M Guanidiniumthiocyanat gelöst und anschließend gegen Puffer dialysiert. Die Proben wurden bei 125 000 g zentrifugiert, um verbliebene Aggregate zu entfernen.

Stopped-Flow-Messungen: Die Bildung von Mikrokugeln wurde durch Messung der Lichtstreuung nach Durchmischen in einem Stopped-Flow-Gerät (Bio Sequential SX.18MmV, Applied Photophysics, Großbritannien) untersucht. eADF4(C16)-Proteinlösungen (1 mg mL<sup>-1</sup>) und Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 8.0) wurden in auf 30 °C temperierte Spritzen gefüllt. Nach schneller Durchmischung

gleicher Volumina beider Lösungen wurde zeitabhängig das Lichtstreuungssignal bei 500 nm aufgenommen. Das erreichte Plateau ist unabhängig von Limitierungen der Photodiode und spiegelt den Endpunkt der Reaktion wider.

REM: Proben für die REM-Untersuchungen wurden nach dreimaligem Waschen mit zweifach destilliertem Wasser zur Entfernung von Salzen auf Thermanox-Plättchen aufgetragen und an der Luft getrocknet. Nach Sputtern der Proben mit Gold wurden diese in einem Rasterelektronenmikroskop (JSM 5900 LV, JEOL, Japan) analysiert.

Kryo-REM: Mikrokugeln wurden auf Metallträger aufgetragen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden in eine Gefrierbruchkammer (Gatan ALTO 2500, Gatan Inc., Großbritannien) übertragen und mit einer kalten Metallklinge geschnitten, bei einer Temperaturdifferenz von 50 °C sublimiert (Probe: -90 °C, Halter: -140 °C), mit Gold-Palladium besputtert und in gefrorenem Zustand in einem Kryo-REM (Hitachi S-4800, Hitachi, Japan) bei 3 kV Beschleunigungsspannung und -120 °C untersucht.

FTIR-Spektroskopie: Absorptionsspektren von Fasern in einem Bereich von 700 bis 6000 cm<sup>-1</sup> wurden bei Raumtemperatur mit einem Bruker IFS 66 s (Bruker, Deutschland) mit einer Auflösung von 4 cm<sup>-1</sup> aufgenommen. Die Proben wurden auf CaF<sub>2</sub>-Scheiben aufgetragen und luftgetrocknet.

Eingegangen am 11. Februar 2008

Online veröffentlicht am 6. Mai 2008

**Stichwörter:** Biomaterialien · Hofmeister-Effekt · Nanofasern · Phasentrennung · Selbstorganisation

- [1] L. A. Munishkina, J. Henriques, V. N. Uversky, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3289–3300.
- [2] T. Lefèvre, J. Leclerc, J.-F. Rioux-Dubé, T. Buffeteau, M.-C. Paquin, M.-E. Rousseau, I. Cloutier, M. Auger, S. M. Gagné, S. Boudreault, C. Cloutier, M. Pérolet, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2342–2344.
- [3] D. P. Knight, F. Vollrath, *Naturwissenschaften* **2001**, *88*, 179–182.
- [4] C. Vendrely, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 401–409.
- [5] D. Huemmerich, U. Slotta, T. Scheibel, *Appl. Phys. A* **2006**, *82*, 219–222.
- [6] F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247–260.
- [7] Y. Zhang, P. S. Cremer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 658–663.
- [8] D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604–13612.
- [9] J. H. Exler, D. Huemmerich, T. Scheibel, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3629–3632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3559–3562.
- [10] D. Huemmerich, T. Scheibel, F. Vollrath, S. Cohen, U. Gat, I. Ittah, *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 2070–2074.
- [11] S. G. Y. C. Bae, *Macromol. Res.* **2003**, *11*, 53–61.
- [12] U. Slotta, S. Hess, K. Spieß, T. Stromer, L. Serpell, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 183–188.
- [13] T. Scheibel, J. Bloom, S. L. Lindquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2287–2292.
- [14] H. Bohr, A. Kühle, A. H. Sørensen, J. Bohr, *Z. Phys. D* **1997**, *40*, 513–515.
- [15] A. Lammel, M. Schwab, U. Slotta, G. Winter, T. Scheibel, *ChemSusChem* **2008**, DOI: 10.1002/cssc.200800030.
- [16] J. M. Kenney, D. Knight, M. J. Wise, F. Vollrath, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4159–4163.
- [17] O. Hakimi, D. P. Knight, M. M. Knight, M. F. Grahn, P. Vadgama, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2901–2908.