

Artifizielle Eierstiele, hergestellt aus rekombinant produziertem Florfliegenseidenprotein**

Felix Bauer und Thomas Scheibel*

Seit Jahrzehnten hat Seide Wissenschaftler wegen ihrer mechanischen Eigenschaften (Kombination aus Zugfestigkeit, Dehnbarkeit und Zähigkeit), ihrer Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit inspiriert. Mögliche Anwendungen von Seide reichen vom Fahrzeugbau (beispielsweise Airbags) bis zu medizinischen Anwendungen (Nervenleitungen oder Wirkstofftransport).^[1–8] Florfliegen (Abbildung 1 A) verwenden Seidenfasern als Eierstiele. Im Unterschied zu den meisten anderen Seiden hat Eierstiel-Seide eine Cross- β -Struktur, die schon 1957 entdeckt wurde.^[9] Seitdem wurden nur wenige zusätzliche Cross- β -Seiden gefunden.^[10] In der Art *Chrysopa carnea* enthält die Spinnlösung hauptsächlich fünf Proteine (Abbildung 1 B), und in der Art *Mallada signata* wurden zwei Serin- und Glycin-reiche Proteine (MalXB1 (86 kD) und MalXB2 (55.5 kD)) gefunden. Beide MalXB-Proteine haben hochrepetitive Kernsequenzen, flankiert von kleinen terminalen Domänen.^[11] Die vermeintliche Sekundärstruktur der Kernsequenz beider Proteine ist β -Faltblatt-reich, mit einer Stranglänge von vier Aminosäuren, gefolgt von β -Schleifen (Abbildung 1 der Hintergrundinformationen). Um einen Eierstiel zu produzieren, platziert die Florfliege einen Tropfen Spinnlösung auf einer Oberfläche und drückt ein Ei in den Tropfen. Durch einfaches Ziehen am Ei wird ein Faden gezogen, der innerhalb weniger Sekunden aushärtet. In ihrer natürlichen Umgebung hängen die Eierstiele unter Blättern, aber wenn man sie umdreht, verbiegen sie sich nicht unter dem Gewicht des Eis (Abbildung 2 B). Allerdings sind Eierstiele bei hoher Luftfeuchtigkeit bis zu 600 % dehnbar.^[11]

Um biomimetisch einen Eierstiel mit identischen Eigenschaften zu produzieren, haben wir ein artifizielles Eierstielprotein entworfen und rekombinant produziert. Durch den repetitiven Charakter der bekannten Eierstielproteine war es möglich, eine Konsensussequenz des Kernbereichs von MalXB2 zu ermitteln, die wir [AS] nannten. Die Sequenz umfasst 48 Aminosäuren (Abbildung 1 D; Abbildung 1 der Hintergrundinformationen). Wie beim Herstellen von hoch repetitiven Spinnenseidenproteinen^[12,13] wurde DNA, die für

dieses Modul kodiert, mithilfe einer nahtlosen Klonierungstechnik^[12] multimerisiert, um die repetitive Sequenz nachzunehmen. Um ein für die Expression in *E. coli* optimiertes Gen zu erhalten, wurden die Sequenzen, die für die terminalen

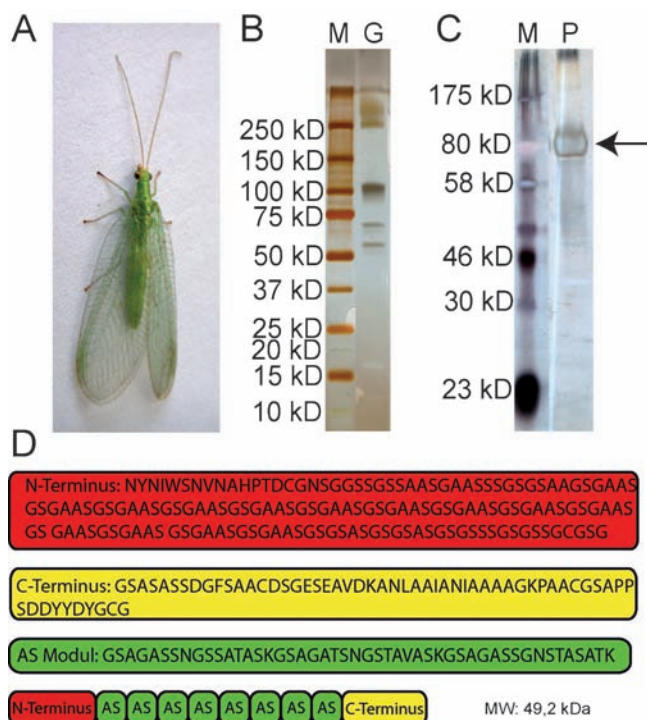


Abbildung 1. Natürliche und rekombinante Florfliegenseide. A) Florfliege *Chrysopa carnea*. B) Spinnlösung aus der Drüse einer weiblichen *Chrysopa carnea*, durch SDS-PAGE getrennt und mit Silberfärbung visualisiert; M: Proteinmarker; G: Florfliegendrüsen Extrakt. C) Gereinigtes rekombinantes N[AS]₈C-Protein; P: gereinigtes N[AS]₈C. D) Artifizielles Module.

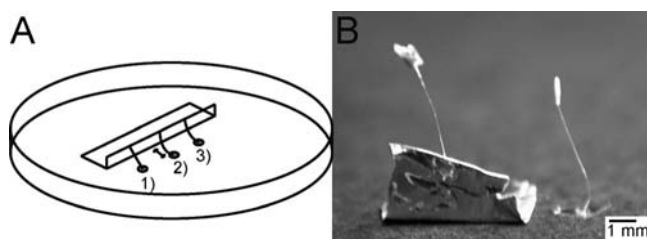


Abbildung 2. Vergleich von natürlichen und artifizellen Stielen. A) Schematisches Bild der Stielproduktion: 1) Stiel mit Pinzette aus dem Tropfen auf die Aluminiumfolie ziehen; 2) Entspannen des Stiels durch Verschieben der Aluminiumfolie; 3) der Stiel kontrahiert während der Nachbehandlung bei 60°C und 70% relativer Luftfeuchtigkeit. B) Bild eines artifizellen Stiels mit einem Stück Aluminiumfolie auf der Spitze (links) und ein natürlicher Stiel mit Ei an der Spitze (rechts).

[*] F. Bauer, Prof. Dr. T. Scheibel
Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth (Deutschland)
E-Mail: thomas.scheibel@uni-bayreuth.de
Homepage: <http://www.fiberlab.de>

[**] Wir danken Christopher Volker Synatschke für die Hilfe bei den MALDI-TOF-Messungen, Johannes Diehl und Claudia Blüm für die Unterstützung bei den SEM-Aufnahmen sowie Dr. Andrew Smith, Dr. Martin Humenik und Lukas Eisoldt für kritisches Lesen des Manuskripts.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201200591> zu finden.

Domänen kodieren, mit dem Konstrukt ligiert. Das artifizielle Protein N[AS]₈C enthält acht Wiederholungen des Moduls [AS], beide natürlichen Termini und hat ein Molekulargewicht von 53 kD, was dem des natürlichen Proteins MalXB2 entspricht.^[11] Zwar zeigte eine SDS-PAGE-Analyse ein höheres Molekulargewicht als für N[AS]₈C berechnet an, jedoch wurde die korrekte Masse mithilfe von Massenspektrometrie bestätigt (Abbildung 2 der Hintergrundinformationen).

Wegen der schlechten Löslichkeit von N[AS]₈C in wässrigen Lösungen wurde das Protein (10% (w/v)) in Hexafluoracetone (HFA) aufgenommen. Im Allgemeinen induziert HFA in gelösten Proteinen α -helikale Struktur;^[14] im Fall von N[AS]₈C wurde diese Sekundärstruktur durch Circular-dichroismus(CD)-Spektroskopie bestätigt (Abbildung 3 der Hintergrundinformationen). Die Stielbildung aus Seide nachahmend, wurde eine Pinzette in einen Tropfen N[AS]₈C-Lösung gedippt und eine Faser aus dem Tropfen gezogen. Das Ende des Stiels wurde auf ein Stück Aluminiumfolie geheftet, und anschließend wurde der Stiel getrocknet (Abbildung 2 A). Zur Nachbehandlung wurden die Stiele in einem Klimaschrank über Nacht bei 60 °C und 70% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Weitere mögliche Nachbehandlungsmethoden wären das Übersichten mit kosmotropen Salzlösungen, Ethanol, Methanol, Isopropanol oder das Anlegen hohen Drucks.^[15,16]

Die künstlichen Eierstiele haben eine glatte Oberfläche wie die natürlichen Stiele (Abbildung 4 der Hintergrundinformationen). Allerdings treten bei den natürlichen Stielen Einschnürungen auf, die durch Belastung unter hoher Luftfeuchtigkeit (> 30%) oder unter Wasser auftreten. Dieses Phänomen führt zu einem Verlust der Biegesteifigkeit in den eingeschnürten Bereichen, begleitet von einer Umformung von einer Cross- β - zu einer Parallel- β -Struktur.^[9] Solche Einschnürungen wurden nicht bei artifiziellen Stielen beobachtet.

Die Sekundärstruktur der artifiziellen und natürlichen Stiele wurde mit FT-IR-Spektroskopie analysiert (Abbildung 3). Fourier-Selbstdekonvolution der Amid-I-Region^[17] ergab einen niedrigeren β -Faltblatt-Anteil in den artifiziellen als in den natürlichen Stielen (Tabelle 1). FT-IR-

Tabelle 1: Durchschnittliche Sekundärstruktur von natürlichen und künstlichen Eierstielen vor (vZM) und nach Zugmessungen (nZM), mit FT-IR-Spektroskopie gemessen und durch Fourier-Selbstdekonvolution der Amid-I-Bande quantifiziert.^[17]

Sekundärstruktur	natürlicher Eierstiel vZM [%]	natürlicher Eierstiel nZM [%]	künstlicher Eierstiel vZM [%]	künstlicher Eierstiel nZM [%]
β -Faltblätter	40 \pm 6	39 \pm 5	32 \pm 3	39 \pm 4
α -Helices	6 \pm 4	7 \pm 1	9 \pm 2	7 \pm 1
β -Schleifen	24 \pm 3	22 \pm 1	30 \pm 3	24 \pm 1
Random Coils	30 \pm 4	32 \pm 2	29 \pm 1	30 \pm 2

spektroskopische Messungen vor und nach Zugmessungen zeigten keine Änderung bei natürlichen Stielen und einen leichten Anstieg des β -Faltblatt-Gehalts bei reduziertem β -Schleifen-Gehalt bei artifiziellen Stielen. Der α -helikale Anteil ist in beiden Stielen mit 6–9% relativ gering. Auffal-

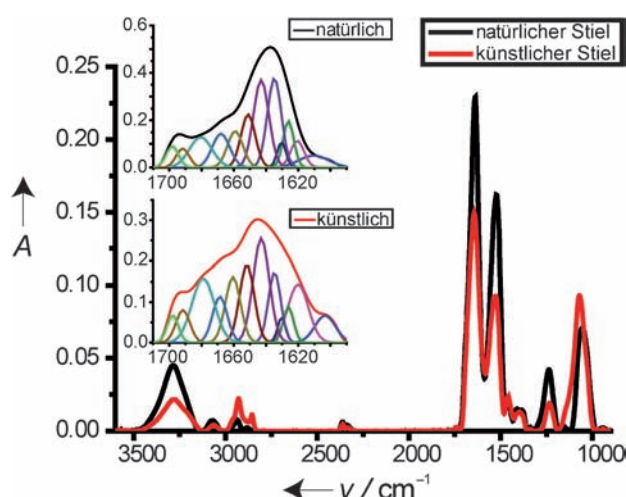


Abbildung 3: FT-IR-Absorptionsspektrum von natürlichen und artifiziellen Stielen vor den Zugmessungen; Einschübe: Fourier-Selbstdekonvolution der Amid-I-Region von natürlichen und artifiziellen Stielen.

lenderweise war der helikale Anteil vor und nach Zugmessungen gleich. Die mithilfe polarisierter FT-IR-Spektroskopie gemessene Poly(L-alanin)-NC α -Streckschwingung^[18] von natürlichen Eierstielen bei einer Wellenzahl von 1167 cm⁻¹ im Winkel zur Stielachse zeigt eine starke Orientierung der Poly(Ala)- β -Faltblätter im Winkel von 0 und 90° zur Stielachse (molekularer Ordnungsparameter^[25] S^{mol} : -0,44; Abbildung 5 der Hintergrundinformationen). Das künstlich hergestellte Protein hat keine Poly(alanin)-Sequenz, weshalb dessen Orientierung nicht detektierbar war. Dies zeigt, dass bisher unbekannte, Poly(alanin)-reiche Proteine, möglicherweise eines der drei zusätzlich in *C. carnea* vorkommenden (Abbildung 1 B), stark am Proteinausrichtungsprozess in natürlichen Stielen beteiligt sein könnten. Deshalb ist unser derzeitiger Ansatz nicht geeignet, die Eigenschaften von natürlichen Eierstielen vollständig nachzuahmen.

Sowohl der natürliche als auch der künstliche Stiel zeigen Doppelbrechung (Abbildung 4 A,B), die auf struktureller Anisotropie basiert. Die Doppelbrechung bei den natürlichen Stielen ist stark, da hoch geordnete kristalline Bereiche mit β -Faltblatt-Struktur, angeordnet im rechten Winkel zur Faserachse, vorhanden sind. Künstliche Stiele zeigen schwächere Doppelbrechung, was auf weniger stark geordnete Strukturen hinweist.

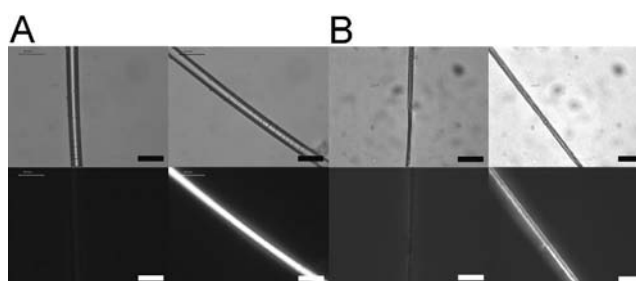


Abbildung 4: Vergleich der Doppelbrechung von natürlichen und künstlichen Stielen. A) Mikroskopisches Bild eines natürlichen Fliegen-Eierstiels. B) Mikroskopisches Bild eines künstlichen Stiels. Oben: Hellfeld; unten: mit gekreuzten Polarisatoren; Maßstab: 50 μ m.

Die künstlichen Stiele haben einen ähnlichen Durchmesser (10 μm) wie die natürlichen und zeigen auch Biegesteifigkeit (Abbildung 2B). Die mechanischen Eigenschaften wurden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit (RH) von 30 und 70 % sowie bei einer Temperatur von 22 °C gemessen. Das Kontrollieren der Luftfeuchtigkeit ist sehr wichtig für Zugmessungen von Seiden.^[19–21] Die Zugfestigkeit von natürlichen Eierstielen (*C. carnea*) ist unter den gewählten Bedingungen mit 68 MPa (30 % RH) und 155 MPa (70 % RH) relativ gering gegenüber den publizierten Werten von 186–375 MPa, gemessen bei 65 % RH (*Mallada signata* und *Chrysopa spec.*;^[11,22] Tabelle 2). Bei 30 % RH reißen die Stiele bei einer Dehnung von 2 %, während sie bei 70 % RH bei einer Dehnung von 211 % reißen (Abbildung 5 und Tabelle 2). Der Elastizitätsmodul von natürlichen Eierstielen bei 30 % RH beträgt 5.7 GPa, bei künstlichen Stielen hingegen nur ca. 40 % dieses Wertes (2.3 GPa). Die Zugfestigkeit von natürlichen Stielen beträgt 68 MPa und die der künstlichen Stiele 55 MPa (Tabelle 2). Wenn man die Porosität der künstlichen Stiele mit einbezieht, kann sogar eine Zugfestigkeit von ca. 63 MPa errechnet werden (30 % RH). Interessanterweise liegt die Zähigkeit von künstlichen Stielen bei 30 % RH bei 1.76 MJ m^{-3} und damit leicht höher als die der natürlichen Stiele mit 1.2 MJ m^{-3} .

Das artifizielle und rekombinant hergestellte Eierstielprotein der Florfliege konnte zu künstlichen Stielen verarbeitet werden, die bei 30 % RH annähernd gleiche Eigenschaften aufweisen wie die natürlichen Eierstiele. Die Stiele sind wie die natürlichen Stiele biegesteif, was sie für Anwendungen, bei denen Steifigkeit in transversaler Richtung von Bedeutung ist, interessant macht. Des Weiteren ermöglicht es der rekombinante Ansatz, das molekulare Struktur-Funktions-Verhältnis in Eierstielen besser zu verstehen. Als nächstes ist es wichtig, die Poly(alanin)-reichen Proteine zu identifizieren und wässrige Spinnlösungen zu erzielen, was nötig ist, um eine Vorstrukturierung zu erhalten. Eine vorstrukturierte Spinnlösung ist der Schlüssel für Fäden mit Cross- β -Struktur.

Experimentelles und Methoden

Alle Genmodule (N, [AS] und C) wurden mit einer 5'-*Bam*HI- und einer 3'-*Hind*III-Restriktionsschnittstelle konstruiert und bei Geneart bestellt. Die Module wurden mithilfe der Enzyme *Bsa*I, *Bsg*I und *Bse*RI geschnitten und anschließend ligiert.^[12] Das vollständige N[AS]₈C-Konstrukt wurde mithilfe von *Bam*HI und *Hind*III in einen pET28-Vektor kloniert.

BL21(DE3)-Zellen wurden mit pET28-N[AS]₈C transformiert und in einem Fermenter (Infors Minifors 2.5 L) nach einer zuvor beschriebenen Vorschrift kultiviert.^[23] Bei einem OD₆₀₀-Wert von 72 wurden die Bakterien drei Stunden mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und dreimal gewaschen.

Tabelle 2: Zugmessungen von natürlichen (*C. carnea*) und künstlichen Eierstielen. Die Versuche wurden bei 30 % RH und 70 % RH und bei einer Temperatur von 22 °C durchgeführt.

	Dehnbarkeit [%]	Zugfestigkeit σ_{max} [MPa]	Elastizitätsmodul [MPa]	Zähigkeit [MJ m^{-3}]
Literaturwerte ^[a]				
65 % RH ^[11]	381	310		
65 % RH ^[22]	249	ca. 375		
natürliche Eierstiele				
30 % RH	2 \pm 1	68 \pm 19	5777 \pm 1257	1.2 \pm 0.72
70 % RH	210 \pm 100	155 \pm 75	3175 \pm 1016	87 \pm 49
künstliche Eierstiele				
30 % RH	5 \pm 2	55 \pm 14	2330 \pm 850	1.76 \pm 0.9
70 % RH	6 \pm 3	25 \pm 11	1012 \pm 252	1.09 \pm 0.59

[a] Für *M. signata* und *C. spec.*

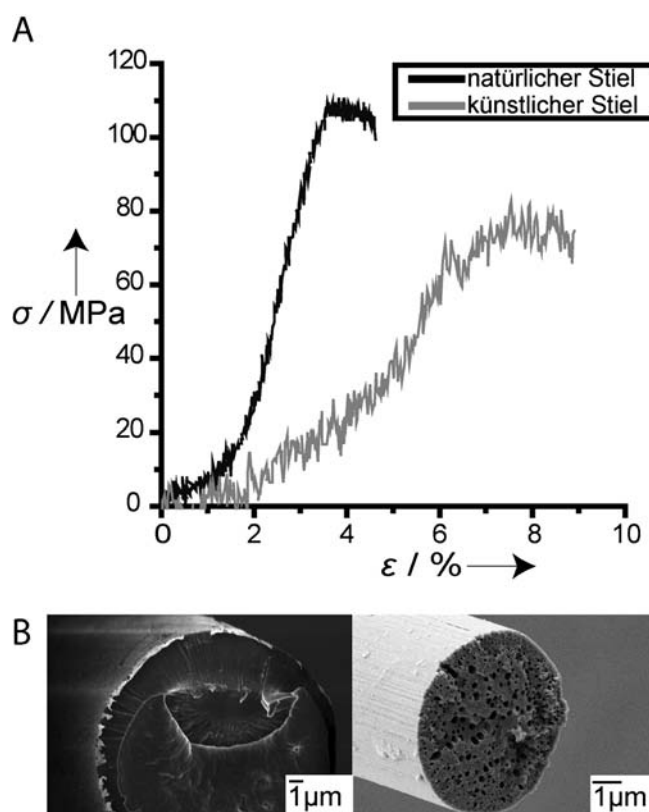


Abbildung 5. A) Spannungs-Dehnungs-Diagramm (Maximalwerte) von natürlichen und künstlichen Eierstielen bei 30 % RH. Die Unterschiede im Rauschen sind durch die kleineren Durchmesser der künstlichen Stiele zu erklären. B) SEM-Bilder von Querschnittsflächen von natürlichen (links) und künstlichen Stielen (rechts).

Die Reinigung erfolgte nach einer Vorschrift, die für rekombinante Seidenproteine beschrieben worden war.^[24] Nach Zelllyse, Ansäuern und Zentrifugieren wurde der Überstand fraktionierend mit Ammoniumsulfat gefällt (1.5 und 2.5 M). Das gefällte Protein wurde mit Wasser gewaschen und lyophilisiert.

Zur Analyse des produzierten Proteins wurden 3 mg mL^{-1} N[AS]₈C in 6 M Guanidiniumthiocyanat gelöst und auf eine Endkonzentration von 2 M Guanidiniumthiocyanat verdünnt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit ZipTip-C4-Pipettenspitzen entsalzt und mit Matrixlösung eluiert. MALDI-TOF-Massenspektrometrie erfolgte mit einem Bruker Reflex III, ausgerüstet mit

einem 337-nm-N₂-Laser, im Linearmodus und mit 20 kV Beschleunigungsspannung. Als Matrix wurde Sinapinsäure (20 mgmL⁻¹) in 50 % CH₃CN und 0.1 % Trifluoressigsäure in H₂O verwendet.

Die Stiele wurden aus seiner 10-proz. (w/v) Lösung von N[AS]₈C in HFA gezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die Spannung aus den Stielen durch Annähern der beiden Auflagepunkte entfernt, und die Proben wurden bei 60 °C und 70 % RH über Nacht in einem Klimaschrank nachbehandelt.

Für die Rasterelektronenmikroskopie (SEM) wurden die Proben durch Sputtern mit Platin beschichtet (Dicke 2 nm). Die SEM-Bilder wurden mit einem Zeiss-1530-Gerät unter der Verwendung des inlens-Detektors aufgenommen.

Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie wurde an einem Bruker tensor 27/pike MIRacle unter Verwendung der Hyperion-Einheit durchgeführt. Die Datenprozessierung und Fourier-Selbstdekonvolution der Amid-I-Region erfolgten mit der Opus-6.5-Software.^[17] Polarisierete FT-IR-spektroskopische Messungen und Prozessierung der Daten wurden gemäß Hagenau et al. durchgeführt.^[25]

Mikroskopische Aufnahmen erfolgten an einem Mikroskop (Leica DMI 3000B), das mit Polarisatoren ausgestattet war.

Proben für die Zugmessungen wurden mit Plastikklebstoff auf Plastikrahmen mit einem Spalt von 2 mm geklebt. Spannungs-Dehnungs-Kurven wurden mit einer Zugmaschine (Bose Electroforce 3220), ausgestattet mit einer 0.5-N-Kraftmessdose und einer Klimakammer zur Einstellung der relativen Luftfeuchtigkeit, aufgenommen. Die Stiele wurden mit einer Geschwindigkeit von 0.01 mms⁻¹ bis zum Reißen gedehnt.

CD-Spektren wurden von 250 bis 195 nm an einem Jasco-J-815-CD-Spektrometer mit einem Intervall von 0.1 nm, einer Bandbreite von 1 nm, einer Scangeschwindigkeit von 50 nmmin⁻¹, einer Digital Integration Time (D.I.T.) von 1 s und drei Akkumulierungen aufgenommen.

Eingegangen am 20. Januar 2012,

veränderte Fassung am 10. April 2012

Online veröffentlicht am 16. Mai 2012

Stichwörter: β-Faltblätter · Biomimetische Synthesen · Faserproteine · Seide

- [1] J. G. Hardy, T. R. Scheibel, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 1093–1115.
[2] A. Leal-Egana, T. Scheibel, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2010**, *55*, 155–167.

- [3] A. Lammel, M. Schwab, M. Hofer, G. Winter, T. Scheibel, *Biomaterials* **2011**, *32*, 2233–2240.
[4] C. Allmeling, A. Jokuszies, K. Reimers, S. Kall, C. Y. Choi, G. Brandes, C. Kasper, T. Scheper, M. Guggenheim, P. M. Vogt, *Cell Proliferation* **2008**, *41*, 408–420.
[5] C. Allmeling, A. Jokuszies, K. Reimers, S. Kall, P. M. Vogt, *J. Cell. Mol. Med.* **2006**, *10*, 770–777.
[6] K. Spiess, A. Lammel, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 998–1007.
[7] S. Weisman, V. S. Haritos, J. S. Church, M. G. Huson, S. T. Mudie, A. J. Rodgers, G. J. Dumsday, T. D. Sutherland, *Biomaterials* **2010**, *31*, 2695–2700.
[8] J. G. Hardy, L. M. Romer, T. R. Scheibel, *Polymer* **2008**, *49*, 4309–4327.
[9] K. D. Parker, K. M. Rudall, *Nature* **1957**, *179*, 905–906.
[10] C. L. Craig, *Annu. Rev. Entomol.* **1997**, *42*, 231–267.
[11] S. Weisman, S. Okada, S. T. Mudie, M. G. Huson, H. E. Trueman, A. Sriskantha, V. S. Haritos, T. D. Sutherland, *J. Struct. Biol.* **2009**, *168*, 467–475.
[12] D. Huemmerich, C. W. Helsens, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604–13612.
[13] C. Vendrely, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 401–409.
[14] J. M. Yao, H. Masuda, C. H. Zhao, T. Asakura, *Macromolecules* **2002**, *35*, 6–9.
[15] H. Peng, S. Zhou, J. Jiang, T. Guo, X. Zheng, X. Yu, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4636–4641.
[16] X. Zhang, M. R. Reagan, D. L. Kaplan, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 988–1006.
[17] X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6161–6170.
[18] W. H. Moore, S. Krimm, *Biopolymers* **1976**, *15*, 2465–2483.
[19] A. Schäfer, T. Vehoff, A. Glisovic, T. Salditt, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **2008**, *37*, 197–204.
[20] T. Vehoff, A. Glisovic, H. Schollmeyer, A. Zippelius, T. Salditt, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 4425–4432.
[21] G. R. Plaza, G. V. Guinea, J. Perez-Rigueiro, M. Elices, *J. Polym. Sci. Part B* **2006**, *44*, 994–999.
[22] H. R. Hepburn, H. D. Chandler, M. R. Davidoff, *Insect Biochem.* **1979**, *9*, 69–77.
[23] D. J. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E. A. Sanders, W. D. Deckwer, *J. Biotechnol.* **1995**, *39*, 59–65.
[24] X.-X. Xia, Z.-G. Qian, C. S. Ki, Y. H. Park, D. L. Kaplan, S. Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 14059–14063.
[25] A. Hagenau, P. Papadopoulos, F. Kremer, T. Scheibel, *J. Struct. Biol.* **2011**, *175*, 339–347.