

**Heterologe Expression hochmolekularer repetitiver Spinnenseiden-basierter Proteine  
*in planta* sowie deren mechanische und immunologische Charakterisierung**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
-Biowissenschaften-  
der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt  
von Valeska Hauptmann  
geb. am 07.06.1983 in Wippra

Gutachter    1. Prof. Dr. Udo Conrad  
                  2. Prof. Dr. Karsten Mäder  
                  3. Prof. Dr. Eva Stöger

Tag der öffentlichen Verteidigung: 13.11.2015

„Die echte Geduld zeugt von großer Elastizität“

Novalis

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungen und Tabellen .....	III
Abkürzungen .....	IV
<b>1 Einleitung</b>	
1.1 Die Spinnenseide – ein faszinierendes Biopolymer .....	1
1.2 Die Spinnenseide der großen Ampullendrüse .....	4
1.3 Die Flagelliform-Seide.....	5
1.4 Die biotechnologische Herstellung des Biopolymers Spinnenseide .....	6
1.5 Posttranslationale Modifizierungen zur Herstellung von hochmolekularen Proteinen .....	10
1.5.1 Posttranslationale Multimerisierung mit gespaltenen Inteinen.....	11
1.5.2 Posttranslationale Multimerisierung mit mikrobieller Transglutaminase.....	12
1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit .....	13
<b>2 Ergebnisse</b>	
2.1 Publikationsübersicht zu dieser Arbeit .....	14
2.1.1 Weitere Publikationen .....	15
2.2 Expression von Spinnenseidenproteinen nativen Molekulargewichtes in Pflanzen durch Intein-basierte Multimerisierung .....	16
2.2.1 Zusammenfassung .....	16
2.2.2 Artikel .....	17
2.2.3 Ergänzende Ergebnisse: Intein-basierte Multimerisierung von Glutenin....	27
2.3 Transglutaminierung ermöglicht die Produktion und Charakterisierung von ELPylierten Spinnenseidenproteinen nativen Molekulargewichtes aus transgenen Pflanzen.....	28
2.3.1 Zusammenfassung.....	28

2.3.2	Artikel .....	28
2.4	Die Produktion von ELPylierten Spidroin-basierten Proteinen <i>in planta</i> führt zu nicht-cytotoxischen Biopolymeren.....	40
2.4.1	Zusammenfassung.....	40
2.4.2	Artikel .....	41
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	
3.1	Aufbau und Bedeutung der Primärstruktur der Spidroin-basierten Biopolymere.....	56
3.2	Effektivität der angewandten Multimerisierungsstrategien.....	59
3.3	Immunologische Analysen auf dem Weg zum Biomaterial .....	60
3.4	Technische Anforderungen an biomedizinischen Applikationsformen aus Spinnenseide.....	63
3.4.1	Cytokompatibilität von rekombinant hergestellten Spidroiden .....	64
3.4.2	Ausblick: Weiterverarbeitung von rekombinanten Spidroiden für biomedizinische Zwecke .....	66
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung/Summary.....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>79</b>
6.1	Ergänzende Daten zu Artikel 2.2.2.....	79
6.2	Ergänzende Daten zu Artikel 2.3.2.....	81
6.3	Ergänzende Daten zu Artikel 2.4.2.....	83
	Danksagung .....	84
	Lebenslauf.....	85
	Eidesstattliche Erklärung .....	86

## Abbildungen

Abbildung 1.1	Der schematische Aufbau eines Spinnennetzes .....	2
Abbildung 1.2	Konsensus-Motive eines <i>ensemble repeat</i> des Proteins Flag.....	5
Abbildung 1.3	Proteinspleißen in <i>trans</i> mit einem gespaltenen Intein .....	11
Abbildung 1.4	Dreidimensionale Proteinstruktur der mikrobiellen Transglutaminase.....	12
Abbildung 2.1	Multimerisierung von Gluteninen durch <i>trans</i> -Proteinspleißen .....	27

## Tabellen

Tabelle 1.1	Die mechanischen Eigenschaften von Spinnenseiden.....	3
Tabelle 1.2	Übersicht von natürlichen und synthetischen Spidroinen aus prokaryotischen und eukaryotischen Expressionssystemen .....	9

# Abkürzungen

AFM	<i>atomic force microscope</i> , Rasterkraftmikroskop
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ELP	elastinähnliches Polypeptid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
Flag	Flagelliform-Seide
Gl.	<i>Glandulae</i> , Drüsen
GPa	Gigapascal
IgG	Immunglobulin G
IntC/IntN	Intein C/InteinN
ITC	<i>inverse transition cycling</i>
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LeB4	Legumin B4
MaSp1	<i>major ampullate spidroin 1</i>
mITC	<i>membrane-based ITC</i>
MJ	Megajoule
<i>N. clavipes</i>	<i>Nephilia clavipes</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
ssp.	Subspecies
TNF	Tumornekrosefaktor
tRNA	Transfer-DNA

Einbuchstaben-Aminosäurecode		(X= alle Aminosäuren außer Prolin)	
Aminosäure	Einbuchstabencode	Aminosäure	Einbuchstabencode
Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Thryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

# Einleitung 1

## 1.1 Die Spinnenseide – ein faszinierendes Biopolymer

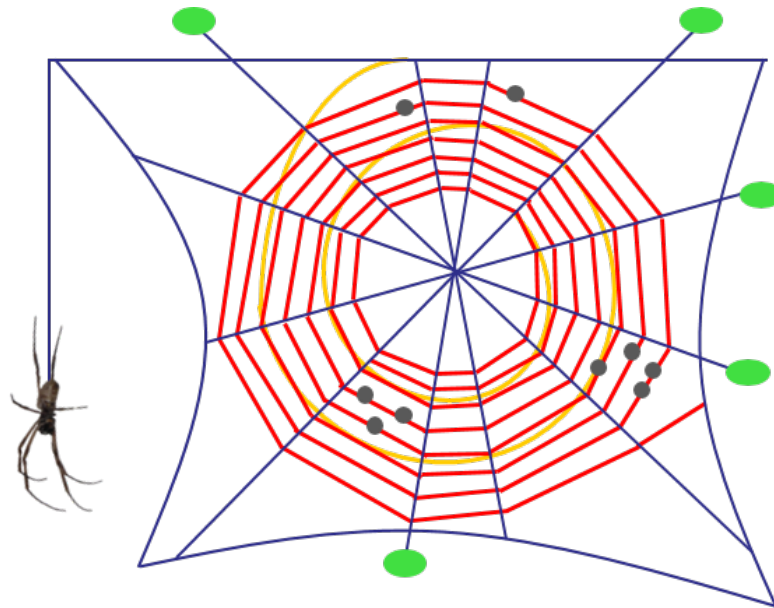
Das aus Proteinen bestehende Biomaterial Spinnenseide weist eine einzigartige Kombination aus Zugfestigkeit und Elastizität auf, die von keinem industriell gefertigten Material erreicht wird. Neben Spinnentieren (*Arachnida*) sind auch die zu den Gliederfüßern (*Arthropoda*) gehörenden Klassen der Insekten (*Insecta*) und Tausendfüßer (*Myriapoda*) in der Lage, Seiden aus den in speziellen Drüsen produzierten Seidenproteinen zu bilden. Definitionsgemäß spricht man bei den natürlich vorkommenden Seiden von fibrillären Proteinen mit einer hochrepetitiven Aminosäuresequenz (Craig, 1997). Sie gehören zu den biologisch abbaubaren Biopolymeren tierischen Ursprungs (Endres *et al.*, 2009).

Im Fokus dieser Arbeit stehen die Spinnenseiden der Goldenen Radnetzspinne *Nephila clavipes* (*N.clavipes*), deren weiblichen Vertreter mit den in ihrem Hinterleib lokalisierten vielgestaltigen und umfangreichen Spinndrüsen bis zu sieben verschiedene Arten von Seide produzieren, welche für die jeweilige Anwendung optimierte Eigenschaften besitzen (Foelix, 1992; Gosline *et al.*, 1999). Einen Überblick über die Seidenarten und ihrer Verwendung gibt die Abbildung 1.1. Ein Spinnennetz besteht hauptsächlich aus den reißfesten Fäden der Major-Ampullate-Seide (MA-Seide), auch Tragfadenseide genannt, welche die strahlenförmig aufgebauten Rahmen und Speichen bilden und aus der in diesem Gerüst integrierten Fangspirale aus der dehnbaren Flagelliform-Seide. Beim Bau der Fangspirale orientiert sich die Radnetzspinne an einer Hilfsspirale, welche sie zuvor aus der Minor-Ampullate-Seide (MI-Seide) konstruiert hat. Abschließend wird die Fangspirale mit der klebrigen Aggregat-Seide beschichtet (Vollrath *et al.*, 1989).



Zur Befestigung des Spinnennetzes wird die Pyriform-Seide verwendet. Diese Kombination aus den genannten verschiedenen Spinnenseiden ermöglicht die Konstruktion eines kompletten, sogenannten Radnetzes (Vollrath, 2000). Weitere Funktionen erfüllen die Spinnenseiden bei der Fortpflanzung (s. Abbildung 1.1 B).

**A**



**B**

Seidentyp	Sekretionsort	Lokalisation, Funktion
Major-Ampullate-Seide (MA-Seide)	große Ampullendrüsen ( <i>Gl. ampullaceae majoris</i> )	Rahmen des Netzes (Tragfäden), Abseilfaden
Minor-Ampullate-Seide (MI-Seide)	kleine Ampullendrüsen ( <i>Gl. ampullacea minoris</i> )	Hilfsspiralfaden
Flagelliform-Seide	Geißelförmige Drüsen ( <i>Gl. flagelliformes</i> )	Fäden der Fangspirale
Aggregat-Seide	Aggregatdrüsen ( <i>Gl. aggregates</i> )	klebrige Beschichtung auf Fangfäden
Piriform-Seide	birnenförmige Drüsen ( <i>Gl. piriformes</i> )	Haftpunkte zur Befestigung des Netzes
Tubulinform-Seide*	zylindrische Drüsen ( <i>Gl. tubiliformes</i> )	äußere Kokonhülle
Aciniform-Seide*	aciniforme Drüsen ( <i>Gl. aciniformes</i> )	Beutekokon, innere Kokonhülle

Referenzen: Foelix, 1992; Hu *et al.*, 2006; Gl. = Glandulae; \*nicht im Schema abgebildet

**Abbildung 1.1** (A) Der schematische Aufbau eines Spinnennetzes der Goldenen Radnetzspinne (*Nephila clavipes*) zeigt die Verwendung der verschiedenen Seidentypen. Ein weibliches Exemplar der Art hängt am Abseilfaden. (B) Auflistung der in (A) dargestellten Seidentypen (farblich zugeordnet) sowie ihrem Sekretionsort und der Verwendung. Jede Drüsenart sekretiert eine bestimmte Spinnenseide.

Natürliche Spinnenseiden sind für ihre herausragenden mechanischen Eigenschaften bekannt. Beispielsweise verfügt die Tragfaden-Seide im Vergleich zu synthetischen Polymeren über eine außerordentliche Zähigkeit (Gosline *et al.*, 1999). Diese Materialeigenschaft beschreibt die Energie, die ein Material pro Volumen aufnehmen kann, bevor es reißt. Auf das Gewicht bezogen ist die Tragfaden-Seide um das Dreifache zäher und zugfester als die Hochleistungsfaser Kevlar. Spinnen nutzen zum Bau der Fangspirale in ihren Netzen die Flagelliform-Seide. Diese ist aufgrund der hohen Elastizität und Dehnbarkeit in der Lage, den Aufprall der Beute abzufangen (Vendrey *et al.*, 2008). Die Dehnbarkeit der Flagelliform-Seide ist der von Nylon überlegen (s. Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Die mechanischen Eigenschaften von Spinnenseiden im Vergleich zu anderen biologischen und synthetischen Polymeren.

Material	Zugfestigkeit (GPa)	Zähigkeit (MJ/m <sup>3</sup> )	Dehnbarkeit (%)
MA-Seide (Tragfaden)*	1.1	160	27
Flagelliform-Seide*	0.5	150	270
Insektenseide ( <i>B. mori</i> )	0.6	70	18
Elastin	0.002	2	150
Nylon	0.95	80	18
Kevlar	3.6	50	2.7
Stahl	1.5	6	0.8
Carbon-Faser	4.0	25	1.3

Werte übernommen von Gosline *et al.* (1999) und Heim *et al.* (2009), \*Daten für *Araneus*

Die Proteine, aus denen die Spinnenseiden hauptsächlich bestehen, werden als Spidroine (*spider fibroin*) bezeichnet. Bei der Art *N. clavipes* erfolgt die Nomenklatur nach dem Drüsentyp, z.B. bedeutet MaSp1 „Major Ampullate Spidroin 1“. Spinnenseidenproteine bestehen aus einer stark repetitiven Kerndomäne, welche von nichtrepetitiven N- und C-terminalen Bereichen flankiert wird. Die im hochrepetitiven Kernbereich wiederkehrende Sequenzelemente werden als Konsensus-Motive bezeichnet (Gatesy *et al.*, 2001).

## 1.2 Die Spinnenseide der großen Ampullendrüse

Die MA-Seide der Goldenen Radnetzspinne zählt zu den am besten untersuchten Spinnenseiden (Beckwitt *et al.*, 1998; van Beek *et al.*, 2002; Sponner *et al.*, 2005; Gaines *et al.*, 2008). Die Hauptproteinkomponenten sind MaSp1 und MaSp2, deren Monomere eine native Größe von jeweils über 350 kDa aufweisen (Lewis, 2006).

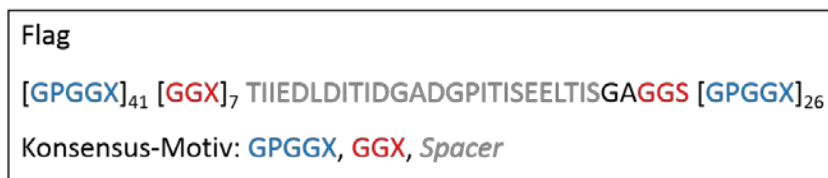
Erste Sequenzdaten von der partiellen cDNA eines für MA-Seide codierenden Gens der Art *Nephila clavipes* wurden 1990 veröffentlicht und das Spidroin MaSp1 somit erstmals beschrieben (Xu *et al.*, 1990). Nach Identifizierung eines Prolin-haltigen Peptids in der MA-Seide, welches nicht durch MaSp1 codiert wurde, konnte in einer weiteren partiellen cDNA das Spidroin MaSp2 identifiziert werden (Hinman *et al.*, 1992). Ayoub *et al.* beschrieben 2007 erstmals die Spinnenseidengene MaSp1 und MaSp2 der Schwarzen Witwe (*Latrodectus hesperus*) in voller Länge (einschließlich der flankierenden Regionen). Demnach werden die hochrepetitiven Polypeptide jeweils durch ein Gen codiert, welches aus einem riesigem Exon (>9000 Basenpaare) besteht (Ayoub *et al.*, 2007).

In den Primärstrukturen der beiden Spidroine der MA-Seide treten die Konsensus-Motive  $A_n$  (MaSp1 und MaSp2) sowie  $(GA)_n$  (MaSp1) auf. Diese Alanin-reichen Regionen kommen in der Sekundärstruktur als  $\beta$ -Faltblätter vor (Parkhe *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 2008). Diese Strukturen bilden eine Art Kristallgerüst, welches für die hohe Zugfestigkeit der MA-Seide verantwortlich sein soll (Hu *et al.*, 2006). Außerdem tritt das Konsensus-Motiv GGX (X = Y, L, Q) im Spidroin MaSp1 auf. Die daraus folgende Sekundärstruktur könnte eine  $3_{10}$ -Helix sein, welche als Bindeglied zwischen den kristallinen Bereichen auftritt. Im Spidroin MaSp2 treten neben den Alanin-reichen Regionen in der Primärstruktur noch die Konsensus-Motive GPGGX bzw. GPGQQ auf. Die daraus entstehende Sekundärstruktur einer  $\beta$ -Spirale verleiht den Spinnenseiden ihre Elastizität (Lewis, 2006).

Die häufigen Wiederholungen der Konsensus-Motive in der Primärsequenz führen zu einem hohen Anteil der Aminosäuren Glycin, Alanin, Glutamin, Prolin und Serin in den Spidroinen der großen Ampullendrüse.

### 1.3 Die Flagelliform-Seide

Sie besteht aus dem Spidroin FLAG, dessen natives Molekulargewicht rund 500 kDa beträgt (Lewis, 2006). Erste Sequenzdaten eines *Flag* cDNA-Klons von *N. clavipes* wurden von Hayashi und Lewis 1998 veröffentlicht. Zwei Jahre später folgten Daten zur genomischen Sequenz aus derselben Art (Hayashi *et al.*, 2000). Das für das Spinnenseidenprotein codierende Gen (*Flag*) hat eine Größe von annähernd 30 kb und zeigt ein Muster aus sich wiederholenden Introns und Exons. Dieser Aufbau ist untypisch, da Spinnenseidenproteine oftmals durch ein großes Exon codiert werden (Beckwitt *et al.*, 1998). Ein Gen *Flag* besteht aus insgesamt dreizehn Exons. Davon codiert das erste Exon den nichtrepetitiven N-terminalen Bereich des nach der Translation vorliegenden Spinnenseidenproteins und Teile des dreizehnten Exons den nichtrepetitiven C-Terminus. Die repetitive Kerndomäne von FLAG wird folglich durch elf Exons codiert, von denen jedes jeweils einen sogenannten *ensemble repeat* (ganze Wiederholungseinheit) verschlüsselt (Hayashi *et al.*, 2000). Abbildung 1.2 zeigt die typischen Konsensus-Motive, aus denen sich ein *ensemble repeat* des Spinnenseidenproteins Flag zusammensetzt.



**Abbildung 1.2** Konsensus-Motive eines *ensemble repeat* des Proteins Flag von *Nephila clavipes*. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode wiedergegeben (Lewis, 2006).

Der Glycin-reiche repetitive Hauptteil besteht demnach aus einer Primärstruktur, welche mit den drei verschiedenen Konsensus-Motiven GPGGX, GGX und einem nicht seidentypischen *Spacer* die Grundlage für die außergewöhnlichen Eigenschaften der Flagelliform-Seide bilden. Wiederholungen des Motivs (GPGGX)<sub>n</sub> ergeben in der Sekundärstruktur eine  $\beta$ -Schleife (Typ II), welche aneinandergereiht einer Sprungfeder im Nanoformat ähneln könnte (Hayashi *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001). Zusammen mit dem Sekundärstrukturelement  $3_{10}$ -Helix, gebildet aus dem Konsensus-Motiv GGX, sind diese Elemente verantwortlich für die enorme Elastizität und Flexibilität der Flagelliform-Seide (Ohgo *et al.*, 2006).

Die Funktion des *Spacers* war lange Zeit nicht bekannt. Da er hauptsächlich aus geladenen und hydrophilen Aminosäuren besteht, wurde angenommen, dass er zur Unterteilung der einzelnen *ensemble repeats* beiträgt (Hu *et al.*, 2006). Adrianos *et al.* (2013) konnten mit der Untersuchung von artifiziell erzeugten Fasern aus vier verschiedenen rekombinanten Proteinen, die eine unterschiedliche Zusammensetzung von bis zu drei typischen Motiven von FLAG aufwiesen, zur Aufklärung der Funktion beitragen. Die mechanischen Analysen zeigten, dass Fäden, die nur das GGX-Motiv enthielten, am dehnbarsten waren. Enthielten die Fasern zusätzlich das *Spacer*-Motiv, konnte zusätzlich eine erhöhte Festigkeit ermittelt werden. Die Fasern bestehend aus Wiederholungen aller drei Motive zeigten im Vergleich zu den Fasern aus den anderen drei Proteinen die höchste Festigkeit und eine moderate Dehnbarkeit. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der *Spacer* als eine Art „Festigkeits-Motiv“ fungiert (Adrianos *et al.*, 2013).

#### 1.4 Die biotechnologische Herstellung des Biopolymers Spinnenseide

Die herausragenden mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide (Zugfestigkeit, Dehnbarkeit, Zähigkeit, s. Abschnitt 1.1) bedingen ein großes Interesse an diesem Biopolymer. Im Bereich Technik könnten Spinnenseiden in die Außenhülle von Flugzeugen oder Autos integriert werden, was zu einer Minimierung des Gewichts führen und sie gleichzeitig unempfindlicher gegen wechselnde Umwelteinflüsse machen würde (Kluge *et al.*, 2008; Hardy *et al.*, 2009). Auch für Anwendungen in der Medizin kann die Spinnenseide aufgrund weiterer charakteristischer Eigenschaften eingesetzt werden. Zum einen sei hier die Biokompatibilität genannt, d.h. die Spinnenseiden wirken auf biologische Systeme nicht toxisch oder haben keine schädlichen Effekte auf sie. Ein weiterer Vorteil ist, dass sie biologisch abbaubar sind. Diese Eigenschaften, in Kombination mit ihren mechanischen Eigenschaften, machen z.B. eine Verwendung in Wundauflagen und Bandagen interessant (Gatesy *et al.*, 2001). Spidroine als Wirkstoffträgersysteme oder als Gerüst- und Trägermaterialien in der Gewebezüchtung sind bereits untersucht worden (Altman *et al.*, 2003; Widhe *et al.*, 2010; Hofer *et al.*, 2012). In der Chirurgie könnten Spinnenseiden als Nahtmaterial eingesetzt werden (Spiess *et al.*, 2010). All diese potenziellen Anwendungen erfordern eine Produktion im Großmaßstab für die Erzeugung industriell relevanter Mengen.

Die Gewinnung natürlicher Spinnenseide für die Umsetzung dieser Anwendungen ist nicht effizient. Spinnen verteidigen ihr Territorium sehr aggressiv, sodass eine Form der Massentierhaltung mit großem Platzbedarf und hohen Kosten verbunden wäre (Kluge *et al.*, 2008). Beispielhaft sei an dieser Stelle das Projekt von Simon Peers und Nicholas Godley zur Herstellung eines Umhanges aus natürlicher Spinnenseiden der Goldenen Radnetzspinne (*Nephila madagascariensis*) genannt. Die Seide für dieses Kleidungsstück wurde aus ungefähr 1,2 Millionen Spinnen gewonnen, welche in der Natur gesammelt und nach dem Melken eines 30-50 Meter langen Spinnenseidenfadens wieder in ihre natürliche Umgebung ausgesetzt wurden. Die Herstellung dieses einzigartigen Produktes mit einem Gewicht von 1,5 kg dauerte 8 Jahre (Chung *et al.*, 2012). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass sich die Zusammensetzung natürlicher Spinnenseide durch Ernährung und Einwirken von Umwelteinflüssen verändert (Craig *et al.*, 2000). Zudem produzieren Radnetzspinnen verschiedene Spinnenseidentypen. Beim Melken der Spinnen, wobei der Spinnenseidenfaden aus der Spinndüse gezogen wird, kann nur MA-Seide gewonnen werden. Andere Varianten von Spinnenseiden, vor allem mit definierten Zusammensetzung, sind auf diesem Weg nicht produzierbar.

Der enorme Bedarf an Spinnenseidenproteinen von gleichbleibender Qualität kann nach dem heutigen Stand der Technik nur mit Hilfe biotechnologischer Verfahren gedeckt werden. Die heterologe Expression zur Erzeugung rekombinanter Spidroine ist dafür die Methode der Wahl. Zum einen wurden mit dieser Methode natürliche Spidroine bzw. deren partielle Sequenzen in verschiedenen Wirtsorganismen produziert, z.B. MaSp1 in *E.coli*. Das Molekulargewicht des rekombinanten Spidroins betrug lediglich 43 kDa (Arcidiacono *et al.*, 1998). Aufgrund des repetitiven Aufbaus der großen Proteine treten bei deren Translation zahlreiche Probleme auf. Die verwendeten Codons von Spinne und Wirtsorganismus sind unterschiedlich und durch die einseitige Aminosäurezusammensetzung und der daraus folgenden Erschöpfung des tRNA-Vorrats kann es zum Abbruch der Translation kommen (Gustafsson *et al.*, 2004). Ebenso sind die codierenden repetitiven Gene im Wirtsorganismus oftmals instabil, sodass mit zunehmender Größe des Gens die Expressionseffizienz abnimmt (Heim *et al.*, 2009; Humenik *et al.*, 2011). Zum anderen werden für die heterologe Expression synthetische Gene verwendet, welche essentielle Bestandteile eines Spidroins enthalten, z.B. die Kombination verschiedener Konsensus-Motive. Bei der rekombinanten Herstellung

synthetischer Spidroine kann die Translationseffizienz durch Adaption der verwendeten Codons an den Wirtsorganismus erhöht werden.

Ebenso entscheidend für die rekombinante Herstellung von Spidroiden ist das verwendete Expressionssystem. Einerseits können Spidroine in prokaryotischen Expressionssystemen produziert werden, hierfür wird oftmals *E.coli* verwendet (Rabotyagova *et al.*, 2009; An *et al.*, 2012). Dieses ist leicht manipulierbar, hat kurze Generationszeiten, die Produktionskosten sind relativ gering und eine Maßstabsvergrößerung der Produktion ist möglich (Tokareva *et al.*, 2013). Andererseits weisen die stark repetitiven Gene, welche die Spidroine codieren, in diesem Expressionssystem ein hohes Maß an genetischer Instabilität auf. Häufig kommt es zu Veränderungen in der Nukleotidsequenz durch homologe Rekombination, Insertionen und Deletionen. Die Herstellung eines synthetischen MaSp1 nativer Größe gelang mit Hilfe eines metabolisch modifizierten *E.coli*-Stammes. Durch Überexpression der tRNA<sup>Gly</sup> konnten Spidroine bis zu einer Größe von 284.9 kDa synthetisiert werden (Xia *et al.*, 2010). Weitere prokaryotische Expressionssysteme, die zur Herstellung rekombinanter Spidroine verwendet wurden, sind *Salmonella typhimurium* (Widmaier *et al.*, 2009) und *Bacillus subtilis* (Fahnestock *et al.*, 2000).

Darüber hinaus können Spidroine in eukaryotischen Expressionssystemen, z.B. Hefen (Agapov *et al.*, 2009), Pflanzen (Scheller *et al.*, 2001; Barr *et al.*, 2004) und Säugerzellen (Lazaris *et al.*, 2002) hergestellt werden. Diese verfügen im Vergleich zu prokaryotischen Expressionssystemen über einen komplexeren Transkriptions- und Translationsmechanismus sowie zusätzliche Zellkompartimente. Daher sind sie in der Lage, Proteine mit besonderen Eigenschaften hinsichtlich Größe und aufwendiger Faltung zu produzieren sowie posttranslational zu modifizieren. Eine Übersicht zur rekombinanten Herstellung natürlicher und synthetischer Spidroine in verschiedenen pro- und eukaryotischer Expressionssystemen ist in Tabelle 1.2 zu finden.

Tabelle 1.2: Übersicht von natürlichen und synthetischen Spidroinen aus prokaryotischen und eukaryotischen Expressionssystemen.

Ursprungsorganismus	Spinnenseidenprotein	Klon	Wirtsorganismus	MW (kDa)	Referenz
<b>prokaryotisch</b>					
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1/MaSp2	synthetisch	<i>Escherichia coli</i>	15-41	Prince <i>et al.</i> , 1995
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	natürlich	<i>Escherichia coli</i>	16-39.5	Dams-Kozłowska <i>et al.</i> , 2013
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	synthetisch	<i>Escherichia coli</i>	25	Winkler <i>et al.</i> , 1999
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp2	synthetisch	<i>Escherichia coli</i>	31-112	Lewis <i>et al.</i> , 1996
<i>Araneus diadematus</i>	ADF3/ADF4	natürlich	<i>Escherichia coli</i>	34.9-56.1	Huemmerich <i>et al.</i> , 2004
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	natürlich	<i>Escherichia coli</i>	43	Arcidiacono <i>et al.</i> , 1998
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	synthetisch	<i>Escherichia coli</i>	46-70	An <i>et al.</i> , 2011
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1/MaSp2	synthetisch	<i>Escherichia coli</i>	65-163	Fahnestock und Irwin, 1997
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	synthetisch	<i>Escherichia coli</i>	100.7-284.9	Xia <i>et al.</i> , 2010
<b>eukaryotisch</b>					
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1/MaSp2	synthetisch	Hefe ( <i>Pichia pastoris</i> )	65-163	Fahnestock und Bedzyk, 1997
<i>Nephila madagascariensis</i>	MaSp1 (1F9)/ MaSp2 (2E12)	synthetisch	Hefe ( <i>Pichia pastoris</i> )	94-113	Bogush <i>et al.</i> , 2009
<i>Araneus ventricosus</i>	Flag	natürlich	Insektenzellen ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	28	Lee <i>et al.</i> , 2007
<i>Nephila clavipes</i>	Flag	natürlich	Insekten ( <i>Bombyx mori</i> )	37	Miao <i>et al.</i> , 2006
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	natürlich	Insekten ( <i>Bombyx mori</i> )	83	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1 (SO1)	synthetisch	Pflanze ( <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Solanum tuberosum</i> )	51.2-99.8	Scheller <i>et al.</i> , 2001
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1/MaSp2	synthetisch	Pflanze ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	60.3/58.6	Menassa <i>et al.</i> , 2004
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1 (DP1B)	synthetisch	Pflanze ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	64	Yang <i>et al.</i> , 2005
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1-Fusionsprotein (SO1-100xELP)	synthetisch	Pflanze ( <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Solanum tuberosum</i> )	94.2	Scheller <i>et al.</i> , 2004
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	synthetisch	Säugetier ( <i>Mus musculus</i> )	31-66	Xu <i>et al.</i> , 2007



Im Rahmen dieser Arbeit wurden rekombinante Spidroine aus Pflanzen (*Nicotiana spp.*) verwendet. Erstmals wurde die Expression synthetischer Spinnenseidenproteine in *planta* von Scheller *et al.* (2001) beschrieben. Dafür wurden fünf verschiedene synthetische Gene aus Konsensus-Motiven von MaSp1 hergestellt. Das synthetische Spidroin SO1 weist eine Ähnlichkeit von 94% zum natürlichen MaSp1 auf. Nach ubiquitärer Expression in Pflanzen (Tabak, Kartoffeln) konnten die synthetischen Spidroine bis zu einem Molekulargewicht von 100 kDa in Blattextrakten detektiert werden. Mit einer Kombination aus Hitze-, Säure- und Ammoniumsulfatfällung wurden die Spidroine aus dem Blattmaterial gereinigt (Scheller *et al.*, 2001). Die Reinigung konnte durch die Erzeugung eines Fusionsproteins aus dem synthetischen Spidroin und Elastin-ähnlichen Polypeptiden (ELP, *elastine like polypeptide*) vereinfacht werden. ELP's weisen ebenfalls eine stark repetitive Struktur auf und sind aus dem Pentapeptid VPGXG (X = alle Aminosäuren außer Prolin) aufgebaut (Urry, 1988). Bis zu 100 Wiederholungen von ELP wurden als Fusionspartner genutzt. Zum einen konnte dadurch die Akkumulation der exprimierten Proteine im endoplasmatischen Retikulum erhöht werden (Scheller *et al.*, 2004). Zum anderen wurde das *Inverse Transition Cycling* (ITC) ermöglicht. Dieses Reinigungsverfahren beruht auf der Eigenschaft von ELP's, unterhalb einer charakteristischen Übergangstemperatur ( $T_t$ ) in Wasser löslich zu sein und oberhalb von  $T_t$  einschließlich des Fusionspartners zu aggregieren. Dadurch wird die kontrollierte und reversible Ausfällung von ELPylierten Proteinen ermöglicht (Meyer *et al.*, 1999; Floss *et al.*, 2010).

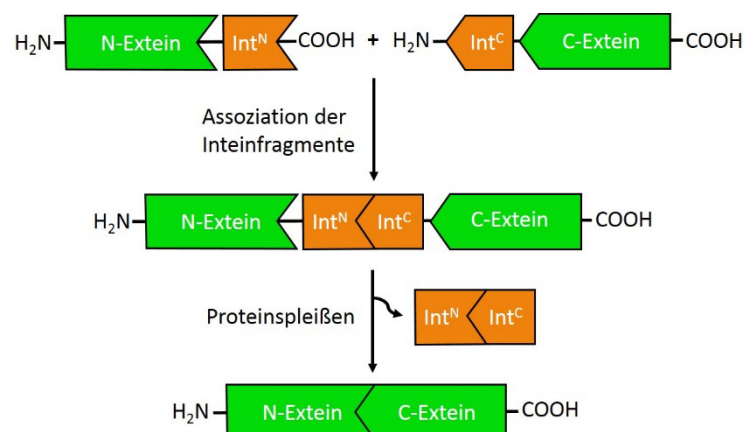
### 1.5 Posttranslationale Modifizierungen zur Herstellung von hochmolekularen Proteinen

Die bisher nachgewiesenen nativen Größen eines Spidroin-Monomers von bis zu 500 kDa lassen vermuten, dass die enorme Größe ein entscheidender Faktor bei der Ausbildung der mechanischen Eigenschaften spielt (Lewis, 2006). Um die natürlichen Spinnenseiden bestmöglich nachzuahmen sollten ihnen die rekombinant hergestellten Spinnenseiden bezüglich des Aufbaus und der Größe so ähnlich wie möglich sein. Die rekombinante Produktion in prokaryotischen und eukaryotischen Expressionssystemen stellt momentan einen limitierten Prozess hinsichtlich der Größe von Proteinen dar. Eine Ausnahme bildet die bereits erwähnte rekombinante Herstellung eines synthetischen MaSp1 in einem

metabolisch modifiziertem *E. coli* Stamm (Xia *et al.*, 2010). Darüber hinaus stellen posttranslationale Modifizierungen eine Möglichkeit dar, um rekombinante Proteine mit einer Größe von mehreren 100 kDa herzustellen.

### 1.5.1 Posttranslationale Multimerisierung mit gespaltenen Inteinen

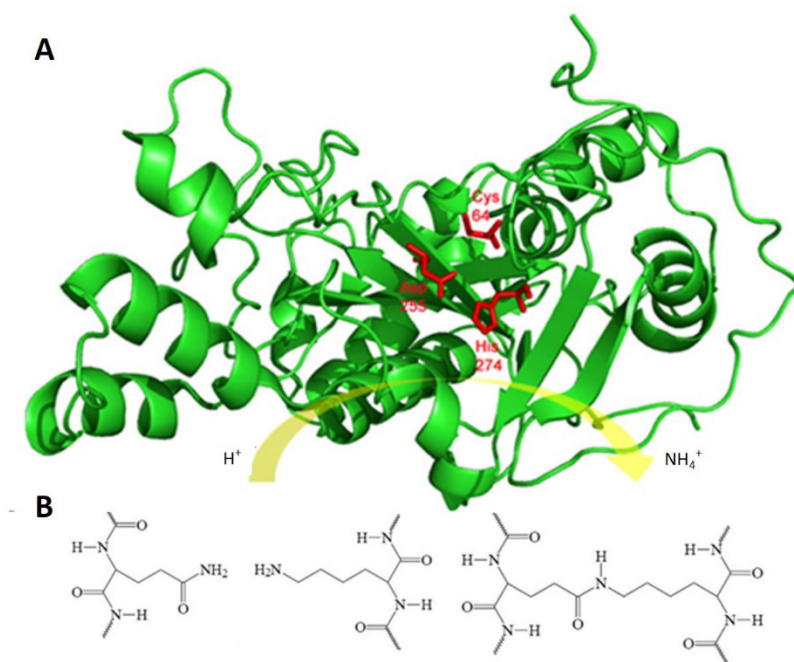
Zur Produktion hochmolekularer Proteine kann aus der Toolbox von posttranslationalen Prozessierungen das Intein-vermittelte Proteinspleißen angewendet werden (Perler, 2005). In dieser autokatalytischen Reaktion wird aus einem proteinösen Vorläufermolekül, bestehend aus Intein(en) und Exteinen, das Intein herausgeschnitten und die verbleibenden Exteine kovalent durch eine Peptidbindung miteinander verknüpft. Bei der besonderen Form des *trans*-Proteinspleißens liegt eine gespaltene Inteindomäne (*split intein*), bezeichnet als Intein<sup>N</sup> und Intein<sup>C</sup>, auf separaten Polypeptiden vor (Wu *et al.*, 1998; Saleh *et al.*, 2006). Nach Assoziation der beiden Inteinfragmente und Rekonstruktion zum aktiven Intein führt das Protein-Spleißen *in trans* zur Verknüpfung der Exteine (Abbildung 1.2). Gespaltenen Inteine wurden in vielfältiger Weise zur Verknüpfung von Proteinen verwendet, z.B. wurden Tag-Sequenzen mit einem gespaltenen Inteinfragment fusioniert, rekombinant exprimiert und nach chemischer Modifikation mittels Proteinspleißen *in trans* auf ein Zielprotein transferiert (Schutz *et al.*, 2014).



**Abbildung 1.3** Proteinspleißen *in trans* mit einem gespaltenen Intein. Nach Assoziation der Domänen des gespaltenen Inteins Intein<sup>N</sup> (Int<sup>N</sup>) und Intein<sup>C</sup> (Int<sup>C</sup>) wird die aktive Inteinstruktur rekonstruiert und im Prozess des Proteinspleißens herausgeschnitten (verändert nach Mootz, 2009).

### 1.5.2 Posttranslationale Multimerisierung mit mikrobieller Transglutaminase

Eine weitere Möglichkeit zur posttranslationalen Modifizierung stellt die Vernetzung von Proteinen mittels Transglutaminase (Protein-Glutamin- $\gamma$ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13), welche zur Enzymklasse der Transferasen gehört, dar. Dieses Enzym katalysiert eine Acyl-Transferreaktion. Dabei reagiert die  $\gamma$ -Carboxyamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutaminrestes mit primären Aminen. Handelt es sich bei dem primären Amin um die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes, so kommt es zur Vernetzung der Proteine unter Ausbildung einer Isopeptidbindung, wodurch hochmolekulare Multimere entstehen können. Die mikrobielle Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis* (Abbildung 1.3) wird routinemäßig in der Lebensmittelindustrie zur Vernetzung von Proteingemischen *in vitro* angewendet (Zhu *et al.*, 1995; Mariniello *et al.*, 2005; Mariniello *et al.*, 2013).



**Abbildung 1.4** (A) Dreidimensionale Proteinstruktur der mikrobiellen Transglutaminase (grün) aus *Streptovorticillum mobaraense*, verändert nach Kashiwagi *et al.* (2002) auf Grundlage des pdb-Files 1IU4. Die für die Katalyse essentiellen Aminosäuren Cys<sup>64</sup>, Asp<sup>255</sup> und His<sup>274</sup> sind in Rot dargestellt. (B) Die Transglutaminase-katalysierte Reaktion der Seitenketten von Glutamin und Lysin führt zur Ausbildung einer Isopeptidbindung.

## 1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Alle bekannten Seidenproteine aus dem Stamm der *Arthropoden* haben ein hohes Molekulargewicht (ab 250 kDa) gemeinsam. Diese evolutionäre Konvergenz unter entfernt verwandten Seiden-spinnenden Arten lässt vermuten, dass die enorme Größe dieser Proteine von großer Bedeutung für die herausragenden mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide ist (Ayoub *et al.*, 2007). Bisher entsprach die rekombinante Produktion von Spinnenseidenproteinen und Spinnenseiden-ähnlichen Proteinen von rund 90 kDa dem Stand der Technik. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode, welche die heterologe Expression von Spidroinen *in planta* mit unterschiedlichen Molekulargewichten ermöglichen sollte. Dabei stand die rekombinante Produktion von repetitiven Spidroinen entsprechend dem Molekulargewicht des natürlichen Vorbildes im Fokus. Nach rekombinanter Produktion der verschiedenen Spidroine sollte mit Hilfe mechanischer und immunologischer Charakterisierung folgende Aspekte Fragen beantwortet werden:

- Sind Spidroine von nativem Molekulargewicht erforderlich, um die mechanischen Eigenschaften der natürlichen Spinnenseidenproteine zu erhalten oder ist eine bestimmte Anzahl von charakteristischen Konsensus-Motiven ausreichend?
- Sind diese rekombinanten Spidroine aufgrund der mechanischen und immunologischen Eigenschaften in der Lage natürliche Spinnenseiden zu ersetzen?

# Ergebnisse 2

## 2.1 Publikationsübersicht zu dieser Arbeit

- Veröffentlichungen zu Kapitel 2.2

**Hauptmann V.**, Weichert N., Menzel M., Knoch D., Paege N., Scheller J., Spohn U., Conrad U., Gils M.: Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. *Transgenic Research* **2013**, 22, (2), 369-377.

**Hauptmann V.**, Gils M., Conrad U., Phan H. T.: Method of producing and purifying polymeric proteins in transgenic plants. Patent Application EP20110164083, **2011**.  
<https://register.epo.org/application?number=EP11164083>

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der Klonierung von InteinC-Flag(cmyc)-InteinN, ortsgerichtete Mutagenese, transiente Expression, Bearbeitung des Manuskriptes, der Abbildungen und des Patentantrages

- Veröffentlichung zu Kapitel 2.3

Weichert N., **Hauptmann V.**, Menzel M., Schallau K., Gunkel P., Hertel T.C., Pietzsch M., Spohn U., Conrad U.: Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* **2014**, 12, (2), 265-275

Eigenanteil: Bearbeitung der Reinigung und der Vernetzung, Anfertigung und Bearbeitung des Manuskriptes

- Veröffentlichung zu Kapitel 2.4

**Hauptmann V.**, Menzel M., Weichert N., Reimers K., Spohn U., Conrad U.: *In planta* production of ELPylated spidroin-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers. *BMC Biotechnology* **2015**, 15:9

Eigenanteil: Planung aller Experimente, Durchführung und Auswertung der Klonierungen, indirekte ELISAs, Auswertung der stabilen Transformation und kompetitiven ELISAs, Anfertigung und Bearbeitung des Manuskriptes und der Abbildungen

### 2.1.1 Weitere Publikationen

**Hauptmann V.**, Weichert N., Rakhimova M., Conrad U.: Spider silks from plants - a challenge to create native-sized spidroins. *Biotechnology Journal* **2013**, *8*, 1183-1192.

Goetz S., Hellwege A., Stenzel I., Kutter C., **Hauptmann V.**, Forner S., McCaig B., Hause G., Miersch O., Wasternack C., Hause B.: Role of cis-12-oxo-phytodienoic acid in tomato embryo development. *Plant physiology* **2012**, *158*, (4), 1715-1727.

Delker C., Poschl Y., Raschke A., Ullrich K., Ettingshausen S., **Hauptmann V.**, Grosse I., Quint M.: Natural variation of transcriptional auxin response networks in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **2010**, *22*, (7), 2184-2200.

## 2.2 Expression von Spinnenseidenproteinen nativen Molekulargewichtes in Pflanzen durch Intein-basierte Multimerisierung

### 2.2.1 Zusammenfassung

Die Limitierung in der rekombinanten Produktion von Spinnenseidenproteinen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes ist in deren hochrepetitiver Struktur begründet. Die Deletion von repetitiven Sequenzen im Spinnenseidengen *per se* wie auch Fehler während Transkription und Translation erschweren die heterologe Expression. Besonders das häufige Auftreten bestimmter Aminosäuren, z.B. Glycin und Alanin, bedingt die Depletion des tRNA-Pools und führt zu fehlerhaften Produkten, geringen Produktionsraten bzw. zum Abbruch der Proteinsynthese (Chung *et al.*, 2012).

Um diese Fehlerquellen auszuschließen wurde eine monomere Einheit [InteinC-Flag(cmyc)-InteinN], bestehend aus charakteristischen Konsensus-Motiven des Spinnenseidenproteins Flag sowie C- und N-terminalen Inteinsequenzen und kurzen Exteinabschnitten des Gens *DnaB* von *Synechocystis* sp., konstruiert. Eine Besonderheit ist hierbei, dass der N-Terminus des Proteins mit der C-terminalen Inteindomäne fusioniert wurde und der proteinöse C-Terminus mit der N-terminalen Inteindomäne, damit unter Verwendung des *trans*-Proteinspleißens eine unbegrenzte Multimerisierung ermöglicht werden kann. Dabei ist das Vorhandensein der kurzen Exteinabschnitte von *DnaB* essentiell, da sich an den Intein/Extein-Bindungen für den Mechanismus des Proteinspleißens konservierte Aminosäuren befinden. Zusätzlich wurden im Verlauf der Synthese des codierenden Gens das *Codon Usage* an den Wirtsorganismus *N. tabacum* adaptiert, um die Effizienz der Proteinsynthese zu erhöhen.

Erst nach Translation der monomeren Einheit (36,7 kDa) im Expressionssystem Pflanze kam es zum posttranslationalen Prozess des *trans*-Proteinspleißens, bei dem sich die Inteine autokatalytisch aus den monomeren bzw. multimerisierten Vorläuferproteinen herausgeschnitten haben und die verbleibenden Flag-Exteine unter Bildung einer Peptidbindung wieder miteinander verknüpft wurden. Mit Hilfe von Expressionsanalysen *via* Western Blot konnte die Bildung von Spinnenseiden-basierten Multimeren mit einem Molekulargewicht von mehr als 250 kDa gezeigt werden (s. Abschnitt 2.2.2, Abbildung 1c).

Eine ortsgerichtete Mutagenese, bei der essentiellen Aminosäuren an den Intein/Extein-Bindungen ausgetauscht wurden, resultierte in der Proteinexpression von monomeren Einheiten des Spidroin-basierten Proteins InteinC-Flag(cmyc)-InteinN. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die Multimerisierung durch das *trans*-Proteinspleißen erfolgte.

Eine weitere Variante des Proteins Flag mit Intein-domänen und einem His-Tag [InteinC-Flag(His)-InteinN] konnte nach transienter Expression in Pflanzen mittels Affinitätschromatografie gereinigt werden. Untersuchungen des Biomaterials am Rasterelektronenmikroskop zeigten, dass das multimerere Flag fibrilläre Strukturen ausbildet.

Somit wurde mittels der Intein-basierten Multimerisierung erstmals *in planta* die heterologe Expression von Spidroiden größer als 250 kDa gezeigt. Dieses Verfahren kann auch zur Multimerisierung anderer repetitiver Proteine angewendet werden (s. Abschnitt 2.2.3).

## 2.2.2 Artikel

(zusätzliche Daten befinden sich im Anhang, Abschnitt 6.1)



## **Native-sized spider silk proteins synthesized *in planta* via intein-based multimerization**

Valeska Hauptmann, Nicola Weichert, Matthias Menzel, Dominic Knoch, Norman Paege, Jürgen Scheller, Uwe Spohn, Udo Conrad, Mario Gils

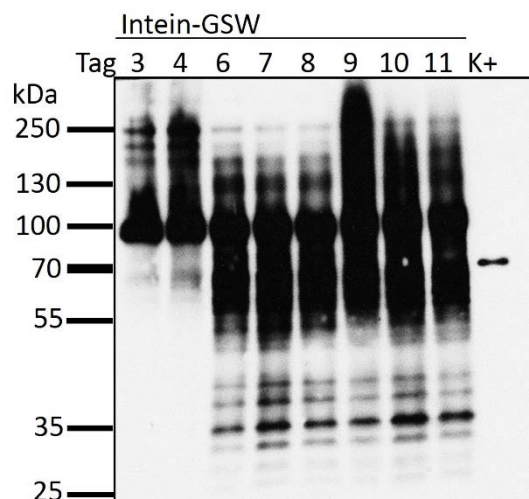
*Transgenic Research* 2013; 22, (2), 369-377; doi: 10.1007/s11248-012-9655-6

### *Abstract*

The synthesis of native-sized proteins is a pre-requisite for exploiting the potential of spider silk as a bio-based material. The unique properties of spider silk, such as extraordinary tensile strength and elasticity, result from the highly repetitive nature of spider silk protein motifs. The present report describes the combination of spider silk flagelliform protein (FLAG) production in the endoplasmic reticulum of tobacco plant leaf cells with an intein-based posttranslational protein fusion technology. The repeated ligation of FLAG monomers resulted in the formation of large multimers. This method avoids the need for highly repetitive transgenes, which may result in a higher genetic and transcriptional stability. Here we show, for the first time, the production of synthetic, high molecular weight spider silk proteins larger than 250 kDa based on the assembly of protein monomers *via* intein-mediated *trans*-splicing *in planta*. The resulting multimeric structures form microfibers, thereby demonstrating their great potential as a biomaterial.

### 2.2.3 Ergänzende Ergebnisse: Intein-basierte Multimerisierung von Glutenin

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Intein-basierte Multimerisierung von Spinnenseiden-ähnlichen Proteinen gezeigt werden (s. Abschnitt 2.2.2). Um die Anwendung dieser Multimerisierungsstrategie auf andere, in der Natur vorkommenden repetitiven Proteinen zu überprüfen, wurde ein synthetisches Gen konstruiert, welches für eine monomere Einheit eines Glutenins (GSW) codiert und mit C- und N-terminalen Inteinsequenzen fusioniert wurde. Glutenine sind Speicherproteine in Weizen und können als pflanzlicher Rohstoff für die Herstellung erneuerbarer und biologisch abbaubarer Materialien eingesetzt werden (Saumonneau *et al.*, 2011). Die repetitive Kerndomäne des resultierenden Proteins Intein-GSW (90,6 kDa) setzt sich aus einer Vielzahl von den für Glutenin charakteristischen Peptiden GYYPTSLQQ, PGQGQQ und GQQ zusammen (s. Abschnitt 6.1.1). Nach transienter Expression in Tabak konnten monomere Einheiten und Multimere mit einem Molekulargewicht von ca. 250 kDa detektiert werden (s. Abbildung 2.1). Dieses Ergebnis verdeutlicht das Potential der Intein-basierten Multimerisierungsstrategie zur posttranslationalen Polymerisierung von repetitiven Protein.



**Abbildung 2.1** Multimerisierung von Gluteninen durch *trans*-Proteinspleißen. Nachweis der transient exprimierten monomeren und multimeren Glutenine in Tabakblättern nach Agrobakterium-Injektion (Tag 3- Tag 11, ausgenommen Tag 5). Blätter wurden in 72 mM Tris (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,25  $\mu$ M Bromphenolblau und 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol gekocht und gleiche Volumina (5  $\mu$ l) der löslichen Proteine für die Visualisierung pro Gelspur aufgetragen. Die Proteine wurden auf einer 10 % SDS-Page aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und mit einem anti-cmyc-Antikörper detektiert. K+ = Positivkontrolle anti-TNF $\alpha$ -ELP (2 ng).

## **2.3 Transglutaminierung ermöglicht die Produktion und Charakterisierung von ELPylierten Spinnenseidenproteinen nativen Molekulargewichtes aus transgenen Pflanzen**

### 2.3.1 Zusammenfassung

Eine weitere Möglichkeit zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen stellt die Multimerisierung mittels Transglutinasen dar. Diese Enzyme katalysieren die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen Polypeptidketten, wobei die Aminosäuren Lysin und Glutamin für die Vernetzung bedeutend sind (Bandiera, 2011).

Auf genetischer Ebene wurde in monomere ELPylierte Einheiten des Spinnenseidenproteins MaSp1 von *N. clavipes* sogenannte Lysin- bzw. Glutamin-Tags eingefügt, da gezeigt werden konnte, dass die Effizienz der Vernetzungsreaktion durch Bereitstellung dieser Aminosäuren in den entsprechenden Tags erhöht werden kann (Tanaka *et al.*, 2004). Die resultierenden monomeren Einheiten Lysin-MaSp1-100xELP (K-MaSp1-100xELP) und Glutamin-MaSp1-100xELP (Q-MaSp1-100xELP) wurden heterolog in *N. tabacum* exprimiert. Als Expressionssystem dienten wiederum Pflanzen, da diese im Vergleich zu bakteriellen Expressionssystemen aufgrund der längeren Generationszeiten nicht so stark von der Limitierung des t-RNA Pools und der Aminosäuresynthese betroffen sind. Die rekombinanten ELPylierten Spidroine wurden mittels *MITC* gereinigt und *in vitro* durch Inkubation mit mikrobieller Transglutaminase vernetzt. Somit konnten mit dieser Multimerisierungsstrategie Spinnenseiden-ähnliche Proteine mit einem Molekulargewicht entsprechend dem der natürlichen Spinnenseidenproteinen generiert werden (s. 2.3.2, Abbildung 4).

Aus den monomeren Einheiten und dem Multimer Q/K-MaSp1-100xELP wurden Proteinfilme hergestellt, welche mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) und AFM-basierter Nanoindentation charakterisiert wurden, um die Abhängigkeit der mechanischen Eigenschaften vom Molekulargewicht ermitteln zu können. Der Elastizitätsmodul der Multimere war im Vergleich zu dem der monomeren Einheiten erhöht, was eine Tendenz zur erhöhten Festigkeit des Biomaterials bei steigendem Spidroingehalt durch die Transglutaminierung zeigt.

### 2.3.2 Artikel (zusätzliche Daten befinden sich im Anhang, Abschnitt 6.1)

## **Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants**

Nicola Weichert, Valeska Hauptmann, Matthias Menzel, Kai Schallau, Philip Gunkel, Thomas C. Hertel, Markus Pietzsch, Uwe Spohn, Udo Conrad

*Plant Biotechnology Journal* 2014; 12, (2), 265-275. doi: 10.1111/pbi.12135

### *Abstract*

In the last two decades it was shown that plants have a great potential for production of specific heterologous proteins. But high cost and inefficient downstream processing are a main technical bottleneck for the broader use of plant-based production technology especially for protein-based products, for technical use as fibres or biodegradable plastics and also for medical applications. High-performance fibres from recombinant spider silks are, therefore, a prominent example. Spiders developed rather different silk materials that are based on proteins. These spider silks show excellent properties in terms of elasticity and toughness. Natural spider silk proteins have a very high molecular weight, and it is precisely this property which is thought to give them their strength. Transgenic plants were generated to produce ELPylated recombinant spider silk derivatives. These fusion proteins were purified by Inverse Transition Cycling (ITC) and enzymatically multimerized with transglutaminase *in vitro*. Layers produced by casting monomers and multimers were characterized using atomic force microscopy (AFM) and AFM-based nanoindentation. The layered multimers formed by mixing lysine- and glutamine-tagged monomers were associated with the highest elastic penetration modulus.

## 2.4 Die Produktion von ELPylierten Spidroin-basierten Proteinen *in planta* führt zu nicht-cytotoxischen Biopolymeren

### 2.4.1 Zusammenfassung

Neben den außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften wird für die Spinnenseide eine geringe Immunogenität angenommen und der modulare Aufbau der Primärsequenz aus repetitiven Einheiten ermöglicht das Design von Biomaterialien angepasst für medizinische Zwecke (Brooks *et al.*, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das synthetisierte Gen *VSO1*, welches die für Zugfestigkeit und Härte vermittelnden Sekundärstrukturen von Spinnenseiden codiert, verwendet. Vier verschiedene ELPylierte Biopolymere mit variierendem Spidroingehalt wurden *in planta* heterolog exprimiert und mit Hilfe der *mITC* gereinigt. Zur Analyse der Abhängigkeit der mechanischen Eigenschaften vom Molekulargewicht der Spidroinhaltigen Biopolymere wurden aus 1xVSO1-100xELP, 2xVSO1-100xELP und 4xVSO1-100xELP Proteinfilme hergestellt und die Härte dieser Biomaterialien mittels auf Rasterkraftmikroskopie basierter Nanoindentation charakterisiert. Der mit ansteigendem Spidroingehalt zunehmende Elastizitätsmodul zeigt tendenziell, dass hochmolekulare rekombinante Spidroine erforderlich sind, um die mechanischen Eigenschaften von natürlichen Spinnenseiden nachzubilden.

Um den Einfluss des steigenden Spidroingehaltes genauer zu analysieren wurden zwei Gruppen von Mäusen jeweils mit dem für diese Studie am kleinsten zur Verfügung stehenden Biopolymer 1xVSO1-100xELP (56 kDa) bzw. mit dem größten Biopolymer 4xVSO1-100xELP (96 kDa) immunisiert. Im indirekten ELISA wurde eine starke Immunantwort der Antikörper in den polyklonalen Mäuseseren gegen das jeweilige Antigen detektiert. Weiterführende immunologische Analysen zeigten keine Hinweise für eine immunogene Aktivität des Spidroinanteils, sondern zeigten die Immunogenität des ELP-Tags. Durch kompetitive ELISAs wurde gezeigt, dass der Kompetitor 100xELP die spezifischen Antikörper zu 100% verdrängt. Daher ist die humorale Immunantwort im Wesentlichen gegen eine durch den Fusionspartner 100xELP gebildete Struktur gerichtet.

Anhand eines Cytokompatibilitätsassays, bei dem der Einfluss von 1xVSO1-100xELP und 4xVSO1-100xELP auf murine embryonale Fibroblasten analysiert wurde, konnte unabhängig vom Molekulargewicht keine cytotoxische Wirkung festgestellt werden. Das ist ein wichtiger Hinweis, dass die in Pflanzen exprimierten Biopolymere für biomedizinische Anwendungen verwendet werden können.

Folglich hat das Molekulargewicht der rekombinanten Spidroine einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der analysierten Biomaterialien, jedoch keinen Einfluss auf die Immunogenität und Cytotoxizität der auf Spidroinen basierenden Biopolymere.

#### 2.4.2 Artikel

(zusätzliche Daten befinden sich im Anhang, Abschnitt 6.3)

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# *In planta* production of ELPylated spidroin-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers

Valeska Hauptmann<sup>1</sup>, Matthias Menzel<sup>2</sup>, Nicola Weichert<sup>1</sup>, Kerstin Reimers<sup>3</sup>, Uwe Spohn<sup>2</sup> and Udo Conrad<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Spider silk is a tear-resistant and elastic biopolymer that has outstanding mechanical properties. Additionally, exiguous immunogenicity is anticipated for spider silks. Therefore, spider silk represents a potential ideal biomaterial for medical applications. All known spider silk proteins, so-called spidroins, reveal a composite nature of silk-specific units, allowing the recombinant production of individual and combined segments.

**Results:** In this report, a miniaturized spidroin gene, named *VSO1* that contains repetitive motifs of *MaSp1* has been synthesized and combined to form multimers of distinct lengths, which were heterologously expressed as elastin-like peptide (ELP) fusion proteins in tobacco. The elastic penetration moduli of layered proteins were analyzed for different spidroin-based biopolymers. Moreover, we present the first immunological analysis of synthetic spidroin-based biopolymers. Characterization of the binding behavior of the sera after immunization by competitive ELISA suggested that the humoral immune response is mainly directed against the fusion partner ELP. In addition, cytocompatibility studies with murine embryonic fibroblasts indicated that recombinant spidroin-based biopolymers, in solution or as coated proteins, are well tolerated.

**Conclusion:** The results show that spidroin-based biopolymers can induce humoral immune responses that are dependent on the fusion partner and the overall protein structure. Furthermore, cytocompatibility assays gave no indication of spidroin-derived cytotoxicity, suggesting that recombinant produced biopolymers composed of spider silk-like repetitive elements are suitable for biomedical applications.

**Keywords:** Spider silk, Immunogenicity, Synthetic spidroin, Biomaterial, Biocompatibility, Atomic force microscopy

## Background

Recent biomedical developments in the field of tissue engineering require protein-based biomaterials as scaffolds that have been optimized for substantial extensibility, long-term stability, self-assembly and low energy loss [1]. Further important properties are biocompatibility and economical production, as well as purification systems, which could be provided by plant-based production of elastin-like peptide (ELP) fusion proteins, referred to as ELPylated proteins [2,3]. Since ancient times, spider silk has been known for its extraordinary properties. Bygone cultures used the secretory product of the spider spinning glands. For example, Ancient Greeks were aware of the boosting effect for wound healing and used spider webs to cover bleeding lesions [4]. Today, spider silk is known to

promote the regeneration of nerves [5], and supports the proliferation of fibroblasts and keratinocyte cell lines [6]. In addition to these fascinating features, the lightweight and flexible biopolymer spider silk joins mechanical properties such as high toughness, tensile strength and stiffness that competes with man-made polymers [7].

Spider silks produced by orb-web-weaving spiders are composed of proteins that are commonly termed spidroins. An intensively investigated silk is the major ampullate silk, which is used by spiders as a structural element to build the web frame and the safety line; therefore, it is also called dragline silk. The well-known structure of major ampullate silk consists of two proteins called major ampullate spidroin 1 (MaSp1) and major ampullate spidroin 2 (MaSp2) [8]. The first partial sequence information from MaSp1 of *Nephila clavipes* was published in 1990 and revealed a high repetitive primary structure [9]. The protein consists of poly(A) blocks alternating with GGX (X = Y, L, Q) and (GA)<sub>n</sub> sequence motifs

\* Correspondence: conradu@ipk-gatersleben.de

<sup>1</sup>Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstrasse 3, 06466 Stadt Seeland, OT Gatersleben, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

[10]. Currently, the high number of repetitive peptide motifs in the core sequence is known as the key feature of spidroins. Clearly there is a strong relationship between the secondary structure, based on the unique motifs in the primary protein structure, and the outstanding properties of spider silks. The alanine-rich peptide regions form a  $\beta$ -sheet that provides remarkable strength to major ampullate silk [11]. Conversely, the high toughness arises from the glycine-rich peptide motifs, which likely induce the formation of  $\beta$ -turns and  $3_{10}$  helices [7,12]. For the spidroin MaSp1, a molecular weight of up to 320 kDa is reported [13]. It is assumed that the size of spider silk proteins is a key factor in defining their mechanical properties, because all characterized native spider silks consist of proteins with high molecular weights [13].

The usage of native spider silk on a larger scale is not economically profitable. Currently, heterologous spidroin production is the method of choice to satisfy the demand of recombinant spider silk for research. For this purpose, the most widely used host system is the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Here, spider silk protein modules of mainly a low molecular weight, approximately 50 kDa, were produced [14-17]. However, heterologous expression of recombinant spider silk proteins in *E. coli* was found to be rather inefficient owing to the low production rate and instability of the spider silk gene [18]. Because of the highly repetitive nature of the proteins, DNA deletion in the spider silk gene, as well as transcription and translation errors were often observed during the reproduction of recombinant *E. coli* harboring the gene [19]. Furthermore, translational errors of proteins were caused by a depletion of the t-RNA pool owing to the high alanine and glycine content. Recently, expression of high molecular weight spider silk derivatives up to 285 kDa has been achieved by optimizing the glycyl-tRNA amount and glycine synthesis [20]. Other expression systems used for heterologous spidroin production are yeast [21], plants [22,23], insects [24] or mammals [25].

The knowledge of the molecular structure of spider silk has inspired researchers to use the repeated modules of silks to develop synthetic spidroins. In addition, an approach using a synthetic gene can avoid the abovementioned difficulties during heterologous expression of spider silk proteins. The adaptation of the codon usage to the t-RNA pool of the intended host system is a considerable advantage of synthetic genes. Furthermore, restriction sites necessary for cloning into expression vectors can be attached during gene synthesis and, therefore, prevent additional PCR reactions that often cause errors with highly repetitive genes. In previous studies, the synthetic spider silk protein SO1, which shows a 94% homology to MaSp1 of the golden silk spider, was successfully expressed in plants (*Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*) [22]. For further investigations, this synthetic spidroin

was fused to 100 repeats of ELP to facilitate the purification of plant-produced spider silk-like proteins [26]. In addition, for other spider silk proteins ELPylation is a powerful technology for easy and economical purification [27].

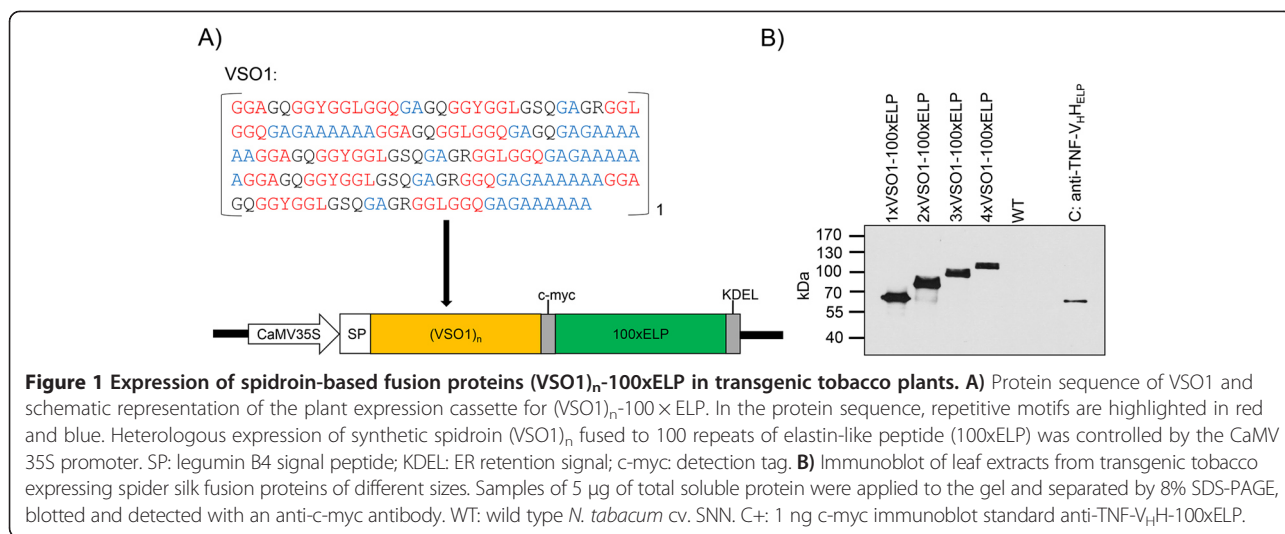
In general, low immunogenicity is anticipated for highly repetitive proteins such as spider silk derivatives and ELP [28]. Here, we designed various synthetic spidroin-based fusion proteins consisting of several repetitive motifs of SO1 and accordingly MaSp1 termed  $(VSO1)_n$ -100xELP. We have designed these artificial fusion proteins to produce material for tissue engineering with suitable mechanical properties, low immunogenicity and cyto-compatibility. After heterologous expression in plants, the spidroin-based fusion proteins were purified by a scalable and economical downstream processing procedure. Furthermore, these synthetic spidroins were used to analyze their mechanical properties and immunogenicity. By producing recombinant spider silks in different formats, the main requirements for biomedical applications, including biocompatibility, sufficient mechanical properties in terms of elasticity, hardness and stiffness, and low or even no immunogenicity, are met. Biocompatibility is defined as the quality of the biomaterial as not being toxic or having injurious effects on biological systems [19]. In the present paper we have measured the cyto-compatibility with murine embryonic fibroblasts as an approach to estimate biocompatibility. Finally, we discuss the suitability of the different recombinant synthetic spider silk proteins for biomedical applications.

## Results

### Recombinant production of synthetic spidroin-based fusion proteins

Four different plant expression vectors coding for spidroin-based fusion proteins varying in the spidroin content have been designed to assess the mechanical properties, immunogenicity and cytotoxicity in relation to the protein size. Therefore, we created the synthetic spidroin gene *VSO1* containing characteristic repetitive motifs of *MaSp1* and *SO1*, respectively, which were used as model proteins for the blueprint. The synthesized gene was flanked by compatible but non-regenerative restriction sites (*Bam*HI and *Bg*III) to enable the insertion of further synthetic genes for extension of the spidroin content. The resulting recombinant proteins contained the typical sequence motifs GGX,  $(GA)_n$  and polyA blocks of MaSp1 in the primary sequence (Figure 1A). Additionally, the synthetic spidroin genes were combined with the gene encoding for the biopolymer 100xELP in an expression vector to facilitate ubiquitous expression in transgenic tobacco. For the retention of the recombinant proteins in the endoplasmic reticulum (ER), the expression cassette also contained the signal peptide (SP) LeB4 [29] and the ER retention signal KDEL [30] (Figure 1A). Thus, four different synthetic





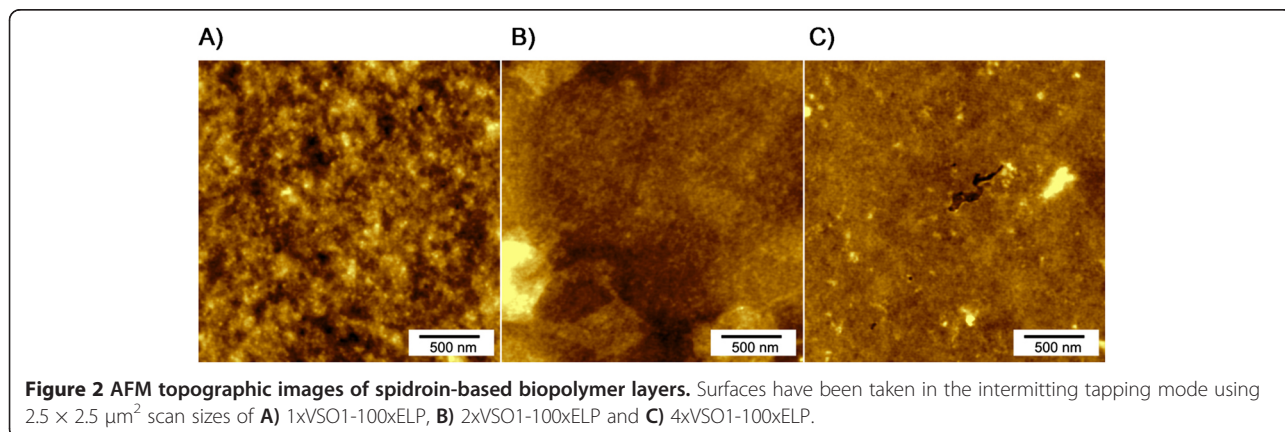
spideroin-based biopolymers were designed with calculated molecular weights of 56 kDa (1xVSO1-100xELP), 69 kDa (2xVSO1-100xELP), 83 kDa (3xVSO1-100xELP) and 96 kDa (4xVSO1-100xELP). Initially, each expression vector was individually transformed into *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), followed by the generation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) by leaf disc transformation. After selection of kanamycin-resistant tobacco plants, expression of fusion proteins was proven by immunoblotting. Analyzed leaf extracts showed the appropriate size increase from 1xVSO1-100xELP to 4xVSO1-100xELP (Figure 1B). The molecular weights were determined by SDS-PAGE and, accordingly, immunoblotting. Protein sizes appeared higher than the calculated masses, a phenomenon that was also observed for other ELP fusion proteins [31,32].

The principal reason for fusion of the synthetic spideroins to 100 repeats of ELP was to enable the chromatography-free purification by inverse transition cycling (ITC) [26,33], a low cost method for recovery of biopolymers. Here, synthetic spideroin-based fusion proteins were purified from

tobacco leaves of transgenic plants *via* an advanced membrane based ITC [34], which was optimized for spider silks and performed according to Weichert *et al.* [27]. A heat incubation step at the beginning of the purification procedure leads to denaturation of the majority of the proteins. In the following cooling step (4°C), all fusion proteins became soluble and were separated by centrifugation and enriched by filtration after several temperature shifts. For further investigations purified proteins were analyzed as casted layers or in solution.

#### Mechanical investigation of synthetic spideroin-based biopolymer layers

Based on freshly prepared and smooth layers of the synthetic biopolymers 1xVSO1-100xELP, 2xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP, we performed Atomic Force Microscopy (AFM) based nanoindentation experiments to examine the relevance of the increasing spideroin content. Figure 2 shows the corresponding topographic images with the z-ranges of 9.6 nm (1xVSO1-100xELP), 7.4 nm (2xVSO1-100xELP) and 11.4 nm (4xVSO1-100xELP),



respectively. All surfaces appeared homogenous with amorphous regions. It should be emphasized here that the roughness of the examined layers is very low, with roughness values  $< 2$  nm (Table 1), fulfilling the presumption for AFM-based nanoindentation to examine the elastic penetration modulus  $E$  and therefore, the characterization of the stiffness of the biopolymer layers. In former studies we showed on the basis of layers prepared from a monomeric tagged spider silk protein (MaSp1) fused to 100 repeats of ELP in comparison to layers consisting of multimers of this protein that the elastic penetration modulus  $E$  increased by multimerization [27]. In this mentioned experiment, the mass relation between the spider silk part and ELP remains unchanged during the multimerization process. In the present study, the determination of the elastic penetration modulus  $E$  of biopolymer layers varying in the spidroin content enabled a more detailed characterization of the relation between the molecular weight of the whole biopolymer and the spidroin content. Experiments were performed at thin layers of each casted layer with a thickness of at least  $1 \mu\text{m}$  and a mean surface roughness smaller than  $2 \text{ nm}$  for  $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$  grids (Table 1). The  $E$  values presented in Table 2 are significantly different, as tested by the differential  $t$ -test [35]. It is important to notice that the  $E$  values of 2xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP were found to be considerably higher than this of 1xVSO1-100xELP. In comparison, AFM-based nanoindentation analyses of the fusion protein 100xELP revealed an  $E$  value of  $2.74 \text{ GPa}$  [27]. The differences between all mean values of the penetration modulus  $E$  are highly significant. It can be assumed that the increase of the spidroin content in the fusion proteins leads to an ascending  $E$  value, and therefore represents a higher stiffness of these materials.

To study in greater detail the influence of the increasing spidroin content in these ELPylated recombinant proteins, analyses of immunogenicity and cytotoxicity were performed and related to their potential use as biomaterials.

#### Immunogenicity of synthetic spidroin-based fusion proteins 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP

The use of spider silk variants for the production of protein scaffolds for tissue engineering or for engineering of drug delivery systems requires spidroin-based derivatives

**Table 1 Surface roughness of various synthetic biopolymer layers**

Substance	Mean surface roughness $s_a$ (nm)	Squared surface roughness $s_q$ (nm)
1xVSO1-100xELP	0.70	0.89
2xVSO1-100xELP	0.78	1.03
4xVSO1-100xELP	0.34	0.55

Defined grids of  $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$  were analyzed.

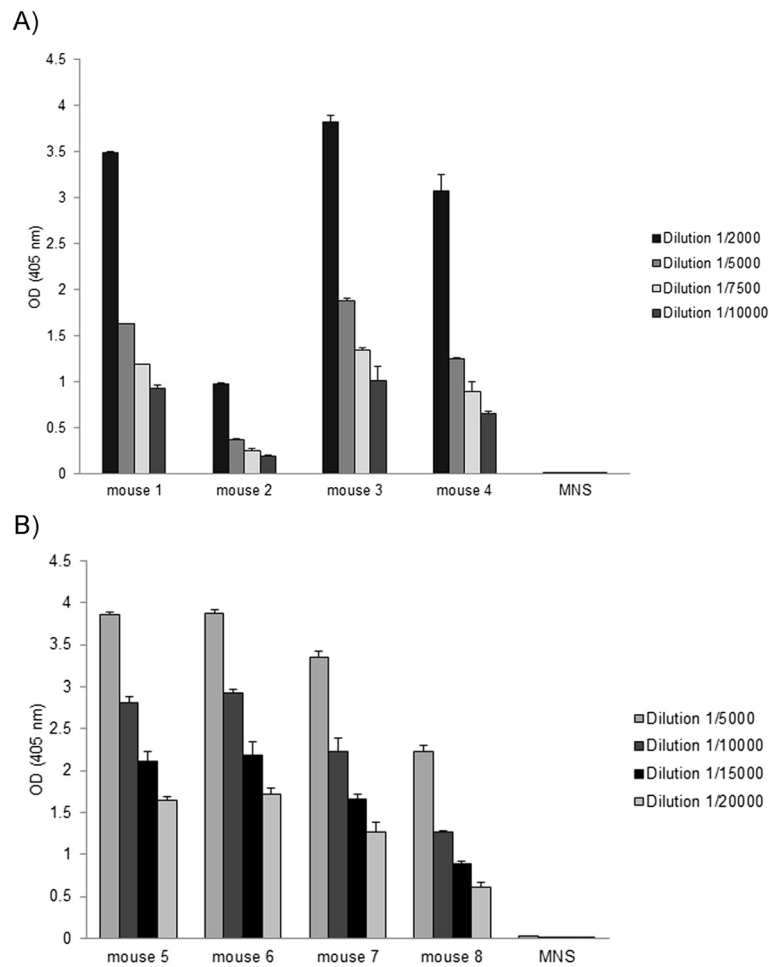
**Table 2 Elastic penetration moduli of recombinant spidroin-based fusion protein layers**

Substance	Elastic penetration modulus $E$ (GPa)
1xVSO1-100xELP	$2.73 \pm 0.02$
2xVSO1-100xELP	$3.85 \pm 0.02$
4xVSO1-100xELP	$4.51 \pm 0.03$
LDPE Riblene®FL30	$0.172 \pm 0.001$

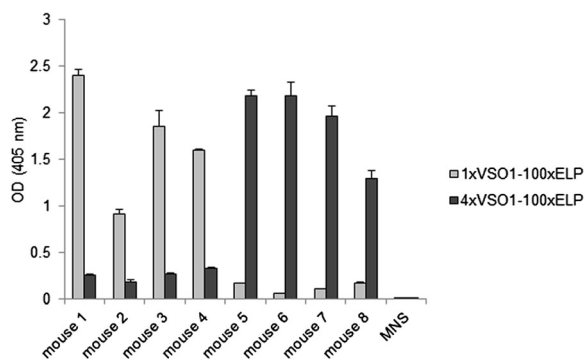
GPa: Gigapascal; ELP: elastin-like peptide.

Values were obtained by AFM-based nanoindentation under the following conditions: temperature =  $23^\circ\text{C}$ , relative humidity = 35%, system sensitivity =  $22.5 \text{ nm/V}$ , spring constant =  $59.3 \text{ N/m}$ , tip radius =  $112 \text{ nm}$ , setpoint control =  $500 \text{ nN}$ , relative setpoint =  $2500 \text{ nN}$ , z-closed loop active, z-length =  $1 \mu\text{m}$ , retract delay =  $10 \text{ ms}$ , grid size =  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ , data point  $35 \times 35$  per run with an orthogonal and lateral inter-sampling point distance of at least  $715 \text{ nm}$ . Low density polyethylene (LDPE) Riblene® FL30 foil was used as reference.

that do not induce immune responses. Natural spider silks do not cause an inflammatory response [36]. A low immunogenicity for 100xELP is anticipated [28], and has been shown experimentally by studying the T-cell response [32]. In this report, we ask the question whether different-sized fusion proteins of synthetic spidroins and ELP can induce a humoral immune response and if the increasing spidroin content in addition to the higher molecular weight has an influence. For the determination of the immunogenicity elicited by heterologous synthetic spidroin-based biopolymers one group of C57BL/6 J mice (animals 1–4) was immunized with 1xVSO1-100xELP and another (animals 5–8) with 4xVSO1-100xELP. After the fourth immunization, the immune responses in mice were determined by an indirect ELISA against the injected antigen (Figure 3A and B). All sera showed a strong immune response against their antigen, but the antisera raised against the 4xVSO1-100xELP showed binding at higher dilutions, indicating a stronger immune response. Cross-reactivity against the other antigen with a different molecular weight was detected; however, this was very low (Figure 4). We next asked the question if this relative specificity is due to specific structural epitopes formed by the different fusion proteins and we also wanted to explain cross-reactivity. For further immunological analyses, serum 1, which was isolated from a mouse immunized with 1xVSO1-100xELP, and serum 5, which was from a mouse that had been immunized with 4xVSO1-100xELP, were selected. First we analyzed whether the immune response was directed against the spidroin region (VSO1), against the c-myc tag and/or against ELP. For this purpose 1xVSO1-100xELP, 4xVSO1-100xELP, 100xELP and the recombinant protein anti-TNF- $V_{\text{H}}\text{H}$  [37], containing a c-myc tag, were included into the immunoblotting analyses. Additionally, the immune response to the fusion protein anti-TNF- $V_{\text{H}}\text{H}$ -100xELP [37], which also contained the c-myc tag, was analyzed. All proteins were synthesized *in planta*. After developing immunoblots with the appropriate mouse serum, synthetic spidroins were detected, along with anti-

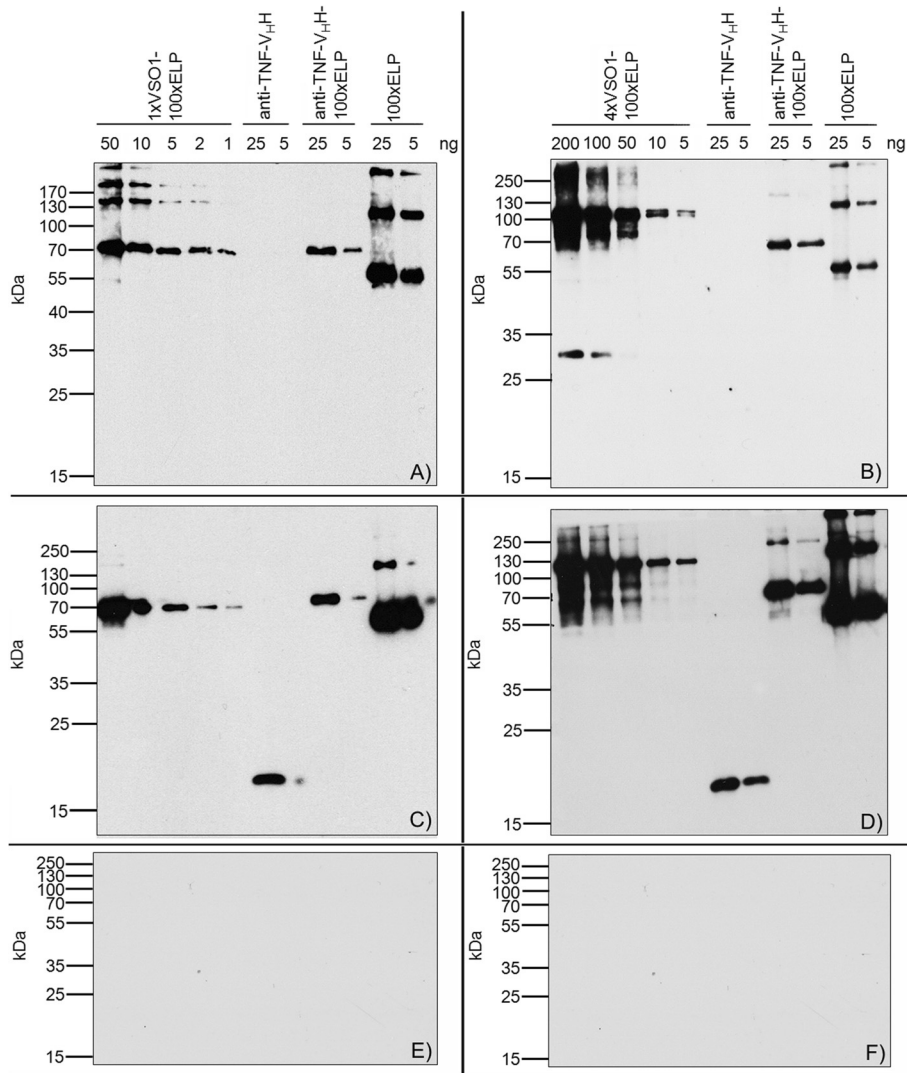


**Figure 3 Specific immune response of mouse sera determined by indirect ELISA.** Samples of 500 ng per well of **A)** 1xVSO1-100xELP and **B)** 4xVSO1-100xELP were coated to a microtiter plate and the reaction against mouse sera was analyzed for different dilutions. The antigen-antibody complex was detected using goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase. Extinction was measured at 405 nm (ordinate).



**Figure 4 Determination of the cross-reaction of mouse sera by indirect ELISA.** Antigens 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP were coated and the cross-reaction against the other antigen was analyzed. Mouse sera specific against 1xVSO1-100xELP were applied at a dilution of 1:2000 and mouse sera specific against 4xVSO1-100xELP were diluted at 1:5000. Extinction was measured at 405 nm (ordinate).

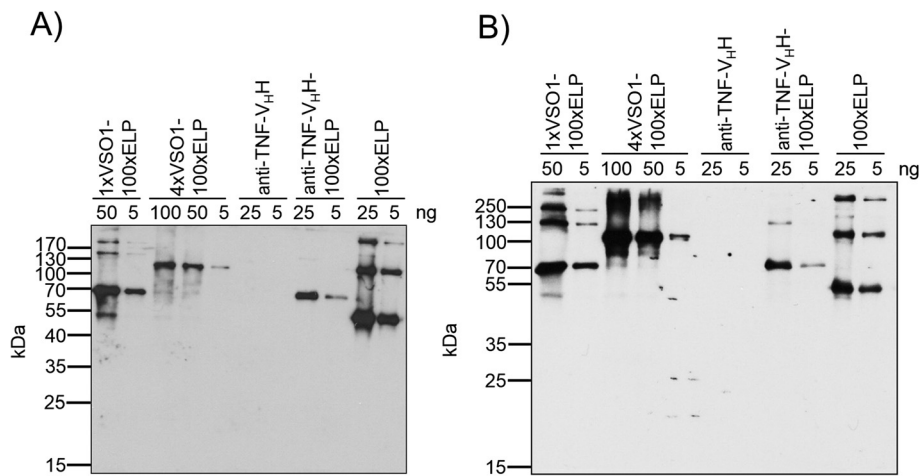
TNF-V<sub>H</sub>H-100xELP and 100xELP proteins (Figure 5A and B). Anti-TNF-V<sub>H</sub>H was not recognized by sera isolated from immunized mice, but it was detected by immunoblotting with the anti-c-myc antibody, implicating that the c-myc tag did not induce an immune response (Figure 5A-D). All other proteins mentioned here contained a c-myc tag and were detectable *via* immunoblotting using an anti-c-myc antibody (Figure 5C and D). After incubation with mouse normal serum, no nonspecific reaction was detectable (Figure 5E and F). The relative specificity for the proteins used for immunization could not be seen after immunoblotting. Serum 1 and serum 5 showed comparable binding behavior (Figures 5 and 6). With serum 1 against 1xVSO1-100xELP it was also possible to detect 4xVSO1-100xELP. Analogous antigen-antibody recognition occurred for serum 5 and 1xVSO1-100xELP. The epitopes responsible for relative specificity against the injected proteins in the indirect ELISA are possibly destroyed by denaturation during SDS-PAGE.



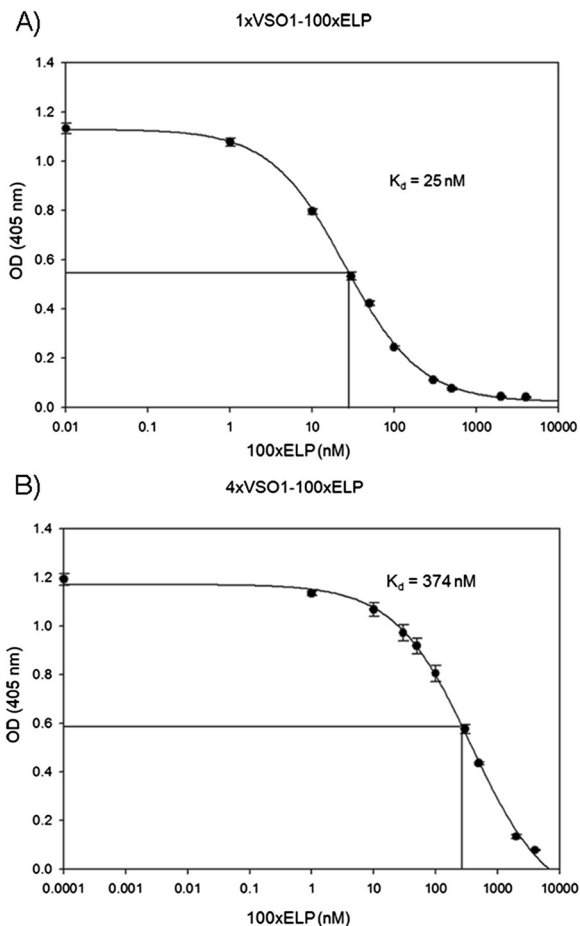
**Figure 5 Comparative immunoblots of the immune response of plant-expressed biopolymers to different antibodies.** Recombinant proteins were separated on 12% SDS-PAGE, electrotransferred and detected with **A)** mouse serum number 1, **B)** mouse serum number 5, **C)** and **D)** anti-c-myc monoclonal antibody, and **E)** and **F)** mouse normal serum.

Additionally, both sera analyzed in more detail showed significant binding to 100xELP in immunoblotting analysis and to anti-TNF-V<sub>H</sub>H-100xELP (Figure 6A and B). Here, we analyzed the binding to ELP in more detail. Polyclonal antibodies are a mixture of different antibodies by nature, with their own respective kinetic characteristics and, in many cases, with differences in epitope specificity. Based on this heterogeneity, the rate constants derived and affinities calculated based on such measurements should be regarded as a mean of different subpopulations. In the case of ELP, the number of different epitopes is limited, because it is a highly repetitive protein consisting of pentamers of very similar if not equal amino acid sequences. Therefore, the complexity is also limited and calculation of a mean dissociation constant  $K_d$  is a useful

tool to characterize the immune response against ELP-based epitopes. For the selected sera, optimal antigen concentrations were predetermined in dilution analyses and further evaluation of the immunogenicity of ELP was performed by a competitive ELISA. For this purpose, 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP, respectively, was adsorbed to the polystyrene surface and the binding of the relevant antisera was measured. This binding was inhibited by competition with 100xELP. The calculated mean dissociation constant  $K_d$  for the complex 1xVSO1-100xELP-anti 1xVSO1-100xELP from animal 1 and the competitor 100xELP was 25 nM (Figure 7A) and the mean  $K_d$  for 4xVSO1-100xELP-anti 4xVSO1-100xELP from animal 5 and 100xELP was 374 nM (Figure 7B). In the immunogenic 1xVSO1-100xELP, the relative ELP content is much



**Figure 6** Immunoblots for the characterization of the capability for cross-reaction of antigens with serum from other spideroins. Both spideroin-based biopolymers, 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP, and the control proteins, anti-TNF-V<sub>H</sub>H, anti-TNF-V<sub>H</sub>H-100xELP and 100xELP, were separated using 12% SDS-PAGE, electrotransferred and detected with **A)** mouse serum 1 or **B)** mouse serum 5.



**Figure 7** Characterization of the immune response to ELP by competitive ELISA. Analyses for a complex consisting of **A)** 1xVSO1-100xELP and mouse serum 1 competing to 100xELP and **B)** 4xVSO1-100xELP, and mouse serum 5 competing to 100xELP.

higher; thus, in the antiserum a stronger binding (higher affinity) to ELP was induced. However, we cannot exclude that the position of the ELP part in the resulting protein structure of the fusion protein is different in 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP. The competition curves showed that binding to 1xVSO1-100xELP and to 4xVSO1-100xELP could be completely inhibited (Figure 7). This implicates that the humoral immune response is mainly directed against 100xELP. An overview of all analyzed immune responses is given in Table 3.

***In vitro* cytotoxicity assays of the synthetic spideroin-based biopolymers 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP**

At first, cytotoxicity of the synthetic spideroins fused to ELP was assayed with soluble and coated proteins. In general, cell metabolic activity is determined as an indirect measure for cell vitality and proliferation. This is done by adding a compound to the culture medium, which is metabolized by the living cells to a fluorescent end product. Here, the influence of a recombinant spider silk protein on the metabolism of murine embryonic fibroblasts was tested by adding the protein to the cell culture medium or by coating the culture surface. In both cases an influence could be observed. 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP significantly stimulated the cells when metabolic activity was determined 24 hours after the addition of the protein (Figure 8A). The same trend was observed on day three; however, now the only statistically significant differences were between 100xELP and 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP, respectively (Figure 8B). The results for cells grown on protein-coated surfaces were similar (Figure 9A and B), although a significant effect was detectable later (Figure 9B).

**Table 3 Overview of analyzed immune responses**

antigen (MW)	antibody	serum 1	serum 5	anti-c-myc antibody	mouse normal serum
1xVSO1-100xELP (56 kDa)		+	+	+	-
4xVSO1-100xELP (96 kDa)		+	+	+	-
anti-TNF-V <sub>H</sub> H (15 kDa)		-	-	+	-
anti-TNF-V <sub>H</sub> H-100xELP (57 kDa)		+	+	+	-
100xELP (42 kDa)		+	+	+	-

A positive reaction is labeled with a plus sign and no reaction is marked with a bar.

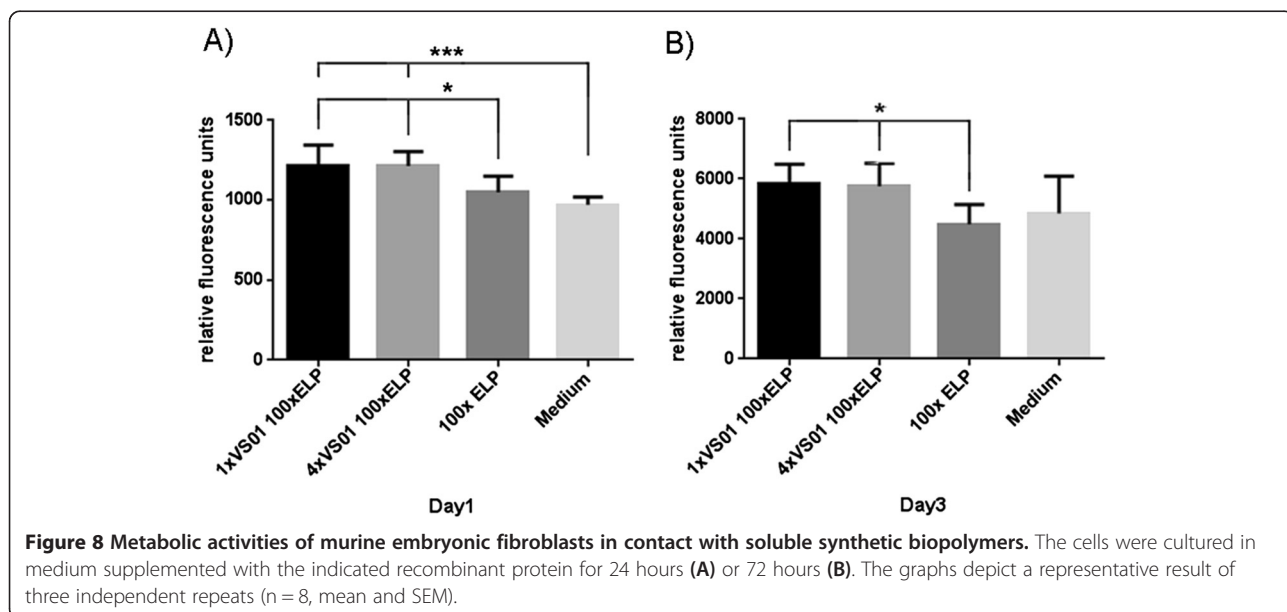
In addition, a surface for hemocompatibility of the fusion protein 100xELP was evaluated by direct hemolysis testing. The possible destruction of the erythrocyte membrane was measured by determining the amount of free plasma hemoglobin (Hb). The results showed that 100xELP was not hemolytic when covered on glass coverslips. While 100% relative hemolysis could be achieved in the samples containing catheters as a positive control the relative hemolysis observed in the samples with protein-coated glass coverslips were in the same range as the samples obtained by testing blood on high density polyethylene films used as the negative reference material (Figure 10). In general, the results of these cytotoxicity analyses examining cytotoxicity and hemocompatibility provided a positive preliminary indication for the use of the investigated synthetic spidroin-based biopolymers in medical applications.

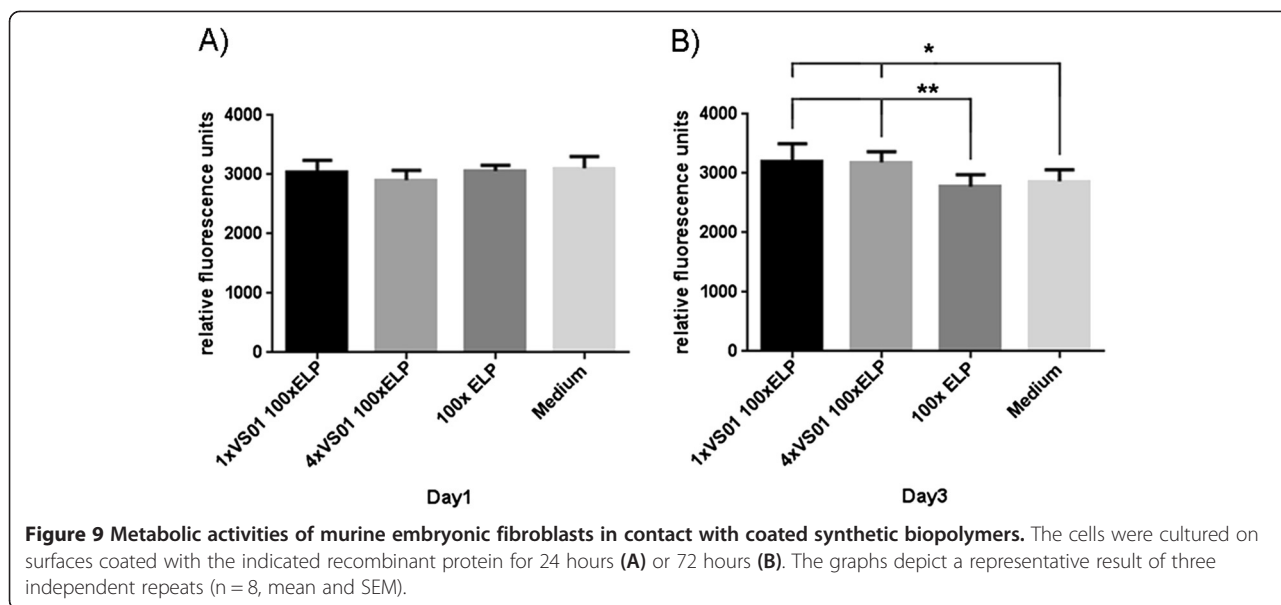
**Discussion**

The high molecular weight of spider silk proteins is assumed to be a key factor that underpins their outstanding

mechanical properties, because all characterized native spider silks consist of proteins with high molecular weights [13]. In this study, we analyzed the relation of the spidroin content in recombinant spidroin-based biopolymers and the corresponding mechanical properties. The elastic penetration modulus E was found to range from 2.7 GPa for 1xVSO1-100xELP to 4.5 GPa for 4xVSO1-100xELP; the synthetic biopolymer with the highest molecular weight that was used in this study. The significant increase of the elastic penetration modulus E, which correlates in a first approximation with the Young’s modulus, appears to be due to the increase in the spidroin content. E values were also comparable to ELPylated MaSp1 derivatives, which were previously investigated [27]. One must take into account that the recombinant spidroin-based biopolymers analyzed here has approximately one-third of the molecular weight of the native MaSp1 and that protein layers were examined. In comparison, for native dragline silk a Young’s modulus of approximately 12 GPa was determined [20]. Additionally, the mechanical characterization of a fiber made from native-sized recombinant spider silk protein showed a Young’s modulus of 21 ± 4 GPa; however, in the same study it was also noted that proteins of lower molecular weight did not yield similar material properties [20]. Therefore, for further intended projects the production of native-sized spidroin containing biopolymers is commendable and has already been successfully performed *in planta* with an intein-based post-translational protein multimerization technology [38].

Low immunogenicity is anticipated for natural spider silks; this feature was exemplarily proven for major ampullate dragline silk collected from *Nephila clavipes* [39].

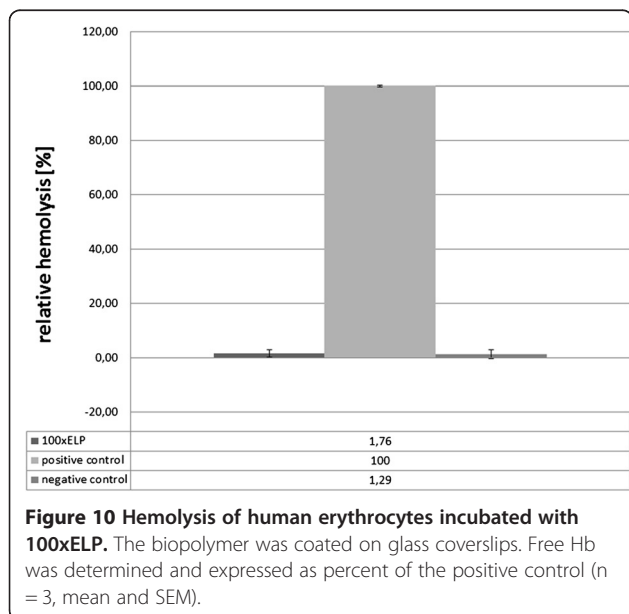




Here, we presented the first results of a specific antibody response to a spidroin-based biopolymer, which was enabled by a collection of various mouse sera that were prepared after immunization of mice with soluble spidroin-ELP fusion proteins. The spidroin-based proteins additionally contain the c-myc tag. An immune response against the c-myc-tag could not be detected by immunoblotting. All the antigens used in the immunological analyses were produced in plants to allow comparisons in all experiments. The data found by indirect ELISA showed a relative specific reaction against the immunogen, either 1xVSO1-100xELP or

4xVSO1-100xELP. This data provides no insight into whether these specific antibodies in the sera bind to ELP- or spidroin-based epitopes or new overall structures in the different fusion proteins. After denaturation of the antigens and SDS-PAGE, the specific reactions were not observed in the immunoblotting experiments. Competitive ELISA data showed clearly that binding is completely inhibited by 100xELP. We conclude that the humoral immune response against the spidroin-based polymers is directed against epitopes involving 100xELP. The sera raised against 1xVSO1-100xELP bind to 100xELP with a > 15-fold higher mean dissociation constant. These differences in the affinity against ELP support the view (see above) that 1xVSO1-100xELP and 4xVSO1-100xELP induced antibodies against different epitopes. These antibodies with higher mean affinity could be induced either by the higher ELP proportion in the fusion protein compared with 4xSO1-100xELP or by specific structures occurring in the 1xVSO1-100xELP fusion protein. We conclude that, in general, spidroin-based biopolymer variants have to be tested according their immunogenicity in each single case. The structure of fusion proteins could lead to the induction of several new immune responses even if standard basic sequences are used.

Cytocompatibility is a prerequisite for the biomedical application of a material. Therefore, *in vitro* cytotoxicity assays are typically one of the first assessments carried out in the biological evaluation of biopolymers. Recombinant spider silk proteins have been tested in a number of different settings. In previous studies, it was shown that a plant-produced synthetic spidroin derived from MaSp1 and fused with hundred repeats of elastin-like peptides (ELP) resulted in a non-cytotoxic biopolymer that supported the proliferation of mammalian cells [26]. An



example of a recombinant spider silk protein consisting of five glycine-rich segments alternating with four poly-alanine stretches connected to a non-repetitive globular C-terminal domain by a serine- and alanine-rich linker produced in *E. coli* was tested with primary human fibroblasts. The cells attached to the material and grew on different matrices such as meshes and foams [40]. 3T3 fibroblasts adhered to porous scaffolds of recombinant protein based on spidroin 1, even filling the deeper layers after 14 days [41]. However, a recombinant protein based on the silk of the European garden spider prevented adhesion and cell proliferation of BALB/3 T3 fibroblasts when coated on silicone surfaces [42]. Here, we found a positive stimulation of cellular metabolism, which indicates higher growth rates. This effect was dependent on the composition of the protein. Interestingly, we could even enhance the positive effect when the proteins were freely available in the medium. Although, we cannot rule out that this effect is based on the nutritive value of the proteins, this is rather unlikely owing to the negligible concentration of the protein present.

Biomaterials in contact with blood must show good hemocompatibility, which is often improved by coating. Sulfated silkworm fibroin has been used for this purpose in a study to enhance the hemocompatibility of poly(lactic-co-glycolic) acid vascular grafts [43]. Nevertheless, it has been discussed that larvae from two pyralid moths express silk proteins in their guts, their fat body and their hemocytes. It is assumed that these proteins also take part in immunity and coagulation [44]. We observed no hemolytic effect in the examined samples, indicating that they may serve as biocompatible coatings of blood-exposed implants.

Synthetic spidroins as biomaterials that are produced in biotechnology processes have potential use in a wide range of biomedical material applications. Prominent examples are scaffolds for tissue engineering (films, sponges, hydrogels) and drug delivery systems that trigger an effective immune response after vaccination with particle bound antigens [45,46]. In this study, we partially worked with casted proteins. Since the surface of the resulting films showed a very low roughness, applications as a coating or a wound dressing device is conceivable. Finally, the molecular weight of spidroin-based biopolymers did not influence the cytocompatibility of the casted films.

## Conclusion

The main goal of the present study was the assessment of the immunological properties and cytotoxic effects of synthetic spidroin-based fusion proteins expressed *in planta*. Considering the rising elastic penetration modulus determined by AFM-based nanoindentation with increasing spidroin content, we assume additionally a first relationship between spidroin size and mechanical properties.

All available antibody detection systems were used to determine epitope regions, including detection of the c-myc tag, characterization of mouse sera after immunization with the synthetic spidroin-based biopolymers and performance of competitive ELISA with the competitor ELP. Furthermore, analyses of cross-reactivity experiments gave no hint of an immunogenic region in the synthetic spidroin part of the fusion constructs. In the end, cytocompatibility studies provided no indication of spidroin-derived cytotoxicity. This implies that these plant-derived synthetic biopolymers are suitable for use as biomaterials.

## Methods

### Design of plasmids

Synthetic *IxVSOI* was produced by Geneart (Life Technologies, CA, USA) and contained repetitive gene motives from *Nephila clavipes* cDNA [GenBank: M37137.2]. In the course of the synthesis, the codon usage of synthetic *IxVSOI* was adapted to *N. tabacum*. After restriction digest with *Bam*HI and *Bgl*II the gene fragment was ligated into the vector 100xELP-pRTRA [47]. Further insertion of synthetic genes was facilitated with an additional restriction digest of the vector (VSO1)<sub>n</sub>-100xELP-pRTRA with *Bam*HI and ligation of a *Bam*HI/*Bgl*II digested *IxVSOI* gene fragment. After ligation, a functional *Bam*HI restriction site was retained at the 5'-prime end of the synthetic gene. The resulting plasmid (VSO1)<sub>n</sub>-100xELP-pRTRA contained a plant expression cassette consisting of the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter [48], the legumin B4 signal peptide (LeB4) [29], the synthetic gene (VSO1)<sub>n</sub>, a c-myc tag [49], 100 repeats of the fusion protein ELP [26] and the ER retention signal KDEL [50]. The expression cassettes were excised with the restriction enzyme *Hind*III and inserted individually into the binary vector pCB301-Kan [51], resulting in the plant expression vectors (VSO1)<sub>n</sub>-100xELP-pCB301-Kan.

### Production of plant-expressed synthetic spidroin-based fusion proteins

The binary vectors were transformed into the *A. tumefaciens* strain C58C1 (pGV2260) [52] by electroporation. For stable transformation of tobacco (*N. tabacum* cv. SNN), the leaf disc transformation method reported by Horsch et al. [53] was performed. The transgenic plants were cultured on Murashige-Skoog agar containing 50 mg/L kanamycin and analyzed by immunoblotting using an anti-c-myc antibody [54]. High expressing plants were cropped into soil and grown in a greenhouse for 4 to 6 weeks prior to harvesting the leaves. The fusion of the synthetic spider silks to 100xELP enabled protein purification *via* membrane-based inverse transition cycling (mITC) [34]. Therefore, frozen leaf material (-80°C) was crushed, added to preheated (85°C) 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)



and cooked for 1 hour. Further purification and desalting was performed as described [27]. For determining protein weight and storage, the purified proteins (VSO1)<sub>n</sub>-100xELP were lyophilized (ALPHA2-4LSD; Christ, Osterode, Germany).

#### SDS-PAGE and immunoblotting analysis

For analysis of transgenic plants, leaf material was ground in liquid nitrogen. Sample buffer (72 mM Tris, 10% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 5% w/v 2-mercaptoethanol and 0.0025 mM bromphenol blue, pH 6.8) was added and the homogenate was incubated for 10 min at 95°C. After centrifugation (30 min, 4°C, 12,000 rpm), the extract (supernatant) was kept and the protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Germany). Plant extracts or purified proteins, which were also analyzed by immunoblotting, were separated on reducing SDS-PAGE and electroblotted to a nitrocellulose membrane (Whatman GmbH, GE Healthcare, Germany) using 25 mM Tris, 0.1% w/v SDS, 192 mM glycine and 20% v/v methanol. For detection of the transgenic product, the membranes were blocked for 2 hours in 5% w/v fat-free dry milk dissolved in 180 mM NaCl and 20 mM Tris, pH 7.8. The primary antibody was either an anti-c-myc (9E10) supernatant [54] or an anti-(VSO1)<sub>n</sub>-100xELP mouse serum. Therefore, two groups of four mice each (C57BL/6 J) were immunized with 1xVSO1-100xELP or 4xVSO1-100xELP. For the first immunization, 50 µg antigen and complete Freund's adjuvants (Difco, USA) were used. In the following three immunizations animals were boosted with 20 µg antigen and incomplete Freund's adjuvants (Difco, USA). Titers from blood samples were evaluated by ELISA and sera were collected one week after the fourth immunization. For immunoblotting analysis the secondary antibody used was a horseradish peroxidase-(HRP)-conjugated anti-mouse IgG from sheep (GE Healthcare UK Ltd., UK). Synthetic spidroin-based fusion proteins were detected by ECL (Amersham ECL Plus TM, GE Healthcare UK Ltd., UK).

#### Mechanical Testing of (VSO1)<sub>n</sub>-100xELP

Protein layers for AFM imaging and AFM-based nanoindentation were casted by the drop to drop technique. Therefore, proteins were solubilized in water to a concentration of 1 mg/mL, successively dropped in 20 µL droplets onto glass slides and dried in a vacuum (Vacuum Concentrator 5301; Eppendorf, Germany) at room temperature until achieving layers of required thickness [27]. Measurements of protein layer thicknesses and topographical imaging were performed by an atomic force microscope Nanowizard<sup>II</sup> (JPK Instruments, Germany) using either the Contact Mode with an MLCT silicon nitride cantilever (Bruker Cooperation, USA) or silicon cantilevers PPP-NCHR (NANOSENSORS<sup>TM</sup>, NanoWorld AG, Switzerland)

with tip radii below 7 nm for the Intermittent Contact Mode. Based on topographical information, roughness data were evaluated. AFM-based nanoindentation was performed to assess the elastic penetration modulus E. For that reason, the same AFM instrument was used to record and evaluate load penetration curves according to an advanced Hertzian model for spherical indenter geometry [27,55] as a course of the load dependent on a penetration depth between 10 to 15 nm. E-values were calculated from a large series of 1225 indentations, which were performed for each protein layer with an orthogonal and lateral inter-sampling point distance of 715 nm and this enabled the statistically evident calculation of E for each material (Additional file 1). Elastic penetration moduli E were calculated from the recorded load penetration curves. Here, a diamond-coated cantilever DT-NCHR #1 (NanoWorld AG, Switzerland) calibrated by the Thermal Noise Method was used. The exact geometry of the diamond-coated cantilever tips was checked by scanning electron microscopy (SEM) before and after indentation measurements.

#### Indirect and competitive ELISA

For evaluation of the antibody titer against the specific antigen and to examine the cross-reaction, an indirect ELISA was performed. Ninety-six-well plates (MaxiSorp<sup>TM</sup> Surface, Thermo Scientific Nunc A/S, Denmark) were coated overnight at room temperature with 500 ng of synthetic spidroin dissolved in 100 µL phosphate-buffered saline for phages (PPBS; 32 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, 100 mM NaCl, pH 7.2). Bovine serum albumin (BSA, 3% w/v) in phosphate-buffered saline (PBS; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl) supplemented with 0.05% (v/v) Tween-20 (PBS-T) was used as the negative control. Blocking was done with 130 µL/well using 3% (w/v) BSA in PBS-T (pH 7.6) for 2 hours at room temperature. Mouse sera were diluted with 3% BSA in PBS-T as indicated in the results section and applied in triplicate using a volume of 100 µL/well on the coated plates for 1.5 hours at 25°C. After five washing steps with PBS-T, a goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma, USA) was added in a dilution of 1:2,000 in 1% (w/v) BSA-PBS-T. Plates were incubated for 1 hour at 25°C followed by five washing cycles with PBS-T. Bound antibodies were detected after the addition of the substrate p-nitrophenyl phosphate (1 mg/mL in 0.1 M diethanolamine-HCl, pH 9.8). The reaction was incubated at 37°C and the absorbance was measured at 405 nm within of 1 hour of the reaction being initiated.

For the competitive ELISA, antigens were dissolved in PPBS and 50 ng/well (1xVSO1-100xELP) or 100 ng/well (4xVSO1-100xELP), respectively, were coated to the microtiter plates. Blocking and washing were performed as mentioned above. Various concentrations of the competitor

100xELP (1 nmol to 4  $\mu$ mol and without ELP) were pre-mixed for 30 min at room temperature with either a 1:7,500 dilution of mouse serum 1 (against 1xVSO1-100xELP) or a 1:4,000 dilution of mouse serum 5 (against 4xVSO1-100xELP). Both competition partners were diluted in 3% (w/v) BSA in PBS-T. This premix was added in quintuplicates to the coated plates followed by incubation at 25°C for 1.5 hours; 3% BSA in PBS-T was used as negative control. Further processing of the assay was performed as described above.

#### Coating of the cell culture material for cytotoxicity tests

The synthetic spidroin-based biopolymers were diluted to a concentration of 50  $\mu$ g/mL with phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (PBS, Life Technologies). Glass coverslips for direct hemolysis assay, coated on both sides, and black microtiter plates for the determination of cell metabolism were coated with the protein by applying the protein solution at 4°C overnight. The liquid was then removed and cell culture plates were dried at room temperature. The coated materials were kept at 4°C or used immediately. PBS without the biopolymer was used as a control.

#### Cell metabolism assay

Murine embryonic fibroblasts were obtained from the ATCC (ATCC® SCRC-1045™) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high-glucose (Biochrom, Berlin Germany) with 1% penicillin/streptomycin (Biochrom, Berlin Germany), 1% sodium pyruvate (Biochrom, Berlin, Germany) and 10% fetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany). The cultures were split thrice weekly and kept in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For the measurements, the cells were diluted to 5 × 10<sup>4</sup> cells/mL and seeded onto microtiter plates. All test samples were done either on surface-coated wells as indicated above or the protein was added to a final concentration of 50  $\mu$ g/mL to the culture medium. After the indicated time points, 20  $\mu$ L of CellTiter-Blue® solution (Promega, USA) was added to each well and incubated at 37°C for 2 hours. Fluorescent resorufin was measured by using 560 nm excitation and 590 nm emission filters. All tests were repeated at two independent times and performed at octuplicates. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

#### Preparation of blood

The blood was obtained from the Institut für Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover. The blood donors subscribed a declaration, that they agree that small amounts of their blood could be used for research proposals. Human blood was collected in S-Monovette tubes (Sarstedt, Germany) with citrate and used within 4 hours after collection by pooling equal amounts of

blood. The Hb value of the pooled blood was measured and the blood was diluted with PBS to a total blood Hb concentration of 10 ± 1 mg/mL.

#### Direct hemolysis assay

The samples were covered with PBS resulting in a surface-to-PBS ratio of 3 cm<sup>2</sup>/mL in screw-cap polypropylene tubes. Subsequently, pooled blood was added at a ratio of 1:7 and incubated at 37°C for 3 hours. During this time, the tubes were inverted carefully twice every 30 minutes. A sample of 1.8 ml was removed from the test tubes and centrifuged at 700–800 g for 15 minutes. Drabkin's solution (Sigma, Germany) was added to the samples at equal volumes and incubated at room temperature for 15 minutes. Two aliquots of each sample were transferred to a microtiter plate and the absorbance was measured at 540 nm. All measurements were done in triplicates and catheters (ARROWg + ard Blue, Arrow international) and high density polyethylene films (RM-C, Hatano Research Institute) were used as hemolytic and non-hemolytic controls, respectively.

#### Additional file

**Additional file 1: Statistical distribution of elastic penetration moduli for layers of synthetic biopolymers.** Load penetration curves (n = 1225) were determined per protein sample layer with a thickness of at least 1  $\mu$ m and a mean surface roughness smaller than 2 nm for a 2.5 × 2.5  $\mu$ m<sup>2</sup> grid.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. VH and UC designed the study, performed most of the experiments, analyzed data, drafted and wrote the manuscript. MM performed AFM experiments and analyzed data. NW performed the protein purification and provided material. KR performed the cell metabolism assay, analyzed data and wrote the manuscript. US provided ideas and feedback and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

We kindly acknowledge the skillful technical support of Isolde Tillack, Christine Helmold and Ulrike Gresch. The authors are also grateful to Christina Reufsteck (BioMedImplant) for her support in the hemocompatibility tests and to Frank Rabenstein (JKI Quedlinburg) for his support on the immunization experiments. Further, we acknowledge all members of the International Society for Plant Molecular Farming for inspiring us and the exciting discussions about the production of spider silks. AFM analysis was financed by grant FKZ 22037511 of the Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V., supported by the Federal Ministry of Food and Agriculture, Germany.

#### Author details

<sup>1</sup>Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstrasse 3, 06466 Stadt Seeland, OT Gatersleben, Germany. <sup>2</sup>Fraunhofer Institute for Mechanics of Materials, Walter-Hülse-Strasse 1, 06120 Halle/Saale, Germany. <sup>3</sup>Department of Plastic, Hand and Reconstructive Surgery, Hannover Medical School, Podbielskistr. 380, 30659 Hannover, Germany.

Received: 9 October 2014 Accepted: 6 February 2015

Published online: 19 February 2015

## References

- Annabi N, Mithieux SM, Camci-Unal G, Dokmeci MR, Weiss AS, Khademhosseini A. Elastomeric Recombinant Protein-based Biomaterials. *Biochem Eng J*. 2013;77:110–8.
- Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J. Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol*. 2010;28(1):37–45.
- Floss DM, Conrad U, Rose-John S, Scheller J. ELP fusion technology for biopharmaceuticals. In: Schmidt SR, editor. *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges*. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell; 2013. p. 211–26.
- Gerritsen VB. The tiptoe of an airbus. In: *Protein Spotlight*. Swiss Prot. 2002. [http://web.expasy.org/spotlight/back\\_issues/024](http://web.expasy.org/spotlight/back_issues/024). Accessed 8 Aug 2013.
- Radtke C, Allmeling C, Waldmann KH, Reimers K, Thies K, Schenk HC, et al. Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in sheep. *PLoS One*. 2011;6(2):e16990.
- Wendt H, Hillmer A, Reimers K, Kuhbier JW, Schafer-Nolte F, Allmeling C, et al. Artificial skin—culturing of different skin cell lines for generating an artificial skin substitute on cross-weaved spider silk fibres. *PLoS One*. 2011;6(7):e21833.
- Hinman MB, Jones JA, Lewis RV. Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends Biotechnol*. 2000;18(9):374–9.
- Spohner A, Schlott B, Vollrath F, Unger E, Grosse F, Weisshart K. Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk. *Biochemistry*. 2005;44(12):4727–36.
- Xu M, Lewis RV. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):7120–4.
- Lewis RV. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials. *Chem Rev*. 2006;106(9):3762–74.
- Simmons AH, Michal CA, Jelinski LW. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science*. 1996;271(5245):84–7.
- Hayashi CY, Shipley NH, Lewis RV. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int J Biol Macromol*. 1999;24(2–3):271–5.
- Ayoub NA, Garb JE, Tinghitella RM, Collin MA, Hayashi CY. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PLoS One*. 2007;2(6):e514.
- Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, Cheley S, Bayley H. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;49(1):31–8.
- Huemmerich D, Helsen CW, Quedzuweit S, Oschmann J, Rudolph R, Scheibel T. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry*. 2004;43(42):13604–12.
- Dams-Kozłowska H, Majer A, Tomaszewicz P, Lozinska J, Kaplan DL, Mackiewicz A. Purification and cytotoxicity of tag-free bioengineered spider silk proteins. *J Biomed Mater Res Part A*. 2012;101(2):456–64.
- Winkler S, Szela S, Avtges P, Valluzzi R, Kirschner DA, Kaplan D. Designing recombinant spider silk proteins to control assembly. *Int J Biol Macromol*. 1999;24(2–3):265–70.
- Fahnestock SR, Irwin SL. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1997;47(1):23–32.
- Chung H, Kim TY, Lee SY. Recent advances in production of recombinant spider silk proteins. *Curr Opin Biotech*. 2012;23(6):957–64.
- Xia XX, Qian ZG, Ki CS, Park YH, Kaplan DL, Lee SY. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14059–63.
- Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI, Klinov DV, Sidoruk KV, Esipova NG, et al. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009;4(1):17–27.
- Scheller J, Guhrs KH, Grosse F, Conrad U. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol*. 2001;19(6):573–7.
- Menassa R, Zhu H, Karatzas CN, Lazaris A, Richman A, Brandle J. Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant Biotechnol J*. 2004;2(5):431–8.
- Wen H, Lan X, Zhang Y, Zhao T, Wang Y, Kajjura Z, et al. Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Mol Biol Rep*. 2010;37(4):1815–21.
- Teule F, Miao YG, Sohn BH, Kim YS, Hull JJ, Fraser Jr MJ, et al. Silkworms transformed with chimeric silkworm/spider silk genes spin composite silk fibers with improved mechanical properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(3):923–8.
- Scheller J, Henggeler D, Viviani A, Conrad U. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res*. 2004;13(1):51–7.
- Weichert N, Hauptmann V, Menzel M, Schallau K, Gunkel P, Hertel TC, et al. Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants. *Plant Biotechnol J*. 2014;12(2):265–75.
- Mackay JA, Chilkoti A. Temperature sensitive peptides: engineering hyperthermia-directed therapeutics. *Int J Hyperthermia*. 2008;24(6):483–95.
- Baumlein H, Wobus U, Pustell J, Kafatos FC. The legumin gene family - structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acids Res*. 1986;14(6):2707–20.
- Fiedler U, Phillips J, Artsaenko O, Conrad U. Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology*. 1997;3(3):205–16.
- Ge X, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A, Filipe CD. Purification of an elastin-like fusion protein by microfiltration. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95(3):424–32.
- Floss DM, Mockey M, Zanella G, Brosson D, Diogon M, Frutos R, et al. Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:274346.
- Meyer DE, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nat Biotechnol*. 1999;17(11):1112–5.
- Phan HT, Conrad U. Membrane-based inverse transition cycling: an improved means for purifying plant-derived recombinant protein-elastin-like polypeptide fusions. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):2808–21.
- Noack S, Schulze G. Statistical evaluation of analytical measurements - approximation of the integral limits of the R-distribution, T-distribution, and F-distribution. *Fresen Z Anal Chem*. 1980;304:250–4.
- Allmeling C, Jokuszies A, Reimers K, Kall S, Choi CY, Brandes G, et al. Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration. *Cell Prolif*. 2008;41(3):408–20.
- Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov AA, et al. ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol J*. 2011;9(1):22–31.
- Hauptmann V, Weichert N, Menzel M, Knoch D, Paege N, Scheller J, et al. Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. *Transgenic Res*. 2013;22(2):369–77.
- Vollrath F, Barth P, Basedow A, Engstrom W, List H. Local tolerance to spider silks and protein polymers in vivo. *In Vivo*. 2002;16(4):229–34.
- Widhe M, Bysell H, Nystedt S, Schenning I, Malmsten M, Johansson J, et al. Recombinant spider silk as matrices for cell culture. *Biomaterials*. 2010;31(36):9575–85.
- Agapov II, Pustovalova OL, Moiseyevich MM, Bogush VG, Sokolova OS, Sevastyanov VI, et al. Three-dimensional scaffold made from recombinant spider silk protein for tissue engineering. *Dokl Biochem Biophys*. 2009;426:127–30.
- Zepelin PH, Maksimovikj NC, Jordan MC, Nickel J, Lang G, Leimer AH, et al. Spider Silk Coatings as a Bioshield to reduce Periprosthetic Fibrous Capsule Formation. *Adv Funct Mater*. 2014;24:2658–66.
- Liu H, Li X, Niu X, Zhou G, Li P, Fan Y. Improved hemocompatibility and endothelialization of vascular grafts by covalent immobilization of sulfated silk fibroin on poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Biomacromolecules*. 2011;12(8):2914–24.
- Korayem AM, Hauling T, Lesch C, Fabbri M, Lindgren M, Loseva O, et al. Evidence for an immune function of lepidopteran silk proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352(2):317–22.
- Hofer M, Winter G, Myschik J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials*. 2012;33(5):1554–62.
- Spies K, Lammel A, Scheibel T. Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol Biosci*. 2010;10(9):998–1007.
- Floss DM, Sack M, Stadlmann J, Rademacher T, Scheller J, Stoger E, et al. Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. *Plant Biotechnol J*. 2008;6(4):379–91.
- Franck A, Guillely H, Jonard G, Richards K, Hirth L. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*. 1980;21(1):285–94.
- Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 1987;48(5):899–907.
- Wandelt CI, Khan MR, Craig S, Schroeder HE, Spencer D, Higgins TJ. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and

accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J.* 1992;2(2):181–92.

51. Gahrtz M, Conrad U. Immunomodulation of plant function by in vitro selected single-chain Fv intrabodies. *Methods Mol Biol.* 2009;483:289–312.
52. Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, et al. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(13):4777–88.
53. Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science.* 1985;227(4691):1229–31.
54. Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Macromol Biosci.* 1985;5(12):3610–6.
55. Lin DC, Dimitriadis EK, Horkay F. Robust strategies for automated AFM force curve analysis–I. Non-adhesive indentation of soft, inhomogeneous materials. *J Biomech Eng.* 2007;129(3):430–40.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



# Diskussion 3

Mit der Intein-basierten Multimerisierung wurde erstmals eine Methode entwickelt, um Spidroine in Pflanzen mit einem Molekulargewicht entsprechend dem der natürlichen Spinnenseidenproteine heterolog zu exprimieren. Ebenfalls konnten mit Hilfe weiterer Multimerisierungsstrategien (Vernetzung mit Transglutaminase, klassische Klonierung) hochmolekulare Spidroin-haltige Biopolymere biotechnologisch hergestellt werden und anhand daraus prozessierter Proteinfilme eine tendenzielle Abhängigkeit der mechanischen Eigenschaften vom Molekulargewicht gezeigt werden. Im Folgenden wird die Zusammensetzung der verwendeten rekombinanten Spidroin-basierten Biopolymere, deren Immunogenität und die angewandten Methoden zur Multimerisierung diskutiert. Außerdem werden Möglichkeiten zur Verwendung der analysierten Spidroine erörtert.

## 3.1 Aufbau und Bedeutung der Primärstruktur der Spidroin-basierten Biopolymere

Ein einzigartiges Strukturmerkmal im molekularen Aufbau aller Spinnenseidenproteine von Arthropoden ist die Abfolge charakteristischer Konsensus-Motive in der repetitiven Kerndomäne (Bini *et al.*, 2004). Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen verschiedene Spinnenseidenproteine von *N. clavipes*, welche hinsichtlich ihrer Primärstruktur zu den am besten untersuchten zählen. Die rekombinante Herstellung von repetitiven Spidroiden *in planta* mit einem Molekulargewicht entsprechend dem der natürlichen Spinnenseiden konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. Für das Design des Spidroin-basierten Anteils in den verwendeten Biopolymeren wurden jeweils charakteristische repetitive Einheiten aus den Kerndomänen verschiedener Spinnenseidenproteine gewählt.

Die für ihre herausragende Zugfestigkeit bekannte Tragfadenseide von *N. clavipes* besteht unter anderem aus dem Spinnenseidenprotein MaSp1. Diesem nachempfunden sind die Spidroinanteile VSO1 in den Biopolymeren nxVSO1-100xELP. VSO1 besteht aus den Alaninreichen Motiven  $A_{(n)}$  und  $GA_{(n)}$ . Für diese Primärstruktur wurde die daraus resultierenden

$\beta$ -Faltblattstrukturen ermittelt und könnten daher für die Festigkeit des Biomaterials verantwortlich sein (Simmons *et al.*, 1996). Dafür spricht auch die anhand der charakterisierten Proteinfilme zunehmende Festigkeit bei ansteigendem Spidroingehalt der Biopolymere. Die ebenso in VSO1 auftretenden GGX Motive könnten an der Ausbildung helikaler Konformationen beteiligt sein (Rising *et al.*, 2005). Diese charakteristischen Konsensus-Motive sind ebenfalls in den Biopolymeren K-MaSp1-100xELP und Q-MaSp1-100xELP vorhanden. Des Weiteren wurden für das Design des repetitiven Monomers für die Intein-basierte Multimerisierung die Konsensus-Motive GPGGX des Spinnenseidenproteins Flag verwendet. Diese Glycin-reichen Sequenzen bilden  $\beta$ -Schleifen, welche hintereinander auftretend eine  $\beta$ -Spirale bilden und mit den elastischen Eigenschaften in Verbindung gebracht werden (Ohgo *et al.*, 2006).

Zum einen wurden für das Design nur charakteristische Konsensus-Motive aus der jeweiligen Primärstruktur der aufgeführten Spinnenseidenproteine verwendet, da diese für die Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturen verantwortlich sind. Ihre Abfolge beeinflusst während der Assemblierung die Anordnung der Spinnenseidenproteine und beeinflusst dadurch die mechanischen Eigenschaften des Biomaterials (Sutherland *et al.*, 2010). Um die entwickelten Methoden zur Multimerisierung zu evaluieren und um die Struktur-Funktions-Beziehung der repetitiven Einheiten zu untersuchen wurden rekombinante Proteine, unter anderem bestehend aus repetitiven Konsensus-Motiven aus der Kerndomäne, eingesetzt. Mit einem ansteigenden Gehalt an repetitiven Einheiten von MaSp1 in den Spidroin-basierten Biopolymeren konnte eine Annäherung an die mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide hinsichtlich der Festigkeit gezeigt werden. Zum anderen war bekannt, dass die hydrophoben Bereiche der repetitiven Kerndomäne die Fähigkeit zur Assemblierung besitzen (Hedhammar *et al.*, 2008).

Die hochrepetitive Primärstruktur aus relativ kurzen Konsensus-Motiven hat ebenso zur Folge, dass die Spinnenseidenproteine einen hohen Anteil an den Aminosäuren Glycin, Alanin und Serin haben. Dieses Strukturmerkmal hat besondere Bedeutung für die heterologe Expression von Spinnenseidenproteinen. Ein besonders häufig auftretendes Problem sind die geringen Expressionsraten von rekombinanten Spinnenseidenproteinen, da der Wirtsorganismus die benötigten tRNAs für die Proteinsynthese nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stellen kann (Winkler *et al.*, 2000). Oftmals wird dieser Effekt durch das unterschiedliche *Codon Usage* des Wirtsorganismus im Vergleich zur

Spinne noch verstärkt. Die hier verwendeten Spidroin-basierten Anteile VSO1 und IntC-Flag-IntN wurden deshalb an das *Codon Usage* von *N.tabacum* angepasst. Ebenso wurden im Rahmen der Gensynthese die Restriktionsschnittstellen für das zu verwendende Vektorsystem integriert, um spätere Amplifikationen der zugleich repetitiven Gensequenz zu vermeiden. Zudem hat das Expressionssystem Pflanze aufgrund des langsamen Wachstums den Vorteil, dass es die für die Proteinsynthese erforderliche tRNAs kontinuierlicher zur Verfügung stellen kann, was eine stabile Expression von repetitiven Proteinen bis zu 100 kDa ermöglicht (Scheller *et al.*, 2001).

Neben der hochrepetitiven Kerndomäne bestehen die natürlichen Spinnenseidenproteine aus einem nichtrepetitiven N-terminalen Bereich sowie einem C-Terminus und sind, auch innerhalb der verschiedenen aus diesen Proteinen resultierenden Seidentypen, stark konserviert (Rising *et al.*, 2006). Der hohe Konservierungsgrad ließ lange Zeit vermuten, dass die Termini im natürlichen Spinnprozess einen ähnlichen Effekt haben.

Die Termini von MaSp1 (*Euprostheno australis*) sind in ihrer Sekundärstruktur durch  $\alpha$ -Helices geprägt (Hedhammar *et al.*, 2008). Im natürlichen Spinnprozess kommt es im Spinnkanal zur Erniedrigung des pH-Wertes. Unter diesen Bedingungen gehen die Strukturen der aminoterminalen Domäne intermolekulare, nichtkovalente Wechselwirkungen ein, was zur Dimerisierung der MaSp1-Monomere führt (Askarieh *et al.*, 2010). Auch die C-Termini einzelner Monomere interagieren mit je einer  $\alpha$ -Helix unter Bildung eines Dimers, welches durch die stark konservierte Disulfidbrücke zusätzlich stabilisiert wird (Hagn *et al.*, 2010; Eisoldt *et al.*, 2012). Demnach wirken die terminalen Domänen als molekulare Schalter und beeinflussen die Löslichkeit der Spinnenseidenproteine und deren Assemblierung während des Spinnprozesses (Eisoldt *et al.*, 2012). Weiterführende Untersuchungen der Bedingungen in den Spinndrüsen von *N. clavipes* mit ionenselektiven Mikroelektroden zeigten einen weitaus größeren pH Gradienten (pH 7,6 – pH 5,7) als bisher angenommen (Andersson *et al.*, 2014). Erstaunlicherweise zeigten die Termini darauf eine Reaktion in entgegengesetzter Weise. Während unter dem Abfall des pH-Wertes die intermolekulare Wechselwirkung über die N-Termini verstärkt wurde und letztendlich zur Multimerisierung der Spidroine führte, kam es zur Destabilisierung der C-terminalen Domäne, was zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblättern ähnlich der in Amyloidfibrillen führte und die Faserbildung auslösen kann (Andersson *et al.*, 2014).

Beim Design neuer artifizierender Spidroine bzw. Spidroin-basierender Biopolymere sollte bei der Auswahl der Sequenzinformationen auch die weitere Prozessierung im Fokus stehen. Die neuesten Ergebnisse zur Funktion der Termini zeigen, dass eine zukünftige Inkorporation von Sequenzinformationen für nichtrepetitiven Amino- bzw. Carboxysequenzen in rekombinanten Spidroinen von Vorteil ist, sofern die Prozessierung in Seidenfäden angedacht ist. Anhand des miniaturisierten Spidroin 4RepCT, welches aus Konsensus-Motiven der repetitiven Kerndomäne sowie der C-terminalen Domäne des MaSp1 von *Euprosthrops australis* besteht, konnte die Assemblierung des Proteins in makroskopische Fasern gezeigt werden (Stark *et al.*, 2007; Hedhammar *et al.*, 2008).

Die für diese Arbeit synthetisierten Spidroin-basierenden Gene enthielten aufgrund der Evaluierung der Multimerisierungsmethode *per se* keine Sequenzinformationen für die terminalen Bereiche. Die mechanische Charakterisierung der aus den Spidroin-basierenden Biopolymeren 1xVSO1-100xELP bis 4xVSO1-100xELP bzw. monomeren oder multimerisierten Einheiten von K-MaSp1-100xELP und Q-MaSp1-100xELP hergestellten Proteinschichten zeigten eine Tendenz zu erhöhter Festigkeit mit zunehmenden Spidroingehalt durch Sequenzinformationen der repetitiven Kerndomäne von MaSp1. Dieses Ergebnis zeigt wiederum die Bedeutung der auf der Primärstruktur basierenden Sekundärstrukturen für die herausragenden mechanischen Eigenschaften von Spinnenseiden.

### 3.2 Effektivität der angewandten Multimerisierungsstrategien

Während die rekombinante Expression von Spinnenseidenproteinen mit einem Molekulargewicht bis zu 50 kDa mittlerweile routinemäßig durchgeführt werden kann, stellte die Produktion der hochrepetitiven Proteine mit einem Molekulargewicht gemäß dem natürlichen Vorbild lange eine Herausforderung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals *in planta* Spidroin-basierte Biopolymere, deren Molekulargewicht dem der natürlich vorkommenden Spinnenseidenproteine entspricht, synthetisiert. Dies wurde durch die Intein-vermittelte Multimerisierung erreicht, bei der Proteine bis zu einer Größe von 500 kDa heterolog exprimiert wurden (s. Kapitel 2.2). Außerdem konnten mit Hilfe der Vernetzung von Monomeren durch Transglutaminase ELPylierte Spidroine mit einem Molekulargewicht von 250 kDa *in vitro* hergestellt werden (s. Kapitel 2.3). In einem



weiteren Ansatz wurden durch klassische Klonierung Spidroin-basierte Biopolymere auf genetischer Ebene um weitere repetitive Einheit ergänzt (s. Kapitel 2.4). Diese Methode ist sehr zeitaufwendig und aufgrund der häufig wiederkehrenden Transformationsereignisse sehr fehleranfällig (Chung *et al.*, 2012). Das mit dieser Methode größte produzierbare Protein hatte ein Molekulargewicht von 96 kDa und ist vergleichbar mit dem Molekulargewicht anderer in Pflanzen exprimierten Spinnenseidenproteine (Scheller *et al.*, 2001; Scheller *et al.*, 2004). Mit einer Multimerisierungsstrategie entsprechend der hier durchgeführten klassischen Klonierung konnten Xia und Mitarbeiter die Produktion eines bakteriell exprimierten Spinnenseidenproteins mit einem Molekulargewicht von 284,9 kDa zeigen. Für die heterologe Expression wurde ein metabolisch veränderter *E.coli* Stamm mit einem erhöhten Vorkommen von Glycyl-tRNA verwendet (Xia *et al.*, 2010).

Hinsichtlich der erreichten Proteingröße stellt die Intein-vermittelte Multimerisierung die effektivste Methode zur Herstellung von repetitiven Spidroiden mit hohem Molekulargewicht dar. Der hier angewandte Mechanismus des *trans*-Proteinspleißens mit der umgekehrten Anordnung von InteinN und InteinC an den jeweiligen Termini der Vorläuferproteine lässt vermuten, dass die Spidroine linear nach einem *end-to-end* Prinzip multimerisiert werden. Dagegen liegen nach der Vernetzung mittels Transglutaminasen ungerichtete Multimere vor. Die entwickelten Multimerisierungsstrategien sind von großer Bedeutung für die rekombinante Produktion von hochmolekularen Spidroiden, welche aufgrund ihrer Größe das Potential haben, die mechanischen Eigenschaften der natürlichen Spinnenseiden nachzuahmen.

### 3.3. Immunologische Analysen auf dem Weg zum Biomaterial

Natürliche Spinnenseide gilt als nicht bzw. schwach immunogen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Immuntoleranz natürlicher Tragfadenseide, subkutan implantiert in Schweinen, vergleichbar war zu Polyurethan oder Kollagen (Vollrath *et al.*, 2002; Lewis, 2006). Eine artifizielle Nervenfasern, bestehend aus natürlicher Tragfadenseide besetzt mit Schwannschen Zellen, wurde gut toleriert und es konnte außerdem gezeigt werden, dass diese die Regeneration peripherer Nerven bei der Substitution des Hüftnervs unterstützt (Allmeling *et al.*, 2008).

Generell wird angenommen, dass hochrepetitive Proteine, besonders wenn sich die wiederholenden Einheiten aus einer kleinen Anzahl an Aminosäuren zusammensetzen, aufgrund der Abwesenheit von potentiellen Epitopen keine Immunreaktion auslösen. Unter anderem wurden im Rahmen dieser Arbeit proteinöse Biopolymere (1xVSO1-100xELP – 4xVSO1-100xELP) rekombinant hergestellt, welche einen unterschiedlichen Anteil an den charakteristischen repetitiven Elementen des Spidroins MaSp1, bestehend aus den Konsensus-Motiven poly(A), und GGX (X = A, Y, L, Q), enthielten. Dadurch konnte erstmals die Immunogenität von Spidroin-basierten ELPylierten Biopolymeren charakterisiert werden. Dabei wurde zum einen analysiert, ob diese auf Spinnenseide basierenden Biopolymere generell eine Immunreaktion auslösen. Zum anderen sollte der Einfluss des Molekulargewichtes auf eine mögliche Immunreaktion analysiert werden. Dafür wurden die Spidroin-basierten Biopolymere 1xVSO1-100xELP mit einem Molekulargewicht von 56 kDa und 4xVSO1-100xELP mit einem Molekulargewicht von 96 kDa verwendet. Zur Analyse der immunogenen Aktivität wurden zwei Gruppen von Mäusen jeweils mit einem der Spidroin-basierten Biopolymere in löslicher Form immunisiert und die isolierten polyklonalen Seren im indirekten ELISA gegen das jeweilige Antigen eingesetzt. Interessanterweise konnte eine starke spezifische Immunantwort von anti-1xVSO1-100xELP gegen das Antigen 1xVSO1-100xELP bzw. von anti-4xVSO1-100xELP gegen 4xVSO1-100xELP nachgewiesen werden (s. Kapitel 2.4). Die beiden Antigene verfügten über identische Sequenzinformationen, nur die Anzahl der repetitiven Einheiten unterschied sich in den Spidroin-basierten Anteilen der Proteine. Bei immunogener Aktivität der Spidroin-basierten Region wäre zu erwarten gewesen, dass die Kreuzreaktivität gleichwertig zu der Immunreaktion gegen das spezifische Antigen ist. Weitere Analysen zeigten jedoch eine geringe Kreuzreaktivität (6-22% im Vergleich zur spezifischen Immunantwort). Daher ist davon auszugehen, dass die Immunogenität durch eine andere Proteinkomponente verursacht wird. Genau genommen erfolgt eine humorale Immunreaktion nicht gegen die Primärstruktur eines Proteins, sondern eine Oberflächenstruktur, resultierend aus einem Abschnitt der Primärstruktur, wirkt immunogen.

Die für die Untersuchungen eingesetzten Biopolymere bestehen aus weiteren Komponenten, welche für die rekombinante Herstellung essentiell sind. Bisher waren keine Daten über den Einfluss von Fusionsproteinen auf die Immunogenität von rekombinanten

Spinnenseidenproteinen bzw. von rekombinanten spinnenseidenähnlichen Proteinen verfügbar. Für das ebenso hochrepetitive Fusionsprotein 100xELP konnte gezeigt werden, dass es keine T-Zell-Antwort auslöst (Floss *et al.*, 2010). Die Spidroin-basierten Biopolymere beinhalteten neben den hochrepetitiven Spidroinanteil und dem ELP-Tag ein LeB4-Signalpeptid, welches für den Transport der Proteine in das ER essentiell ist, aber nach dem Transportvorgang abgespalten wurde. Zur Retention der Proteine im ER verfügten die Biopolymere über das KDEL Motiv, welches aufgrund des geringen Molekulargewichtes wahrscheinlich kein immunogene Aktivität aufweist. Durch Western Analysen mit den polyklonalen Mäuseseren und dem anti-cmyc-Antikörper konnte auch der cmyc-Tag als Immunogenität auslösender Bereich ausgeschlossen werden (s. Abschnitt 2.4.2, Abbildung 5). Hierfür wurden die Biopolymere und andere pflanzlich exprimierte Proteine in die Untersuchung einbezogen. Das Protein anti-TNF-V<sub>H</sub>H, welches über einen cmyc-Tag, aber weder über einen Spidroin-Anteil oder einen ELP-Tag verfügte, konnte nicht mit den Mäuseseren anti-1xVSO1-100xELP oder anti-4xVSO1-100xELP nachgewiesen werden. Die Detektion von anti-TNF-V<sub>H</sub>H mit dem anti-cmyc-Antikörper war hingegen erfolgreich. Die Western Analysen mit den Mäuseseren zeigten aber eine starke Immunantwort gegen alle ELPylierten Proteine sowie gegen 100xELP. Weiterführende kompetitive ELISAs zeigten, dass die Bindung der Antikörper gegen 1xVSO1-100xELP bzw. 4xVSO1-100xELP zu 100% durch den Kompetitor 100xELP verhindert wurde, was zeigt, dass die humorale Immunantwort gegen eine Proteinstruktur im ELP-Bereich gerichtet ist. Die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten  $K_d$  von 25 nM (für den Komplex 1xVSO1-100xELP-anti-1xVSO1-100xELP) bzw. 374 nM (4xVSO1-100xELP-anti-4xVSO1-100xELP) können durch strukturelle Unterschiede oder einer unterschiedlichen Anzahl an zugänglichen Epitopen begründet sein. Die beiden hier verwendeten Biopolymere können aufgrund der ELP-Fusion oder des variierenden Spidroingehaltes unterschiedliche räumliche Strukturen des gesamten Proteinkomplexes aufweisen. Bereits eine minimale Veränderung in der Primärstruktur kann sich auf die Sekundär- und Tertiärstruktur (und davon ausgehend auch die Quartärstruktur) auswirken und zur Auslösung einer Immunreaktionen führen. Das betrifft auch die Fusion von nicht immunogenen Partnern, welche als Fusionsproteine immunogene Strukturen ausbilden können. Eine modellbasierte Berechnung der zu erwartenden Proteinstruktur ist aufgrund nicht vorhandener kristallografischer Daten bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Hinsichtlich

der Gesamtstruktur der Proteine sollte beachtet werden, dass i.d.R. bei Untersuchungen mit natürlichen Spinnenseiden, welche keine bzw. geringe Immunogenität zeigten, Fasern verwendet wurden. Für die hier gezeigten Untersuchungen wurden lösliche Proteine eingesetzt, worin ebenso strukturelle, Immunogenität auslösende Faktoren begründet sein können. Schließlich zeigen diese Ergebnisse die Bedeutung von immunologischen Analysen bei Fusionsproteinen, auch wenn die einzelnen Komponenten nicht immunogen sind.

Für einen weiteren Nachweis der Immunogenität des Fusionsproteins würde zum einen die Immunisierung von Mäusen mit 100xELP die Untersuchungen ergänzen. Zum anderen könnte mit rekombinanten Spidroinen ohne Fusionspartner die Immunogenität direkt überprüft werden. Dams-Kozłowska *et al.* (2013) konnten die Proteinreinigung, basierend auf der thermischen Stabilität und der Resistenz gegenüber organischen Säuren der Spinnenseiden, von zwei bakteriell exprimierten Tag-freien Spidroinen (16 und 39,5 kDa) zeigen. Nach Inkubation von murinen Makrophagen mit diesen Spidroinen bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml konnte keine Freisetzung des TNF-α detektiert werden, bei einer Konzentration von 1000 µg/ml war die Konzentration von TNF-α im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen erhöht. Da keine bzw. minimale Makrophagenaktivierung nachgewiesen werden konnte, schlussfolgerten die Autoren dieser Studie, dass die Tag-freien Spidroine keine immunogene Aktivität aufweisen (Dams-Kozłowska *et al.*, 2013).

### 3.4 Technische Anforderungen an biomedizinischen Applikationsformen aus Spinnenseide

Natürliche Spinnenseide vereint neben herausragenden mechanischen Eigenschaften eine Vielzahl von weiteren Voraussetzungen, die für eine biomedizinische Anwendung notwendig sind, beispielsweise gute Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit (Rising *et al.*, 2011). Das Produkt des Spinnprozesses, der Spinnenseidenfaden, gilt seit langem als ein biologisch sicheres Material mit Wundheilung fördernder Wirkung. Kürzlich zeigten Schäfer-Nolte *et al.* (2014) die erfolgreiche Behandlung von Hernie mittels eines handgewobenen Netzes aus der Tragfadenseide von *Nephila ssp.* in einem *in vivo* Modell. Im Vergleich zu synthetischen Netz-Implantaten zeigte das Implantat aus Spinnenseide ein erhöhtes Dehnungsverhalten bei entsprechender Festigkeit und war vier Monate nach dem operativen Eingriff vollständig abgebaut unter Verbleib einer stabilen Narbe (Schäfer-Nolte *et al.*, 2014).

Die Herausforderung bei der Verwendung rekombinant produzierter Spidroine als Biomaterial besteht darin, neben den erforderlichen mechanischen Eigenschaften, z.B. Elastizität und Härte, auch die hohen Anforderungen für biomedizinische Anwendungen zu erfüllen. Demzufolge darf ein biokompatibles Material *per se* keine gesundheitsschädlichen oder toxischen Effekte auf ein biologisches System haben (Chung *et al.*, 2012). Weiterhin sind je nach Expressionssystem und Reinigungsstrategie mögliche Kontaminationen zu beachten. Problematisch bei bakteriellen Expressionssystemen sind Verunreinigungen mit Endotoxinen, welche schon in geringen Konzentrationen eine immunologische Reaktion auslösen (Hedhammar *et al.*, 2010). Die hier verwendeten Spinnenseiden-ähnlichen Proteine wurden ausschließlich in stabil transformierten, pflanzlichen Expressionssystemen produziert, was diese Kontaminationsquelle somit ausschließt. Im Allgemeinen gelten pflanzliche Expressionssysteme im Vergleich zu anderen eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystemen als sicherer hinsichtlich einer potentiellen Kontamination mit Pathogenen oder Toxinen (Daniell *et al.*, 2001). Ebenso können im nachfolgenden Reinigungsprozess endotoxische Verunreinigungen eingebracht werden und die Biokompatibilität beeinflussen (Gorbet *et al.*, 2005). Zum einen sind nach der hier angewandten Proteinreinigung, Hitze- und Filtrationsschritte einschließend, solche Kontamination bei den analysierten Spidroin-haltigen Biopolymeren nicht zu vermuten, da die spezifische Immunreaktion sowie die Kreuzreaktion der Antigene 1xVSO1-100xELP und 4xVSO1-100xELP gegen die jeweiligen Antikörper (Mausserum 1 und Mausserum 5) unterschiedliche Intensitäten aufwiesen (siehe Abschnitt 3.3). Zum anderen wurde zur weiteren Beurteilung der Biokompatibilität die Toxizität der proteinösen Biopolymere untersucht. Diese wird im Folgenden erläutert, um insbesondere neben immunologischen und mechanischen Eigenschaften die Charakterisierung als Biomaterial zu ermöglichen.

#### 3.4.1 Cytokompatibilität von rekombinant hergestellten Spidroiden

Zur Evaluierung der Cytotoxizität der Biopolymere 1xVSO1-100xELP und 4xVSO1-100xELP wurde der Einfluss auf den Zellstoffwechsel *in vitro* untersucht. Dafür wurde zum einen der Einfluss von gelösten Spidroin-haltigen Biopolymeren auf murine embryonalen Fibroblasten untersucht, zum anderen wurde der Effekt einer Beschichtung aus den jeweiligen Biopolymeren in Kontakt mit der Zellkultur analysiert. Generell konnte eine

positive Stimulation auf den Zellstoffwechsel der Fibroblasten gezeigt werden im Vergleich zu den Negativkontrollen 100xELP und PBS. Die signifikante Stimulation des Zellstoffwechsels war bei der Inkubation mit den Proteinen in gelöster Form nach einem Tag detektierbar und verstärkt im Vergleich zum beschichteten Material; hier war ein signifikanter Unterschied in der Stimulation des Zellmetabolismus nach drei Tagen detektierbar. Ein Grund könnte die möglicherweise verminderte Interaktion zwischen den Spidroin-haltigen Biopolymeren in der Beschichtung und den Fibroblasten sein. Diese Ergebnisse zeigen ebenso, dass die hier analysierten Spidroin-basierten Biopolymere 1xVSO1-100xELP und 4xVSO1-100xELP keine cytotoxische Wirkung *in vitro* haben. Die Proteinkonzentrationen der eingesetzten Biopolymere waren mit jeweils 50 µg/mL zwar gering, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Wachstumseffekt durch den Nährwert der Proteine hervorgerufen wurde. Zur abschließenden Charakterisierung der Biokompatibilität ist eine *in vivo* Analyse notwendig; zum Beispiel wäre die subkutane Implantation von Filmen im Mausmodell möglich. Anhand histologischer Analysen in bestimmten Zeiträumen könnte man die Degradation der Biopolymere verfolgen. Desgleichen könnte mittels Detektion spezifischer Zelltypen die Akzeptanz des Implantats analysiert werden, so wäre beispielsweise eine Entzündungsreaktion durch Ansammlung von Lymphozyten und Neutrophilen erkennbar.

Frühere Untersuchungen zeigten ebenfalls einen positiven Einfluss von rekombinanten Spinnenseiden-ähnlichen Proteinen auf die Cytokompatibilität *in vitro*. Ein pflanzlich exprimiertes ELPyliertes Spidroin, welches dieselben repetitiven Motive in höherer Anzahl enthält wie die in dieser Arbeit analysierten Spidroin-haltigen Biopolymere, zeigte einen unterstützenden Einfluss auf die Proliferation und Adhäsionsrate von Chondrocyten (Scheller *et al.*, 2004). Weitere Beispiele sind mit bakteriell exprimierten Spinnenseiden-ähnlichen Proteinen bekannt. An Matrices aus dem Miniatur-Spidroin 4RepCT, bestehend aus vier poly-Alanin-Stretches und Glycin-reichen Segmenten sowie der nicht repetitiven C-terminalen Domäne, banden und wuchsen primäre humane Fibroblasten (Widhe *et al.*, 2010). Ebenso war keine cytotoxische Wirkung von Filmen aus verschiedenen Spinnenseidenproteinen, bestehend aus einer unterschiedlichen Anzahl von repetitiven Motiven der Konsensus-Motive von MaSp1 1 von *N. clavipes*, auf NIH 3T3 Zellen nachweisbar (Dams-Kozłowska *et al.*, 2013).

### 3.4.2 Ausblick: Weiterverarbeitung von rekombinanten Spidroinen für biomedizinische Zwecke

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften mittels AFM-Nanoindentation wurden aus den rekombinanten transglutaminierten MaSp1-Derivaten (K-MaSp1-100xELP, Q-MaSp1-100xELP, Q/K-MaSp1-100xELP) sowie aus den synthetischen Spinnenseiden-ähnlichen Biopolymeren (1xVSO1-100xELP, 2xVSO1-100xELP, 4xVSO1-100xELP) Proteinschichten hergestellt. Deren Oberflächen zeichneten sich durch eine sehr geringe Rauheit von unter 10,5 nm aus, wobei die Werte für die Spidroin-basierten Biopolymere sogar unter 1,1 nm betragen. Diese Anforderungen an die Rauheit der Proteinschichten sind eine Voraussetzung für die Durchführbarkeit der AFM-Nanoindentation. Neben der Erforderlichkeit einer bestimmten Oberflächenstruktur zur Durchführung der AFM-Nanoindentation bestimmt die Rauheit der Oberfläche auch die Biokompatibilität eines Materials, da Untersuchungen gezeigt haben, dass unterschiedliche Rauheit verschieden ausgeprägte Zellantworten hervorrufen (Gomes *et al.*, 2011). Humane Knochenzellen (MG63 Zellen) bildeten an glatten Nanotopografien schneller fokale Kontakte als an rauen eloxierten Oberflächen (Zinger *et al.*, 2004).

Aufgrund der gezeigten Cytokompatibilität der Spidroin-ähnlichen Biopolymere 1xVSO1-100xELP und 4xVSO1-100xELP ist eine Anwendung als stabilisierendes bzw. wachstumsförderndes Agens in Zellkulturen möglich. Zusätzlich besteht durch die geringe Rauheit der analysierten Proteinfilme eine potentielle Anwendung als Bestandteil von Implantatbeschichtungen oder als die Wundheilung unterstützendes Additiv in medizinischen Mullkompressen oder Pflasterspray. Hierfür ist jedoch eine vorherige Analyse der immunogenen Aktivität im *in vivo* Modell unerlässlich, da durch das Fusionsprotein 100xELP eine humorale Immunantwort induziert werden kann.

Das Vorhandensein rekombinanter Spidroine und Spidroin-ähnlicher Proteine in löslicher Form hat den Vorteil, dass sie durch eine Vielzahl an Prozessierungsmöglichkeiten in verschiedene Applikationsformen bzw. Morphologien gebracht werden können. Neben den oben genannten Filmen werden in der Literatur beispielsweise auch Weiterverarbeitungen zu Kapseln, Mikrokugeln, Schäume oder Hydrogele beschrieben (Spiess *et al.*, 2010; Humenik *et al.*, 2011). Unter Berücksichtigung von pH, Temperatur, Proteinkonzentration, Ionenstärke und Zusammensetzung kann die Assemblierung der

Spidroine variieren, was einen unterschiedlichen Gehalt an Sekundärstrukturen und somit an unterschiedlichen Eigenschaften im erhaltenen Material zur Folge hat (Humenik 2011). Diese maßgeschneiderten Biomaterialien können für verschiedene medizinische Anwendungen eingesetzt werden. Bisher konnte anhand der rekombinanten Spinnenseide eADF4(C16) gezeigt werden, dass diese als Beschichtung von Implantaten zur Verbesserung der Biokompatibilität und Oberflächeneigenschaften beiträgt, da die Seidenbeschichtung zu einer Verminderung der Kapselbildung in Ratten führt aufgrund der Inhibierung der Anheftung und Proliferation von Fibroblasten sowie der Synthese von Collagen I (Zeplin *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu ermöglicht ein Gewebe aus versponnenen eADF4(C16) die Anheftung und Proliferation von Fibroblasten, was einerseits das Potential dieses Biomaterials als extrazelluläre Matrix für das *Tissue Engineering* und andererseits auch die Bedeutung der Applikationsform, welche die Zell-Matrix-Interaktionsmöglichkeiten entscheidend beeinflusst, zeigt (Schacht *et al.*, 2014). Ferner wurde am Modellprotein Lysozym gezeigt, dass eADF4(C16) als Wirkstofftransporter für instabile proteinogene Wirkstoffe eingesetzt werden kann (Hofer *et al.*, 2012).

Ein weiterer Trend geht zur Funktionalisierung von Oberflächen aus Spinnenseide. Jansson *et al.* (2014) verwendeten zur Herstellung von Filmen das Spinnenseiden-basierte Protein 4RepCT, welches entweder mit IgG-bindenden Domänen (Z oder C2), einer Albumin-bindenden Domäne ABD oder der Biotin-bindenden Domäne M4 fusioniert war. Nach Inkubation mit Kaninchenserum, humanen Plasma oder biotinylierter DNA konnten die jeweiligen Interaktionspartner an die chemisch und thermisch stabilen Proteinfilme binden. Diese Ergebnisse zeigen das Potential dieses Biomaterials zur Funktionalisierung, da nach dem Einfügen einer Affinitätsdomäne auf genetischer Ebene eine Vielzahl an Biomolekülen auf der Proteinoberfläche funktionell präsentiert werden kann (Jansson *et al.*, 2014). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Spinnenseiden-ähnlichen Biopolymeren besteht durch *Genetic Engineering* ebenso die Möglichkeit der Funktionalisierung über das Einfügen von Affinitätsdomänen und stellen nach der Herstellung von Filmen eine potentielle Anwendung dar. In dieser Arbeit wurde indirekt im ELISA bereits die Fähigkeit dieser Biopolymere zur Bindung von IgGs an sich gezeigt bei der Detektion des cmc-Tags durch den anti-cmc-Antikörper.

Abschließend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Bedeutung des Molekulargewichtes auf die mechanischen Eigenschaften von Spidroin-basierten Biopolymeren. Im Gegensatz



dazu zeigen die cytotoxischen Analysen, dass die Stimulation des Zellstoffwechsels vom Molekulargewicht der Spidroine unabhängig ist. Daher sollte beim Design von rekombinanten Spidroiden anwendungsspezifisch abgewogen werden, welche Möglichkeiten zur rekombinanten Produktion hinsichtlich des Molekulargewichtes im verfügbaren Expressionssystem bestehen. Die entwickelten Multimerisierungsstrategien leisten einen wichtigen Beitrag für die Produktion von rekombinanten repetitiven Spidroiden, welche aufgrund ihres Molekulargewichtes das Potential haben, die herausragenden Eigenschaften der natürlichen Spinnenseiden nachzuahmen. Durch die biotechnologische Herstellung von repetitiven Spinnenseidenproteinen in großem Maßstab und in der geforderten Qualität können die erforderlichen Mengen produziert werden, um die Biopolymere in entsprechende Morphologien zu überführen, welche in unterschiedlichen medizinischen und technischen Bereichen Anwendung finden können.

# Zusammenfassung 4

Spinnenseiden sind ein aus Proteinen bestehendes Biomaterial mit herausragenden mechanischen Eigenschaften. Sie zeichnen sich durch eine extrem hohe Zähigkeit und Elastizität im Vergleich zu synthetischen Polymeren (z.B. Kevlar oder Nylon) aus. Aus diesem Grund sind sie von großem Interesse für Medizin und Technik. Natürliche Spinnenseidenproteine haben eine hochrepetitive Primärstruktur, bestehend aus modularen Konsensus-Motiven, und weisen ein Molekulargewicht von mindestens 250 kDa bis zu mehreren hundert kDa auf. Für mögliche Anwendungen ist die biotechnologische Herstellung von Spinnenseidenproteinen in ausreichender Menge entscheidend. Darüber hinaus ermöglicht der modulare Aufbau die rekombinante Produktion von Spinnenseiden-ähnlichen Proteine mit einer definierten Zusammensetzung, um das Verhältnis der Proteingröße und der Zusammensetzung auf die morphologischen und strukturellen Eigenschaften zu untersuchen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der heterologen Expression hochmolekularer repetitiver Spinnenseidenproteine von *Nephila clavipes* und davon abgeleiteter, mit Elastin-ähnlichen Polypeptiden (ELPs) fusionierten Proteinen *in planta*. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Multimerisierungsstrategien angewendet. Zum einen wurden auf genetischer Ebene synthetische Spinnenseidengene durch klassischer Klonierung verlängert. Zum anderen wurden hochmolekulare Proteine mit Hilfe von posttranslationalen Multimerisierungsstrategien generiert. Hierfür konnten mittels Vernetzung durch bakterielle Transglutaminase Spinnenseiden-ähnliche Proteine *in vitro* mit einem Molekulargewicht entsprechend dem der natürlichen Spinnenseidenproteine hergestellt werden. Unter Verwendung einer weiteren Multimerisierungsstrategie wurden Spinnenseiden-basierte Monomere mit einem gespaltenen Intein fusioniert und nach der Translation durch *trans*-Proteinspleißen polymerisiert. Mittels der Intein-basierten Multimerisierung wurde erstmals die heterologe Expression von Spinnenseiden-basierter Proteine *in planta* mit einem Molekulargewicht größer als 250 kDa gezeigt.

Ausgewählte, heterolog exprimierte Spinnenseiden-Fusionsproteine wurden aus transgenem Tabak gereinigt. Für die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften wurden Proteinfilme mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) und mit AFM-basierter

Nanoindentation untersucht. Der mit ansteigendem Spinnenseidenproteingehalt zunehmende Elastizitätsmodul zeigt tendenziell, dass hochmolekulare rekombinante Spidroine erforderlich sind, um die mechanischen Eigenschaften von natürlichen Spinnenseiden nachahmen zu können. Außerdem werden erstmalig immunologische Analysen von Spinnenseiden-ähnlichen Fusionsproteinen gezeigt. Mit Hilfe kompetitiver ELISAs konnte gezeigt werden, dass eine zuvor detektierte humorale Immunantwort im Wesentlichen gegen eine Struktur des ELP-Fusionsproteins gerichtet ist. Anhand eines Cytokompatibilitätsassays, bei dem der Einfluss von Spinnenseiden-ähnlichen Proteinen auf murine embryonale Fibroblasten analysiert wurde, konnte unabhängig vom Molekulargewicht keine cytotoxische Wirkung festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen den bedeutenden Einfluss der primären Strukturelemente auf die mechanischen und biologischen Eigenschaften und liefern somit nähere Erkenntnisse zur Struktur-Funktions-Beziehung von Spinnenseidenproteinen.

## Summary

Spider silks represent a protein-based biomaterial with outstanding mechanical properties. They are characterized by high toughness and elasticity in comparison to synthetic polymers (e.g. Kevlar or nylon). Therefore, they are of great interest for medical and technical applications. Native spider silks commonly consist of large and repetitive proteins composed of modular consensus motifs, showing a molecular weight from at least 250 kDa to several hundred kDa. Biotechnological production of spider silk proteins is the way to prevent limitations in all intended applications. Moreover, the modular structure enables the recombinant production of spider silk-like proteins in order to explore the relationship between length and composition on morphological and structural features.

Here, the heterologous expression of high-molecular weight spider silk proteins originated from *Nephila clavipes* and spider silk-derived proteins fused to elastin-like peptides (ELPs) is presented. For that reason, three different multimerization strategies were applied. In one approach, synthetic spider silk genes were elongated with each other by a classical cloning strategy. Furthermore, posttranslational multimerization strategies with the crosslinking enzyme transglutaminase and an intein-based polymerization with a split intein capable of protein *trans*-splicing were used to produce native-sized spider silk-like proteins. By the intein-mediated multimerization, the heterologous expression of native-sized spider silk-like proteins *in planta* larger than 250 kDa was shown for the first time.

Several selected spider silk-like fusion proteins were purified from transgenic tobacco. For further characterization, protein layers were prepared and analyzed by atomic force microscopy (AFM) and AFM-based nanoindentation. An increased content of spider silk-derived sequences in the recombinant fusion proteins was correlated with a rising elastic penetration modulus, indicating the need for recombinant spider silks of high molecular weight to mimic the mechanical properties of native spider silks. In addition, the first immunological analysis of spider silk-like fusion proteins are shown. Competitive ELISAs indicated that the humoral immune response is mainly directed against the fusion partner ELP. Finally, a cytocompatibility assay with murine embryonic fibroblasts gave no indication for spider-silk derived cytotoxicity, independently from the molecular weight of the spider silk-like proteins.

All in all, the results of this study provide an important contribution about the influence of the primary structure elements on the mechanical and biological properties, thus facilitating a more detailed understanding of the structure-function-relationship of spider silk proteins.

# Literatur 5

Adrianos, S. L., F. Teule, M. B. Hinman, J. A. Jones, W. S. Weber, J. L. Yarger and R. V. Lewis (2013). "Nephila clavipes Flagelliform silk-like GGX motifs contribute to extensibility and spacer motifs contribute to strength in synthetic spider silk fibers." *Biomacromolecules* 14(6): 1751-1760.

Agapov, I., O. L. Pustovalova, M. M. Moiseyev, V. G. Bogush, O. S. Sokolova, V. I. Sevastyanov, V. G. Debabov and M. P. Kirpichnikov (2009). "Three-dimensional scaffold made from recombinant spider Silk protein for tissue engineering." *Dokl Biochem Biophys* 426: 127-130.

Allmeling, C., A. Jokuszies, K. Reimers, S. Kall, C. Y. Choi, G. Brandes, C. Kasper, T. Scheper, M. Guggenheim and P. M. Vogt (2008). "Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration." *Cell Prolif* 41(3): 408-420.

Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond and D. L. Kaplan (2003). "Silk-based biomaterials." *Biomaterials* 24(3): 401-416.

An, B., J. E. Jenkins, S. Sampath, G. P. Holland, M. Hinman, J. L. Yarger and R. Lewis (2012). "Reproducing natural spider silks' copolymer behavior in synthetic silk mimics." *Biomacromolecules* 13(12): 3938-3948.

Andersson, M., G. Chen, M. Otkovs, M. Landreh, K. Nordling, N. Kronqvist, P. Westermark, H. Jorvall, S. Knight, Y. Ridderstrale, L. Holm, Q. Meng, K. Jaudzems, M. Chesler, J. Johansson and A. Rising (2014). "Carbonic anhydrase generates CO<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> that drive spider silk formation via opposite effects on the terminal domains." *PLoS Biol* 12(8): e1001921.

Arcidiacono, S., C. Mello, D. Kaplan, S. Cheley and H. Bayley (1998). "Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol* 49(1): 31-38.

Askarieh, G., M. Hedhammar, K. Nordling, A. Saenz, C. Casals, A. Rising, J. Johansson and S. D. Knight (2010). "Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay." *Nature* 465(7295): 236-238.

Ayoub, N. A., J. E. Garb, R. M. Tinghitella, M. A. Collin and C. Y. Hayashi (2007). "Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes." *PLoS One* 2(6): e514.

Bandiera, A. (2011). "Transglutaminase-catalyzed preparation of human elastin-like polypeptide-based three-dimensional matrices for cell encapsulation." *Enzyme Microb Technol* 49(4): 347-352.

Barr, L. A., S. R. Fahnestock and J. J. Yang (2004). "Production and purification of recombinant DP1B silk-like protein in plants." *Molecular Breeding* 13(4): 345-356.

Beckwitt, R., S. Arcidiacono and R. Stote (1998). "Evolution of repetitive proteins: spider silks from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae)." *Insect Biochem Mol Biol* 28(3): 121-130.

Bini, E., D. P. Knight and D. L. Kaplan (2004). "Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly." *J Mol Biol* 335(1): 27-40.

Bogush, V. G., O. S. Sokolova, L. I. Davydova, D. V. Klinov, K. V. Sidoruk, N. G. Esipova, T. V. Neretina, I. A. Orchanskyi, V. Y. Makeev, V. G. Tumanyan, K. V. Shaitan, V. G. Debabov and M. P. Kirpichnikov (2009). "A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins." *J Neuroimmune Pharmacol* 4(1): 17-27.

Brooks, A. E., T. J. Brothers, M. S. Creager and R. V. Lewis (2007). "A novel methodology to explore the viscoelasticity of spider major ampullate silk." *J Appl Biomater Biomech* 5(3): 158-165.

Chung, H., T. Y. Kim and S. Y. Lee (2012). "Recent advances in production of recombinant spider silk proteins." *Current Opinion in Biotechnology* 23(6): 957-964.

Craig, C. L. (1997). "Evolution of arthropod silks." *Annu Rev Entomol* 42: 231-267.

Craig, C. L., C. Riekel, M. E. Herberstein, R. S. Weber, D. Kaplan and N. E. Pierce (2000). "Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders." *Mol Biol Evol* 17(12): 1904-1913.

Dams-Kozłowska, H., A. Majer, P. Tomasiewicz, J. Lozinska, D. L. Kaplan and A. Mackiewicz (2013). "Purification and cytotoxicity of tag-free bioengineered spider silk proteins." *J Biomed Mater Res A* 101(2): 456-464.

Daniell, H., S. J. Streatfield and K. Wycoff (2001). "Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants." *Trends Plant Sci* 6(5): 219-226.

Eisoldt, L., C. Thamm and T. Scheibel (2012). "Review the role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins." *Biopolymers* 97(6): 355-361.

Endres, H. J. and A. Siebert-Raths (2009). *Technische Biopolymere: Rahmenbedingungen, Marktsituation, Herstellung, Aufbau und Eigenschaften* München, Carl Hanser Verlag.

Fahnestock, S. R. and L. A. Bedzyk (1997). "Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*." *Appl Microbiol Biotechnol* 47(1): 33-39.

Fahnestock, S. R. and S. L. Irwin (1997). "Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol* 47(1): 23-32.

Fahnestock, S. R., Z. Yao and L. A. Bedzyk (2000). "Microbial production of spider silk proteins." *J Biotechnol* 74(2): 105-119.

Floss, D. M., M. Mockey, G. Zanello, D. Brosion, M. Diogon, R. Frutos, T. Bruel, V. Rodrigues, E. Garzon, C. Chevalere, M. Berri, H. Salmon, U. Conrad and L. Dedieu (2010). "Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy." *J Biomed Biotechnol* 2010: 274346.

Floss, D. M., K. Schallau, S. Rose-John, U. Conrad and J. Scheller (2010). "Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application." *Trends in Biotechnology* 28(1): 37-45.

Foelix, R. F. (1992). *Biologie der Spinnen*, Stuttgart, Thieme.

Gaines, W. A. t. and W. R. Marcotte, Jr. (2008). "Identification and characterization of multiple Spidroin 1 genes encoding major ampullate silk proteins in *Nephila clavipes*." *Insect Mol Biol* 17(5): 465-474.

Gatesy, J., C. Hayashi, D. Motriuk, J. Woods and R. Lewis (2001). "Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences." *Science* 291(5513): 2603-2605.

Gomes, S., K. Numata, I. B. Leonor, J. F. Mano, R. L. Reis and D. L. Kaplan (2011). "AFM study of morphology and mechanical properties of a chimeric spider silk and bone sialoprotein protein for bone regeneration." *Biomacromolecules* 12(5): 1675-1685.

Gorbet, M. B. and M. V. Sefton (2005). "Endotoxin: the uninvited guest." *Biomaterials* 26(34): 6811-6817.

Gosline, J. M., P. A. Guerette, C. S. Ortlepp and K. N. Savage (1999). "The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function." *Journal of Experimental Biology* 202(Pt 23): 3295-3303.

Gustafsson, C., S. Govindarajan and J. Minshull (2004). "Codon bias and heterologous protein expression." *Trends Biotechnol* 22(7): 346-353.

Hagn, F., L. Eisoldt, J. G. Hardy, C. Vendrely, M. Coles, T. Scheibel and H. Kessler (2010). "A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly." *Nature* 465(7295): 239-242.

Hardy, J. G. and T. R. Scheibel (2009). "Silk-inspired polymers and proteins." *Biochem Soc Trans* 37(Pt 4): 677-681.

Hayashi, C. Y. and R. V. Lewis (1998). "Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks." *J Mol Biol* 275(5): 773-784.

Hayashi, C. Y. and R. V. Lewis (2000). "Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene." *Science* 287(5457): 1477-1479.

Hayashi, C. Y., N. H. Shipley and R. V. Lewis (1999). "Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins." *Int J Biol Macromol* 24(2-3): 271-275.

Hedhammar, M., H. Bramfeldt, T. Baris, M. Widhe, G. Askarieh, K. Nordling, S. Aulock and J. Johansson (2010). "Sterilized recombinant spider silk fibers of low pyrogenicity." *Biomacromolecules* 11(4): 953-959.

Hedhammar, M., A. Rising, S. Grip, A. S. Martinez, K. Nordling, C. Casals, M. Stark and J. Johansson (2008). "Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthenoops australis*: implications for fiber formation." *Biochemistry* 47(11): 3407-3417.

Heim, M., D. Keerl and T. Scheibel (2009). "Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber." *Angew Chem Int Ed Engl* 48(20): 3584-3596.

Hinman, M. B. and R. V. Lewis (1992). "Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber." *J Biol Chem* 267(27): 19320-19324.

- Hofer, M., G. Winter and J. Myschik (2012). "Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs." *Biomaterials* 33(5): 1554-1562.
- Holland, G. P., J. E. Jenkins, M. S. Creager, R. V. Lewis and J. L. Yarger (2008). "Quantifying the fraction of glycine and alanine in beta-sheet and helical conformations in spider dragline silk using solid-state NMR." *Chem Commun (Camb)*(43): 5568-5570.
- Hu, X., K. Vasanthavada, K. Kohler, S. McNary, A. M. Moore and C. A. Vierra (2006). "Molecular mechanisms of spider silk." *Cell Mol Life Sci* 63(17): 1986-1999.
- Huemmerich, D., C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph and T. Scheibel (2004). "Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility." *Biochemistry* 43(42): 13604-13612.
- Humenik, M., A. M. Smith and T. Scheibel (2011). "Recombinant Spider Silks-Biopolymers with Potential for Future Applications." *Polymers* 3(1): 640-661.
- Jansson, R., N. Thatikonda, D. Lindberg, A. Rising, J. Johansson, P. A. Nygren and M. Hedhammar (2014). "Recombinant spider silk genetically functionalized with affinity domains." *Biomacromolecules* 15(5): 1696-1706.
- Kashiwagi, T., K. Yokoyama, K. Ishikawa, K. Ono, D. Ejima, H. Matsui and E. Suzuki (2002). "Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*." *J Biol Chem* 277(46): 44252-44260.
- Kluge, J. A., O. Rabotyagova, G. G. Leisk and D. L. Kaplan (2008). "Spider silks and their applications." *Trends Biotechnol* 26(5): 244-251.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein." *Journal of Molecular Biology* 157(1): 105-132.
- Lazaris, A., S. Arcidiacono, Y. Huang, J. F. Zhou, F. Duguay, N. Chretien, E. A. Welsh, J. W. Soares and C. N. Karatzas (2002). "Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells." *Science* 295(5554): 472-476.
- Lee, K. S., B. Y. Kim, Y. H. Je, S. D. Woo, H. D. Sohn and B. R. Jin (2007). "Molecular cloning and expression of the C-terminus of spider flagelliform silk protein from *Araneus ventricosus*." *J Biosci* 32(4): 705-712.
- Lewis, R. V. (2006). "Spider silk: ancient ideas for new biomaterials." *Chem Rev* 106(9): 3762-3774.
- Lewis, R. V., M. Hinman, S. Kothakota and M. J. Fournier (1996). "Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins." *Protein Expr Purif* 7(4): 400-406.
- Mariniello, L. and R. Porta (2005). "Transglutaminases as biotechnological tools." *Prog Exp Tumor Res* 38: 174-191.
- Mariniello, L., R. Porta, A. Sorrentino, C. V. Giosafatto, G. Rossi Marquez, M. Esposito and P. Di Pierro (2013). "Transglutaminase-mediated macromolecular assembly: production of conjugates for food and pharmaceutical applications." *Amino Acids*.



- Menassa, R., H. Zhu, C. N. Karatzas, A. Lazaris, A. Richman and J. Brandle (2004). "Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production." *Plant Biotechnol J* 2(5): 431-438.
- Meyer, D. E. and A. Chilkoti (1999). "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides." *Nat Biotechnol* 17(11): 1112-1115.
- Miao, Y., Y. Zhang, K. Nakagaki, T. Zhao, A. Zhao, Y. Meng, M. Nakagaki, E. Y. Park and K. Maenaka (2006). "Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system." *Appl Microbiol Biotechnol* 71(2): 192-199.
- Mootz, H. D. (2009). "Split inteins as versatile tools for protein semisynthesis." *Chembiochem* 10(16): 2579-2589.
- Ohgo, K., T. Kawase, J. Ashida and T. Asakura (2006). "Solid-state NMR analysis of a peptide (Gly-Pro-Gly-Gly-Ala)<sub>6</sub>-Gly derived from a flagelliform silk sequence of *Nephila clavipes*." *Biomacromolecules* 7(4): 1210-1214.
- Parkhe, A. D., S. K. Seeley, K. Gardner, L. Thompson and R. V. Lewis (1997). "Structural studies of spider silk proteins in the fiber." *J Mol Recognit* 10(1): 1-6.
- Perler, F. B. (2005). "Protein splicing mechanisms and applications." *IUBMB Life* 57(7): 469-476.
- Prince, J. T., K. P. McGrath, C. M. DiGirolamo and D. L. Kaplan (1995). "Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk." *Biochemistry* 34(34): 10879-10885.
- Rabotyagova, O. S., P. Cebe and D. L. Kaplan (2009). "Self-assembly of genetically engineered spider silk block copolymers." *Biomacromolecules* 10(2): 229-236.
- Rising, A., H. Nimmervoll, S. Grip, A. Fernandez-Arias, E. Storckenfeldt, D. P. Knight, F. Vollrath and W. Engstrom (2005). "Spider silk proteins--mechanical property and gene sequence." *Zool Sci* 22(3): 273-281.
- Rising, A., G. Hjalm, W. Engstrom and J. Johansson (2006). "N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins." *Biomacromolecules* 7(11): 3120-3124.
- Rising, A., M. Widhe, J. Johansson and M. Hedhammar (2011). "Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications." *Cell Mol Life Sci* 68(2): 169-184.
- Saleh, L. and F. B. Perler (2006). "Protein splicing in cis and in trans." *Chem Rec* 6(4): 183-193.
- Saumonneau, A., K. Rottier, U. Conrad, Y. Popineau, J. Gueguen and M. Francin-Allami (2011). "Expression of a new chimeric protein with a highly repeated sequence in tobacco cells." *Plant Cell Rep* 30(7): 1289-1302.
- Schacht, K. and T. Scheibel (2014). "Processing of recombinant spider silk proteins into tailor-made materials for biomaterials applications." *Curr Opin Biotechnol* 29C: 62-69.
- Schafer-Nolte, F., K. Hennecke, K. Reimers, R. Schnabel, C. Allmeling, P. M. Vogt, J. W. Kuhbier and U. Mirastschijski (2014). "Biomechanics and biocompatibility of woven spider silk meshes during remodeling in a rodent fascia replacement model." *Ann Surg* 259(4): 781-792.

- Scheller, J., K. H. Guhrs, F. Grosse and U. Conrad (2001). "Production of spider silk proteins in tobacco and potato." *Nat Biotechnol* 19(6): 573-577.
- Scheller, J., D. Henggeler, A. Viviani and U. Conrad (2004). "Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation." *Transgenic Res* 13(1): 51-57.
- Schutz, V. and H. D. Mootz (2014). "Click-tag and amine-tag: chemical tag approaches for efficient protein labeling in vitro and on live cells using the naturally split Npu DnaE intein." *Angew Chem Int Ed Engl* 53(16): 4113-4117.
- Simmons, A. H., C. A. Michal and L. W. Jelinski (1996). "Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk." *Science* 271(5245): 84-87.
- Spieß, K., A. Lammel and T. Scheibel (2010). "Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials." *Macromol Biosci* 10(9): 998-1007.
- Sponner, A., B. Schlott, F. Vollrath, E. Unger, F. Grosse and K. Weisshart (2005). "Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk." *Biochemistry* 44(12): 4727-4736.
- Stark, M., S. Grip, A. Rising, M. Hedhammar, W. Engstrom, G. Hjalmar and J. Johansson (2007). "Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins." *Biomacromolecules* 8(5): 1695-1701.
- Sutherland, T. D., J. H. Young, S. Weisman, C. Y. Hayashi and D. J. Merritt (2010). "Insect silk: one name, many materials." *Annu Rev Entomol* 55: 171-188.
- Tanaka, T., N. Kamiya and T. Nagamune (2004). "Peptidyl linkers for protein heterodimerization catalyzed by microbial transglutaminase." *Bioconjug Chem* 15(3): 491-497.
- Tokareva, O., V. A. Michalczychen-Lacerda, E. L. Rech and D. L. Kaplan (2013). "Recombinant DNA production of spider silk proteins." *Microb Biotechnol* 6(6): 651-663.
- Urry, D. W. (1988). "Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics." *J Protein Chem* 7(1): 1-34.
- van Beek, J. D., S. Hess, F. Vollrath and B. H. Meier (2002). "The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10266-10271.
- Vendrely, C., C. Ackerschott, L. Römer and T. Scheibel (2008). "Molecular design of performance proteins with repetitive sequences: recombinant flagelliform spider silk as basis for biomaterials." *Methods Mol Biol* 474: 3-14.
- Vollrath, F. (2000). "Strength and structure of spiders' silks." *J Biotechnol* 74(2): 67-83.
- Vollrath, F., P. Barth, A. Basedow, W. Engstrom and H. List (2002). "Local tolerance to spider silks and protein polymers in vivo." *In Vivo* 16(4): 229-234.
- Vollrath, F. and D. T. Edmonds (1989). "Modulation of the Mechanical-Properties of Spider Silk by Coating with Water." *Nature* 340(6231): 305-307.

- Wen, H., X. Lan, Y. Zhang, T. Zhao, Y. Wang, Z. Kajiura and M. Nakagaki (2010). "Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons." *Mol Biol Rep* 37(4): 1815-1821.
- Widhe, M., H. Bysell, S. Nystedt, I. Schenning, M. Malmsten, J. Johansson, A. Rising and M. Hedhammar (2010). "Recombinant spider silk as matrices for cell culture." *Biomaterials* 31(36): 9575-9585.
- Widmaier, D. M., D. Tullman-Ercek, E. A. Mirsky, R. Hill, S. Govindarajan, J. Minshull and C. A. Voigt (2009). "Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers." *Mol Syst Biol* 5: 309.
- Winkler, S. and D. L. Kaplan (2000). "Molecular biology of spider silk." *J Biotechnol* 74(2): 85-93.
- Winkler, S., S. Szela, P. Avtges, R. Valluzzi, D. A. Kirschner and D. Kaplan (1999). "Designing recombinant spider silk proteins to control assembly." *Int J Biol Macromol* 24(2-3): 265-270.
- Wu, H., Z. Hu and X. Q. Liu (1998). "Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9226-9231.
- Xia, X. X., Z. G. Qian, C. S. Ki, Y. H. Park, D. L. Kaplan and S. Y. Lee (2010). "Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32): 14059-14063.
- Xu, H. T., B. L. Fan, S. Y. Yu, Y. H. Huang, Z. H. Zhao, Z. X. Lian, Y. P. Dai, L. L. Wang, Z. L. Liu, J. Fei and N. Li (2007). "Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice." *Anim Biotechnol* 18(1): 1-12.
- Xu, M. and R. V. Lewis (1990). "Structure of a protein superfiber: spider dragline silk." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 7120-7124.
- Yang, J., L. A. Barr, S. R. Fahnestock and Z. B. Liu (2005). "High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting." *Transgenic Res* 14(3): 313-324.
- Zeplin, P. H., N. C. Maksimovikj, M. C. Jordan, J. Nickel, G. Lang, A. H. Leimer, L. Römer and T. Scheibel (2014). "Spider Silk Coatings as a Bioshield to reduce Periprosthetic Fibrous Capsule Formation." *Advanced Functional Materials* 24: 2658-2666.
- Zhou, Y., S. Wu and V. P. Conticello (2001). "Genetically directed synthesis and spectroscopic analysis of a protein polymer derived from a flagelliform silk sequence." *Biomacromolecules* 2(1): 111-125.
- Zhu, Y., A. Rinzema, J. Tramper and J. Bol (1995). "Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing." *Applied Microbiology and Biotechnology* 44(3-4): 277-282.
- Zinger, O., K. Anselme, A. Denzer, P. Habersetzer, M. Wieland, J. Jeanfils, P. Hardouin and D. Landolt (2004). "Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography." *Biomaterials* 25(14): 2695-2711.

# Anhang 6

## 6.1 Ergänzende Daten zu Artikel 2.2.2

### (A) IntC-FLAG-c-myc-IntN-KDEL-monomer

1 SPEIEKLSQS DIYWDSIVSI TETGVVEEVD LTVPGPHNFV  
41 ANDIIVHNSI EQDGGGGSGG GSGGGGSGP GGYGPGGAGP  
81 GGYGPGGAGP GGYGPGGAGP GGYGPGGTGP GGYGPGGTGP  
121 GGVGPGGAGP GGYGPGGAGP GGAGPGGAGP GGAGPGGAGP  
161 GGAGPGGYGP GSGGPGGATI IEDLDITIDG ADGPPITISE  
201 ELTISGAGGS GPGGVGPGGS GPGGVGPGSF GPGGVGPGGS  
241 GPGGVGSGGS GQGGVVRPSGS GPGGVEQKLI SEEDLNRESG  
281 CISGDSLISL ASTGKRVS IK DLLDEKDFEI WAINEQTMKL  
321 ESAKVS RVFC TGK KLVYILK TR LGRTIKAT ANHRFLTIDG  
361 WKRLDELSLK EHIALPRKLE SSSLQLGSKD EL

### (B) IntC-FLAG-His-IntN-KDEL-monomer

1 SPEIEKLSQS DIYWDSIVSI TETGVVEEVD LTVPGPHNFV  
41 ANDIIVHNSI EQDGGGGSGG GSGGGGSGP GGYGPGGAGP  
81 GGYGPGGAGP GGYGPGGAGP GGYGPGGTGP GGYGPGGTGP  
121 GGVGPGGAGP GGYGPGGAGP GGAGPGGAGP GGAGPGGAGP  
161 GGAGPGGYGP GSGGPGGATI IEDLDITIDG ADGPPITISE  
201 ELTISGAGGS GPGGVGPGGS GPGGVGPGSF GPGGVGPGGS  
241 GPGGVGSGGS GQGGVVRPSGS GPGGVH HHHH HGGRSGRESG  
281 CISGDSLISL ASTGKRVS IK DLLDEKDFEI WAINEQTMKL  
321 ESAKVS RVFC TGK KLVYILK TR LGRTIKAT ANHRFLTIDG  
361 WKRLDELSLK EHIALPRKLE SSSLQLGSKD EL

### (E) IntCmut-FLAG-c-myc-IntNmut-KDEL-monomer

1 SPEIEKLSQS DIYWDSIVSI TETGVVEEVD LTVPGPHNFV  
41 ANDIIVHAAI EQDGGGGSGG GSGGGGSGP GGYGPGGAGP  
81 GGYGPGGAGP GGYGPGGAGP GGYGPGGTGP GGYGPGGTGP  
121 GGVGPGGAGP GGYGPGGAGP GGAGPGGAGP GGAGPGGAGP  
161 GGAGPGGYGP GSGGPGGATI IEDLDITIDG ADGPPITISE  
201 ELTISGAGGS GPGGVGPGGS GPGGVGPGSF GPGGVGPGGS  
241 GPGGVGSGGS GQGGVVRPSGS GPGGVEQKLI SEEDLNRESG  
281 AISGDSLISL ASTGKRVS IK DLLDEKDFEI WAINEQTMKL  
321 ESAKVS RVFC TGK KLVYILK TR LGRTIKAT ANHRFLTIDG  
361 WKRLDELSLK EHIALPRKLE SSSLQLGSKD EL

### (F) IntC-ELP-c-myc-IntN-KDEL-monomer

1 SPEIEKLSQS DIYWDSIVSI TETGVVEEVD LTVPGPHNFV  
41 ANDIIVHNSI EQDGGGGSGG GSGGGGSGP GVGVPGTGVP  
81 GLGVPGFGVP GVGVPGHGVP GSGVPGAGVP GQGVPGCGVP  
121 GVGVPGYGVP GGGVPGWVVP GVGVPKGVVP GIGVPRGVVP  
161 GEGVPGDGVP GVGVPNGVVP GTGVPGCGVP GVGVPGHGVP  
201 GAGVPGQGVVP GRGVPGSGVP GVGVPGWVVP GNGVPGFGVP  
241 GVGVPGGGVVP GDGVPEGVVP GYGVPKGVVP GVGVPGLGVP  
281 GIGVPGQGVVP GVGVPDGVP GWGVPEGVVP GYGVPGSGVP  
321 GVGVPGHGVP GIGVPGAGVP GVGVPGGGVVP GFGVPKGVVP  
361 GLGVPRGEQ KLISEEDLNR ESGCISGDSL ISLASTGKRV  
401 SIKDLLDEKD FEIWAINEQT MKLES AKVSR VFCTGK KLVY  
441 ILKTR LGRTI KATANHRFLT IDGWKRLDEL SLKEHIALPR  
481 KLESSSLQLG SKDEL

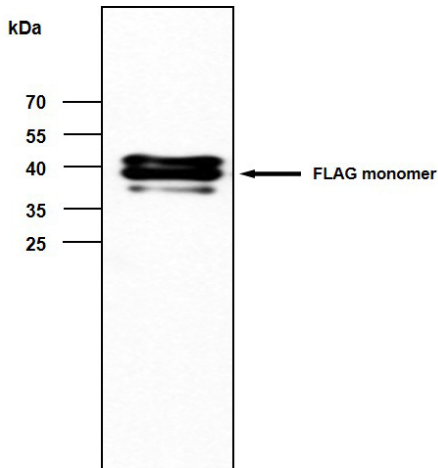
### (C) IntC-FLAG-c-myc-IntN-KDEL-dimer

1 SPEIEKLSQS DIYWDSIVSI TETGVVEEVD LTVPGPHNFV  
41 ANDIIVHNSI EQDGGGGSGG GSGGGGSGP GGYGPGGAGP  
81 GGYGPGGAGP GGYGPGGAGP GGYGPGGTGP GGYGPGGTGP  
121 GGVGPGGAGP GGYGPGGAGP GGAGPGGAGP GGAGPGGAGP  
161 GGAGPGGYGP GSGGPGGATI IEDLDITIDG ADGPPITISE  
201 ELTISGAGGS GPGGVGPGGS GPGGVGPGSF GPGGVGPGGS  
241 GPGGVGSGGS GQGGVVRPSGS GPGGVEQKLI SEEDLNRESG  
281 SIEQDGGGGS GGGGSGGGGS GPGGYGPGGA GPGGYGPGGA  
321 GPGGYGPGGA GPGGYGPGGT GPGGYGPGGT GPGGVGPGGA  
361 GPGGYGPGGA GPGGAGPGGA GPGGAGPGGA GPGGAGPGGY  
401 GPGGSGPGGA TIIEDLDITI DGADGPPITI SEELTISGAG  
441 GSGPGGVGP GSGPGGVGP SFPGGVGVP GSGPGGVGP  
481 GSGQGGVRS GSGPGGVEQK LI SEEDLNRE SGCISGDSL I  
521 SLASTGKRVS IKDLLDEKDF EIWAINEQTM KLES AKVSRV  
561 FCTGK KLVYI LKTR LGRTIK ATANHRFLTI DGWKRLDELS  
601 LKEHIALPRK LESSSLQLGS KDEL

### (D) SP-IntCmut-FLAG-c-myc-IntNmut-KDEL-monomer

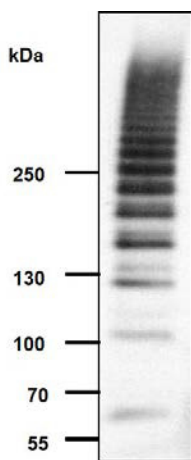
1 MASKPFLSLL SLSLLLFST CLASPEIEKL SQSDIYWDSI  
41 VSITETGVVEE VFDLTVPGPH NFVANDIIVH AAIEQDGGGG  
81 SGGGGSGGGG SGP GGYGPGG AGP GGYGPGG AGP GGYGPGG  
121 AGP GGYGPGG TGP GGYGPGG TGP GGVGPGG AGP GGYGPGG  
161 AGP GAGP GGG AGP GAGP GGG AGP GAGP GGG YGPGGS GPGG  
201 ATIIEDLDIT IDGADGPPIT ISEELTISGA GSGGPGGVVP  
241 GSGGPGGVVP GSFPGGVVP GSGGPGVGS GSGQGGVVP  
281 SSGGPGGVEQ KLISEEDLNR ESGAISGDSL ISLASTGKRV  
321 SIKDLLDEKD FEIWAINEQT MKLES AKVSR VFCTGK KLVY  
361 ILKTR LGRTI KATANHRFLT IDGWKRLDEL SLKEHIALPR  
401 KLESSSLQLG SKDEL

**Figure S1** Peptide sequences of the various intein fusion proteins. IntN/IntC: N- and C-terminal intein domains, SP: legumin B4 signal peptide, ELP: elastin-like polypeptide, c-myc/His: protein detection and purification tags.



**Figure S2** Heterologous production of mutated IntC-Flag-IntN monomers in *E. coli*.

The mutated *intc::flag::intn* sequence was cloned into the vector pET16b and expressed in the cytosol of *E. coli* BL21 cells. Specific signals were detected after Western blot analysis by ECL via the c-myc-tag. Comparison with a standard molecular weight marker ladder indicated a size of the FLAG-intein monomer was 39 kDa.



**Figure S3** Heterologous overexpression of distinct His-tagged FLAG-intein multimers in stably transformed tobacco leaves. Western blot analysis of extracts of tobacco leaves overexpressing the IntC-FLAG-IntN protein. Plant leaf extracts were separated by 3-13% SDS-PAGE, electroblotted, and distinct FLAG multimers were detected by ECL based on the presence of the His-tag.

### 6.1.1. Proteinsequenz von Intein-Glutenin

```

1   MASKPFLSLL SLSLLLFTST CLASPEIEKL SQSDIYWDSI VSITETGVVEE
51  VFDLTVPGPH NfVANDIIVH NSIEQDGGGG SGGGSGGGG SEGEASRQLQ
101 CERELQESSL EACRQVVDQQ LAGRLPWSTG LQMRCCQQLR DVSAKCRSVA
151 VSQVARQYEQ TVVPPKGGSF YPGETTPLQQ LQQGIFWGTS SQTvQGYYPG
201 VTSPrQGSYY PGQASPQQPG QGQQPGKWQE PGQQQWYYP TSLQQPGQQQ
251 QIGKGQQGYy PtsLQQPGQG QGGYYPTSLQ HTGQRQQPVQ GQQPEQQQQP
301 GQWQQGYyPT SPQQLGQQQQ PRQWQQSGQG QGGHYPTSLQ QPGQQQQGHY
351 LASQQQPGQG QGGHYPASQQ QPGQQQQGHY PASQQQPGQG QGGHYPASQQ
401 EPGQQQQGQI PASQQQPGQG QGGHYPASLQ QPGQQQQGHY PtsLQQLGQG
451 QQTGQPGQKQ QPGQQQTGQ GQQPEQQEQP GQQQQGYyPT SLQQPGQQQ
501 QGQQQQGYyP TSLQQPGQQQ QGHYPASLQQ PGQQPGQRQ QPGQQQHPEQ
551 GKQPGQQQQG YyPTSPQQPG QGQQLGGQQQ GYYPTSPQQP GQQQPGQQQ
601 QGHcPTSPQQ SGQAQQPGQG QQIGVQQPG QGQQGYyPTS VQQPGQQQS
651 GQGQQSGQGH QPGQQQQSGQ EQQGYDspYH VSAEQQAASP MVAKAQQPAT
701 QLPTVCRMEG GDALSASQEQ KLISEEDLNR ESGCISGDSL ISLASTGKRv
751 SIKDLLDEKd FEIWAINEQT MKLESakVSR VFCTGKKLVY ILKTRLGRtI
801 KATANHRFLT IDGWKRLDEL SLKEHIALPR KLESSSLQLG SKDEL

```

## 6.2 Ergänzende Daten zu Artikel 2.3.2

### K-MaSp1-100xELP

```
1   MASKPFLSLL  SLSLLLFTST  CLAGSGSGMK  ETAAARFERN  HMDSGSGPGA
51  AQGAGAAAAA  AGGAGQGGY  GLGGQGAGQG  GYGGLGGQGA  GQGAGAAAAA
101 AAGGAGQGGY  GGLGSQGAGR  GGQGAGAAAA  AAGGAGQGGY  GGLGSQGAGR
151 GGLGGQGAGA  AAAAAAGGAG  QGGYGGLGNQ  GAGRGGQGAA  AAAAGGAGQG
201 GYGGLGSQGA  GRGGLGGQGA  GAAAAAAGGA  GQGGYGGLGG  QGAGQGGYGG
251 LGSQAGRGG  LGGQGAGAAA  AAAAGGAGQG  GLGGQGAGQG  AGASAAAAGG
301 AGQGGYGGLG  SQAGRGGEG  AGAAAAAAGG  AGQGGYGGLG  GQGAGQGGY  G
351 GLGSQAGARG  GLGGQGAGAA  AAGGAGQGGL  GGQGAGQGAG  AAAAAAGGAG
401 QGGYGGLGSQ  GAGRGGGLGQ  GAGAVAAAAA  GGAGQGGYGG  LGNQAGRGG
451 QGAAAAAGGA  GQGGYGGLGS  QGAGRGGQGA  GAAAAAVGA  GQGGYGGLGG
501 QGAGQGGYGG  LGSQGSRRGG  LGGQGAGAAA  AAAGGAGQGG  LGGQGAGQGA
551 GAAAAAAGGV  RQGGYGGLGS  QGAGRGGQGA  GAAAAAAGGA  GQGGYGGLGG
601 QGVRRGGLGG  QGAGAAAAGG  AGQGGYGGVG  SGASAASAAA  SRLSSPQASS
651 RLSSAVSNLV  ATGPTNSAAL  SSTISNVVSQ  IGASNPGLSG  CDVLIQALLE
701 VVSALIQLG  SSSIGQVNYG  SAGQATQIVG  QSVYQALGVY  QALGAGGQAA
751 AEQKLISEED  LNGAVEMGHG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
801 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
851 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
901 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
951 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
1001 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
1051 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
1101 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
1151 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
1201 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
1251 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  GLAAAEKDE  L
```

### Q-MaSp1-100xELP

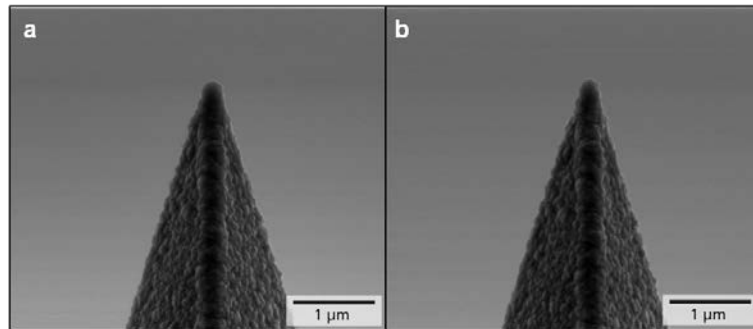
```
1   MASKPFLSLL  SLSLLLFTST  CLAGSGSGMA  ETAAAFERQ  HMDSGSGPGA
51  AQGAGAAAAA  AGGAGQGGY  GLGGQGAGQG  GYGGLGGQGA  GQGAGAAAAA
101 AAGGAGQGGY  GGLGSQGAGR  GGQGAGAAAA  AAGGAGQGGY  GGLGSQGAGR
151 GGLGGQGAGA  AAAAAAGGAG  QGGYGGLGNQ  GAGRGGQGAA  AAAAGGAGQG
201 GYGGLGSQGA  GRGGLGGQGA  GAAAAAAGGA  GQGGYGGLGG  QGAGQGGYGG
251 LGSQAGRGG  LGGQGAGAAA  AAAAGGAGQG  GLGGQGAGQG  AGASAAAAGG
301 AGQGGYGGLG  SQAGRGGEG  AGAAAAAAGG  AGQGGYGGLG  GQGAGQGGY  G
351 GLGSQAGARG  GLGGQGAGAA  AAGGAGQGGL  GGQGAGQGAG  AAAAAAGGAG
401 QGGYGGLGSQ  GAGRGGGLGQ  GAGAVAAAAA  GGAGQGGYGG  LGNQAGRGG
451 QGAAAAAGGA  GQGGYGGLGS  QGAGRGGQGA  GAAAAAVGA  GQGGYGGLGG
501 QGAGQGGYGG  LGSQGSRRGG  LGGQGAGAAA  AAAGGAGQGG  LGGQGAGQGA
551 GAAAAAAGGV  RQGGYGGLGS  QGAGRGGQGA  GAAAAAAGGA  GQGGYGGLGG
601 QGVRRGGLGG  QGAGAAAAGG  AGQGGYGGVG  SGASAASAAA  SRLSSPQASS
651 RLSSAVSNLV  ATGPTNSAAL  SSTISNVVSQ  IGASNPGLSG  CDVLIQALLE
701 VVSALIQLG  SSSIGQVNYG  SAGQATQIVG  QSVYQALGVY  QALGAGGQAA
751 AEQKLISEED  LNGAVEMGHG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
801 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
851 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
901 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
951 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
1001 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
1051 VGVPGGVPG  AGVPGGVPG  VGVPGVGVP  GGVPAGVPG  VGVPGVGVP
```

```

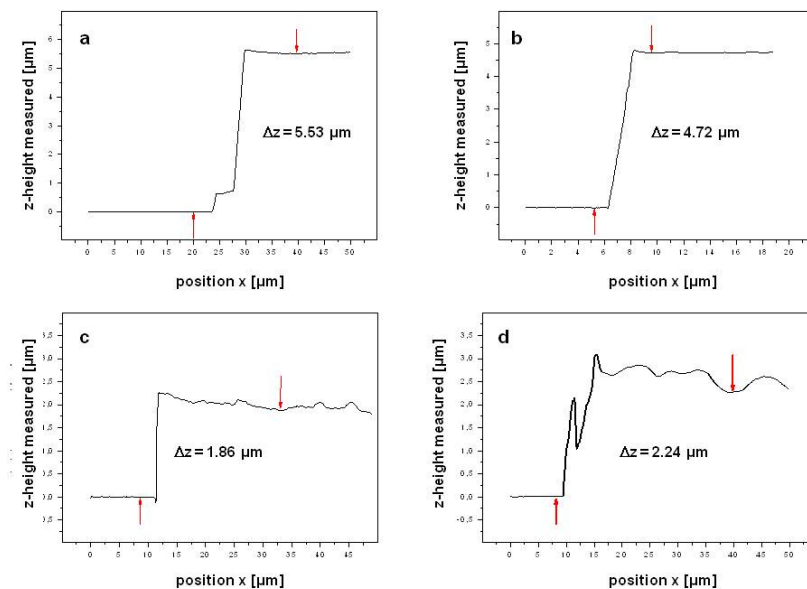
1101  VGVPGGGVPG  AGVPGGGVPG  VGVPGVGVPG  GGVPGAGVPG  VGVPGVGVPG
1151  VGVPGGGVPG  AGVPGGGVPG  VGVPGVGVPG  GGVPGAGVPG  VGVPGVGVPG
1201  VGVPGGGVPG  AGVPGGGVPG  VGVPGVGVPG  GGVPGAGVPG  VGVPGVGVPG
1251  VGVPGGGVPG  AGVPGGGVPG  GLAAAEPKDE  L

```

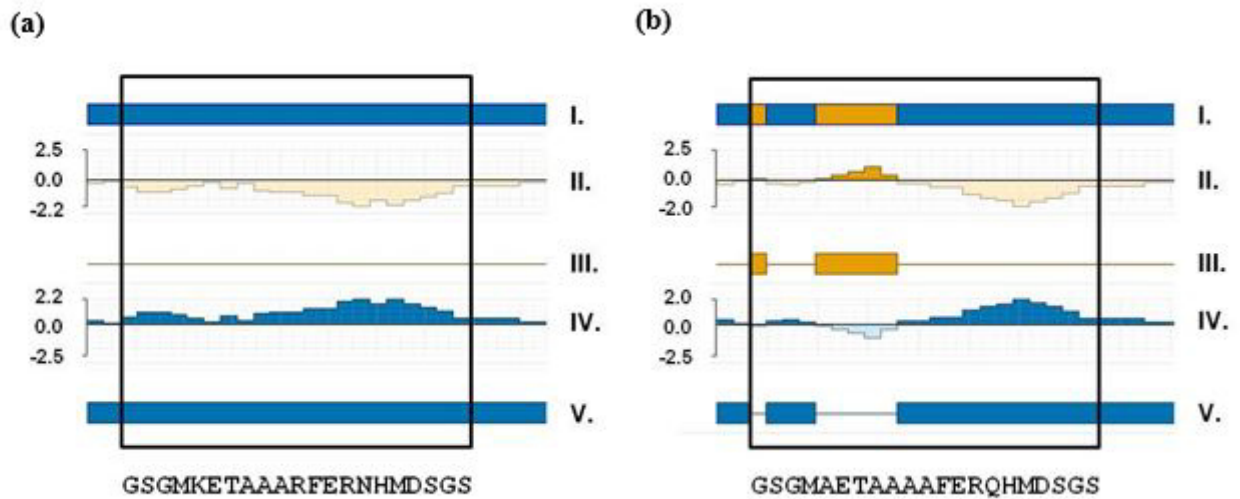
**Figure S1** Designed protein sequences of recombinant N-terminal tagged ELPylated spider silk proteins. The legumine B4 signal peptide is marked in grey. The corresponding lysine-tag as well as the glutamine-tag sequence is underlined.



**Figure S2** Scanning electron micrographs of diamond-coated cantilever tips. Cantilever DT-NCHR #1 (NanoWorld AG, Neuchâtel, Schweiz) tips were imaged to evaluate the exact tip radius both before (a) and after AFM indentation experiments (b). A tip radius of  $112 \pm 2$  nm has been measured.

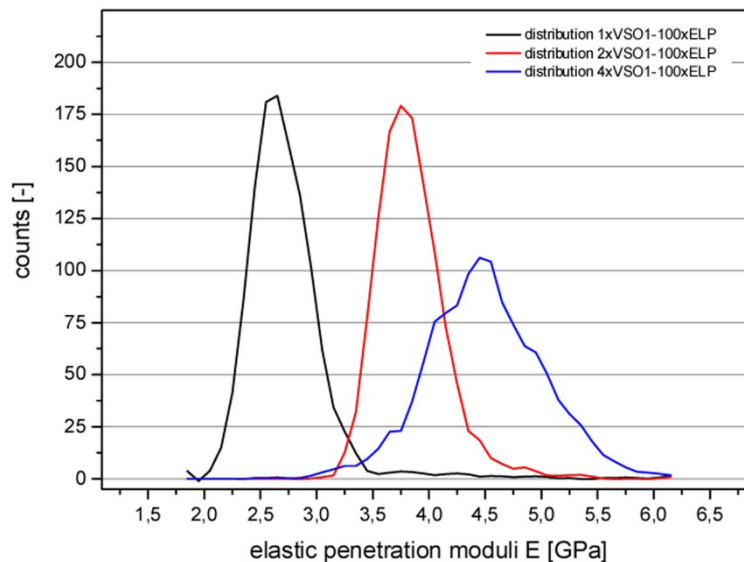


**Figure S3** Thickness of layers from casted ELPylated spider silk proteins represented by topographical cross section diagrams. Z-height range of produced layers is marked by red arrows, the calculated thickness is written in the diagrams. (a) 100xELP. (b) K-MaSp1-100xELP. (c) Q-MaSp1-100xELP. (d) Q/K-MaSp1-100xELP.



**Figure S4** Hydrophobicity using Kyte-Doolittle scale (Kyte and Doolittle, 1982) of N-terminal lysine- and glutamine-tags of monomeric ELPylated spider silk proteins. (a) N-terminal K-tag region of K-MaSp1-100xELP. (b) N-terminal Q-tag region of Q-MaSp1-100xELP. The appropriate tag is shown with a black frame. The amino acid sequence of both tags is shown below the frame. I. Hydropathy profile. II. Hydrophobicity. III. Hydrophobic regions. IV. Hydrophilicity. V. Hydrophilic regions. The profiles were performed with Protean 3D (Lasergene® 10.0.1 software suite, DNASTAR Inc., USA).

### 6.3 Ergänzende Daten zu Artikel 2.4.2



**Figure S1** Statistical distribution of elastic penetration moduli E for layers of synthetic biopolymers. Load penetration curves ( $n = 1225$ ) were determined per protein sample layer with a thickness of at least  $1 \mu\text{m}$  and a mean surface roughness smaller than  $2 \text{ nm}$  for a  $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$  grid.



# Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Personen, die mich im Laufe meiner Promotionszeit unterstützt haben und damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Betreuer Prof. Udo Conrad danke ich für die Bereitstellung des spannenden Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und vielfältige Unterstützung sowie für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Prof. Thomas Altmann danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung anfertigen zu dürfen.

Ein großes Dankeschön geht an alle derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Phytoantikörper, in der ich die vorliegende Arbeit angefertigt habe. Ein besonderer Dank geht hierbei an Dr. Bianca Baudisch, Dr. Gudrun Mönke, Dr. Nicola Weichert, Dr. Phan Trong Hoang, Christine Helmold und Ingrid Pfort.

Ebenso besonders danke ich Dr. Mario Gils für die erfolgreiche Zusammenarbeit, die zur gelungenen Kooperation von Inteinen und Spinnenseiden geführt hat sowie für die richtungsweisenden Tipps zum Verfassen von Publikationen.

Danke sagen möchte ich auch Matthias Menzel und Dr. Uwe Spohn für die langjährige Kooperation zur mechanischen Charakterisierung von Spinnenseidenproteinen.

Prof. Kerstin Reimers danke ich für die Durchführung der Cytotoxizitätstest und der persönlichen Bekanntmachung mit *Nephila clavipes*.

Bei der ehemaligen COST Action Fa0804 (Molecular Farming) bedanke ich mich für die Finanzierung meines Forschungsaufenthaltes in Frankreich und die lehrreichen und schönen Meetings.

Mein größter und herzlichster Dank gebührt meinem Sohn und meinem Freund - ohne euch geht nichts. Und natürlich an meine Eltern, meine Geschwister, allen anderen aus meiner Straßberger Familie und an meine Freunde - DANKE, dass ihr immer für mich da seid!

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Valeska Hauptmann
Geburtsdatum	07. Juni 1983
Geburtsort	Wippra
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, 1 Kind

## Ausbildung und Beruf

seit 01.2015	wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben, Arbeitsgruppe Phytoantikörper, Fertigstellung der Dissertation und Projektbeantragung
05.2014 – 01.2015	Elternzeitvertretung einer wissenschaftlichen Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben, Arbeitsgruppe Phytoantikörper, Projekt: Selektive Proteindegradation in Pflanzen
02.2011 – 02.2012	Erziehungszeit
03.2010 – 04.2010	Forschungsaufenthalt am National Institute for Agricultural Research (INRA) in Nantes (Frankreich), Research Unit on Biopolymers
03.2012 – 12.2013 11.2008 – 02.2011	wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben, Arbeitsgruppe Phytoantikörper, Projekt: <i>Genetic Engineering</i> von Spinnenseidenproteinen und ihre Produktion in Pflanzen
01.2008 – 10.2008	Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle, Kooperation der Arbeitsgruppen Auxin-Signaltransduktion und Jasmonatfunktion & Mykorrhiza, Thema: „Analyse der Auxin-Wirkung bei der Ausbildung Stickstoff-fixierender Knöllchen in <i>Medicago truncatula</i> “
10.2003 – 10.2008	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss Diplom-Biochemikerin
08.1994 – 07.2003	Schulbildung am Gymnasium Harzgerode, Abschluss Abitur

Halberstadt, Mai 2015

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halberstadt im Mai 2015

---

Valeska Hauptmann