

Partikel und Kapseln auf Basis des  
rekombinanten Spinnenseidenproteins  
eADF4(C16)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

an der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik

und Naturwissenschaften der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biologin

**Claudia Blüm**

Bayreuth 2013



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2008 bis Juni 2013 am Lehrstuhl Biomaterialien der Universität Bayreuth unter der Anleitung von Prof. Dr. Thomas Scheibel angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Dissertation eingereicht: 04.06.2013

Zulassung durch die Prüfungskommission: 10.06.2013

Wissenschaftliches Kolloquium: 14.11.2013

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Thomas Scheibel (Erstgutachter)

Prof. Dr. Andreas Fery (Zweitgutachter)

PD Dr. Stefan Geimer (Vorsitz)

Prof. Dr. Clemens Steegborn



## Inhaltsverzeichnis

1	Summary.....	1
2	Zusammenfassung.....	3
3	Einleitung.....	7
3.1	Natürliche Spinnenseide.....	7
3.1.1	Aufbau und Struktur des Abseilfadens von Radnetzspinnen .....	9
3.1.2	Assemblierung des natürlichen Abseilfadens.....	11
3.1.3	Mechanische Eigenschaften natürlicher Spinnenseide.....	14
3.1.4	Natürliche Seidenproteine als Biomaterial .....	17
3.2	Rekombinante Spinnenseide.....	18
3.2.1	Aufbau und Struktur von eADF4.....	19
3.2.2	Assemblierungsformen von eADF4 .....	20
3.2.2.1	Partikel.....	20
3.2.2.2	Kapseln .....	22
3.3	Wirkstofftransport und kontrollierte Wirkstofffreisetzung .....	25
3.3.1	Polymere als mobile Wirkstofftransport- und Depotsysteme .....	29
3.4	Sterilisationsmethoden .....	37
3.5	Zielsetzung.....	40
4	Material und Methoden .....	43
4.1	Material .....	43
4.1.1	Chemikalien .....	43
4.1.2	Materialien .....	44
4.1.3	Größenstandards und Kits.....	44
4.1.4	Proteine und Antikörper.....	45
4.1.5	Puffer und Lösungen .....	45
4.1.6	Geräte .....	47
4.1.7	Computerprogramme.....	49
4.2	Reinigung der rekombinanten Spinnenseidenproteine .....	49
4.3	Proteinanalytische Methoden.....	50
4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
4.3.2	Silberfärbung .....	51
4.3.3	Western Blot.....	52
4.4	Spektroskopische Methoden.....	53

4.4.1	UV/Vis-Spektroskopie.....	53
4.4.2	Fluoreszenzspektroskopie .....	54
4.4.3	Fourier transformierte Infrarot (FTIR-)Spektroskopie .....	54
4.4.4	Massenspektrometrie (MALDI-TOF).....	55
4.5	Proteinpräparative Methoden .....	56
4.5.1	Dialyse .....	56
4.5.2	Chemische Kopplung von 5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Fluorescein) an eADF4(C16) .....	56
4.6	Proteinverarbeitende Methoden - Partikel.....	57
4.6.1	Herstellung von Mikropartikeln .....	57
4.6.2	Chemische Vernetzung der eADF4 Partikel.....	58
4.6.3	Analyse des Einflusses der Vernetzung auf die chemischen Stabilität von eADF4(C16) Partikeln.....	59
4.6.4	Beladung von eADF4(C16) Partikeln.....	60
4.6.5	Wirkstofffreisetzung aus eADF4(C16) Partikeln .....	61
4.7	Proteinverarbeitende Methoden - Kapseln .....	61
4.7.1	Kapselherstellung .....	61
4.7.2	Herstellung von Kapseln mit Mikrofluidik .....	62
4.7.2.1	Herstellung einer Photomaske und Platine .....	63
4.7.2.2	Gießen eines Mikrofluidik-Chips aus PDMS .....	64
4.7.2.3	Zu- und Abläufe .....	64
4.7.2.4	Weitere Versuchsdurchführungen .....	65
4.7.3	Molekulare Größenausschlussbestimmung von eADF4(C16) Kapseln.....	65
4.7.4	Verkapselung von Enzymen.....	66
4.8	Enzymkinetik mit $\beta$ -Galaktosidase .....	66
4.8.1	Proteolytischer Verdau von $\beta$ -Galaktosidase .....	68
4.9	Mikroskopische Methoden.....	69
4.9.1	Lichtmikroskopie .....	69
4.9.2	Fluoreszenzmikroskopie .....	69
4.9.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	69
4.9.4	Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie (CLSM) .....	70
4.9.5	Rasterkraftmikroskopie (AFM) .....	70
4.9.5.1	Bildgebung mit dem AFM .....	70
4.9.5.2	Mikromechanische Charakterisierung mittels der <i>Colloidal Probe Technique</i> ..	71

4.9.5.3	Direkte Kraft-Messungen mittels der <i>Colloidal Probe Technique</i> .....	73
4.10	Materialanalysen .....	76
4.10.1	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) .....	76
4.10.2	Thermogravimetrische Analyse (TGA).....	76
4.10.3	Wasseraufnahme und –abgabe der eADF4(C16) Partikel .....	77
4.10.4	Zetapotential und Elektrophoretische Mobilität.....	77
4.11	Sterilisationsmethoden .....	78
4.11.1	Gammastrahlen- und Ethylenoxid-Behandlung .....	78
5	Ergebnisse.....	81
5.1	Herstellung und chemische Vernetzung von eADF4 Partikeln.....	81
5.2	Charakterisierung der eADF4 Partikel .....	82
5.2.1	Morphologische Eigenschaften der eADF4(C16) Partikel .....	82
5.2.2	Quellverhalten von eADF4(C16) Partikeln.....	83
5.2.3	Einfluss der chemischen Vernetzung auf die Sekundärstruktur der eADF4(C16) Partikel.....	85
5.2.4	Oberflächenpotential der eADF4(C16) Partikel.....	86
5.2.5	Chemische Stabilität der eADF4(C16) Partikel .....	90
5.2.6	Thermische Stabilität von eADF4 Partikel .....	93
5.2.7	Mechanische Stabilität von eADF4 Partikeln .....	95
5.3	Beladung und Freisetzung von Rhodamin B aus eADF4(C16) Partikeln.....	97
5.4	Sterilisation von eADF4(C16) Partikeln .....	103
5.4.1	SDS-PAGE mit Silberfärbung und Western Blot .....	103
5.4.2	Massenspektrometrie .....	104
5.4.3	UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie.....	105
5.4.4	FTIR-Spektroskopie.....	106
5.5	Herstellung und Charakterisierung von eADF4(C16) Kapseln .....	107
5.5.1	Modifizierte Herstellung von eADF4(C16) Kapseln .....	107
5.5.2	Mikroskopische Charakterisierung der Kapseln .....	109
5.5.3	Membranpermeabilität.....	110
5.6	Herstellung von Kapseln mittels Mikrofluidik .....	112
5.7	Kapseln als Reaktionscontainer am Beispiel $\beta$ -Galaktosidase.....	115
6	Diskussion.....	121
6.1	eADF4 Partikel als Wirkstofftransportsystem .....	121
6.1.1	Einfluss der Vernetzung auf eADF4(C16) Partikel .....	122

6.1.2	Wirkstofftransport und Wirkstofffreisetzung.....	129
6.2	Sterilisation von eADF4(C16) Partikeln .....	132
6.3	eADF4(C16) Kapseln als Reaktionscontainer.....	134
6.4	Rekombinante Spinnenseidenproteine als Wirkstofftransportsystem im Vergleich zu anderen Polymeren .....	137
7	Literatur .....	141
8	Abkürzungen.....	155
9	Publikationen.....	159
10	Anhang.....	161



## 1 Summary

Natural spider silk has been used as a biomaterial for centuries due to its unique mechanical properties and its biocompatibility. The dragline silk proteins of the European garden cross spider *A. diadematus* are of special interest. *Araneus diadematus* fibroin 4 (ADF4) is one of this dragline silk's protein components and it has been used as a template for the engineered *Araneus diadematus* fibroin 4 (eADF4). ADF4 is composed of up to 100 repetitions of the repetitive core sequence which is flanked by non-repetitive terminal regions. eADF4 consists of several repetitions of a mimic of the core sequence (known as the C-module), which has been optimized for production in *E. coli*. Theoretically the C-module can be repeated many times, the number of repetitions defining the size of the resulting protein, however *E. coli* can not translate large proteins faultlessly, which limits the size of the proteins that can be produced. In this work, the main focus was eADF4(C16) which consists of 16 repetitions of the C-module resulting in a molecular weight of around 47 kDa.

Controlled drug delivery as well as controlled enzyme transport is one focus of medical and pharmaceutical research. By using controlled drug delivery, many problems of traditionally drug delivery can be overcome. Side effects due to local drug concentrations being toxic after injections or dissolution of tablets are problems which have to be solved. Therefore, depot systems with a controlled release of drugs over a longer period of time are of interest. Mobile systems like particles or capsule are also suitable.

eADF4(C16) particles are produced by a precipitation step and they are suitable for the transport of water-insoluble drugs, which has been shown for rhodamine B, a model drug. Drug loading of particles can be performed either by co-precipitation of the drug molecules together with the protein or by diffusion, with the co-precipitation step resulting in the highest loading. The influence of crosslinking on drug release was investigated; however, we observed no significant increase in the duration of release. Nevertheless, an increase in chemical stability due to the chemical crosslinking was achieved. Chemical as well as physical crosslinking influenced the mechanical behavior and the swelling ratio of the particles which also influences the storage stability. The

mechanical as well as the surface properties of eADF4(C16) particles are important parameters in regard to their possible applications. Composites are an interesting application field for the particles. By incorporating the particles into a matrix, the mechanical behavior of the matrix material can be enhanced, and the biodegradability of the recombinant spider silk particles render them attractive for incorporation in bone tissue scaffolds.

Capsules are in contrast to particles, liquid filled systems which are enclosed by a thin but stable silk film. They are produced by self-assembly of the protein at the oil-water interface. Until now, the established system was based on the use of toluene as the oil phase, which is a problem for medical applications. Capsule-based transport systems can be used for both water soluble and water insoluble drugs with a molecular weight larger than 30 kDa. The substitution of toluene by silicon oil enabled the successful encapsulation of enzymes with  $\beta$ -galactosidase being used as a model enzyme. Due to the semi-permeable capsule membrane, the substrates for  $\beta$ -galactosidase can diffuse freely through the membrane while proteases with a molecular weight larger than the pore size are excluded. Because of these properties, the capsules can be used as reaction containers, their contents shielded from proteases. One benefit of spider silk capsules in contrast to other systems is that even inactive enzymes can be encapsulated and by adding the activator, the capsules can be activated at the desired location. By this method, unwanted side reactions within the body can be avoided. To achieve an optimal uniform size distribution, a microfluidic-based system was tested as a potential production method.

To be able to use the eADF4 proteins in the medical and pharmaceutical field, sterile protein is a crucial criterion. Recombinant proteins, especially if they are produced in bacteria, are non-sterile even after purification. Therefore different sterilization techniques were tested and their influence on the recombinant spider silk protein analyzed.

## 2 Zusammenfassung

Natürliche Spinnenseide als Biomaterial wird aufgrund seiner einzigartigen mechanischen Eigenschaften und seiner guten Biokompatibilität schon seit Jahrhunderten vom Menschen genutzt. Hierbei sind insbesondere die Proteine des Abseilfadens der Gartenkreuzspinne *A. diadematus* von Interesse. Der Abseilfaden setzt sich aus mehreren Proteinkomponenten zusammen, eine dieser Komponenten ist das Protein ADF4, diesem nachempfunden ist das rekombinant hergestellte Protein eADF4. ADF4 besteht aus bis zu 100 Wiederholungen einer repetitiven Kernsequenz, welche von nicht-repetitiven terminalen Regionen flankiert wird. eADF4 besteht aus dieser, jedoch für *E. coli* optimierten, Kernsequenz (C-Modul), welche theoretisch beliebig oft wiederholt werden kann. Limitiert ist die Häufigkeit der Wiederholung von der daraus resultierenden Proteingröße; *E. coli* können keine beliebig großen Proteine mit entsprechend hoher Ausbeute fehlerfrei synthetisieren. In dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf eADF4(C16). Dieses besteht aus 16 Wiederholungen des C-Moduls, das daraus resultierende Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 47 kDa.

Die kontrollierte und gezielte Freisetzung von Wirkstoffen oder Enzymen (*controlled drug delivery*) ist ein wichtiges Forschungsgebiet sowohl in der Pharmazie als auch in der Medizin. Mittels *controlled drug delivery* sollen Probleme der herkömmlichen Medikation behoben werden. Hierzu zählen beispielsweise Nebenwirkungen die aufgrund einer sehr hohen lokalen Wirkstoffkonzentration nach Injektion des Wirkstoffs oder nach Auflösen einer Tablette am Wirkort auftreten können. Um dies zu minimieren, sollen Depotsysteme Medikamente kontrolliert über einen längeren Zeitraum am gewünschten Wirkort abgeben. Hierfür eignen sich insbesondere mobile Systeme, wie Partikel und Kapseln.

Bei Partikeln aus eADF4(C16) handelt es sich um sogenannte Vollkugeln, welche durch Aussalzprozesse aus wässriger Lösung hergestellt werden. Sie eignen sich insbesondere für den Transport von wasserlöslichen Stoffen, was am Beispiel Rhodamin B gezeigt wurde. Die Beladung der Partikel erfolgt hierbei auf zwei verschiedene Arten. Zum einen durch Eindiffundieren der Wirkstoffe in die fertig ausgebildeten Partikel, zum anderen durch co-Präzipitation des Wirkstoffs zusammen mit dem Protein. Es konnte gezeigt

werden, dass die Beladung der Partikel mit Wirkstoffen durch co-Präzipitation im Vergleich zu Diffusionsprozessen deutlich erhöht werden konnte. Zusätzlich sollte durch Vernetzungsprozesse (*crosslinking*) Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung genommen werden. Dies konnte jedoch nicht in vollem Umfang erzielt werden, die Wirkstofffreisetzung wurde durch die chemische Vernetzung nur minimal verringert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass chemisches Vernetzen einen deutlichen Einfluss auf die chemische Stabilität der Partikel hat und dass sowohl chemisches als auch physikalisches Vernetzen die Mechanik der Partikel stark beeinflusst. Zusätzlich konnte das Quellverhalten der Partikel analysiert werden, was einen entscheidenden Einfluss auf ihre Lagerstabilität aufweist. Sowohl die Mechanik als auch die Oberflächeneigenschaften der Partikel sind wichtige Parameter in Bezug auf weitere Anwendungsmöglichkeiten. Insbesondere im Bereich der Kompositmaterialien sind die Partikel vielseitig einsetzbar. Durch Inkorporation von eADF4 Partikeln in eine Matrix können die mechanischen Eigenschaften des Matrixmaterials möglicherweise stark verbessert werden und durch die Bioabbaubarkeit der Partikel ergeben sich weitere Möglichkeiten im Bereich von Knochenersatzmaterialien.

Bei Kapseln handelt es sich um flüssigkeitsgefüllte Systeme, die von einem dünnen, aber stabilen Seidenfilm umhüllt sind. Die Kapselherstellung erfolgt mittels Grenzflächenpolymerisation an der Grenzfläche zwischen Öl und Wasser. Das bisher etablierte System basiert auf der Verwendung von Toluol, welches in Hinblick auf eine medizintechnische Anwendung bedenklich ist. Kapseln als Transportsystem eignen sich sowohl für schlechtlösliche als auch für gut-wasserlösliche Wirkstoffe mit einem Molekulargewicht größer als 30 kDa. Durch die Herstellung von Kapseln mittels Silikonöl anstatt Toluol, konnte ihre Verwendung als Transportsystem für Enzyme erfolgreich gezeigt werden. Dies erfolgte mittels  $\beta$ -Galaktosidase als Modellenzym. Die Substrate können, aufgrund der semi-permeablen Kapselhülle, in die Kapseln eindiffundieren, bestimmte Proteasen mit entsprechend großem Molekulargewicht werden jedoch abgehalten. Mit diesen Eigenschaften können Kapseln als Reaktionskontainer dienen, die ihren Inhalt vor dem Abbau durch Proteasen schützen. Ein Vorteil der Spinnenseidenkapseln gegenüber anderen Systemen ist, dass auch inaktive Enzyme verkapselt und am Wirkort durch Zugabe des Aktivators gezielt aktiviert werden können.

Dadurch können ungewollte Nebenreaktionen im Organismus vermieden werden. Um eine möglichst homogene Größenverteilung der Kapseln zu erzielen, wurde eine Herstellung mittels Mikrofluidik erprobt.

Um die Anwendbarkeit von eADF4 Proteinen im medizinischen oder pharmazeutischen Bereich sicherstellen zu können ist die Sterilität der Proteine ein entscheidendes Kriterium. Rekombinante Proteine, speziell solche, die in Bakterien produziert wurden, sind in der Regel auch nach Aufreinigung unsteril. Aus diesem Grund wurden in meiner Arbeit verschiedene Sterilisationsmethoden getestet und ihre Auswirkungen auf die rekombinanten Spinnenseidenproteine analysiert.



### 3 Einleitung

#### 3.1 Natürliche Spinnenseide

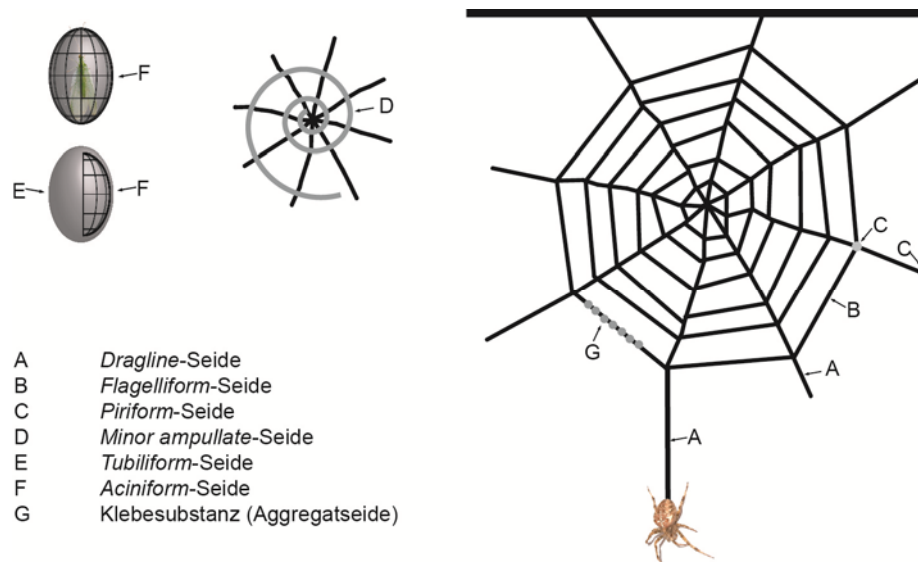
Seiden bestehen aus Proteinen, die eine hoch-repetitive Aminosäuresequenz mit großen Anteilen an Glycin, Serin und Alanin besitzen. In der Natur liegen die Proteine in hochkonzentrierten wässrigen Lösungen in den Drüsen vor, und bilden durch Verspinnen einen wasserunlöslichen Faden.<sup>1</sup>

Neben dem Seidenspinner *Bombyx mori* (*B. mori*) und fast allen Spinnenarten, gibt es in der Natur auch viele Seidenproduzenten, die weniger bekannt sind und alle zum Stamm der Arthropoden gehören. Hierzu zählen beispielsweise einige Bienen- und Wespenarten,<sup>2-4</sup> Florfliegen<sup>5-7</sup> und auch verschiedene Käfer.<sup>2,8</sup> Sie verwenden die von ihnen hergestellten Seiden um ihren Nachwuchs zu schützen (z. B. Eierstiele der Florfliegen), um Beute zu fangen (z. B. Spinnen) oder um sich während des Verpuppungsvorgangs zu schützen (z. B. Seidenspinner).<sup>9,10</sup>

Die Seide des Seidenspinners stammt aus seinem Kokon. Sie findet seit tausenden von Jahren Anwendung in der Textilindustrie<sup>11</sup> und seit einigen hundert Jahren auch in der medizinischen Forschung, beispielsweise als Nahtmaterial oder Wundabdeckung.<sup>12-15</sup> Aufgrund des Stellenwertes, den die Seide des Seidenspinners in der Textilindustrie besitzt und angesichts seiner einfachen Kultivierbarkeit, besteht keine Notwendigkeit, diese Seide rekombinant herzustellen, sie ist preisgünstig und in großem Maßstab vorhanden.<sup>16</sup> Mikroskopisch ist die Seide der Seidenraupe nicht als Einzelfaden angeordnet sondern liegt in Form eines Zwillingsfadens vor. Dieser ist zusätzlich von einer Schicht hydrophiler Proteine umgeben, den so genannten Sericinen.<sup>17,18</sup> Nach der Extraktion der Seidenproteine (Fibroine) aus den Kokons können diese in verschiedene Morphologien überführt werden. Je nach gewünschter Anwendung können sowohl Fasern, Vliese und Filme als auch 3-Dimensionale-Strukturen für Zellkulturexperimente, wie z. B. Hydrogele, Schäume oder schwammähnliche Morphologien, ebenso wie mobile Wirkstofftransporter (z. B. Partikel) hergestellt werden.<sup>17</sup>

Eine andere, in den Fokus der Forschung gerückte Seidenart ist der Abseilfaden (*Dragline*) von Radnetzspinnen.<sup>19-21</sup> Weibliche Radnetzspinnen, z. B. die

Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* (*A. diadematus*) oder die Goldene Seidenspinne *Nevila clavipes* (*N. Clevipes*), können bis zu sieben verschiedene Seidenarten produzieren (Abb. 3.1),<sup>22</sup> jede einzelne in einer eigens dafür angelegten Drüse. Die einzelnen Seidenarten sind meist nach den Drüsen benannt, in denen sie gebildet werden und unterscheiden sich in ihrem Aufbau und ihren mechanischen Eigenschaften stark.<sup>23</sup>



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der verschiedenen Seidenarten, sowie der Klebesubstanz von Radnetzspinnen am Beispiel *A. diadematus*. Die *Dragline*-Seide dient der Spinne als Abseilfaden sowie als Speichen des Netzes (A). Die Fangspirale des Radnetzes besteht aus *Flagelliform*-Seide (B). Fangspirale und Speichen des Spinnennetzes werden durch die *Piriform*-Seide zusammen gehalten (C). Diese Seide ist auch für die Verankerung des Netzes an Oberflächen zuständig. Die *Minor ampullate*-Seide (D) wird als Hilfsspirale beim Netzbau benötigt und hat im fertigen Netz eine netzverstärkende Funktion. Zwei weitere Seidenarten werden zum Schutz der Nachkommen verwendet, es handelt sich dabei um die *Tubuliform*-Seide (E) die die äußere Hülle des Eiersacks (Koknhülle) darstellt und um *Aciniform*-Seide (F), die die innere Koknhülle bildet. Die Klebesubstanz wird abschließend auf das Netz aufgebracht und dient dem Festhalten der Beute.

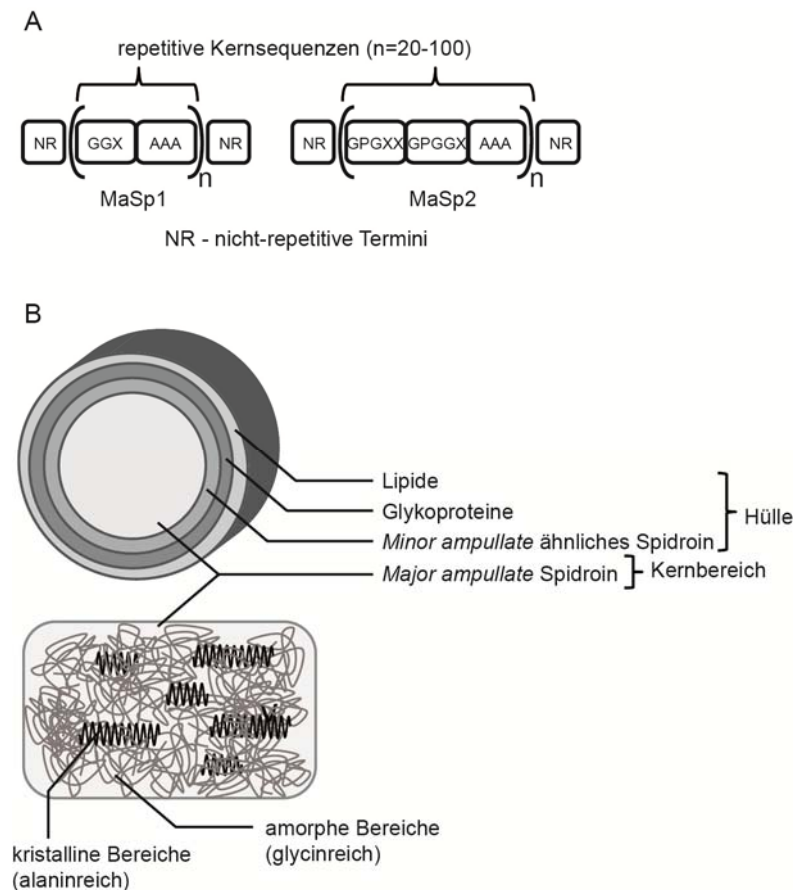
Die sogenannte *Dragline*-Seide wird in der großen Ampullendrüse (*Major ampullate*) gebildet und besteht hauptsächlich aus den Proteinkomponenten MaSp1 und MaSp2 (*Major ampullate Spidroin*).<sup>24</sup> *Dragline*-Seide wird als Sicherheits- und Abseilfaden der Spinne, sowie für den Rahmen und die Speichen des Netzes verwendet (Abb. 3.1A).<sup>25</sup> Sie ist die am besten charakterisierte Seide und vereinigt einzigartige mechanische Eigenschaften (Tab. 3.1).<sup>26,27</sup> Die zweite beim Netzbau verwendete Seide ist die *Flagelliform*-Seide (B), welche die Fangspirale des Netzes bildet. Sie besteht nur aus einer Proteinkomponente und besitzt viskoelastische Eigenschaften mit einer einzigartigen Dehnbarkeit (270 %).<sup>26,27</sup> Die enorme Dehnbarkeit ist wichtig, um den



Aufprall von Insekten im Netz abzufangen. Zu Beginn des Netzbaus wird noch eine zusätzliche Seidenart benötigt, die sogenannte *Minor ampullate*-Seide (MiSp) (D). Diese wird in der kleinen Ampullendrüse gebildet, dient als Hilfsspirale beim Netzbau und wirkt netzverstärkend im fertig ausgebildeten Netz. Mit Hilfe der *Piriform*-Seide (seidenähnliche Klebesubstanz) (C) wird das fertige Netz an verschiedenen Oberflächen befestigt. Eine zusätzliche Funktion dieser Seide ist das Verbinden von *Dragline*-Seide und *Flagelliform*-Seide. Weibliche Radnetzspinnen produzieren noch zwei weitere Seidenarten, die dem Schutz der Nachkommen dienen, die *Tubuliform*-Seide (E), welche die äußere Kokonhülle bildet und die *Aciniform*-Seide (F), welche die innere Kokonhülle darstellt, aber hauptsächlich zum Einwickeln von Beute verwendet wird. Die Klebesubstanz (G), welche auf die Netzoberfläche aufgebracht wird und die auftreffenden Insekten festhält, ist im eigentlichen Sinn keine Seide. Sie besteht hauptsächlich aus organischen Molekülen, Salzen, Fettsäuren und Glykoproteinen, welche in der Aggregatdrüse gebildet werden.

### **3.1.1 Aufbau und Struktur des Abseilfadens von Radnetzspinnen**

Der Abseilfaden von Radnetzspinnen ist einer der stabilsten bekannten natürlichen Fasern und setzt sich im Kern aus zwei Proteinkomponenten, den sogenannten Spidroinen, zusammen. Diese werden in der großen Ampullendrüse gebildet, woraus sich ihre Nomenklatur, MaSp1 und MaSp2, ergibt.<sup>17</sup> Abhängig von der Spinnenart variieren sowohl die Aminosäurezusammensetzung als auch die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften (Kapitel 3.1.3); der prinzipielle hierarchische Aufbau des Abseilfadens bleibt jedoch gleich (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** A) Schematischer Aufbau der Spidroine des Abseilfadens von Radnetzspinnen. Repetitive Kernsequenzen werden von nicht-repetitiven terminalen Domänen (NR-Domänen) flankiert. B) Hierarchischer Aufbau eines Abseilfadens am Beispiel *N. clavipes*. Der Abseilfaden besteht aus einem fibrillären Kern, welcher von mehreren Hüllschichten umgeben ist. Hierzu zählen sowohl Lipide und Glykoproteine als auch MiSp1 ähnliche Proteine. Der fibrilläre Kernbereich des Abseilfadens besteht aus kristallinen und amorphen Bereichen. Die kristallinen Bereiche sorgen für die enorme Stabilität des Fadens und die amorphen Bereiche sind für seine Elastizität verantwortlich. Sowohl kristalline als auch amorphe Bereiche sind durch die Aminosäuresequenz festgelegt, glycinreiche Module der Kernsequenzen bilden die amorphen Bereiche, alaninreiche Sequenzen die kristallinen  $\beta$ -Faltblattstrukturen.

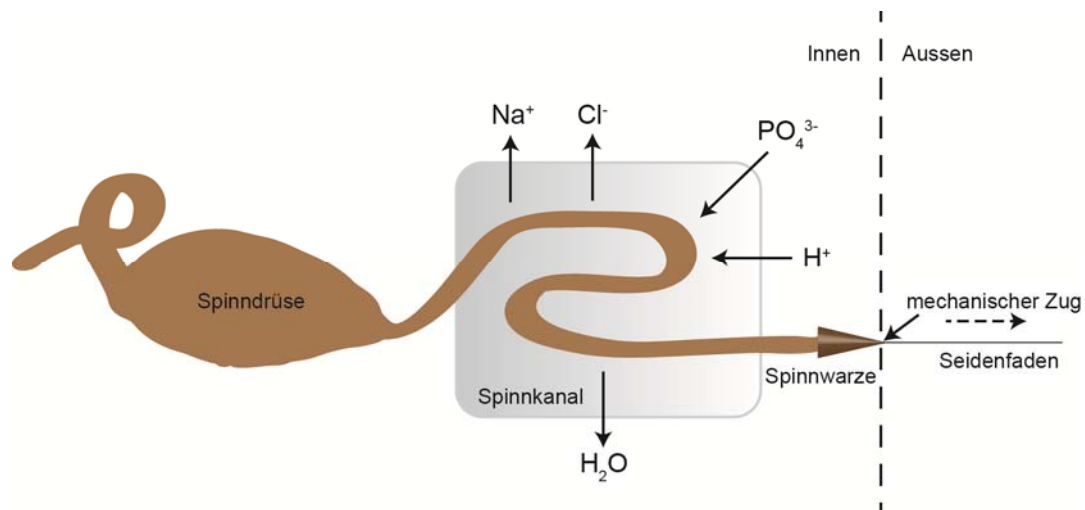
Der Abseilfaden besteht aus einem fibrillären Kern, welcher aus den beiden Proteinen MaSp1 und MaSp2 besteht. Die Spidroine MaSp1 und MaSp2 setzen sich aus repetitiven Kernsequenzen zusammen, welche von nicht-repetitiven Termini flankiert werden. Die repetitiven Kernsequenzen von MaSp1 bestehen hauptsächlich aus poly-Alaninen (A) oder glycinreichen Wiederholungseinheiten (GGX), wobei X entweder für Alanin, Tyrosin, Leucin oder Glutamin steht. Die Kernsequenzen von MaSp2 hingegen bestehen zu einem Großteil aus poly-Alanin-Abfolgen und prolinreichen Sequenzen in unterschiedlichen Abfolgen (meist GPGQQ oder GPGGY) (Abb. 3.2A).<sup>11,28,29</sup> Durch die poly-Alanin-Abfolgen entsteht innerhalb des Fadens ein hydrophoberer Teil, zusammen mit den glycinreichen Bereichen ergibt sich daher eine Zusammensetzung, die stark an

Block-Copolymere erinnert.<sup>30-34</sup> Die Sekundärstrukturen innerhalb des Fadens, welche sich für die einzigartigen mechanischen Eigenschaften verantwortlich zeigen, sind durch die Aminosäurezusammensetzung der repetitiven Module festgelegt. Mittels Fourier transformierter Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie), Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Röntgenbeugungsanalysen konnten den poly-Alanin-Sequenzen größtenteils  $\beta$ -faltblattreiche Strukturen zugeordnet werden, welche für die enorme Stabilität des Fadens verantwortlich sind.<sup>30-34</sup> Die amorphen Bereiche bestehen hauptsächlich aus  $\beta$ -Spiralen, ungeordneten Strukturen und  $3_1$ -Helices, welche sich für die enorme Elastizität des Abseilfadens verantwortlich zeigen.<sup>33,35,36</sup> Die jeweiligen Wiederholungseinheiten werden von nicht-repetitiven Termini flankiert (NR-Regionen). Diese Regionen bestehen aus ca. 100 Aminosäuren, welche eine wichtige Rolle sowohl bei der Fadenassemblierung als auch bei der Lagerung der hochkonzentrierten wässrigen Spinnlösungen innerhalb der Drüsen spielen. Aufgrund von Veränderungen der Umgebungsbedingungen (Salzgehalt oder pH-Wert) werden durch die terminalen Domänen innerhalb des Spinnkanals wichtige Schritte bei der Fadenassemblierung eingeleitet.<sup>37-40</sup> Zum Schutz vor Austrocknung oder anderen Umwelteinflüssen ist die fibrilläre Kernregion sowohl von Glykoproteinen und Lipiden, als auch von einem MiSp1 ähnlichen Protein umgeben (Abb. 3.2B).

Der Abseilfaden der Gartenkreuzspinne *A. diadematus* ist dem von *N. clavipes* in seinem Aufbau ähnlich, die Nomenklatur unterscheidet sich jedoch. Anstelle von MaSp1 und MaSp2 sind die Spidroine der Gartenkreuzspinne nach ihrem Artnamen und der Reihenfolge ihrer Identifizierung benannt, *Araneus diadematus* Fibroin (ADF) 3 und 4. Bei ADF3 und ADF4 handelt es sich aufgrund ihres hohen Prolingehaltes um MaSp2-Analoga.<sup>23</sup>

### 3.1.2 Assemblierung des natürlichen Abseilfadens

Die Assemblierung des Abseilfadens aus einer hochviskosen Lösung zu einem festen, mechanisch stabilen Faden, findet bei Radnetzspinnen im Spinnkanal, der aus der großen Ampullendrüse austritt, statt. Die Drüse unterteilt sich in zwei Bereiche, die Spinnendrüse mit der sekretorischen Zone und der Lagerungszone. An diese schließt sich der S-förmige Spinnkanal an, welcher in die Spinnwarze mündet (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung des natürlichen Spinnprozesses am Beispiel der *Dragline*-Seide. Der Spinnapparat unterteilt sich in zwei Hauptbereiche, die Spinnrinne und den Spinnkanal. Die Spinnrinne dient sowohl der Sekretion als auch der Lagerung der Spinnenseidenproteine, der Spinnkanal dient der Konzentrierung und Umstrukturierung der Proteine. Durch Ionenaustausch und Wasserentzug entsteht eine hochviskose Spinnlösung. Die Proteine richten sich aus, wodurch der  $\beta$ -Faltblattanteil der Proteinlösung stark erhöht wird. An der Spinnwarze wird der Faden durch mechanischen Zug aus dem Spinnkanal herausgezogen und erhält durch die zusätzliche Streckbewegung seine besonderen mechanischen Eigenschaften.

Der sekretorische Teil der Spinnrinne befindet sich im obersten Abschnitt, einem länglichen, breiter werdenden Fortsatz (Abb. 3.3). Dieser Abschnitt besteht aus säulenartigen Endothelzellen, in welchen die Spinnenseidenproteine translatiert werden, und aus sekretorischen Granula.<sup>16,30</sup> Die aus den Granula sekretierten Spinnenseidenproteine des Abseilfadens werden in hoher Konzentration (ca. 50 % (w/v)) in der Lagerungszone der großen Ampullendrüse in gelöster Form gespeichert.<sup>41</sup> Die hohe Löslichkeit der Proteinlösung geht unter anderem auf die Sekundärstruktur der MaSp-Proteine zurück. Diese entspricht der Sekundärstruktur eines nativ entfalteten Proteins und besteht größtenteils aus *random-coil* und poly-Prolin-II Strukturen sowie  $\alpha$ -Helices.<sup>42</sup> Insbesondere die poly-Prolin-II-Helix-ähnlichen Bereiche haben hierbei eine besondere Bedeutung, da diese hauptsächlich aus Sequenzen der repetitiven Bereiche gebildet werden, die  $\alpha$ -Helices werden meist von den terminalen Domänen gebildet. Indem sie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Proteinseitenketten und dem Lösungsmittel begünstigen, verhindern die poly-Prolin-II-Helices das Ausbilden intramolekularer Wasserstoffbrücken, wodurch die stabile Lagerung der Proteinlösung in der Spinnrinne erklärt werden kann.<sup>43</sup> Zusätzlich lassen sich die Helices aufgrund ihrer Torsionswinkel leicht in  $\beta$ -Faltblattstrukturen umwandeln,

welche den größten Sekundärstrukturanteil im finalen Faden darstellen.<sup>44</sup> Um aus der Spinnlösung einen Faden zu assemblieren, sind sowohl biochemische als auch physikalische Veränderungen notwendig.<sup>45</sup> Die physikalischen Einflüsse sind sowohl Elongations- als auch Scherkräfte, welche auf dem Weg durch den sich verjüngenden S-förmigen Spinnkanal auf die Lösung einwirken. Abgesehen von diesen Kräften, welche sich auf die Orientierung der Seidenproteine auswirken, spielen chemische Veränderungen während des Transports der Seidenproteine durch den Spinnkanal eine entscheidende Rolle.<sup>30</sup> Zu den Einflüssen gehört u. a. die Änderungen des pH-Werts (von pH 7,4 (Spinndrüse) auf 6,3 (Spinnkanal))<sup>37,45-48</sup> welcher durch eine Protonenpumpe geregelt wird. Auch werden Natrium- und Chloridionen durch kosmotrope Ionen (Kalium- und Phosphationen) ersetzt, was zu einer Flüssig-flüssig-Phasentrennung führt. Die Konzentrierung der Spinnlösung erfolgt durch Mikrovilli der Epithelzellen und eine besondere kutikuläre Schicht im letzten Abschnitt des Spinnkanals. Beide vergrößern die Oberfläche des Kanals, wodurch eine Wasserabscheidung begünstigt wird.<sup>30,49</sup> Zuletzt erfolgt ein Flüssig-fest-Phasenübergang an der Spinnwarze. Am Ende dieses Phasenübergangs steht ein noch unfertiger Faden, der durch einen endgültigen Streckungsprozess an der Luft finalisiert wird.<sup>41</sup>

Die besondere Bedeutung der nicht-repetitiven terminalen Domäne der Proteine, sowohl bei der Lagerung der hochkonzentrierten Proteinlösung in der Drüse als auch bei der Fadenassemblierung konnte bereits für verschiedene Seidenproteine gezeigt werden.<sup>37,38</sup> Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Funktion der nicht-repetitiven terminalen Domänen sondern auch ihre Struktur zwischen verschiedenen Spinnenarten hoch-konserviert sind.<sup>50</sup> Beide nicht-repetitiven Termini fungieren als molekulare Schalter, welche abhängig von den Umgebungsbedingungen der Proteine ihre Konformation ändern. Der Amino-terminale Bereich liegt unter Speicherbedingungen in der Spinndrüse als Monomer vor, durch pH-Änderungen zum Sauren dimerisiert dieser jedoch in antiparalleler Weise.<sup>50</sup> Der Carboxy-terminale, nicht-repetitive Bereich, hingegen liegt immer als paralleles Dimer vor. In dieser Form fördert der Terminus die Löslichkeit der Spidroine und unterstützt, bei der Assemblierung, die geordnete Ausbildung der Fasern.<sup>37,38,51</sup>

### 3.1.3 Mechanische Eigenschaften natürlicher Spinnenseide

Natürliche Spinnenseiden sind für ihre außerordentlichen mechanischen Eigenschaften bekannt. In Tab. 3.1 sind vier Materialeigenschaften verschiedener natürlicher und synthetischer Materialien aufgelistet. Bei der Steifigkeit handelt es sich um eine Größe, die den Widerstand eines Körpers gegen seine Verformung beschreibt. Die Festigkeit eines Materials kann als die Kraft pro Fläche beschrieben werden, die aufgebracht werden muss, um einen Gegenstand mechanisch zu verformen bzw. zu zerreißen. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Dehnbarkeit. Diese ist definiert als die maximale Ausdehnung eines Körpers, bevor er reißt. Als vierte Materialeigenschaft wird die Zähigkeit verschiedener Materialien verglichen. Es handelt sich hierbei um die Energie, die ein Körper pro Volumen aufnehmen kann, bevor er reißt.

**Tab. 3.1:** Mechanische Eigenschaften einiger natürlicher und synthetischer Materialien im Vergleich (modifiziert nach<sup>26,27</sup>).

Material	Steifigkeit (E-Modul) [GPa]	Festigkeit [GPa]	Dehnbarkeit [%]	Zähigkeit [MJm <sup>-3</sup> ]
<b>Dragline-Seide (<i>A. diadematus</i>)</b>	10	1,1	27	160
<b>Flagelliform-Seide (<i>A. diadematus</i>)</b>	0,003	0,5	270	150
<b>Kokon-Seide (<i>B. mori</i>)</b>	7	0,6	18	70
<b>Elastin</b>	0,0011	0,002	150	2
<b>Resilin</b>	0,002	0,004	190	4
<b>Collagen</b>	1,2	0,12	130	6
<b>Distaler Muschelbyssus</b>	0,87	0,075	109	45
<b>Proximaler Muschelbyssus</b>	0,016	0,035	200	35
<b>Knochen</b>	20	0,16	3	4
<b>Wolle (100 % Luftfeuchtigkeit)</b>	0,5	0,2	50	60
<b>Kevlar 49</b>	130	3,6	2,7	50
<b>Nylon</b>	5	0,95	18	80
<b>Karbonfaser</b>	300	4	1,3	25
<b>Hochfester Stahl</b>	200	1,5	0,8	6

Insbesondere der Abseilfaden von Spinnen ist aufgrund seiner Kombination aus Steifigkeit, Festigkeit und hoher Dehnbarkeit und der daraus resultierenden enormen Zähigkeit für die Forschung von besonderem Interesse (Tab. 3.1). Der Abseilfaden der Gartenkreuzspinne *A. diadematus* besitzt mit 10 GPa eine doppelt so hohe Steifigkeit und mit  $160 \text{ MJm}^{-3}$  eine doppelt so hohe Zähigkeit wie Nylon. Keines der anderen aufgelisteten Materialien verkörpert diese Kombination an Eigenschaften. Sowohl hochfester Stahl als auch Karbonfasern und Kevlar 49-Fasern besitzen deutlich höhere Steifigkeiten, sie erreichen jedoch geringere Werte bei den anderen dargestellten Parametern. Die *Flagelliform*-Seide von *A. diadematus* weist ebenfalls sehr beeindruckende mechanische Eigenschaften auf, sie besitzt eine Dehnbarkeit von ca. 270 %. Diese mechanischen Eigenschaften der natürlichen Spinnenseide zeigen ihre optimale Anpassung an ihre mechanischen Anforderungen in der Natur.<sup>27,52,53</sup> Der Abseilfaden von Radnetzspinnen muss in seiner natürlichen Umgebung zum einen das Abseilen der Spinne aus großen Höhen ermöglichen und wird zum anderen für Rahmen und Speichen beim Netzbau eingesetzt. Der *Dragline*-Seide kommt somit hauptsächlich eine stabilisierende Funktion zu. Die *Flagelliform*-Seide hingegen stellt die Fangspirale im fertigen Netz dar und muss somit den Aufprall auftreffender Insekten abfangen, damit die Beute nicht wieder aus dem Netz geschleudert wird.<sup>53</sup> Hierfür benötigt sie Eigenschaften wie beispielsweise eine hohe Dehnbarkeit kombiniert mit einer hohen Zähigkeit.

Die mechanischen Eigenschaften der natürlichen Spinnenseide gehen insbesondere auch auf ihren molekularen Aufbau zurück. Im Faden sind die kristallinen Bereiche in einer Matrix aus unstrukturierten Regionen eingebettet (Abb. 3.2). Die Elastizität des Seidenfadens geht auf die unstrukturierte Matrix des Fadens zurück. Diese semi-amorphen Regionen bestehen hauptsächlich aus  $\beta$ -Spiralen und helikalen Strukturen,<sup>54</sup> welche auf die GPGXX-Motive zurück gehen. Die *Flagelliform*-Seide besteht hauptsächlich aus diesen Motiven, wodurch sich ihre enorme Elastizität erklären lässt. Die Stabilität des Seidenfadens geht hingegen, wie bei anderen  $\beta$ -faltblattreichen Proteinen auch, auf die  $\beta$ -Faltblattstrukturen zurück, welche als physikalisch quervernetzte Nanokristalle in die semi-amorphe Matrix eingebettet sind.<sup>54-57</sup> Die Motive, die diesen Strukturen zugrunde liegen, bestehen hauptsächlich aus poly-Alanin-

Sequenzen und, bei *B. mori*, aus poly-(Glycin-Alanin)-Abfolgen. Die Größe dieser Nanokristalle hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Festigkeit und die Zähigkeit der Fasern.<sup>57,58</sup> Die Verringerung der Länge der poly-Alanine hat auch einen Einfluss auf die korrekte Ausbildung der  $\beta$ -Faltblatt-Nanokristalle.<sup>59</sup> Zusätzlich zur Länge der poly-Alanin-Sequenzen hat die Ausrichtung der Kristalle (antiparallel oder parallel) eine enorme Bedeutung in Bezug auf die mechanischen Eigenschaften (z. B. Steifigkeit) von Spinnenseide.<sup>60,61</sup> Wird der Faden einer Zugkraft ausgesetzt, verstärken die Nanokristalle die teilweise unstrukturierten Bereiche durch Ausbildung von Verzahnungen. Durch diese wird die auf den Faden einwirkende Kraft gleichmäßig verteilt und die semi-amorphen Regionen werden daran gehindert, sich zu stark auszudehnen.<sup>32,43,57,60</sup>

Die mechanischen Eigenschaften der verschiedenen, von einer Spinne gebildeten Fäden, unterscheiden sich jedoch sehr stark, je nachdem in welcher Spinnrüse die Proteine gebildet wurden (Tab. 3.1). Des Weiteren variiert auch die Mechanik von Seidenfäden des gleichen Typs unterschiedlicher Spinnenarten ebenso wie zwischen Individuen der gleichen Spinnenart. Diese Varianz hat viele Ursachen und geht unter anderem auf die jeweiligen Messbedingungen zurück.<sup>1</sup> Insbesondere Umwelteinflüsse spielen bei der Bestimmung der mechanischen Eigenschaften eines Seidenfadens eine wichtige Rolle, bereits geringe Veränderungen in der Luftfeuchtigkeit oder Temperatur während einer Messung können einen enormen Einfluss auf die gewonnenen mechanischen Daten aufweisen. Ein Grund hierfür ist der semi-kristalline Zustand des Seidenfadens. Flexible Bereiche und kristalline Bereiche liegen nebeneinander im Faden vor und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden. Wasser und Temperatur können die Bindungsenergie dieser Bindungen herabsetzen und somit als Weichmacher fungieren.<sup>62</sup> Zusätzlich lässt sich die mechanische Varianz auch auf verschiedene Umwelteinflüsse (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) sowie die Spinnengeschwindigkeit während des Spinnprozesses zurückführen.<sup>1</sup> Die Spinnengeschwindigkeit der Spinne beeinflusst sowohl die Dicke des Fadens als auch die Ausbildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen.<sup>58</sup> Bis zu einer Spinnengeschwindigkeit von  $20 \text{ mms}^{-1}$ , nimmt der Fadendurchmesser von *N. edulis* mit zunehmender Geschwindigkeit ab, oberhalb dieser Geschwindigkeit bleibt der Durchmesser des Seidenfadens konstant, bei extremen



Zuggeschwindigkeiten (ca.  $800 \text{ mms}^{-1}$ ) kann jedoch kein stabiler Faden gewonnen werden. Die hohe Zuggeschwindigkeit beeinflusst die Proteinfaltung während des Spinnprozesses ebenso wie die damit einhergehenden Vernetzungsprozesse innerhalb des Fadens.<sup>1,16,63-65</sup>

### 3.1.4 Natürliche Seidenproteine als Biomaterial

Biomaterialien sind aus vielen Bereichen der medizinischen Forschung nicht wegzudenken. Seit vielen Jahren finden sie Anwendung als Implantatmaterial im Dentalbereich, als Prothesenmaterial, z. B. für künstliche Herzen, als Knochentransplantat oder auch als neuronale Prothesen.<sup>66</sup> Insbesondere im Bereich der Implantate, also der Endoprothesen, spielen Biokompatibilität und zum Teil auch Bioabbaubarkeit eine wichtige Rolle. Die Oberflächenbeschaffenheit und somit auch die Biokompatibilität eines Implantats, ebenso wie die Grenzfläche zwischen Implantat und dem ihn umgebenden Gewebe sind wichtige Aspekte, die bei der Wahl des Implantatmaterials berücksichtigt werden müssen. Durch die optimale Anpassung des Materials kann die Integration des Biomaterials im jeweiligen Organismus begünstigt, mögliche Abstoßungsreaktionen vermieden und eine möglichst lange Verweildauer des Implantats im Körper erzielt werden. Aufgrund der besonderen Eigenschaften natürlicher Seide, insbesondere im Bereich der Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit, rückt diese sowohl als Implantatmaterial als auch als mögliches Beschichtungsmaterial für Implantate immer mehr in den Fokus der Wissenschaft.<sup>67</sup> Weitere Eigenschaften natürlicher Spinnenseide, wie ihre starke mechanische Belastbarkeit und ihre Elastizität, unterstützen diese Rolle weiter. Insbesondere die Kombination der genannten Eigenschaften zusammen mit ihrer biostatischen Wirkung (Verhindert das Wachstum von Mikroorganismen),<sup>68</sup> hebt natürliche Spinnenseide von anderen Seidenarten, z. B. der Seide des Seidenspinners, aber auch von vielen anderen natürlichen und synthetischen Materialien, ab (Tab. 3.1). In verschiedenen Ansätzen wurde die Biokompatibilität von natürlichen Seiden analysiert. Vor allem die Kokon-Seide von *B. mori* stand lange Zeit in der Kritik, hypersensitive Reaktionen bei Patienten hervorzurufen. Mittlerweile konnte jedoch die Ursache für diese Reaktionen analysiert werden, es handelt sich wahrscheinlich um das den Seidenfaden umgebende Sericin.<sup>69</sup> Heutzutage ist das Reinigungsprotokoll der Seide des Seidenspinners optimiert, und es

ist nun möglich, eine biokompatible Seide aus den Kokons zu extrahieren.<sup>67,70</sup> Dank ihrer enormen Biokompatibilität, findet Seide in immer mehr Bereichen Anwendung. Beispielsweise als Nahtmaterial wurden Seidenfäden als mögliche Alternative zu den herkömmlichen Polymeren und Biomaterialien getestet.<sup>15,19</sup> Ein häufig verwendetes abbaubares Nahtmaterial ist *Catgut*, ein natürliches Biomaterial, welches aus Naturdärmen hergestellt und im Körper innerhalb von 3-7 Tagen vollständig abgebaut wird, jedoch teilweise Entzündungsreaktionen hervorruft.<sup>14</sup> Aus Seidenproteinen lassen sich, abgesehen vom Seidenfaden, noch weitere Morphologien herstellen. Hierzu zählen sowohl Filme,<sup>12,13</sup> Vliese<sup>71,72</sup> und Hydrogele<sup>73</sup> zur Wundabdeckung, als auch Partikel<sup>74</sup> oder Kapseln,<sup>75</sup> welche sich insbesondere für die Anwendung im Bereich der Wirkstoffimmobilisierung und der kontrollierten Wirkstofffreisetzung eignen.<sup>74,76-80</sup>

### 3.2 Rekombinante Spinnenseide

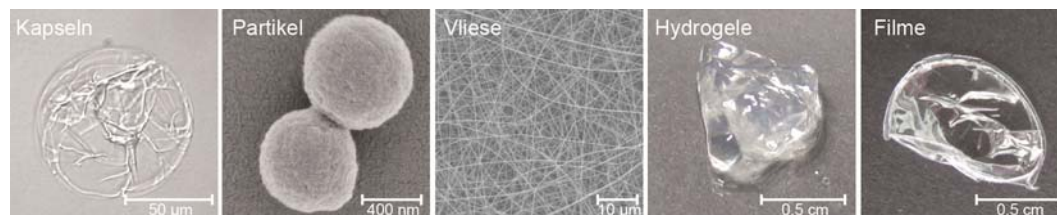
Ein Nachteil von Spinnenseide im Vergleich zur Seide des Seidenspinners *B. mori* ist ihre aufwendige Gewinnung. Die Seidenproteine können beispielsweise direkt aus der Spinnndrüse extrahiert werden.<sup>81,82</sup> Eine Alternative ist das Sammeln von Spinnennetzen in der Natur. Das ist jedoch sehr mühsam, die Ausbeute ist gering und aufgrund des Aufbaus eines Spinnennetzes kommt es oftmals zu Kontaminationen durch andere Proteine oder durch natürliche Umwelteinflüsse (u. a. Pflanzenpollen, Insektenreste, unterschiedliche Qualität durch die Nahrung). Eine dritte Möglichkeit ist das Melken von Spinnen zur Gewinnung des Seidenfadens.<sup>83,84</sup> Diese Methode ist jedoch ebenfalls problematisch, da viele Spinnenarten kannibalisches Verhalten zeigen und somit schlecht kostengünstig und effizient gehalten werden können. Um diese Problematik zu umgehen und gleichzeitig eine gleichbleibende Qualität des Proteins zu gewährleisten, gibt es verschiedene Ansätze der rekombinanten Spinnenseidenproduktion. Hierfür wurden sowohl transgene Pflanzen und Pilze als auch transgene Tiere als Wirtsorganismen getestet. Jedoch zeigten sowohl die Versuche in *Pichia pastoris* (Hefe),<sup>85-87</sup> in verschiedenen Zelllinien,<sup>88</sup> Pflanzen<sup>89-91</sup> und Säugetieren,<sup>92</sup> Nachteile. Diese waren zum einen hohe Kosten, aufgrund der Zucht und Pflege der Wirtsorganismen, zum anderen sind teilweise ein sehr langsames Wachstum der Wirtsorganismen als auch Probleme bei der Extraktion und Reinigung der Spinnenseidenproteine deutlich geworden. Einige dieser Probleme können durch die



Hierfür wurde durch reverse Translation das gewünschte repetitive Konsensus-Motiv aus ADF4 in eine Oligonukleotidsequenz übersetzt und diese für die *Codon usage* von *E. coli* optimiert. Dieses einzelne Modul wird als C-Modul bezeichnet und kann nun mittels einer nahtlosen Klonierungsstrategie beliebig oft wiederholt und hintereinander gesetzt werden.<sup>98</sup> Die nicht-repetitiven Carboxy- und Amino-terminalen Domänen fanden hierbei keine Berücksichtigung. In dieser Arbeit werden hauptsächlich Proteine verwendet, welche aus 8, 16 oder 32 Wiederholungseinheiten dieses C-Moduls bestehen. Aufgrund der Größe des C-Moduls (35 Aminosäuren) ergeben sich somit Proteine mit einem Molekulargewicht von 24,6 kDa, 47,7 kDa und 93,8 kDa.

### 3.2.2 Assemblierungsformen von eADF4

Die von ADF4 abgeleiteten rekombinanten Spinnenseidenproteine eADF4(C16), eADF4(C32) und eADF4(C8) lassen sich je nach Herstellungsart und Anwendungsgebiet in unterschiedliche Formen überführen (Abb. 3.5), hierzu zählen Kapseln, Partikel, Vliesstoffe, Hydrogele oder Filme.



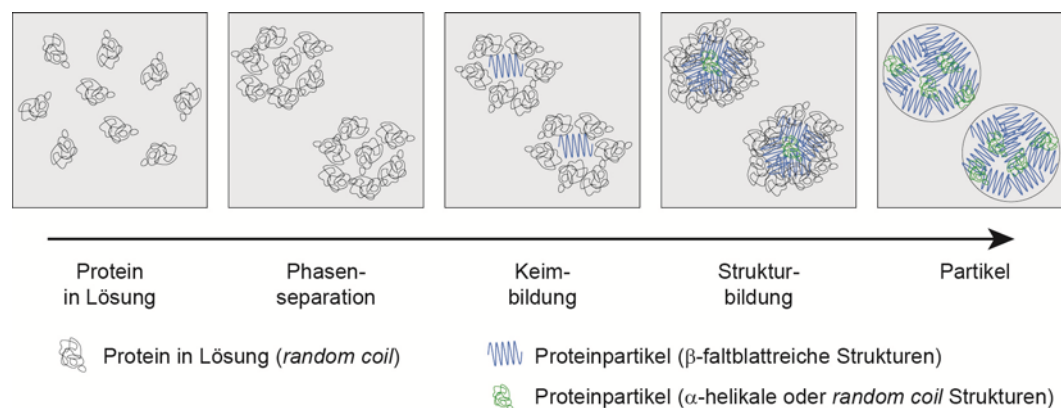
**Abb. 3.5:** Verschiedene aus eADF4(C16) hergestellte Morphologien.

Kapseln (Kapitel 3.2.2.2) eignen sich aufgrund ihrer Porengröße sowohl für den Transport von Wirkstoffen mit einem großen Molekulargewicht (27 kDa) als auch als Verpackungsmaterial und Schutzhülle für Enzyme.<sup>99,100</sup> Partikel (Kapitel 3.2.2.1) hingegen haben sich als mögliches Transport- und Verpackungsmaterial für niedermolekulare und wasserlösliche sowie wasserunlösliche Wirkstoffe herauskristallisiert.<sup>101-103</sup> Beide Morphologien werden hinsichtlich ihrer Herstellung und möglicher Anwendungsgebiete in den folgenden Kapiteln genauer behandelt.

#### 3.2.2.1 Partikel

Partikel aus eADF4(C16) sind eine der am besten charakterisierten Morphologien dieses rekombinanten Spinnenseidenproteins. Sie werden durch Aussalzen mit kosmotropen Ionen (z. B. Kaliumphosphat, Ammoniumsulfat) aus wässriger Lösung hergestellt. Der

Assemblierungsvorgang der Kugelbildung kann in mehrere Schritte unterteilt werden (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6:** Schematische Darstellung der Partikelassemblierung, modifiziert nach.<sup>104</sup>

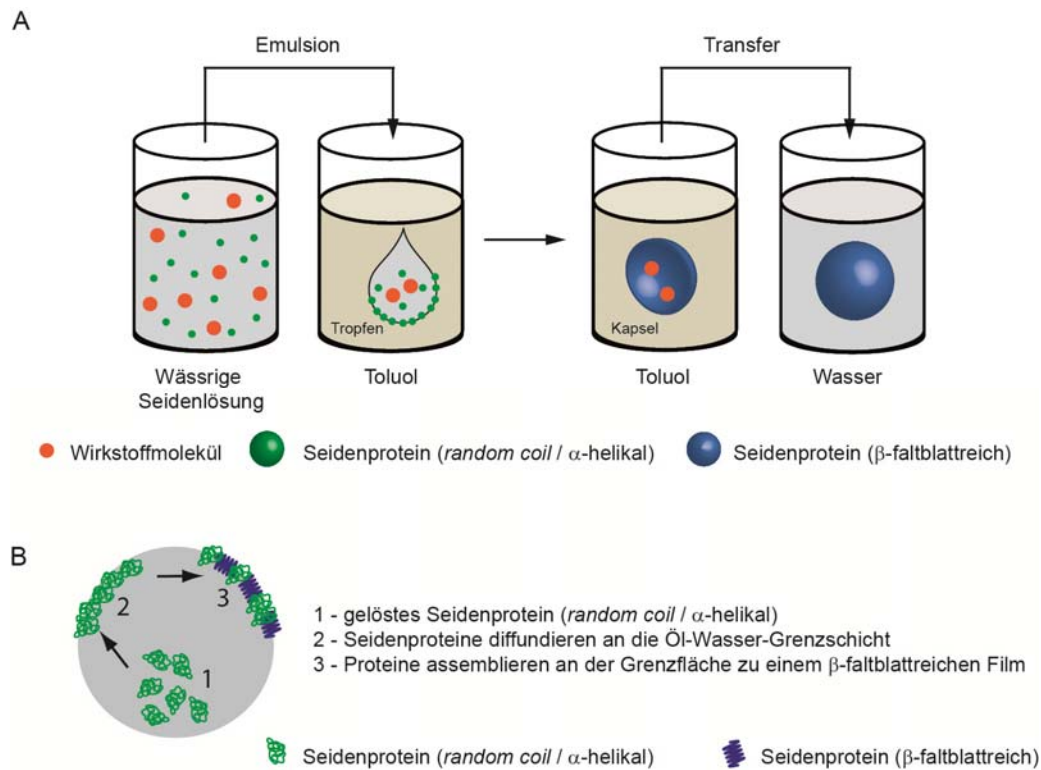
eADF4(C16) Moleküle liegen in wässriger Lösung, ebenso wie ihre natürlichen Vorbilder in der Spinndrüse (ADF4 Moleküle), intrinsisch ungefalteten vor.<sup>42</sup> Dieser Zustand wird *in vitro* für die Herstellung von Partikeln durch die Zugabe von kosmotropen Salzen verändert. Diese induzieren eine energetisch bevorzugte Mikro-Phasenseparation in eine proteinreiche und eine proteinarme Phase. Hierbei wird das Protein in der proteinreicheren Phase immer weiter konzentriert und es formen sich Nukleationskeime. Diese induzieren eine Strukturänderung der sie umgebenden Proteinmoleküle wodurch die Keime zu  $\beta$ -faltblattreichen Mikrokugeln anwachsen. Die maximale Partikelgröße wird durch die Proteinkonzentration in der proteinreichen Phase bestimmt. Ist diese unterhalb des Lösungsgleichgewichtes, lagern sich keine Monomere mehr an die Partikel an und diese stellen ihr sphärisches Wachstum ein.<sup>104</sup> Die Größe dieser Partikel ist jedoch nicht nur von der Proteinkonzentration abhängig, sondern wird ebenso durch die Mixintensität während der Partikelbildung beeinflusst. Je höher die Proteinkonzentration, desto größer werden die Partikel und je höher die Mixintensität desto kleiner werden diese. Meist weisen eADF4(C16) Mikropartikel, die ohne Zusätze hergestellt werden, eine mittlere Größe von 250 nm bis 3  $\mu$ m auf. Ein weiterer wichtiger Parameter für die Partikelherstellung ist auch die Konzentration des verwendeten kosmotropen Salzes. Ist die Salzkonzentration zu niedrig, entstehen fibrilläre Strukturen, aber keine Partikel. Die minimale notwendige Kaliumphosphatkonzentration um mikroskopisch schöne, in sich abgeschlossene Partikel

zu erhalten, ist 400 mM.<sup>104</sup> Fertig ausgebildete Partikel besitzen einen  $\beta$ -Faltblattanteil von mindestens 60 %.<sup>104</sup> Dieser hohe Anteil verleiht den Partikeln ihre enorme Stabilität.

Aufgrund der einfachen Herstellungsweise eignen sich Partikel auf Basis von eADF4(C16) als Transportsystem für niedermolekulare, wasserlösliche und wasserunlösliche Wirkstoffmoleküle. Dies konnte bereits anhand verschiedener Modellwirkstoffe und Proteinen gezeigt werden.<sup>101,102,105</sup> Die Beladung der Partikel mit Wirkstoffen kann einerseits durch co-Präzipitation des Wirkstoffes zusammen mit eADF4(C16) erfolgen, andererseits können die Modellwirkstoffmoleküle auch über Diffusionsprozesse in die Partikel gelangen.<sup>102</sup> Die Freisetzung der Wirkstoffe erfolgt über Diffusionsprozesse aus dem intakten Partikel oder durch proteolytischen Verdau des Proteins.

### 3.2.2.2 Kapseln

Kapseln sind flüssigkeitsgefüllte sphärische Strukturen, die von einer Hülle umgeben sind. Die Kapselhülle von eADF4(C16) Kapseln besteht aus einem dünnen Proteinfilm (ca. 50 nm).<sup>100</sup> Aufgrund des amphiphilen Charakters von eADF4, können Kapseln durch Grenzflächenpolymerisation an einer Grenzschicht aus Wasser und einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Flüssigkeit wie Toluol oder mit Öl, hergestellt werden (Emulsion) (Abb. 3.7A). Hierbei wandern die Proteine über Diffusionsprozesse an die Toluol-Wasser-Grenzfläche und richten sich dort aus (Abb. 3.7B). Toluol, sowie viele aromatische Öle, induzieren eine Sekundärstrukturänderung hin zu  $\beta$ -faltblattreichen Strukturen, wodurch im Fall des Seidenproteins eADF4(C16) ein wasserunlöslicher Proteinfilm entsteht. Die Größe der Kapseln lässt sich durch den Emulsionsprozess einstellen. Je kleiner die wässrigen Tropfen in der organischen oder Öl-Phase sind, desto kleiner werden die Kapseln. Der Transfer der Kapseln aus Toluol in Wasser erfolgt entweder durch Zentrifugation der Kapseln in eine wässrige Phase oder durch Resuspension der Emulsion mit 95 % Ethanol.<sup>100</sup>



**Abb. 3.7:** A) Schematische Darstellung der Kapselherstellung aus eADF4(C16) Proteinen. Als organische bzw. Öl-Phase wird Toluol verwendet, das Protein liegt in wässriger Phase vor. B) Detaillierte Darstellung der Vorgänge innerhalb eines Tropfens. Über Diffusionsprozesse wandern die gelösten Seidenproteine an die Öl-Wasser-Grenzschicht und assemblieren dort. Dadurch entsteht ein  $\beta$ -faltblattreicher Proteinfilm, welcher den wässrigen Tropfen umhüllt.

Mittels Toluol hergestellte eADF4(C16) Kapseln wurden bereits detailliert charakterisiert.<sup>99,100</sup> Mittels FTIR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Proteinfilm um eine Proteinhülle mit einem hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern handelt, wodurch eine gute chemische Stabilität der Kapseln (unlöslich in 2 % SDS und 8 M Harnstoff) erzielt werden kann. Proteolytisch können die Kapseln jedoch mit Proteinase K verdaut werden. Durch die Verwendung von Fluoreszeinisothiocyanat-(FITC-) markierten Dextranen wurde der molekulare *Cut-off* bestimmt. Bei der Kapselhülle handelt es sich um eine semi-permeable Membran mit einer mittleren Ausschlussgröße von 27 kDa. Der Elastizitätsmodul der Kapseln wurde ebenfalls bestimmt, er liegt zwischen 0,7 – 3,6 GPa und ist damit vergleichbar mit dem Elastizitätsmodul des Bakteriophagencapsids von *Bacillus subtilis*.<sup>106</sup>

Ein wichtiger Schritt während der Kapselherstellung ist die Diffusion der Proteinmoleküle an die Öl-Wasser-Grenzschicht. Dieser kann durch Mikrofluidik-Prozesse beschleunigt und gleichzeitig berechnet und kontrolliert werden. Mikrofluidik

beschreibt Strömungen von Fluiden auf kleinstem Raum, zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 1 mm, wobei sich Fluide in diesem Fall insbesondere auf Flüssigkeiten bezieht. Es gibt drei wichtige Parameter, welche Flüssigkeiten charakterisieren, die Dichte, die Viskosität und der Druck. Das Fließverhalten der Flüssigkeiten innerhalb der Mikrofluidik folgt einem laminaren Strömungsprofil. Dieses wird durch die Reynolds-Zahl beschrieben, eine dimensionslose Kennzahl, die das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften angibt. Je größer die Reynolds-Zahl ist, desto turbulenter ist eine Strömung. Da diese direkt proportional zum Kanaldurchmesser ist, erhält man in der Mikrofluidik lediglich sehr kleine Werte für die Reynolds-Zahl, wodurch sich das laminare Strömungsprofil ergibt.<sup>107,108</sup> Durch dieses Strömungsprofil ist es möglich, die Strömungen innerhalb der Mikrofluidikkanäle zu berechnen. Ein weiteres Phänomen innerhalb dieser kleinen Dimensionen ist, dass aufgrund des großen Oberflächen- zu Volumenverhältnis, Oberflächeneigenschaften wie beispielsweise die Oberflächenspannung der Lösungen oder kapillare Effekte an Bedeutung gewinnen.

Mikrofluidik-Chips stellen eine Möglichkeit dar, verschiedene Prozesse auf kleinem Raum zusammen zu fassen. Hierbei reicht das Spektrum von einfachen Kanalsystemen, welche durch geschickte Verbindungen der einzelnen Kanäle, Lösungen gezielt mischen, bis hin zu dreidimensionalen Fokussierungen von Strömungen. Dadurch ist es u. a. möglich, Emulsionen herzustellen, ihre Tropfengröße einzustellen und Koaleszenz zu verhindern. Dies beschränkt sich jedoch nicht allein auf monodisperse Emulsionen, auch polydisperse Emulsionen sind problemlos herstellbar.<sup>109,110</sup> Mikrofluidik bietet aufgrund ihres kleinen Maßstabs viele Vorteile im Vergleich zu Versuchsaufbauten im Labormaßstab. Insbesondere die kleinen Probenvolumina, welche für Kanäle im Mikrometermaßstab benötigt werden, spielen hierbei eine wichtige Rolle, da dadurch verschiedene Kanalstrukturen oder Layouts kostengünstig und schnell getestet werden können.

Chips für die Mikrofluidik basieren auf unterschiedlichen Materialien, u. a. auf Glas, Metallen oder Polymeren. Letztere sind hierbei aufgrund ihrer einfachen und kostengünstigen Handhabung von besonderem Interesse. Polydimethylsiloxan (PDMS) bietet viele Vorteile gegenüber anderen Materialien, da es leicht zu verarbeiten und im auspolymerisierten Zustand klar und chemisch inert ist. Die Fertigung der Mikrofluidik-

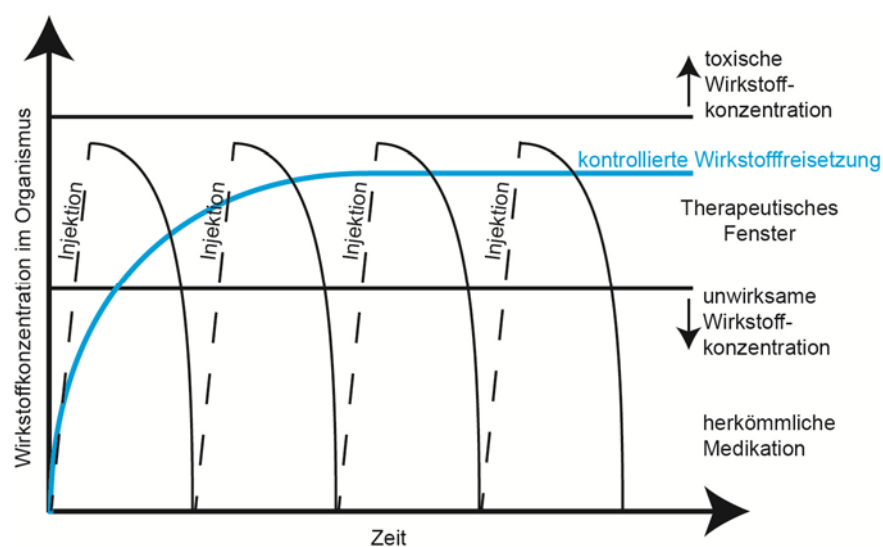


Chips erfolgt hierbei in vier Schritten, der Erstellung einer Fotomaske und des Formwerkzeugs, dem Gießen des Chips und der abschließenden Bearbeitung.

Im Bereich der Biomaterialien werden Mikrofluidik-Chips bereits zur Herstellung unterschiedlicher Morphologien eingesetzt. So ist es gelungen, einen Faden aus *B. mori* Fibroin durch gezieltes Fokussieren im Mikrofluidik-Kanal herzustellen und zusätzlich seine Eigenschaften durch Variation der Parameter einzustellen.<sup>111</sup> Auch die Herstellung von Fibroinpartikeln im Mikrometerbereich konnte bereits realisiert werden.<sup>112</sup>

### 3.3 Wirkstofftransport und kontrollierte Wirkstofffreisetzung

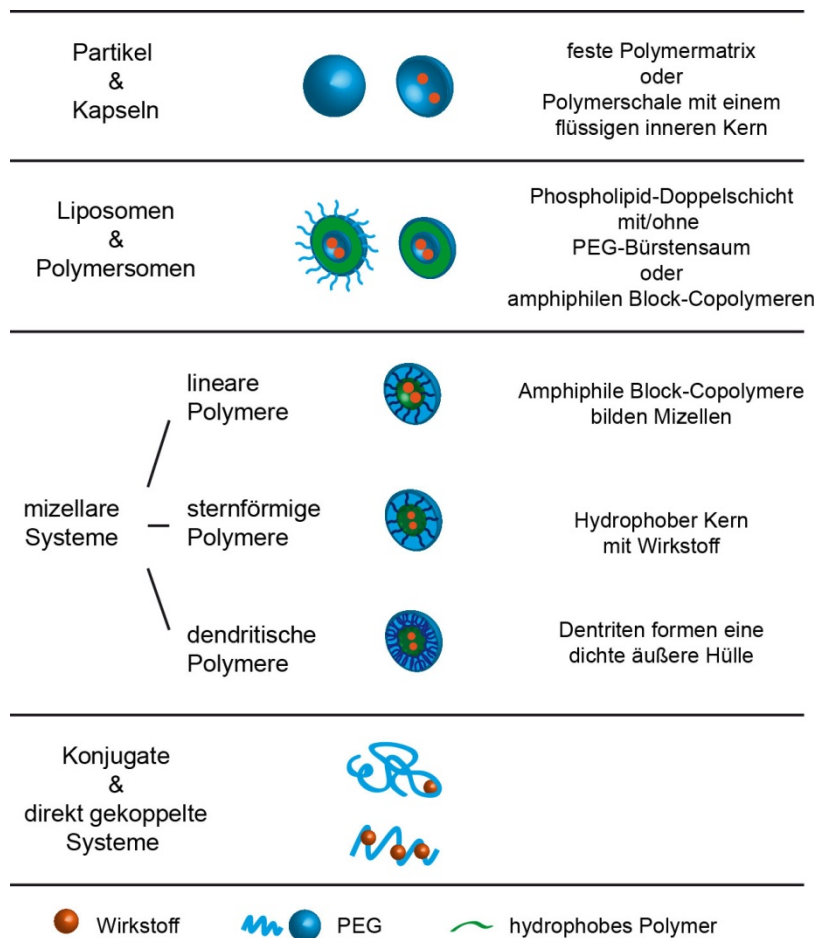
Der kontrollierte Wirkstofftransport an einen Zielort innerhalb des Organismus, ebenso wie die kontrollierte Wirkstofffreisetzung am Wirkort (*controlled drug delivery/release*) hat viele Vorteile im Vergleich zu herkömmlicher Medikation (Abb. 3.8).<sup>113</sup> Viele Wirkstoffe wirken nur innerhalb eines therapeutischen Fensters, unterhalb dieser Konzentration sind viele Medikamente wirkungslos, oberhalb können toxische Nebenreaktionen auftreten. Bei der herkömmlichen Verabreichung von Medikamenten treten nach Injektion bzw. nach Einnahme des Medikaments meist sehr hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen auf, welche aber über einen recht kurzen Zeitraum hinweg schnell wieder abflachen. Diese Schwankungen können unerwünschte Nebenreaktionen bedingen und sollen deshalb durch die kontrollierte Wirkstofffreisetzung verringert werden.



**Abb. 3.8:** Schematische Darstellung der erwarteten Wirkstoffkonzentrationen im Plasma durch kontrollierte Wirkstofffreisetzung und herkömmliche Medikation (modifiziert nach<sup>113</sup>). Durch eine

kontrollierte Freisetzung sollen toxische Nebenwirkungen ebenso wie unwirksame Konzentrationsbereiche der Medikamente vermieden werden.

Sowohl mobile als auch stationäre Systeme sind für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung denkbar. Mobile bzw. injizierbare Systeme sind u. a. mit Wirkstoffen beladene Partikel oder Kapseln, welche im Blutkreislauf zirkulieren oder oral aufgenommen werden. Abb. 3.9 zeigt verschiedene mobile Wirkstofftransportsysteme am Beispiel von Polyethylenglykol (PEG), dem am häufigsten verwendeten synthetischen Polymer im Bereich des Polymer-basierten Wirkstofftransportes.<sup>114</sup>



**Abb. 3.9:** Übersicht der verschiedenen Polymer-basierten, mobilen Wirkstofftransportsysteme am Beispiel PEG (modifiziert nach<sup>114</sup>).

Hierbei wird deutlich, dass es verschiedene Möglichkeiten gibt, Wirkstoffe zu verpacken bzw. zu transportieren. Zum einen können diese vollständig durch kapsuläre, partikuläre oder mizellare Systeme eingeschlossen werden, zum anderen können die Wirkstoffe an ein Trägermolekül gekoppelt werden, welches die Verweildauer im Blutkreislauf erhöht oder die spezifische Zellaufnahme fördert. Die Wahl eines geeigneten Systems ist hierbei

sowohl von den Eigenschaften des Wirkstoffes als auch vom Zielort und der Art der Therapie abhängig.

Im Gegensatz zu mobilen Systemen sind stationäre Systeme entweder implantierbare Wirkstoffträger, z. B. Partikel, Hydrogele oder Filme (Implantatbeschichtungen),<sup>115</sup> oder Wundabdeckungen und Nahtmaterial, welche die Wirkstoffe langsam an die Wunde abgeben. Für Wundabdeckungen eignen sich beispielsweise Filme, Vliese<sup>116</sup> oder Hydrogele,<sup>117</sup> als Nahtmaterial lediglich Fasern.

Die Freisetzung der Wirkstoffe kann sowohl bei mobilen als auch bei stationären Systemen auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Die Wirkstoffmoleküle können zum einen aus dem Transportsystem heraus diffundieren. Die Freisetzung erfolgt hierbei aufgrund von Änderungen des pH-Wertes im umgebenden Plasma, des Wirkstoffkonzentrationsgefälles im Plasma oder anderen Faktoren. Das Transportsystem bleibt hierbei während des Diffusionsprozesses erhalten und wird anschließend entweder ausgeschieden (mobile Systeme), durch Proteasen verdaut, im Verdauungstrakt durch Säuren etc. nachträglich zersetzt oder, z. B. bei Wundaufgaben, von der Wunde abgelöst. Alternativ können die Wirkstoffträger nach Freigabe des Wirkstoffes auch wieder explantiert werden. Zum anderen können die Wirkstoffmoleküle auch durch die Degradation des Trägermaterials freigesetzt werden.<sup>118</sup> Je nach Material kann das einerseits durch Säuren im Verdauungstrakt geschehen, andererseits auch durch Proteasen direkt am Wirkort. Die Freisetzung der Wirkstoffe und somit die Wahl des Systems ist von verschiedenen Parametern abhängig. Hierzu zählen das Molekulargewicht, die Kristallinität und Porosität, sowie der Aufbau und die Größe des Trägermaterials (Polymer), ebenso wie das Wirkstoffmolekül an sich (Größe, Ladung) und die Umgebungsbedingungen in die die Wirkstoffmoleküle freigesetzt werden sollen.<sup>118,119</sup>

Anstelle der Verpackung von Wirkstoffen, können auch Zellen oder Enzyme verpackt werden. Hierbei wird nicht der Wirkstoff, sondern die im Organismus fehlenden Zellen oder Enzyme transportiert. Ein Beispiel hierfür ist die Verpackung von Langerhans Inseln. Diese verpackten Zellen können Diabetikern an eine gut zugängliche und gut durchblutete Stelle implantiert werden, z. B. in den Oberarmmuskel. Je nach der Höhe

des Blutzuckerspiegels können die Zellen dort Insulin produzieren, ohne dass dieses injiziert werden muss. Die Überlebensrate der verpackten Zellen ist von mehreren Faktoren abhängig, zum einen vom umgebenden Material, zum anderen auch von der Implantationsstelle. Durch die Verpackung in Materialien wie beispielsweise Alginat sind die Zellen vom Immunsystem geschützt, das umgebende Netzwerk ist jedoch semi-permeabel, so dass Nährstoffe und Sauerstoff zu den Zellen hinein diffundieren können und Abfallprodukte sowie Wirkstoffe, z. B. das produzierte Insulin, nach draußen gelangen können.<sup>120-122</sup>

Die verschiedenen, bereits beschriebenen, Anforderungen an Polymere, welche für den Wirkstofftransport eingesetzt werden, sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Der Fokus dieser Auflistung liegt in den Bereichen Wirkstoffverarbeitung, Pharmakokinetik und klinische Verabreichung.<sup>123</sup>

**Tab. 3.2:** Anforderungen an ein Wirkstofftransportsystem auf Basis von Polymeren hinsichtlich der Wirkstoffverarbeitung, Pharmakokinetik und klinischen Verabreichung (modifiziert nach<sup>123</sup>).

Wirkstofftransport	Blut	Zielgewebe	Ausscheidung	Klinik
keine giftigen Monomere und Zusatzstoffe	Hämo-kompatibilität	Gewebe- oder Zellspezifische Markierungen	niedriges Molekulargewicht	sichere und einfache Applikation
Stabilisierung und Solubilisierung des Wirkstoffes	verlängerte Zirkulationsdauer	durchdringt biologische Barrieren	ungiftige Abbauprodukte	gutes Kosten-/Risiko-/ Nutzen-Verhältnis
Schutz der Wirkstoffe	kontrollierte Wirkstofffreisetzung	Aufnahme in Zellen/Organe	keine Akkumulationen in Organen	hochskalierbar
physikalische, chemische und mikrobielle Stabilität	Schutz vor Agglomeration und Aggregation	Maßgeschneider-tes Freisetzung-verhalten	Ausscheidung über Leber oder Nieren	einfache Lagerung
hohe Biokompatibilität	keine Aufnahme durch das RES (Retikuloendotheliales System)	Bioabbaubarkeit		einfache Sterilisierbarkeit
	keine Reinigung durch die Lunge	Biokompatibilität		angemessene Gebinde
	verursacht keine Embolien	nicht zytotoxisch, genotoxisch oder immunogen		

### 3.3.1 Polymere als mobile Wirkstofftransport- und Depotsysteme

Viele verschiedene Biomaterialien wurden bereits für ihren Einsatz als Wirkstofftransport- und Depotsystem, aber auch als Verpackungsmaterial für Zellen oder Enzyme getestet. Hierzu zählen Materialien wie z. B. Alginat,<sup>124</sup> Chitosan,<sup>125-127</sup> Gelatine,<sup>128</sup> Fibroin,<sup>74,76,79,112,129-131</sup> Zein,<sup>132</sup> und Spinnenseiden,<sup>99,100,102,103,133</sup> aber auch Kompositmaterialien aus mehreren dieser Biomaterialien.<sup>73</sup> Ein Vorteil dieser natürlichen Polymere gegenüber synthetischen wie PEG,<sup>114</sup> PLA,<sup>119</sup> PGA oder PLG<sup>113,134,135</sup> liegt in der Verarbeitung und Verträglichkeit der Moleküle. Viele synthetische Polymere benötigen starke organische Lösungsmittel oder sehr hohe Temperaturen für ihre Verarbeitung, im Gegensatz zu natürlichen Polymeren, die meist unter milden Bedingungen in wässrigen Lösungen verarbeitet werden können. Des Weiteren weisen viele der natürlichen Polymeren eine hohe Biokompatibilität und teilweise auch eine gute Bioabbaubarkeit auf, wodurch sie sich für eine medizinische Anwendung eignen. Synthetische Polymere sind in diesem Punkt meist im Nachteil. Insbesondere PEG steht im Verdacht, unter Stress verstärkt Abbaureaktionen hin zu toxischen Abbauprodukten zu zeigen. Diese und weitere allgemeine Unterschiede zwischen synthetischen und natürlichen Polymeren sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

**Tab. 3.3:** Allgemeine Eigenschaften natürlicher und synthetischer Wirkstoffträger in Bezug auf pharmazeutische Anwendungen.<sup>123,136</sup>

Eigenschaften	natürliche Polymere	synthetische Polymere
<b>Bioabbaubar/metabolisierbar</b>	ja	teilweise
<b>Herstellungsmethode</b>	Produktion in Bioorganismen	chemisch synthetisiert
<b>Reinigungsschritte</b>	meist aufwändig	meist nicht aufwendig
<b>Gleichbleibende Chargenqualität</b>	nein	ja
<b>mögliche molekulare Veränderungen</b>	genetisch/chemisch	chemisch
<b>Auslösen von Entzündungsreaktionen</b>	kaum	ja
<b>Immunogen</b>	kaum	ja
<b>Entfernung der Trägermaterials aus dem Organismus</b>	bioabbaubar	operativ
<b>Verschiedene Beladungsmechanismen (elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen, kovalente Bindungen)</b>	ja	teilweise
<b>Oberflächenmodifikationen</b>	viele	kaum

Sowohl bei natürlichen als auch bei synthetischen Polymeren handelt es sich um allgemeine Begriffe, welche sehr große und inhomogene Gruppen umschreiben. Aus diesem Grund sind in Tab. 3.4 und Tab. 3.5 einige Mitglieder dieser Gruppen genauer beschrieben und charakterisiert. Es handelt sich hierbei um eine vergleichende Auflistung verschiedener natürlicher und synthetischer Polymere, welche im Bereich des gezielten Wirkstofftransportes genutzt werden, sowie einige ihrer Vor- und Nachteile in Bezug auf medizinische Anwendungen.

**Tab. 3.4:** Vergleichende Auflistung einiger synthetischer Polymere, welche als mobile Wirkstofftransportsysteme Verwendung finden.<sup>123</sup>

Stoffklasse	Material	Morphologie	Vorteile	Nachteile
<b>Polyester</b>	Polyglykolsäure (PGA)	-Implantate	-FDA-Zulassung	-wasserunlöslich
	Poly lactide (PLA)	-Beschichtungen	-bioabbaubar/metabolisierbar	-nicht autoklavierbar
	Poly lactid-co-Glycolid (PLG) <sup>137,138</sup>	-Partikel -Gerüstsysteme	-kontrollierbare Degradationsrate -hydrophob -biokompatibel	-immunogenes Potential ist vorhanden -geringe Toxizität -schlechte Interaktion mit hydrophilen Wirkstoffmolekülen
<b>Acrylbasierte Polymere</b>	Polyacrylamid (PAA)	-Beschichtungen -Partikel	-verlängerte Verweildauer von Wirkstoffen im Blutssystem -Proteinresistent	-Implantation von Hydrogelen kann zu Entzündungsreaktionen führen
	oder andere Polymere auf Acrylamid-Basis <sup>139-143</sup>	-Hydrogel -Hydrogelpartikel	-keine zytotoxischen Nebenreaktionen -biokompatibel	-kann zu Acrylamid abgebaut werden (durch Temperatur oder photolytische Effekte) – lösen neurotoxische Reaktionen aus -nicht-abbaubares Karbon-Rückgrat -teilweise Akkumulation der Partikel in der Leber
<b>Silikon</b> <sup>144</sup>	Polydimethylsiloxan (PDMS)	-Hydrogel -Flüssigkeit -Kapseln -Membran	-physiologisch inert -thermisch stabil -oxidativ stabil -FDA-Zulassung	-geringe Toxizität
<b>Poly(Aminosäuren)</b> 114,145,146	Polyglutaminsäure (PGS)	-Beschichtungen	-bioabbaubar in nicht-toxische Aminosäuren	-Organische Lösungsmittel bei der Verarbeitung
	Polyhydroxyethyl-L-asparagin (PHEA)	-Liposomen -Mizellen	-verlängert die Verweildauer von Wirkstoffen im Blut -erhöhte Löslichkeit in Wasser durch Konjugate	-können im Organismus eine Immunantwort auslösen
	Polyhydroxyethyl-L-Glutamin (PHEG)	-Konjugate	-verbesserte Zellaufnahme -hydrophil -biokompatibel	
<b>Sonstige</b>	Polyethylenglykol (PEG) <sup>114,147-153</sup>	-Partikel -Kapsel -Liposomen/ Polymersomen -Mizellen -Konjugate	-verlangsamte Degradationszeit des Wirkstoffes -verlängerte Zirkulationszeit des Wirkstoffes im Blut -günstig in der Produktion -verbesserte Permeabilität und Aufnahme in Zellen -viele PEG-stabilisierte Wirkstoffe sind bereits in USA und Europa zugelassen	-Hypersensitivität -toxische Nebenprodukte bei der Produktion -verstärkte Degradation unter Stresseinfluss möglich -nicht bioabbaubar -mögliche Beeinflussung der Pharmakokinetik bei mehrfacher Verabreichung ( <i>accelerated blood clearance</i> – beschleunigte

	-Beschichtung	-biokompatibel -vermindert die Interaktion mit Komponenten des Blutes -reduziert die Partikelaggregation -die enorme Größenvarianz der PEG-Moleküle (400 Da bis 50 kDa für medizinische Anwendungen) macht sie für die Kopplung verschiedener Moleküle interessant (z. B. Proteine, Polypeptide, DNS, RNS...)	Blutreinigung) -durch Oxidation entstehen toxische Metabolite, insbesondere bei PEG mit kleinem Molekulargewicht
Polyethylenimin (PEI) <sup>154,155</sup>	-nichtvirale Vektor Systeme -verzweigte oder lineare Moleküle mit unterschiedlichen Molekulargewichten -Partikel	-verhält sich wie ein Protonenschwamm -besonders geeignet für den Gen-Transport -durch die vielen Amino-Gruppen eröffnen sich viele Anwendungsgebiete (chemische Modifikationen) -kationisch	-stark zytotoxisch -schlechte Blutverträglichkeit -bisher konnte kein kontrollierter Wirkstofftransport zum Zielort erreicht werden



**Tab. 3.5:** Vergleichende Auflistung verschiedener natürlicher Polymere, welche als mobile Wirkstofftransportsysteme Verwendung finden.<sup>123</sup>

Stoffklasse	Material	Morphologie	Vorteile	Nachteile
<b>Polysaccharide mikrobiellen Ursprungs</b>	Chitosan und seine Derivate <sup>126,136,156-163</sup>  <i>Polyamino-saccharid, aus N-Acetylglucosamin-resten</i>	-Partikel -Beschichtungen -Granulat -Hydrogel -Fasern -Filme	-Molekulargewicht: 5-540 kDa -einfache Verarbeitung unter milden Bedingungen -biokompatibel -bioabbaubar -bioadhäsiv/mukoadhäsiv -pH sensitiv -kationisch -kann vernetzt werden -für den Transport von Proteinen geeignet -wasserlöslich -blutstillend -wundheilungsfördernd	-saurer pH-Wert löst das Netzwerk auf -Quellverhalten ist vom pH-Wert abhängig -unter milden Bedingungen hergestellte Partikel sind meist sehr groß (1-2 mm) -Vernetzungsreaktionen mit Glutaraldehyd sind biomedizinisch problematisch
	Dextran oder seine Derivate <sup>136,164</sup>  <i>Polysaccharide aus der Klasse der α-D-Glucane</i>	-Hydrogele -Kapseln	-Molekulargewicht: 10-150 kDa -gleichmäßige Wirkstofffreisetzung -bioabbaubar -biokompatibel -chemische Modifikationen sind möglich -autoklavierbar -wasserlöslich -chemisches und physikalisches Vernetzen ist möglich	-löst sich unvernetzt in wässriger Umgebung auf
<b>Polysaccharide menschlichen oder tierischen Ursprungs</b>	Heparin und seine Derivate <sup>136,165</sup>  <i>Polysaccharid, aus D-Glucosamin und Uronsäuren</i>	-Kapseln -elektrostatische Komplexe -Gele	-anionisch -3-50 kDa -antithrombotisch -gerinnungshemmend -bioabbaubar	-löst sich unvernetzt in wässriger Umgebung auf

	Hyaluronsäure <sup>136,166</sup>	-Hydrogel	-Molekulargewicht: bis zu 10.000kDa -hydrophil -wasserlöslich -mögl. therapeutischer Effekt -kann vernetzt werden -biokompatibel -bioabbaubar	-löst sich ohne Vernetzung im Organismus schnell auf
<b>Polysaccharide pflanzlichen Ursprungs</b>	Alginate <sup>126,136,167-176</sup>  <i>Polysaccharid, aus <math>\alpha</math>-L-Guluronsäure und <math>\beta</math>-D-Mannuronsäure</i>	-Partikel -Hydrogel	-biokompatibel -bioabbaubar -pH sensitiv -bioadhäsiv/mukoadhäsiv -insbesondere für den Transport von Zellen und Proteinen -wasserlöslich -Porengröße der Partikel ist einstellbar	-nur die Verwendung von Ba <sup>2+</sup> Ionen führt zur Ausbildung eines stabilen Netzwerkes im Körper, Ca <sup>2+</sup> Ionen können unter Umständen wieder herausgelöst werden – Auflösen des Netzwerkes
	Cellulose und seine Derivate <sup>177,178</sup>  <i>Polysaccharid aus Cellobiose, einem Disaccharid aus <math>\beta</math>-D-Glucose</i>	-Partikel -Beschichtungen -Hydrogel -Dispersionen -Tabletten	-wasserlöslich (pH-Wert und Derivat-abhängig) -mukoadhäsiv -biokompatibel	-löst leichte Reaktionen im Körper aus -nicht bioabbaubar
<b>Proteinbasierte Polymere</b>	Spinnenseide <sup>100-102,105,133,179</sup>  <i>Protein, mit einer hochrepetitiven Aminosäuresequenz</i>	-Fäden/Fasern -Partikel -Kapseln -Beschichtungen -Hydrogele -Filme -Schäume	-unlöslich in vielen Lösungsmitteln -löst keine Entzündungsreaktionen aus -gute Verträglichkeit -antibakterielle Eigenschaften -gute mechanische Eigenschaften des natürlichen Fadens -bioabbaubar in nicht-toxische Nebenprodukte -chemische und genetische Modifikationen sind möglich -gleichbleibende Qualität bei biotechnologischer Produktion -große Mengen rekombinanter Seide stehen zur Verfügung	-keine gleichbleibende Qualität bei natürlicher Seide -Kontaminationen durch Umwelteinflüsse sind bei natürlicher Seide möglich -Kannibalisches Verhalten der Spinnen erschwert die gezielte Züchtung und Haltung -rekombinante Proteine besitzen ein geringeres Molekulargewicht als ihre natürlichen Vorbilder

<p>Fibroin von <i>B. mori</i> oder anderen Seidenspinnerarten<sup>74,78,79,124,129,130,180-184</sup></p> <p><i>Protein, mit einer hochrepetitiven Aminosäuresequenz</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Partikel</li> <li>-Beschichtungen</li> <li>-Hydrogele</li> <li>-Filme</li> <li>-Schäume</li> <li>-Fasern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-ruft keine Entzündungsreaktionen hervor</li> <li>-gute Verträglichkeit</li> <li>-antibakterielle Eigenschaften</li> <li>-lässt sich in viele verschiedene Morphologien überführen</li> <li>-große Mengen natürliches Material stehen zur Verfügung</li> <li>-gute mechanische Eigenschaften des natürlichen Fadens</li> <li>-Bioabbaubarkeit in nicht-toxische Nebenprodukte</li> <li>-Herstellung der Partikel aus wässriger Lösung</li> <li>-chemische Modifikationen sind möglich</li> <li>-hohe chemische Beständigkeit der Partikel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-muss aufwendig aufbereitet werden</li> <li>-keine gleichbleibende Qualität, da von Umwelteinflüssen abhängig</li> </ul>
<p>Zein<sup>136,185,186</sup></p> <p><i>Speicherprotein des Mais</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Partikel</li> <li>-Mizellen</li> <li>-Kapseln</li> <li>-Beschichtungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-antibakterielle Eigenschaften bei Beschichtungen</li> <li>-alkohollöslich</li> <li>-biokompatibel</li> <li>-geringe Wasseraufnahme</li> <li>-temperaturstabil</li> <li>-mechanisch stabil</li> <li>-amphiphil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-wasserunlöslich</li> <li>-Partikel akkumulieren teilweise in der Leber</li> </ul>
<p>Kollagen<sup>136,187</sup></p> <p><i>Strukturprotein der extrazellulären Matrix</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Wundabdeckung</li> <li>-Kapseln</li> <li>-Filme</li> <li>-Hydrogel</li> <li>-Partikel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-bioabbaubar</li> <li>-600-3000 Aminosäuren lang</li> <li>-biokompatibel</li> <li>-geringe antigene Wirkung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-in hohen Dosen bei intravenöser Applikation toxisch</li> <li>-geringe mechanische Belastbarkeit</li> </ul>
<p>Gelatine<sup>136</sup></p> <p><i>Stoffgemisch, dass aus Kollagen gewonnen wird</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hydrogele</li> <li>-Kapseln</li> <li>-Beschichtungen</li> <li>-Partikel</li> <li>-Verdickungsmittel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-biokompatibel</li> <li>-bioabbaubar</li> <li>-kann vernetzt werden</li> <li>-chemisch modifizierbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-quillt in Wasser</li> <li>-löst sich oberhalb von 50 °C auf</li> </ul>

Biopolymere besitzen insbesondere für den Einsatz im medizinischen und pharmazeutischen Bereich einen großen Vorteil gegenüber synthetischen Polymeren, ihre enorme Biokompatibilität. Sowohl die eingesetzten Moleküle und die verwendeten Lösungsmittel als auch die Abbauprodukte der natürlichen Polymere weisen meist eine gute Verträglichkeit auf. Es gibt allerdings auch innerhalb der Gruppe der Biopolymere Unterschiede. Natürliche Polymere unterteilen sich in zwei Hauptgruppen, proteinbasierte Polymere und Polysaccharide. Die Materialien beider Gruppen weisen Vor- und Nachteile auf, wobei die proteinbasierten Polymere, verglichen mit den Polysacchariden, einen großen Vorteil haben. Dieser liegt in der Biodegradationszeit. Einige Polysaccharide, z. B. Alginat, Dextran, Chitosan oder Hyaluronsäure, sind wasserlöslich und werden dadurch teilweise sehr schnell abgebaut, es sei denn sie wurden zusätzlich chemisch oder physikalisch vernetzt. Proteine können zwar auch vernetzt werden, sie weisen jedoch auch ohne diese zusätzliche Behandlung eine langsamere Degradation auf.<sup>136</sup> Durch einen sehr schnellen Abbau des Polymers, kann es gleichzeitig zu einer schnellen Wirkstofffreisetzung kommen, wodurch die Idee der langsamen und kontinuierlichen Freisetzung unterwandert wird. Biodegradation ist keine Voraussetzung für eine erfolgreiche Wirkstofffreisetzung, aber bioabbaubare Wirkstoffträger stellen die wichtigste Klasse im Bereich des kontrollierten Wirkstofftransports dar, da sie nicht wieder aus dem Körper entfernt werden müssen.<sup>123</sup>

Es gibt jedoch, neben der Bioabbaubarkeit, noch andere Faktoren, die einen wichtigen Einfluss auf die Verweildauer eines Wirkstoffträgers im Blut haben, beispielsweise die Opsonisation. Hierbei handelt es sich um einen Vorgang, bei welchem ein Partikel im Organismus spezifisch mit Plasma-Membran-Rezeptoren markiert wird, so dass diese durch Makrophagen erkannt und abgebaut werden. Verschiedene physikochemische Parameter haben einen Einfluss auf die Opsonisation, u. a. Ladung, Molekulargewicht, Form, Hydrophilie und Lipophilie eines körperfremden Partikels. Kationische Polymere beispielsweise treten in intensive elektrostatische Interaktionen mit den Plasma-Proteinen, Zellmembranen und Bindegewebe, so dass diese für Makrophagen markiert werden und dadurch schneller abgebaut werden. Anionische Polymere weisen eine längere Verweildauer im Blut auf als kationische. Ungeladene Partikel besitzen die längste Zirkulationshalbwertszeit.<sup>123</sup>

### 3.4 Sterilisationsmethoden

Aufgrund seiner natürlichen Bioabbaubarkeit und da es keine Entzündungsreaktionen hervorruft, eignen sich Seidenmaterialien besonders gut für den Einsatz im medizinischen Bereich.<sup>17</sup> Diese Eigenschaften sind jedoch für die Zulassung eines Produktes nicht ausreichend. Um eine Zulassung für ein medizinisches Produkt zu erhalten, muss gewährleistet sein, dass es steril ist und keine allergischen Reaktionen oder Entzündungsreaktionen auslöst. Hinzu kommt, dass durch die rekombinante Herstellung von Spinnenseide im Labor ihre natürliche Biokompatibilität nicht mehr unmittelbar gegeben ist, da bakterielle Kontaminationen auch durch die Genexpression in *E. coli* oder anderen Wirtsorganismen auftreten können. Industriell ist es meist technisch und finanziell nicht möglich, den vollständigen Herstellungsprozess eines Produktes unter sterilen Bedingungen ablaufen zu lassen. Dies ist vom Gesetzgeber jedoch auch nicht vorgeschrieben. Für die Herstellung von Arzneimitteln und Medizinprodukten gibt es klare Bestimmungen und Richtlinien, welche vom Bundesministerium für Gesundheit, von der Europäischen Kommission, der FDA (*Food and Drug Administration*, USA) und weiteren Behörden, zusammengestellt wurden. Diese sind unter dem Titel GMP-Bedingungen bekannt (*Good Manufacturing Practice*, Gute Herstellungspraxis) und werden in folgende zehn Elemente unterteilt: Produktion und Prozesskontrolle, Personalmanagement, Dokumentation, Kalibrierung, Validierung, Fehlermanagement, standardisierte Protokolle (*SOP – Standard operating procedures*), Benennung / Nomenklatur, Qualitätskontrolle und Überprüfungen sowie Anlagen und Ausstattung.<sup>188</sup> Alle Arzneimittel und Medizinprodukte müssen gemäß diesen Richtlinien produziert und gelagert werden, die Einhaltung dieser Bestimmungen wird regelmäßigen Kontrollen unterzogen.

Der einfachste Weg, um ein steriles Produkt zu erhalten ist, eine geeignete Behandlung nach der Herstellung. Die bekanntesten großtechnischen Sterilisationsmethoden sind autoklavieren und trockenes Erhitzen (thermische Sterilisation), Gammabestrahlung mit Kobalt (Co-60) (physikalische Sterilisation) oder eine Behandlung der Proben mit Chemikalien wie z. B. Ethylenoxid, Ethanol oder Ozon (chemische Sterilisation).

Seiden gelten im Gegensatz zu vielen anderen Faserproteinen, wie beispielsweise Kollagenen, als sterilisierbar. Insbesondere Autoklavieren scheint die Sekundärstruktur oder die Morphologie nicht zu beeinflussen.<sup>189</sup> Fibroin und rekombinante Spinnenseidenproteine wurden zusätzlich mit Gammastrahlen und Ethylenoxid behandelt oder in 70 % Ethanol inkubiert, auch diese Methoden scheinen auf den ersten Blick auf das Protein keinen Einfluss zu haben.<sup>17,71,189-191</sup> Weitere Versuche haben jedoch gezeigt, dass durch Gammastrahlen die Elastizitätseigenschaften von Fibroinfasern deutlich verändert wurden. Festigkeit und Dehnbarkeit verringern sich durch die Bestrahlung jeweils um etwa die Hälfte, die kristallinen Strukturen des Fadens verändern sich jedoch auch nach sehr hohen Bestrahlungsdosen nicht.<sup>192,193</sup> Es konnte gezeigt werden, dass bei vielen Proteinen bereits geringe Strahlendosen ausreichen, um Kettenabbrüche und Vernetzungsreaktionen auszulösen.<sup>194,195</sup> Auf Gelatine-Lösungen ebenso wie auch auf Chitosan haben Gammastrahlen ebenfalls einen dosisabhängigen Einfluss, insbesondere auf die Viskosität der Gelatine-Lösung,<sup>196</sup> aber auch auf die Glasübergangstemperatur und die elastischen Eigenschaften des Chitosans.<sup>197</sup> Diese Veränderungen sind auf Kettenbrüche zurückzuführen, welche wiederum von den Gammastrahlen ausgelöst werden, da diese chemische Bindungen, insbesondere auch Peptidbindungen, spalten.<sup>192</sup> Bei Gammabestrahlung ist die Dosis sehr stark von der sogenannten Vorverkeimung abhängig. Hierfür wird mikrobiologisch die Anzahl an keimbildenden Einheiten auf dem zu sterilisierenden Material bestimmt und anhand dieser Ergebnisse die Strahlen-Dosis errechnet. Normalerweise liegt diese für medizinische Produkte zwischen 30 und 50 kGy. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation hat die Bestrahlung von Nahrungsmitteln mit hohen Dosen Gammastrahlen keinen gesundheitsgefährdenden Einfluss auf den Menschen, der diese Nahrungsmittel konsumiert.<sup>196</sup>

Eine weitere, diskutierte Sterilisationsmethode ist die chemische Sterilisation mittels Ozon. Durch Ozon Behandlung können sowohl Prionen inaktiviert als auch pathogene Prionenproteine abgebaut werden.<sup>198</sup> Des Weiteren kann Ozon Bakterien und Protozoen abtöten und Viren zerstören, wobei diese Form der Desinfektion deutlich schneller ist, als eine Desinfektion mit Chlor. Das kann darauf zurück geführt werden, dass Ozon direkt durch Zelllyse und durch die Zerstörung von Zellwänden Mikroorganismen

abtötet. Diese Methode hat jedoch im Bezug auf die Sterilisation von Proteinen auch Nachteile. Aromatische Aminosäuren reagieren direkt mit Ozon, insbesondere Tryptophan und Tyrosin, so dass es zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen kommen kann. Zusätzlich wird die Löslichkeit von Proteinen die viele Cysteine enthalten, aufgrund von Thiolbindungen, verschlechtert und fallen dadurch schneller aus. Dies geschieht jedoch nur bei einer Behandlung von gelöstem Protein mit Ozon. Im festen Zustand konnte keine Proteinschädigung bzw. Veränderung durch Ozon nachgewiesen werden.<sup>199</sup> Verglichen mit Gammastrahlen führt Ozon jedoch nicht zu Kettenabbrüchen. Die Behandlung mit Ethylenoxid (EO) zählt ebenfalls zu den chemischen Sterilisationsmethoden.<sup>194</sup> Sie eignet sich besonders für Materialien, die sehr Hitze-, Feuchtigkeits- oder Strahlungssensitiv sind. Es handelt sich bei EO um ein farbloses, aber sehr toxisches Gas. Aus diesem Grund müssen Materialien, die mit EO behandelt wurden, lange entlüftet werden um sicherzustellen, dass keine Reste mehr im Produkt zurück bleiben, die im Organismus zu Schäden führen können oder den Heilungsprozess verlangsamen.<sup>190,200</sup> Auch das Produkt selbst kann durch EO verändert werden, die Aminosäuren Lysin und Hydroxylysin reagieren mit EO, wodurch sowohl der pI als auch die Stabilität der Proteine beeinflusst wird.<sup>194,195</sup>

### 3.5 Zielsetzung

Natürliche Spinnenseide ist für ihre gute Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und ihre außerordentlichen mechanischen Eigenschaften bekannt. Bereits seit hunderten von Jahren findet Sie in verschiedenen Bereichen Anwendung, unter anderem in der Medizin zur Wundversorgung und als Nahtmaterial.

Durch die rekombinante Herstellung von Spinnenseidenproteinen ist es nun möglich, diese in großem Maßstab herzustellen und in verschiedene Morphologien zu überführen, welche in unterschiedlichen medizinischen und technischen Bereichen Anwendung finden können.

Seidenpartikel wurden bereits als mögliche Wirkstofftransportsysteme charakterisiert und das Be- und Entladeverhalten analysiert. Letzteres war bei gut wasserlöslichen Wirkstoffen zu schnell, um die Seidenpartikel als Wirkstofftransporter einsetzen zu können. Hier sollte durch zusätzliche Vernetzungsprozesse und neue Belademechanismen eine bessere Beladung und eine verlängerte Wirkstofffreisetzungsdauer erzielt werden. Hierfür wurde Rhodamin B als Modellwirkstoff verwendet. Da partikuläre Systeme sowohl als Transportsysteme im medizinischen Bereich als auch als mögliche Füllstoffe in Kompositmaterialien einer starken mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind, ist es wichtig, das mechanische Verhalten der Partikel zu bestimmen. Unter Verwendung der *Colloidal Probe Technique* wurden sowohl die mechanischen Eigenschaften als auch die Oberflächeneigenschaften der Partikel analysiert. Mit Hilfe der daraus gewonnenen Daten können mögliche Anwendungsbereiche besser ausgewählt und charakterisiert werden.

Die Optimierung der Herstellung von Kapseln aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) stellte einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Die Herstellung von Kapseln ist bereits seit mehreren Jahren bekannt und publiziert, allerdings konnte bislang keine biomedizinisch relevante Anwendung der Kapseln gezeigt werden. Der herkömmliche Herstellungsprozess basiert jedoch auf der Verwendung des als gesundheitsgefährdend eingestuften Toluols. In einem neuen Prozess sollte Toluol durch das unbedenkliche Silikonöl ersetzt werden, um mittels dieser neuen Herstellungsvariante ein geeignetes Verpackungssystem für aktive



Wirkstoffe und Enzyme zu generieren. Dies wurde am Beispiel  $\beta$ -Galaktosidase gezeigt. Des Weiteren sollte gezeigt werden, dass das Enzym auch nach dem Herstellungsprozess noch aktiv ist und durch die Proteinhülle vor Proteasen geschützt wird. Zusätzlich sollte eine nachträgliche Aktivierung verkapselter Enzyme erprobt werden, wodurch sich neue Anwendungsgebiete in Medizin und Biotechnologie aufzeigen würden. Um möglichst homogene Kapseln herzustellen, sollte zudem die Mikrofluidik als Herstellungsmethode getestet werden.

Um rekombinant in Bakterien hergestellte Proteine im medizinischen Bereich anwenden zu können, muss die Sterilität der Proteine bzw. des fertigen Produkts gewährleistet sein. Aus diesem Grund wurden verschiedene bekannte Sterilisationsverfahren im Hinblick auf ihre Auswirkungen auf eADF4(C16) hin getestet und analysiert.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle weiteren verwendeten Chemikalien von den Firmen Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland oder Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, mit dem Reinheitsgrad p. a. bezogen. Zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurde ultrareines Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Billerica, MA, USA) verwendet.

Chemikalien	Firma
(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
3-Aminopropyl-diisopropylethoxysilan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ameisensäure, p. a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol, p. a.	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran (Molekulargewichte: 3-5 kDa, 20 kDa, 40 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fluoreszein-NHS	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Glyzerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hellmanex®III	Hellma GmbH & Co.KG, Mühlheim, Deutschland
Klebstoff, 2-Komponenten (UHU Endfest 300)	UHU GmbH & Co.KG, Bühl, Deutschland
Klebstoff, UV-härtend (Norland Optical Adhesives Nr. 63)	Norland Products, Cranbury, NJ, USA
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polydimethylsiloxan Sylgard 184	Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Sigmacote®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

#### 4.1.2 Materialien

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

Material	Firma
Aluminiumoxid-Tiegel für TGA	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Aluminium-Tiegel für DSC	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Dialysemembran (6-8 kDa)	Spektra/Por, Rancho Dominguez, CA, USA
Feindosierungsspritze 1 ml (Injekt® F Solo)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen 4 ml (Omnifix® Solo)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß (Safe-Lock) 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatte 96-well, schwarz	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Mikrotiterplatte 24-well, klar	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Platine (unbearbeitet)	Bungard Elektronik GmbH & Co.KG, Windeck, Deutschland
Polystyrol-Röhrchen (15 ml, 45 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PVDF-Membran	GE Healthcare GmbH, München, Deutschland
Original Perfusor®-Leitung, PE	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Quarzglas Suprasil Küvetten	Hellma GmbH & Co.KG, Mühlheim, Deutschland
REM-Probenhalter	Agar Scientific Ltd., Essex, UK
Silikat-Kugeln (20-50 µm) (Mikromechanik)	Polysciences Europe GmbH, Eppenheim, Deutschland
Silikat-Kugeln (direkte Kraftmessungen), Ludox AM 30	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Thermanox™ <i>plastic cover slips</i>	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Whatman® Chromatographiepapier 3MM CHR	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe Deutschland

#### 4.1.3 Größenstandards und Kits

Molekulargewichtsstandard: *ColorPlus Prestained Protein Marker 7-175 kDa*  
(New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland)

ECL *western blot detection kit*: Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA

#### 4.1.4 Proteine und Antikörper

Antikörper:	T7-Tag <i>HRP conjugate</i> (Novagen, Madison, WI, USA) aus der Maus, Verdünnung: 1:10000 in PBS mit 1 % (w/v) Milchpulver
Endoproteinase AspN	<i>Sequencing grade</i> , aus <i>Pseudomonas fragi</i> mutant, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
$\beta$ -Galactosidase:	<i>Grade VI</i> , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
$\beta$ -Galactosidase Fragmente:	ED28 (Peptid) und EA22 (Akzeptor) beide $\alpha$ -Komplementations-Untereinheiten wurden von Dr. Alfons Nichtl (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) synthetisiert.

#### Rekombinante Spinnenseidenproteine, basierend auf ADF4 (*A. diadematus*):

Rekombinantes Spinnenseidenprotein	Molekulargewicht	Quelle
eADF4(C8)	24,6 kDa	Daniel Hümmerich
eADF4(C16)	47,7 kDa	Daniel Hümmerich
eADF4(C32)	93,8 kDa	Daniel Hümmerich

#### 4.1.5 Puffer und Lösungen

##### SDS-PAGE

Trenngelpuffer (4x):	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,8 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer (2x):	250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS
Auftragspuffer (5x) (Lämmli):	10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 300 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 25 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
Laufpuffer (10x):	250 mM Tris/HCl (pH 8,8), 2 M Glyzin (v/v), 1 % (w/v) SDS

Zusammensetzung der SDS-Gele

5 % Sammelgel:	Sammelgelpuffer (1x), 5 % Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, 0,2 % (w/v) SDS, 0,13 % (w/v) APS, 0,066 % (v/v) TEMED
12 % Trenngel:	Trenngelpuffer (1x), 12 % Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, 0,1 % (w/v) SDS, 0,065 % (w/v) APS, 0,033 % (v/v) TEMED

Silberfärbung

Fixierlösung I (Fix I):	30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Fixierlösung II (Fix II):	0,4 M Natriumacetat (pH 6,0), 0,5 % (v/v) Eisessig, 30 % (v/v) Ethanol, 0,1 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silberfärbelösung:	6 mM AgNO <sub>3</sub> , 0,025 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung:	0,35 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,04 % (v/v) Formaldehyd
Stopplösung:	50 mM EDTA, pH 7,5

Western Blot

Transferpuffer:	48 mM Tris, 39 mM Glyzin, 1,3 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol
PBS:	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O, 115 mM NaCl (pH 7,4)
Blocking-Reagenz:	PBS-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver

Sonstige Lösungen

Puffer Z:	100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7), 10 mM KCl, 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 50 mM 2-Mercaptoethanol
Matrix-Lösung:	20 mg/ml Sinapinsäure in 50 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure in H <sub>2</sub> O

Ätzlösung (Platine): 20 % H<sub>2</sub>O, 20 % HCl<sub>konz</sub> und 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.1.6 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Blot-Apparatur	Fastblot B44	Biometra, Göttingen, Deutschland
<i>Cantilever</i>	hart: NSC 14 weich: NSC 36 / CSC 17 NSC 12 (silikon) SNL-10 (Silikon-Nitrit)	MikroMasch, Tallinn, Estland  Bruker Corporation, Bremen, Deutschland
Exsikkator	Novus mit Tubusdeckel	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Feuchtigkeitsanalysegerät	IGASorp	Hidden Analytical, Kochel am See, Deutschland
<i>Fluoreszenzimager</i>	Ettan DIGE	GE Healthcare, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMI3000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Fluoreszenzspektrometer	FP-6500	Jasco GmbH, Essex, UK
FTIR-Spektrometer	Tensor 27 IR-Spektrometer Detektor: MCT Messeinheit: MIRacle Germanium ATR Kristall	Bruker Corporation, Bremen, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur	Mighty Small II SE250 basic	Hoefer Inc., Holliston, Ma, USA
Hochdruckhomogenisator	Panda 2K	GEA Niro Soavi, Lübeck, Deutschland
Konfokales <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop	DMI 6000 CS Scankopf: TCS SP5	Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Deutschland
Lichtmikroskop mit Schwarz-Weiß-Kamera	Leica DMI 3000 B (Mikroskop) Leica DFC340FX (Kamera)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lyophilie	Alpha 1-2 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Kalorimeter	DSC/SDTA 821e	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Massenspektrometer	Bruker Reflex III	Bruker Corporation, Bremen, Deutschland

Ofen	Heraeus Function Line	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA
pH-Meter	Lab 850	SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Platereader</i>	Mithras LB 940	Berthold Technologies, Spremlingen, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	1540ESB Cross Beam	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	LEO 1530VP-FESEM	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Rasterkraftmikroskop mit inversem optischen Mikroskop	NanoWizard® I (AFM)	JPK Instruments, Berlin, Deutschland
	Axiovert 200 (Mikroskop)	Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland
Rasterkraftmikroskop	MFP-3D	Asylum Research, CA, USA
Rollenschüttler	Stuart SRT 1	Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, UK
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Spritzenpumpen	Harvard 33	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Thermogravimeter	SDTA 861e	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Thermomixer	Thermo Compact/Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Überkopfschüttler	Intelli Mixer	neoLab Migge Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ultrazentrifuge	Optima MAX-XP	Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA
UV/Vis-Spektrometer	Cary50 Bio	Varian, Darmstadt, Deutschland
Vortex Schüttler	VV3	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waagen	CPA225D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	Ohaus Pioneer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Biofuge primo R	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	Heraeus Fresco 17	
	Heraeus Pico 17	



Zetaview	Heraeus Multifuge 3SR+ Sorvall RC 6 plus Zetaview PMX 100	Particle Metrix GmbH, Meerbusch, Deutschland
----------	---	---

#### 4.1.7 Computerprogramme

Adobe Illustrator CS5:	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Adobe Photoshop CS5:	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Adobe Reader 9.0:	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
ImageJ 1.45s:	Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA
Leica Application Suite:	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Office 2007:	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
OriginPro 8.1G:	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
OPUS software:	Bruker AXS Inc., Madison, WI, USA
Stare Software:	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
ExPASy-SIB Bioinformatics Resource Portal:	<a href="https://expasy.org">https://expasy.org</a>

## 4.2 Reinigung der rekombinanten Spinnenseidenproteine

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Proteinen handelt es sich um am Lehrstuhl Biomaterialien etablierte Konstrukte. Die Fermentation und Ernte der transformierten *E. coli* Bakterien im 30 L Maßstab wurde von Andreas Schmidt und Johannes Diehl durchgeführt. Die geernteten Bakteriensuspensionen wurden anschließend im schockgefrorenen Zustand bereitgestellt.

Die Reinigung aller verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine wurde analog des für eADF4(C16) etablierten Protokolls durchgeführt.<sup>98</sup> In einem ersten Schritt wurden die Zellpellets aufgetaut. Alle weiteren Schritte wurden, bis zur Fällung des

Proteins mit Ammoniumsulfat, auf Eis durchgeführt. Der aufgetauten Zellsuspension wurden unter Rühren Proteaseinhibitoren und Oxidationshemmer (PMSF, EDTA und Na-Ascorbinsäure) zugesetzt. Da die rekombinanten Spinnenseidenproteine durch *E. coli* nicht ins Medium sekretiert wurden, sondern innerhalb der Bakterienzellen vorlagen, mussten die Zellwände für die Extraktion des Proteins aufgeschlossen werden. Dies erfolgte unter Verwendung eines Hochdruckhomogenisators (drei Durchläufe mit jeweils 800 bar). Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt (45 min, 30.000x g, 4 °C) und verworfen, der Überstand mit den löslichen eADF4 Proteinen wurde aufgefangen und anschließend für 20 min auf 75-80 °C erhitzt (Hitzeschritt). Bei diesen hohen Temperaturen denaturierten viele *E. coli* Proteine, wobei die rekombinanten Spinnenseidenproteine stabil in Lösung blieben. Die unerwünschten, Hitze-denaturierten Proteine wurden anschließend wiederum durch Zentrifugation (10 min, 17.700x g, 4 °C) sedimentiert und der Überstand aufgefangen. Um die gewünschten eADF4 Proteine aus dem Überstand zu gewinnen, wurden diese mit 20 % (w/v) Ammoniumsulfat für 60 min bei Raumtemperatur aus dem Überstand präzipitiert und anschließend abzentrifugiert (30 min, 17.700x g, 20 °C). Etwaig copräzipitierte *E. coli* Proteine wurden aus dem erhaltenen Proteinpellet durch einen zusätzlichen Waschschrift mit 8 M Harnstoff entfernt und das eADF4 Proteinpellet dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> gewaschen, um mögliche Harnstoffreste zu entfernen. Für die Trocknung der Proteine wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer Lyophilie über Nacht gefriergetrocknet. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die Bestimmung der Reinheit der Proteine erfolgte durch Fluoreszenzspektroskopie (Kapitel 4.4.2), UV/Vis-Spektroskopie (Kapitel 4.4.1) und SDS-PAGE (Kapitel 4.3.1) mit Silberfärbung (Kapitel 4.3.2) und Western Blot (Kapitel 4.3.3).

### **4.3 Proteinanalytische Methoden**

#### **4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Gelelektrophorese ist eine Methode, bei der Moleküle entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Laufverhalten ist hierbei abhängig von der Maschengröße des Gels, welche wiederum von der Konzentration des Trenngels abhängig ist. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Sonderform der

Elektrophorese. Hierbei lagern sich SDS-Moleküle unspezifisch an die aufzutrennenden Proteine an (1,4 g SDS/g Protein) und sorgen somit für einen denaturierenden Zustand.<sup>201</sup> Zusätzlich werden die Eigenladungen des Proteins durch das anionische Tensid SDS maskiert, wodurch die Auftrennung der Proteine in der porösen Polyacrylamidmatrix nicht mehr Eigenladungs- oder Tertiärstrukturabhängig, sondern Größenabhängig ist. Zur Auftrennung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurde das diskontinuierliche System nach Lämmli verwendet.<sup>201,202</sup> Hierfür wurden Trenngele mit 12 % Acrylamid eingesetzt, die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5 %. Vor dem Auftragen der Proteinproben auf das Gel wurden die Proben mit 5x Auftragspuffer nach Lämmli versetzt und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert.<sup>201,202</sup> Die Gele liefen bei konstanter Stromstärke (25 mA/Gel) für 45 bis 60 min. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine aufgetragen. Für eine Analyse mittels Silberfärbung wurden 10 µg Protein pro Tasche aufgetragen, für den spezifischen Nachweis der Proteine mittels Western Blot 1 µg.

#### **4.3.2 Silberfärbung**

Zur Sichtbarmachung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde Silberfärbung verwendet.<sup>203</sup> Diese Methode besitzt, je nach Protein, eine Nachweisgrenze von 5-30 ng. Es kommt hierbei zu einer Komplexbildung zwischen Silberionen und verschiedenen Proteinseitenketten, wobei die Silberionen der Komplexe durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert werden. Bei dieser Methode ist es wichtig, die aufgetrennten Proteine vor der Färbung im Gel zu fixieren.<sup>201</sup> Hierfür wurden die Gele zuerst für 10 min in Fix I und anschließend für 30 min in Fix II geschwenkt. Nach drei darauf folgenden Waschschritten mit H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> folgte die Inkubation des Gels unter Lichtausschluss für 30-45 min in Silberfärbelösung. Die Entwicklung der Gele erfolgte durch Zugabe der Entwicklerlösung, dadurch wurden die vom immobilisierten Protein gebundenen Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Sobald die gewünschte Bandenintensität erreicht war, wurde die Reaktion durch Zugabe eines starken Komplexbildners als Stopplösung (50 mM EDTA, pH 7,5), unterbunden, welcher die restlichen Silberionen komplexierte.

### 4.3.3 Western Blot

Für die Identifikation der gewünschten Proteine wurde ein Western Blot durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine mittels Elektrophorese aus einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen, an welcher sie aufgrund von hydrophoben oder ionischen Wechselwirkungen binden.<sup>201</sup> In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit PVDF-Membranen gearbeitet. Hierbei wurde der durch den Expressionsvektor angefügte T7-Tag der eADF4 Proteine mittels spezifischer Antikörper auf der PVDF-Membran nachgewiesen. Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran erfolgte durch Anlegen einer Spannung für 90 min in einer Blotting Apparatur. Die angelegte Stromstärke betrug  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  SDS-Gel. Zur Aktivierung der hydrophoben PVDF-Membran vor dem Blotvorgang wurde diese für 20-30 sek in Methanol inkubiert und anschließend drei Mal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  gewaschen. Die aktivierte Membran wurde daraufhin zusammen mit dem SDS-Gel und Whatman®-Filterpapier für 10-15 min in Transferpuffer geschwenkt. Für den Blotvorgang wurden die einzelnen Bestandteile wie folgt aufeinander gestapelt: 5x Whatman®-Filterpapier, 1x PVDF-Membran, SDS-Gel und 5x Whatman®-Filterpapier. Hierfür wurden sowohl das Filterpapier als auch die PVDF-Membran auf die entsprechende Größe des Gels zugeschnitten. Der vollständige Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran konnte anhand der Übertragung des *Prestained*-Markers überprüft werden.

Nach Abschluss des Blotvorgangs, vor Zugabe der entsprechenden Antikörperlösung, wurden die freien Bindungsstellen der PVDF-Membran mit Blocking-Reagenz abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für 45 min in einer Antikörperlösung (T7-Tag *HRP conjugate* aus der Maus) mit entsprechender Verdünnung inkubiert und danach drei Mal mit PBS gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Detektion des Protein-Antikörper-Komplexes erfolgte mittels *ECL western blot detection kit* nach Herstellerangaben in einem *Fluoreszenzimager* unter Verwendung der *Deep Purple 2*-Einstellungen (Extinktions-Filter: 390/20 nm, Emissions-Filter 595/25 nm, Expositionszeit 400 ms).

## 4.4 Spektroskopische Methoden

### 4.4.1 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren der sterilisierten Proteinproben, in wässriger Lösung (10 mM Tris/HCl, pH 8), wurden in einem UV/Vis-Spektrometer im Bereich von 250 bis 400 nm aufgenommen und dienen der Konzentrationsbestimmung der Proteine in wässriger Lösung nach Lambert-Beer. Das Lambert-Beersche-Gesetz (Gleichung 1), beschreibt den Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration ( $c$ ) in mol/l, wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten ( $\varepsilon_\lambda$ ), Schichtdicke der Küvette ( $d$ ) in cm und der gemessenen Extinktion ( $E_\lambda$ ).

$$E_\lambda = \varepsilon_\lambda * c * d \quad \text{Gleichung 1}$$

Der Extinktionskoeffizient der Proteine ist hierbei zu einem großen Teil von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin und zu einem geringen Teil von Phenylalanin und Cystein abhängig. Die mit Hilfe des Programmes *ProtParam* berechneten Extinktionskoeffizienten (280 nm, gemessen in Wasser) sind Tab. 4.1 zu entnehmen und wurden aus den Extinktionskoeffizienten von Tryptophan, Tyrosin und Cystein berechnet (*ExpASy*).

**Tab. 4.1:** Extinktionskoeffizienten einiger rekombinanter Spinnenseidenproteine, bestimmt unter Verwendung des Programms *ProtParam*, basierend auf der Absorption bei 280 nm in Wasser und einer 1 mg/ml Proteinlösung. Gemessen wurde jeweils in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke.

Protein	Extinktionskoeffizient ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
eADF4(C8)	23.840
eADF4(C16)	47.680
eADF4(C32)	95.360

Die UV/Vis-Spektren wurden entweder an einem Cary50 Bio Spektrometer der Firma Varian aufgenommen, oder an einem NanoDrop ND-1000 der Firma Thermo Scientific. Für die Messungen im Cary50 Bio wurden Quarzglas Suprasil Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und einer minimalen Füllmenge von 200  $\mu$ l verwendet. Für die Messungen am NanoDrop ND-1000 wurden 3  $\mu$ l wässrige Proteinlösung benötigt.

#### 4.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie kann die Fluoreszenz verschiedener aromatischer Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin) detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt, um die Reinheit des eingesetzten, gelösten Proteins zu überprüfen. eADF4 Proteine besitzen in ihrer Aminosäuresequenz kein Tryptophan, so dass ein Tryptophan-Emissionsspektrum auf Verunreinigungen durch Fremdproteine oder Mutationen schließen lässt.

Emissionsspektren der wässrigen Proteinproben wurden nach Anregung bei 278 nm für die Aminosäure Tyrosin und bei 295 nm für Tryptophan in einem Fluoreszenzspektrometer über einen Wellenlängenbereich von 300 bis 450 nm aufgezeichnet. Hierbei liegt die maximale Emission der Tyrosine bei 305 nm, und die der Tryptophane bei 300-350 nm. In Tab. 4.2 können die am Gerät eingestellten Parameter nachgelesen werden.

**Tab. 4.2:** Messparameter für die Fluoreszenzspektroskopie zur Ermittlung der Reinheit von Proteinproben nach der Reinigung.

Parameter	Tyrosin	Tryptophan
Anregungswellenlänge	278 nm	295 nm
Aufnahme der Emission	300-450 nm	300-450 nm
Spaltbreiten Ex/Em	5 nm	5 nm
Sensitivität	medium	medium
Integrationszeit	0,5 sek	0,5 sek
Scan-Geschwindigkeit	100 nm/min	100 nm/min

Für die Messungen wurden Quarzglas Suprasil Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

#### 4.4.3 Fourier transformierte Infrarot (FTIR-)Spektroskopie

Proteinspektren von unbehandelten, sterilisierten, ebenso wie von chemisch vernetzten eADF4(C16) Partikeln im dehydratisierten Zustand wurden mittels FTIR-Spektroskopie unter Verwendung eines Germaniumkristalls mit der ATR-Methode (*attenuated total reflexion*) aufgezeichnet („Miracle“-Zubehör des Tensor 27, Bruker). Die Spektren sollen Aufschluss über etwaige Veränderungen in den Sekundärstrukturanteilen (Amid I und

Amid II) der behandelten Proteine geben. Mittels FTIR-Spektroskopie ist es möglich, bis zu neun verschiedene, für Proteine relevante Banden (Amid Banden) zu identifizieren, welche sich auf Schwingungen innerhalb des Peptidrückgrates beziehen.<sup>204,205</sup> Für die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von Proteinen sind jedoch lediglich zwei Bereiche, die Amid I und II Banden der Spektren von Bedeutung, da insbesondere der Amid I Bande ( $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) die C=O Streckschwingung zugrunde liegt, welche zum Großteil auf die Peptidbindungen zurück geht. In Tab. 4.3 sind typischen Absorptionsbanden mit den ihnen zugeordneten Protein-Sekundärstrukturen zusammengefasst.<sup>206,207</sup>

**Tab. 4.3:** Typische Absorptionsbereiche mit den ihnen zugeordneten Protein-Sekundärstrukturen.<sup>206,207</sup>

Sekundärstruktur	Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ ) Amid I	Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ ) Amid II
$\alpha$ -Helix	1656-1662	1540-1550
$\beta$ -Faltblatt	1622-1637 (stark) 1697-1703 (schwach)	1520-1530
$\beta$ -turn ( $\beta$ -Schleifen)	1663-1696	
unstrukturiert ( <i>random coil</i> )	1638-1655	1520-1545

Für die Aufnahme von FTIR-Spektren in dieser Arbeit wurden pro Probe 20 Spektren mit jeweils 1400 Datenpunkten und einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$  im Bereich von  $1900\text{ bis }800\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen und zusätzlich ein Hintergrundspektrum durch die Software OPUS verrechnet. Nachträglich wurden die Spektren durch Grundlinienkorrektur korrigiert.

#### 4.4.4 Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

Die in dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Analysen erfolgten mittels MALDI-TOF. MALDI beschreibt hierbei die Ionisierungsart (*Matrix-assisted laser desorption and ionization*), TOF den Analysator (*Time of flight*). Für die hier verwendete Ionisierung der Probe wird diese auf einer Matrix immobilisiert. Die Matrixmoleküle übertragen Protonen auf die Probe, so dass diese eine oder mehrere positive Ladungen aufweist. Wird die Matrix mit eingebetteter Probe Laserbeschuss ausgesetzt, verdampft diese explosionsartig und reißt dabei die Probe mit sich, welche gleichzeitig ionisiert wird. Die Proteinionen gehen hierbei in die Gasphase über und werden anschließend in

den Analysator eingespeist und detektiert. Bei dem hier verwendeten Detektor handelt es sich um einen Flugzeitanalysator. Durch Anlegen einer Beschleunigungsspannung wandern die Proteinionen im elektrischen Feld, wobei die Flugzeit in Abhängigkeit des Masse-zu-Ladungsverhältnisses dargestellt wird.<sup>201,208</sup>

In dieser Arbeit wurde MALDI-TOF eingesetzt, um den Einfluss verschiedener Sterilisationsmethoden auf eADF4(C16) Proteine nachzuweisen. Für die Probenvorbereitung wurden Proteine in wässriger Lösung mit der Matrix-Lösung auf eine Konzentration von 20 µM in 5 mM Tris/HCl (pH 8) verdünnt. Die massenspektrometrische Untersuchung mittels MALDI-TOF wurde an einem Gerät der Firma Bruker am Lehrstuhl Makromolekulare Chemie II der Universität Bayreuth durchgeführt. Dieses Gerät ist ausgestattet mit einem 337 nm N<sub>2</sub>-Laser im linearen Modus und einer Beschleunigungsspannung von 20 kV.

## **4.5 Proteinpräparative Methoden**

### **4.5.1 Dialyse**

Für viele der biochemischen Analysen, aber auch für proteinpräparative Methoden, werden die sterilisierten eADF4 Proteine in denaturierter Form in wässriger Lösung verwendet. Um dialysiertes Protein in eine wässrige Lösung zu überführen, wurde dieses in 6 M GdmSCN ca. 30 min denaturiert und anschließend in Dialyseschläuche mit einer molekularen Ausschlussgröße von 6.000 – 8.000 Da überführt. Die Dialyse erfolgte über Nacht gegen einen mindestens 1.000-fachen Volumenüberschuss 10 mM Tris/HCl (pH 8) oder 10 mM HEPES (pH 8) (je nach späterer Verwendung) bei Raumtemperatur. Der verwendete Puffer wurde währenddessen mindestens vier Mal gewechselt. Nach beenden der Dialyse wurde die Proteinlösung abzentrifugiert (60 min, 186.000x g, 15 °C), um mögliche Aggregate zu sedimentieren. Die dialysierten, wässrigen Proteinlösungen wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **4.5.2 Chemische Kopplung von 5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Fluoreszein) an eADF4(C16)**

NHS-Ester können unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid an primäre Amine binden. eADF4 Proteine verfügen über eine N-terminale Amin-Gruppe, welche sich für Kopplungsreaktionen mit NHS-Ester eignen. Durch den Einsatz von fluoreszierenden



NHS-Derivaten ist es somit möglich, unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe N-Terminal an eADF4(C16) zu koppeln. In der vorliegenden Arbeit wurde NHS-Fluoreszein verwendet. Für die Kopplungsreaktion wurde ein 20-facher molarer Überschuss des NHS-Fluoreszein (20 mM in DMF) mit der wässrigen eADF4(C16) Lösung in 10 mM HEPES-Na (pH 8) für 2 Stunden unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde das Protein mit 1 M Kaliumphosphat (pH 8) gefällt, das nicht-gekoppelte NHS-Fluoreszein blieb hierbei in Lösung. Durch Zentrifugation wurde das präzipitierte Protein anschließend sedimentiert und drei Mal mit  $H_2O_{MQ}$  gewaschen. Im Anschluss daran wurde das Protein gefriergetrocknet. Die weitere Verwendung des Proteins (Denaturierung, Dialyse) erfolgte analog zu den nicht-fluoreszierenden eADF4 Proteinen (Kapitel 4.5.1).

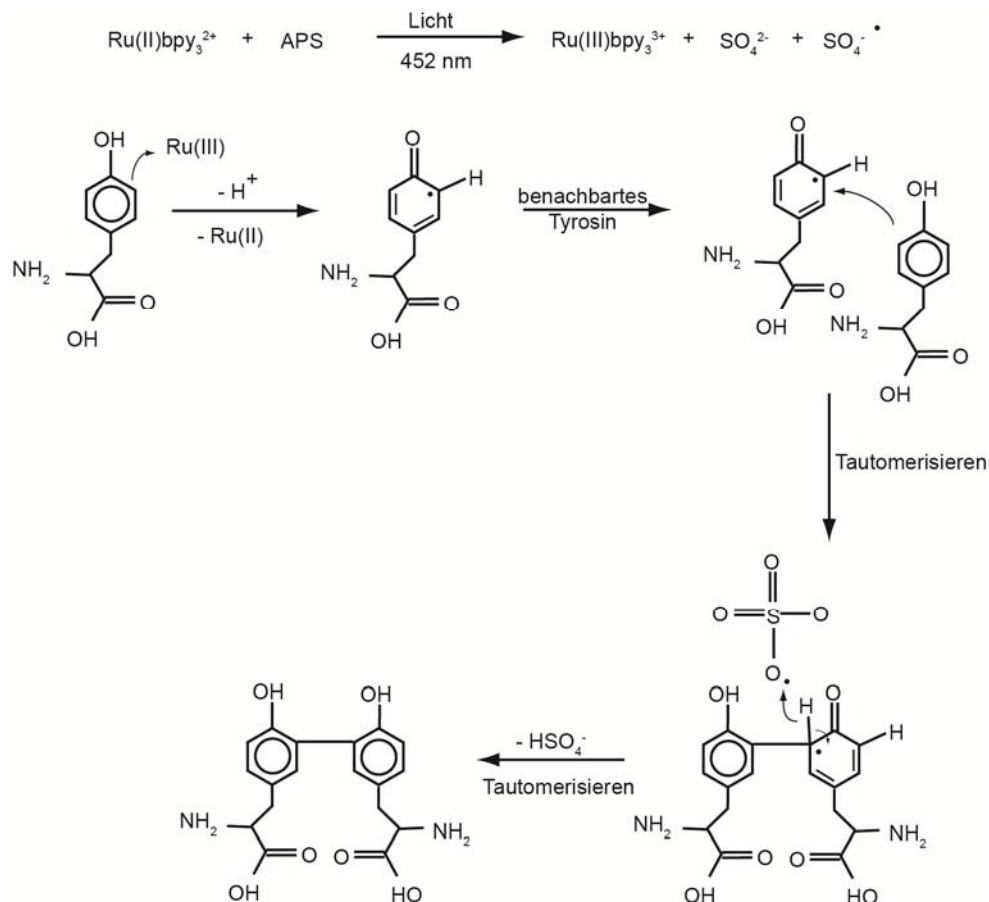
## **4.6 Proteinverarbeitende Methoden - Partikel**

### **4.6.1 Herstellung von Mikropartikeln**

Die Herstellung von Mikropartikeln aus den rekombinanten Spinnenseidenproteinen eADF4(C8), eADF4(C16) und eADF4(C32) beruht auf der gezielten Präzipitation der Proteine mit kosmotropen Salzen. Der postulierte Mechanismus der Partikelassemblierung ist in Kapitel 3.2.2.1, Abb. 3.6 zusammengefasst. Die Größe der präzipitierten Partikel ist abhängig von der Proteinkonzentration in der wässrigen Lösung und der Mixintensität während des Präzipitationsschrittes.<sup>103,104</sup> Für die Herstellung von Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 400 und 600 nm, wurde eine 50  $\mu$ M Proteinlösung (in 10 mM Tris/HCl, pH 8) nach der Dialyse durch Resuspendieren (Pipette) mit 2 M Kaliumphosphat (pH 8) im Verhältnis 1:1 innerhalb weniger Minuten ausgefällt. Um Partikel mit einem Durchmesser größer als 1  $\mu$ m herzustellen, erfolgte der Präzipitationsschritt langsamer. Hierfür wurde die wässrige Proteinlösung 45 min gegen das 100-fache Volumen 1 M bzw. 2 M Kaliumphosphat (pH 8) bei Raumtemperatur dialysiert. Die präzipitierten Partikel wurden nach der Herstellung abzentrifugiert (10 min, 17.000x g, 20 °C) und je nach Anwendung drei Mal mit  $H_2O_{MQ}$  bzw. mit 10 mM Tris/HCl (pH 8) gewaschen.

#### 4.6.2 Chemische Vernetzung der eADF4 Partikel

Die chemische Vernetzung der eADF4 Partikel erfolgte mit dem von Fancy und Kodadek beschriebenen Prozess (Abb. 4.1).<sup>209</sup> Bei dieser Vernetzungsstrategie werden durch Rubpy ((2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II)) und APS (Ammoniumpersulfat) Proteine über aromatische Seitenketten vernetzt. Rubpy und APS wirken hierbei als Initiator einer radikalischen Reaktion (Abb. 4.1). Dies geschieht über die Photolyse von Rubpy in Anwesenheit von APS mit Licht im sichtbaren Bereich (452 nm). Dadurch entsteht Ru(III), ein sehr wirkungsvolles Ein-Elektronen-Oxidant und ein Sulfat-Radikal. Ru(III) kann leicht aromatische Proteinseitenketten oxidieren, wodurch ein Radikal entsteht, welches gegebenenfalls mehrere, in räumlicher Nähe befindliche aromatische Gruppen angreifen kann und dadurch zu stabilen C-C-Bindungen und Kopplung von Arenen führt.<sup>209</sup> Diese Vernetzungsstrategie eignet sich gut für die eADF4-Moleküle, da jedes C-Modul zwei Tyrosine besitzt, welche auf diese Weise durch die Bildung von di-Tyrosinen inter- und intramolekular vernetzt werden.



**Abb. 4.1:** Postulierte Vernetzungsstrategie von aromatischen Aminosäuren durch APS und Rubpy.<sup>209</sup> Durch Licht wird Rubpy in der Anwesenheit von APS oxidiert, dadurch können die Aromaten ebenfalls oxidiert

werden und eine radikalische Reaktion starten. Im Fall von eADF4 kommt es dadurch zur Ausbildung von di-Tyrosinen.

Es wurde bereits gezeigt, dass Rubpy und APS unterschiedliche Assemblierungsformen von eADF4(C16) chemisch vernetzen können, dazu zählen Hydrogele<sup>210,211</sup> und Kapseln.<sup>100</sup> Sowohl bei Hydrogelen als auch bei Kapseln ist eine verbesserte chemische und enzymatische Stabilität beobachtet worden, bei den Hydrogelen konnten zusätzlich Veränderungen im rheologischen Verhalten erzielt werden, die zuvor nicht gegeben waren.<sup>100,210</sup>

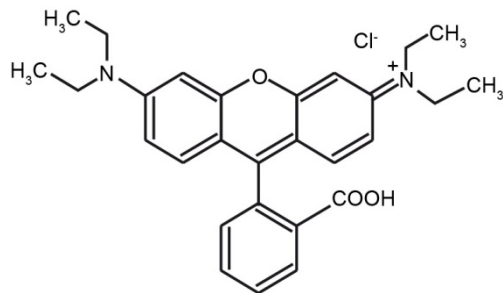
In der vorliegenden Arbeit wurde ein zweifacher molarer Überschuss Rubpy und ein 200-facher Überschuss APS entweder direkt mit der wässrigen Proteinlösung vermischt und zusammen ausgefällt (co-Präzipitation) oder mit bereits gebildeten Partikeln über Nacht im Dunkeln inkubiert, so dass die Vernetzermoleküle in die Partikel hinein diffundieren konnten. Der Vernetzungsprozess beider Routen wurde durch Licht im sichtbaren Bereich initiiert. Hierfür wurden die Partikel 2 min mit einer handelsüblichen Wolframlampe bestrahlt. Anschließend wurden die chemisch vernetzten Partikel abzentrifugiert (10 min, 17.000x g, 20 °C) und drei Mal, je nach späterer Anwendung, entweder mit H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>, mit 10 mM Tris/HCl (pH 8) oder mit 10 mM Tris/HCl (pH 8) + 50 µM Rhodamin B (Kapitel 4.6.4) gewaschen. Die Lagerung der vernetzten Partikel erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

#### **4.6.3 Analyse des Einflusses der Vernetzung auf die chemischen Stabilität von eADF4(C16) Partikeln**

In diesem Versuch sollte nun ein möglicher Einfluss der Vernetzung mit Rubpy und APS auf die chemische Beständigkeit von eADF4(C16) Partikeln gegenüber 6 M GdmSCN, Ameisensäure, HFIP, 8 M GdmCl und 10 mM Tris/HCl (pH 8) analysiert werden. Hierfür wurden Partikel mit einem Durchmesser zwischen 400 und 600 nm aus 10 nmol eADF4(C16) Lösung präzipitiert und anschließend bei 37 °C in den jeweiligen Lösungsmitteln (400 µl) inkubiert. Jeweils nach 6 h und nach 25 h wurden die Proben abzentrifugiert (10 min, 17.000x g, 20 °C) und die Größe der sedimentierten Proteinpartikelpellets optisch bestimmt. Die resultierenden Partikel wurden zusätzlich elektronenmikroskopisch analysiert (Kapitel 4.9.3).

#### 4.6.4 Beladung von eADF4(C16) Partikeln

Als Modell-Wirkstoffmolekül für die Versuche zur Beladung von eADF4(C16) Partikeln wurde Rhodamin B verwendet (Abb. 4.2). Es handelt sich hierbei um einen gut wasserlöslichen, fluoreszierenden Xanthen-Farbstoff mit einem Molekulargewicht von 479 Da, welcher insbesondere im Bereich der kontrollierten Wirkstofffreisetzung und Wirkstoffverpackung häufig als Modellsystem verwendet wird.<sup>74,212,213</sup>



**Abb. 4.2:** Strukturformel von Rhodamin B.

Die Beladung der Partikel mit Rhodamin B erfolgte auf zwei Arten. Entweder wurden 50  $\mu$ M Rhodamin B-Lösung (in 10 mM Tris/HCl pH 8) mit bereits präzipitierten Partikeln über Nacht im Dunkeln inkubiert, so dass die Farbstoffmoleküle in die Partikel hinein diffundieren konnten, oder die gleiche Menge Rhodamin B wurde zusammen mit dem gelösten Protein aus einer wässrigen Lösung co-präzipitiert. Für beide Methoden wurden Partikel aus 10 nmol eADF4(C16) ausgefällt. Die zwei verschiedenen Beladungsarten wurden mit vernetzten und mit unvernetzten Partikeln durchgeführt. Bei den vernetzten Partikeln wurde zusätzlich unterschieden, ob die Partikel zum Zeitpunkt des Beladens bereits vernetzt waren oder nicht, bzw. ob die Vernetzermoleküle mit co-präzipitiert wurden oder nicht (Abb. 5.1). Für die Bestimmung der aufgenommenen Rhodamin B Mengen wurden die beladenen Partikel durch Zentrifugation (5 min, 17.000x g, 15 °C) sedimentiert und der Überstand abgenommen. 100  $\mu$ l des Überstands wurden anschließend in eine schwarze 96-well Mikrotiterplatte überführt und photometrisch am *Platereader* analysiert (Emission, Anregungswellenlänge: 530 nm, Emissionswellenlänge: 600 nm). Die verwendete 50  $\mu$ M Rhodamin B-Lösung wurde hierbei als 100 % Beladung angenommen. Um aus den daraus resultierenden Werten die Menge an aufgenommenem Rhodamin B zu bestimmen, wurde eine Eichgerade erstellt. Bei den mittels co-Präzipitation beladenen

Partikeln wurde der Verdünnungsfaktor durch die Kaliumphosphat-Lösung berücksichtigt und ebenfalls eine entsprechende Eichgerade erstellt.

#### **4.6.5 Wirkstofffreisetzung aus eADF4(C16) Partikeln**

Um die Menge an Rhodamin B bestimmen zu können, die aus den eADF4(C16) Partikeln freigesetzt wurde, wurden die beladenen Partikel in 200 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8) (Puffer) überführt und resuspendiert. Hierfür wurden Partikel verwendet, die auf zwei verschiedene Arten beladen wurden, durch Diffusion und durch co-Präzipitation. Zusätzlich wurden die Versuche mit vernetzten Partikeln durchgeführt. Nach jeweils 30 min Inkubationszeit im Puffer wurden die Partikel abzentrifugiert (5 min, 17.000x g, 15 °C) und der Überstand abgenommen. Die sedimentierten Partikel wurden anschließend sofort in frischem Puffer resuspendiert und die Rhodamin B-Freisetzung weiter verfolgt. 100 µl des abgenommenen Überstands wurden, ebenso wie bei der Beladung der Partikel, photometrisch am *Platereader* in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten analysiert (vgl. Kapitel 4.6.4). Die Bestimmung der Menge an freigesetztem Rhodamin B erfolgte alle 30 min über einen Zeitraum von 240 min und wurde unter Zuhilfenahme einer Eichgeraden analysiert. Für die Bestimmung der Freisetzungskinetik wurden die Rhodamin B Mengen nach der Freisetzung addiert, so dass nach 240 min deutlich wurde, wie viel Rhodamin B sich noch in den Partikeln befand.

### **4.7 Proteinverarbeitende Methoden - Kapseln**

#### **4.7.1 Kapselherstellung**

Grundlage für die Kapselbildung an einer Öl-Wasser-Grenzfläche ist der amphiphile Charakter von eADF4(C16). Dadurch lagert sich das Protein bevorzugt an der Öl-Wasser-Grenzschicht an, wodurch die Filmbildung an der Grenzfläche begünstigt wird. Die Herstellung von Kapseln aus eADF4(C16) basiert auf einem Protokoll von Hermanson et al (Abb. 3.7).<sup>100</sup> Dieses beschreibt die Kapselherstellung durch Grenzflächenpolymerisation des Proteins an einer Toluol-Wasser-Grenzfläche.

In dieser Arbeit wurde das Protokoll für die Verwendung von Silikonöl modifiziert. Bei Silikonölen handelt es sich um klare, farblose und chemisch inerte hydrophobe Flüssigkeiten. Silikonöle sind polymerisierte Methylsiloxane, die im Gegensatz zu Toluol

nicht gesundheitsgefährdend sind und daher gefahrlos für medizinische, pharmazeutische oder kosmetische Anwendungen verwendet werden können. Ein weiterer Vorteil liegt in der Vielseitigkeit des Öls. Silikonöle werden in verschiedenen Viskositäten angeboten, so dass der Einfluss der Viskosität auf die jeweilige Anwendung erprobt werden kann, ohne gleichzeitig weitere chemische Parameter zu verändern.

Für die Herstellung von eADF4(C16) Kapseln wurden die Silikonöle M5 ( $5 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ , niedrigviskos), M100 ( $100 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ , mittelviskos) und M500 ( $500 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ , mittelviskos) erprobt.

Die modifizierte Methode basiert auf der Herstellung einer Emulsion aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen in wässriger Lösung und Silikonöl. Durch Vermischen von  $500 \mu\text{l}$  Silikonöl mit  $5 \mu\text{l}$  wässriger Proteinlösung mit einer Konzentration von  $3\text{-}7 \text{ mg/ml}$  für  $45 \text{ sek}$  mit einem Vortexer bildete sich eine Emulsion. Die gebildeten kapselartigen Strukturen sanken im Eppendorf Reaktionsgefäß auf den Boden ab, so dass der Silikonöl-Überstand abgenommen werden konnte. Durch Resuspendieren der restlichen Emulsion in  $200 \mu\text{l}$   $50 \%$  Ethanol p. a. fand eine Strukturänderung der Proteine in der Kapselhülle hin zu einem höheren  $\beta$ -Faltblattanteil statt. Dadurch wurde die Kapselhülle stabilisiert und die Kapseln konnten in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  überführt und gewaschen werden. Dies erfolgte in *24-well* Mikrotiterplatten, wobei jeder Ansatz aus einem  $1,5 \text{ ml}$  Eppendorf Reaktionsgefäß in ein einzelnes *well* überführt wurde.

Die Lagerung der Kapseln erfolgte in Wasser in *24-well* Mikrotiterplatten bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der Erfolg der Kapselherstellung wurde lichtmikroskopisch überprüft.

Um Kapseln fluoreszenzmikroskopisch und mittels CLSM analysieren zu können, wurde der wässrigen eADF4(C16) Lösung vor der Kapselherstellung Fluoreszein-markiertes eADF4(C16) im Verhältnis eADF4(C16) zu eADF4(C16)-Fluoreszein  $20:1$  zugesetzt (Kapitel 4.5.2). Die fluoreszierenden Kapseln wurden unter Lichtausschluss gelagert.

#### **4.7.2 Herstellung von Kapseln mit Mikrofluidik**

Die Kapselherstellung mittels Mikrofluidik wurde zu einem großen Teil von Bernhard Kaufmann während seiner Studienarbeit am Lehrstuhl Biomaterialien unter meiner Anleitung durchgeführt. Da uns zu diesem Zeitpunkt kein Reinraum zur Verfügung stand,

wurden die PDMS-Chips am Lehrstuhl Biomaterialien gegossen, die Platinen hierfür wurden am Lehrstuhl für Mess- und Regeltechnik (Universität Bayreuth) unter Anleitung von Annette Hacker belichtet und geätzt. Die Herstellung der mit Glas verschlossenen PDMS-Chips und der entsprechenden Platinen wurde von Martin Trebbin (Lehrstuhl Physikalische Chemie I, Universität Bayreuth) übernommen.

#### 4.7.2.1 Herstellung einer Photomaske und Platine

Für die Herstellung der Photomaske wurde das gewünschte Layout mittels eines Laserdruckers in mehreren Schichten auf eine durchsichtige Folie gedruckt (5x).<sup>214</sup> Mehrere Schichten sind notwendig, um eine gute Deckkraft des Druckertoners zu gewährleisten und somit die Lichtdurchlässigkeit an den bedruckten Stellen zu verringern. Um eine optimale Auflösung der Strukturen zu erhalten, wurde das gewünschte Layout in einem Vektorgrafikformat gespeichert, die in (Abb. 5.28) abgebildete Struktur wurde mit dem Textsatzsystem *LATEX* erstellt. Der Quellcode hierzu kann in der Studienarbeit von Bernhard Kaufmann oder im Anhang nachgelesen werden.

Für die Herstellung der Platine mit erhabenen Kanalstrukturen, wurde eine unbearbeitete Platine verwendet, welche aus einer mit Kupfer (70 µm) beschichteten Epoxydharzplatte besteht. Die Dicke der Kupferschicht stellt später die maximale Kanalhöhe im fertigen PDMS-Chip dar. Auf die Kupferschicht ist eine positive Photolackschicht aufgebracht. Um die designte Kanalstruktur auf die Platine zu übertragen, wurde die Photomaske auf die Platine gelegt und 2 min mit UV-Licht belichtet. Nach diesem Belichtungsvorgang folgte das Entwickeln der Platine. Hierfür wurde diese in schwacher Natronlauge geschwenkt, so dass sich der belichtete Photolack langsam ablöst, anschließend folgte ein Waschschrift in Wasser. Um die nun freigelegten Kupferflächen zu entfernen, folgte das Ätzen der Platine mit der Ätzlösung. Nach wenigen Minuten Schwenken der Platine in der Ätzlösung erhielt man die erhabenen Layout-Strukturen aus Kupfer welche als Vorlage für das PDMS dienten. Der verbliebene Photolack konnte mit einer Bürste vorsichtig abgelöst werden.

#### 4.7.2.2 Gießen eines Mikrofluidik-Chips aus PDMS

Bei dem verwendeten PDMS handelte es sich um ein Präpolymer mit Härter. Diese wurden im Verhältnis 10:1 eingewogen (ca. 30 g Präpolymer/Chip), vorsichtig vermischt und anschließend in einem Exsikkator entgast. Die Masse wurde über die hergestellte Platine gegossen und anschließend erneut entgast, um mögliche Lufteinschlüsse zu vermeiden. Hierfür wurde die Platine in eine Schale aus Aluminiumfolie gelegt, die nach dem Aushärten wieder abgezogen werden konnte. Je nach Abdichtung des Chips (Platte aus PDMS oder aus Glas) wurde unterschiedlich weiter verfahren.

Um den Mikrofluidik-Chip mit einer Platte aus PDMS zu verschließen, wurde partielles Härten als Verfahren angewandt. Hierfür wurde parallel zum Chip eine Platte aus PDMS gegossen, welche anschließend als Deckel für den Chip diente. Um die Platte zu gießen wurde ein Glas-Objektträger ebenfalls in eine Form aus Aluminiumfolie gelegt und mit einer dünnen Schicht PDMS bedeckt. Der Auspolymerisierungsprozess beider PDMS-Teile wurde durch Erhitzen der Massen auf 60 °C beschleunigt. Je nach Dicke der PDMS-Schicht dauerte dieser Vorgang zwischen 35 und 40 min. Anschließend wurde der PDMS-Chip vorsichtig von der Platine abgelöst, auf die vorbereitete Deckelplatte gelegt und für 90 min bei 100 °C final ausgehärtet.<sup>215</sup>

Wenn eine Glasplatte als Deckel für den PDMS-Chip verwendet wurde, wurde der Chip sofort auf 100 °C erhitzt, bis das Material vollständig auspolymerisiert war. Nach dem Abziehen des PDMS-Chips von der Platine musste sowohl die Glasplatte als auch der PDMS-Chip mit Sauerstoffplasma behandelt und anschließend aufeinandergelegt werden. Durch das Sauerstoffplasma wurden die Oberflächen hydrophil, und aufgrund von Adhäsionskräften kam es zu einer irreversiblen Bindung zwischen PDMS und Glasplatte.<sup>215</sup>

#### 4.7.2.3 Zu- und Abläufe

Um die Zu- und Abläufe sicher in das PDMS einbringen zu können wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurden kurze Stücke einer Metallkanüle während des Vorgangs des partiellen Härtens, nach dem Abziehen des Chips von der Platine, in die PDMS-Struktur eingebracht und anschließend mit ausgehärtet. Über möglichst kurze Schlauchstücke mit Luer/Lock-Prinzip wurden die Kanülen mit den



Spritzenpumpen verbunden. Alternativ wurden nach dem Aushärten der Chips, bevor diese mit den Glasplatten verschlossen wurden, Löcher an die markierten Stellen gestanzt. In diese Löcher wurde ein dünnes Schlauchstück eingeführt, welches über eine Perfusor-Leitung mit den Spritzenpumpen verbunden wurde.

#### 4.7.2.4 Weitere Versuchsdurchführungen

Für die Versuche zur Kapselherstellung wurde eADF4(C16) in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 4–6 mg/ml (Kapitel 4.5.1) in eine 1 ml Feindosierungsspritze überführt. Als Ölphase wurde entweder das mittelviskose Silikonöl M100 bzw. das etwas viskosere Silikonöl M500 verwendet, welches in 5 ml Einmalspritzen gefüllt wurde. Alternativ wurde das Silikonöl M500 mit Toluol im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Spritzen wurden in Spritzenpumpen des Typs Harvard 33 eingebaut und die jeweiligen Schubgeschwindigkeiten manuell eingestellt. Zu Beginn der Versuche wurde, um das Layout zu überprüfen und die Fließgeschwindigkeiten der beiden Lösungen einzustellen, anstatt mit Protein- mit Pufferlösung (10 mM Tris/HCl, pH 8) gearbeitet.

Für die Beschichtung der Kanäle wurden diese mit 500 µl Sigmacote® gespült, anschließend entleert und schließlich getrocknet.

#### 4.7.3 Molekulare Größenausschlussbestimmung von eADF4(C16) Kapseln

Um Zellen oder Enzyme erfolgreich in Kapseln verpacken zu können, ist es wichtig die molekulare Ausschlussgröße der Kapselmembran zu kennen. Die Kapselhülle stellt hierbei eine semi-permeable Membran dar, durch die die verpackten Stoffe vor Angriffen des Immunsystems aber auch vor Proteasen sicher geschützt sind. Gleichzeitig können die verkapselten Stoffe nicht aus der Kapsel hinaus diffundieren, es sei denn die Hülle wird gezielt beschädigt oder abgebaut.

Für die Bestimmung des molekularen Größenausschlusses von eADF4(C16) Kapseln wurden FITC-markierte Dextrane verwendet. Für die hier beschriebenen Versuche wurden drei verschiedene Dextrane verwendet, mit Molekulargewichten von 3-5 kDa, 20 kDa und 40 kDa. Pro Ansatz wurde 1 µl der entsprechenden FITC-Dextran-Stocklösung (40 µg/µl in H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>) zur wässrigen Proteinlösung gegeben und anschließend durch Herstellung einer Emulsion mit Silikonöl in die Kapseln eingeschlossen (vgl. Kapitel 4.7.1). Die Kapseln wurden sowohl vor als auch nach ihrer Überführung in die

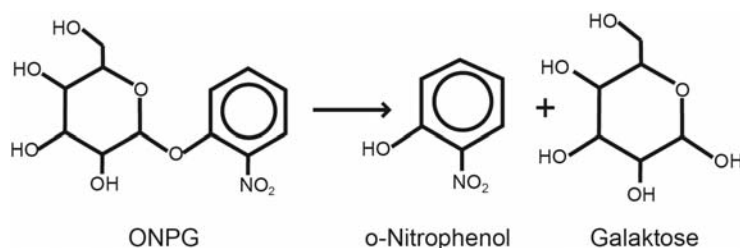
wässrige Phase fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Fluoreszieren die Kapseln auch im Wasser, so konnte das FITC-Dextran nicht durch die Kapselporen in das umgebende Medium diffundieren, das Dextran ist somit größer als die Poren.

#### 4.7.4 Verkapselung von Enzymen

Kapseln können für den Transport verschiedener Moleküle verwendet werden. In dieser Arbeit wurde  $\beta$ -Galaktosidase als Modellenzym verkapselt. Die Verkapselung von Enzymen folgt dem gleichen Schema wie bereits für die Kapselherstellung (Kapitel 4.7.1) und die Verpackung von FITC-Dextranen (Kapitel 4.7.3) beschrieben. Die zu verkapselnden Enzyme wurden direkt vor der Emulsionsherstellung in gewünschter Konzentration zur wässrigen Proteinlösung gegeben. Für die Verkapselung von  $\beta$ -Galaktosidase wurden 150 mU Enzym pro Kapselansatz verwendet, für den Einschluss des  $\alpha$ -Akzeptor EA22, 500 mU pro Ansatz (vgl. Abb. 4.4). Anschließend wurde durch Vortexen eine Emulsion hergestellt und die gebildeten Kapseln mit Hilfe von 50 % Ethanol p. a. in die wässrige Phase überführt. Die abschließenden Waschschriffe erfolgten anstatt mit  $H_2O_{MQ}$  mit dem Reaktionspuffer der  $\beta$ -Galaktosidase, Puffer Z.

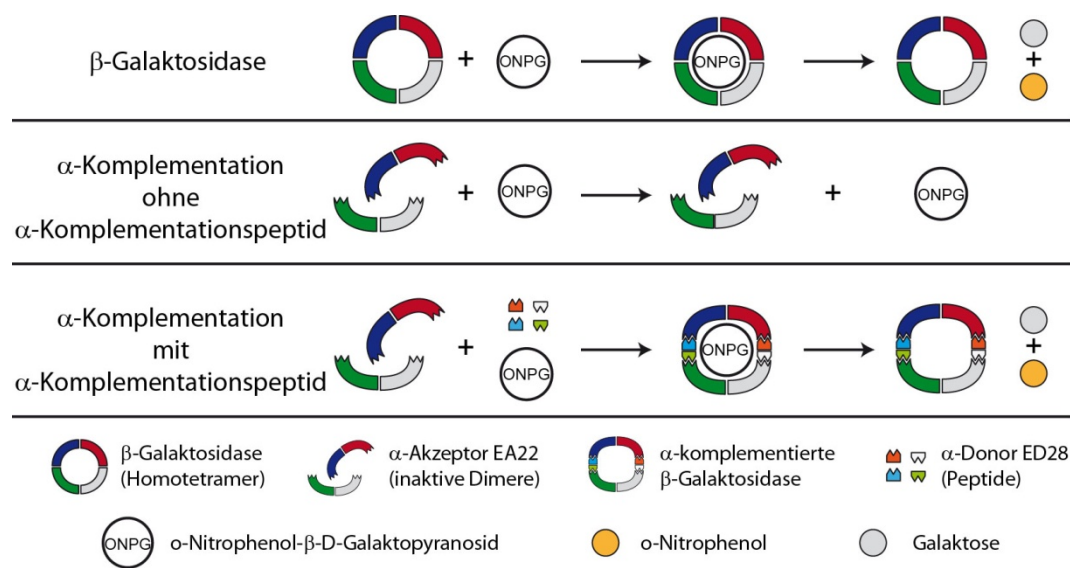
#### 4.8 Enzymkinetik mit $\beta$ -Galaktosidase

$\beta$ -Galaktosidase ist ein homo-tetrameres Enzym mit einem Molekulargewicht von 116 kDa pro Monomer. Die Bestimmung der Enzymaktivität von  $\beta$ -Galaktosidase erfolgt mit ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) als Substrat. ONPG ist ein farbloses Substrat, welches von  $\beta$ -Galaktosidase in Galaktose und o-Nitrophenol aufgespalten wird (Abb. 4.3). o-Nitrophenol weist in Lösung eine gelbe Farbe auf und kann photometrisch an einem UV/Vis-Spektrophotometer (Absorption, 420 nm, 37 °C) detektiert werden. Der bevorzugte Reaktionspuffer für  $\beta$ -Galaktosidase ist, nach Herstellerangaben, Puffer Z.<sup>216</sup>



**Abb. 4.3:** Enzymatische Hydrolyse von ONPG zu o-Nitrophenol und Galaktose durch  $\beta$ -Galaktosidase.

Eine besondere Eigenschaft der  $\beta$ -Galaktosidase ist zudem die  $\alpha$ -Komplementation (Abb. 4.4).<sup>217-219</sup> Bei dieser Methode ist es möglich, eine inaktive Form der  $\beta$ -Galaktosidase nachträglich zu aktivieren. Dieser inaktiven Form, EA22 oder  $\alpha$ -Akzeptor, fehlen einige Aminosäuren am Amino-Terminus, wodurch ein inaktives Dimer entsteht. Dieses inaktive Dimer kann jedoch nachträglich aktiviert werden. Durch die Zugabe eines Peptids, des sogenannten  $\alpha$ -Donors oder ED28, bindet dieses an das inaktive Dimer, wodurch eine Dimerisierung hin zum aktiven Tetramer erfolgt. Die Aktivität dieses nachträglich aktivierten Enzyms kann ebenfalls durch ONPG nachgewiesen werden.<sup>217-219</sup>



**Abb. 4.4:** Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Komplementation von  $\beta$ -Galaktosidase.

In einem ersten Schritt wurde die Enzymaktivität von  $\beta$ -Galaktosidase und der  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galaktosidase in unverkapselter, gelöster Form in Anwesenheit und Abwesenheit von gelöstem eADF4(C16) ( $0,8 \mu\text{M}$ ) bestimmt. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität in Anwesenheit von eADF4(C16) Kapseln durchgeführt, wobei das Enzym in diesem Fall nicht verkapselt vorlag, sondern in Lösung. Unverkapselte  $\beta$ -Galaktosidase wurde für die Enzymkinetiken in fünf verschiedenen Konzentrationen eingesetzt ( $0 / 10 / 20 / 40 / 100 \text{ mU/ml}$ ). Die Aktivität der  $\alpha$ -Komplementierten  $\beta$ -Galaktosidase wurde in vier verschiedenen Konzentrationen des  $\alpha$ -Komplementationsakzeptors EA22 ( $0 / 10 / 20 / 40 \text{ mU/ml}$ ) analysiert. Für die Aktivierung des  $\alpha$ -Akzeptors wurde jeweils ein 200-facher Überschuss des  $\alpha$ -Komplementationspeptids (ED28) zusammen mit ONPG zum Versuchsansatz hinzu pipettiert. Alle Versuche erfolgten in 1x Puffer Z in einem Ansatzvolumen von  $500 \mu\text{l}$  in Quarzglas-Küvetten (Schichtdicke:  $1 \text{ cm}$ ).  $1,33 \mu\text{M}$

ONPG wurden bei jeder Messung als Substrat zugegeben, wobei die ONPG-Zugabe als Startpunkt für die Kinetik angenommen wurde. Die Enzymkinetiken liefen über einen Zeitraum von 60 min, wobei die Messpunkte alle 60 sek aufgenommen wurden.

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten der verkapselten Enzyme wurden jeweils die Kapseln eines Ansatzes, also eines *wells* einer 24-*well* Mikrotiterplatte (Kapitel 4.7.1), in 500 µl Puffer Z in eine Quarzglas-Küvette überführt. Analog zu den unverkapselten Enzymen wurde die Enzymaktivität anhand der Bildung von o-Nitrophenol photometrisch bestimmt. Durch die Aufnahme von Kinetiken ohne Substrat kann ein Einfluss der Kapseln auf die Absorption des o-Nitrophenol ausgeschlossen werden.

Die Enzyme in Lösung und die verkapselten Enzyme wurden bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert.

#### 4.8.1 Proteolytischer Verdau von $\beta$ -Galaktosidase

Der Schutz von  $\beta$ -Galaktosidase durch die Kapselhülle vor proteolytischem Verdau ist ein Ziel der Verkapselung des Enzyms mit eADF4(C16). Hierfür wurde jeweils ein Ansatz Kapseln mit eingeschlossener  $\beta$ -Galaktosidase für 4 Stunden mit 0,04 µg Proteinase AspN in 10 mM Tris/HCl, pH 8 (Reaktionspuffer von AspN) bei 37 °C inkubiert. Die Ansatzgröße für den proteolytischen Verdau entsprach 225 µl. Proteinase AspN schneidet  $\beta$ -Galaktosidase an 64 Positionen (Tab. 4.4).

**Tab. 4.4:** AspN Schnittstellen innerhalb von  $\beta$ -Galaktosidase, berechnet mit *ExpASy*.<sup>220</sup>

Protease	Anzahl Schnittstellen	Position, nach der das Enzym schneidet
Endoproteinase AspN	64	5, 15, 45, 77, 82, 96, 130, 144, 164, 172, 193, 199, 201, 211, 224, 233, 234, 252, 280, 287, 319, 329, 368, 375, 403, 411, 428, 429, 447, 469, 479, 492, 497, 507, 509, 569, 572, 579, 591, 594, 598, 610, 648, 659, 671, 746, 772, 782, 790, 792, 802, 828, 832, 859, 869, 875, 908, 916, 919, 924, 954, 987, 996, 997

Durch die Zugabe von 225 µl 2x Puffer Z zum Verdau wurde die Proteolyse gestoppt. Gleichzeitig werden dadurch optimale Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von ONPG durch  $\beta$ -Galaktosidase geschaffen. Die Aktivität der verkapselten  $\beta$ -Galaktosidase kann somit, nach der Zugabe von 1,33 µM ONPG, durch die Gelbfärbung der Lösung nachgewiesen werden. Die Gesamtansatzgröße bei der enzymatischen Umsetzung von

ONPG war, ebenso wie bei den Kinetiken der unverkapselten Enzyme, 500  $\mu$ l. Als Kontrollen wurden unverkapselte  $\beta$ -Galaktosidase und unverkapselte  $\beta$ -Galaktosidase in Anwesenheit von eADF4(C16) Kapseln (Negativkontrollen) mit AspN (in den gleichen Konzentrationen) verdaut, und zusätzlich verkapselte  $\beta$ -Galaktosidase ohne AspN (Positivkontrolle) inkubiert, jeweils für 4 Stunden in 10 mM Tris/HCl (pH 8) bei 37 °C. Anschließend wurden die Kontrollen ebenfalls in 2x Puffer Z im Verhältnis 1:1 resuspendiert und die Enzymaktivität mit ONPG überprüft.

## **4.9 Mikroskopische Methoden**

### **4.9.1 Lichtmikroskopie**

Die lichtmikroskopischen Analysen der eADF4(C16) Kapseln erfolgten mit einer 50, 100, 200 oder 400-fachen Vergrößerung an einem Leica DMI 3000 B Mikroskop. Dieses ist mit einer Leica DFC340FX Schwarz/Weiß-Kamera ausgestattet. Die Bestimmung der Kapselgröße erfolgte in 24-well Mikrotiterplatten mit der Software *Leica Application Suite*.

### **4.9.2 Fluoreszenzmikroskopie**

Um die Ausschlussgrößen der eADF4(C16) Kapseln bestimmen und die fluoreszenzmarkierten Kapseln analysieren zu können, wurde ein Leica DMI 3000 B Fluoreszenzmikroskop mit einer 200-fachen Vergrößerung verwendet. Die Belichtungszeit der Kamera betrug 400 ms. Die Analysen erfolgten in 24- bzw. 48-well Mikrotiterplatten.

### **4.9.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Für die elektronenmikroskopische Analyse der eADF4 Partikel wurden diese in  $H_2O_{MQ}$  resuspendiert und auf Thermanox™-Plättchen pipettiert und dort getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Partikel vorsichtig 1-2 mal mit  $H_2O_{MQ}$  gewaschen, und das Thermanox™-Plättchen anschließend mit einem leitfähigen Klebeplättchen auf einem REM-Probenhalter fixiert. Ein dünnes Band aus Aluminium wurde zusätzlich angebracht, um Elektronen abzuleiten. Vor der Analyse im Elektronenmikroskop wurden die Proben unter Vakuum entweder mit einer dünnen Schicht aus Gold (10-20 nm) oder Platin (2 nm) besputtert. Bis zur Analyse wurden die Proben in einer Trocknungskammer

gelagert, um sie vor Luftfeuchtigkeit zu schützen. Die REM-Aufnahmen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 3 kV und einem Arbeitsabstand zwischen 4,3 und 6,1 mm unter Verwendung des SE2- oder Inlens-Detektors aufgenommen. Verwendet wurden für die REM-Aufnahmen zwei Mikroskope, zum einen das 1540EsB Cross Beam der Firma Zeiss (Lehrstuhl Metallische Werkstoffe, Universität Bayreuth) und zum anderen das LEO 1530VP-FESEM der Firma Zeiss (Bayreuther Institut für Makromolekülforschung (BIMF)).

#### **4.9.4 Konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie (CLSM)**

Um sicherzustellen, dass es sich bei den fluoreszierenden Kapseln um runde, dreidimensionale Strukturen handelt, wurde konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie verwendet. Im Gegensatz zu normalen Fluoreszenzmikroskopen ist es mit der CLSM möglich, die Z-Fokusebene schrittweise zu verändern und somit einzelne Bilder bzw. Schnitte aus verschiedenen Ebenen aufzunehmen. Man erhält dadurch einen dreidimensionalen Eindruck von den Proben. Hierfür wurde aus mit NHS-Fluoreszein gekoppeltem eADF4(C16) (Kapitel 4.5.2) und nicht fluoreszierendem eADF4(C16) im Mischungsverhältnis 1:5, Kapseln hergestellt und in Wasser überführt. Anschließend wurde eine Kapsel auf einen speziellen Glasobjektträger mit Schliff aufgebracht, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit einer 100-fachen Vergrößerung analysiert.

#### **4.9.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Die mikromechanischen Charakterisierungen und bildgebenden Aufnahmen am Rasterkraftmikroskop (AFM) wurden am Lehrstuhl für Physikalische Chemie II der Universität Bayreuth von Martin Neubauer bzw. von Benjamin Käsdorf unter der Anleitung von Martin Neubauer durchgeführt. Die direkten kraftspektroskopischen Messungen erfolgten durch Nicolas Helfricht (Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth).

##### **4.9.5.1 Bildgebung mit dem AFM**

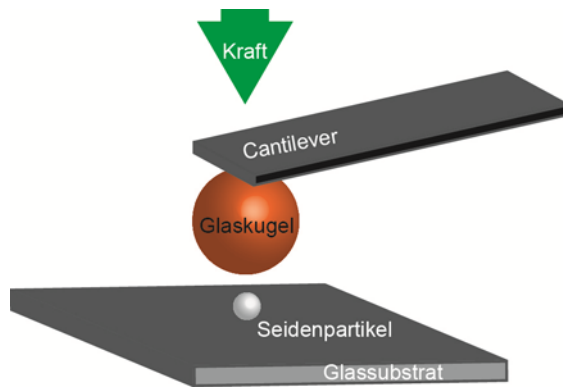
Unter Verwendung der bildgebenden Rasterkraftmikroskopie kann das Quellverhalten von eADF4 Partikeln bestimmt werden. Hierfür wurden dehydratisierte Partikel analysiert und anschließend rehydratisiert. Beide Zustände wurden im bildgebenden Modus des AFM aufgenommen und die gemessenen Partikeldurchmesser anschließend miteinander verglichen. Ein Vorteil dieser Methode im Vergleich zur

Rasterelektronenmikroskopie liegt darin, Partikel im hydratisierten Zustand analysieren zu können. Dadurch werden Artefakte, welche auf Trocknungsprozesse zurückzuführen sind, minimiert. Des Weiteren kann das Quellverhalten der Partikel in Hinblick auf ihre Größenzunahme bestimmt werden.

Die bildgebenden AFM-Aufnahmen wurden an einem AFM (NanoWizard® I) im diskontinuierlichen Kontakt Modus gemessen, welches zusätzlich mit einem optischen Mikroskop (Axiovert 200) ausgestattet ist. Hierbei wurden für die hydratisierten Messungen weiche *Cantilever* mit einer typischen Federkonstante von 0,95 N/m bzw. 0,15 N/m verwendet, für Messungen unter dehydratisierten Bedingungen wurden harte *Cantilever* mit einer Federkonstante von 5 N/m verwendet. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 4.9.5.2 Mikromechanische Charakterisierung mittels der *Colloidal Probe Technique*

Die *Colloidal Probe Technique* stellt eine Methode dar, um die Mechanik von Partikeln mittels Kraftspektroskopie zu bestimmen.<sup>221</sup> Hierbei wird mit einer am *Cantilever* immobilisierten Kugel (mind. 2 µm Durchmesser) direkt Druck auf einen Partikel ausgeübt, wodurch sowohl Informationen zu den Wechselwirkungskräften als auch zur Adhäsion des Partikels generiert werden (Abb. 4.5). Das Messprinzip der *Colloidal Probe Technique* ist hierbei ähnlich dem eines herkömmlichen AFM.<sup>221</sup> Durch die immobilisierte Kugel am *Cantilever* wird die Probenoberfläche nicht beschädigt, dadurch ergibt sich die Möglichkeit, einen Partikel mehrmals zu messen. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch ihre Auflösung. Bei bildgebenden AFM-Messungen können Strukturen im Nanometer-Bereich aufgelöst werden, durch die *Colloidal Probe Technique* lediglich Partikel mit einem Durchmesser im Mikrometerbereich.<sup>221,222</sup> Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode sind jedoch weitreichend. So können mechanische Kräfte im Kontaktbereich der Partikel ermittelt werden (direkte Kraft-Messungen), um die Materialeigenschaften (Elastizität, Härte) und die Oberflächenladung eines runden Partikels zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil des AFM liegt in seiner Vielseitigkeit, es können sowohl Messungen in Flüssigkeit, im Trockenen, unter verschiedenen Gasatmosphären als auch unter Vakuum durchgeführt werden.<sup>222</sup>



**Abb. 4.5:** Schematische Darstellung des *Colloidal Probe* Setups.  
(Modifiziert nach Neubauer et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Für die mikromechanische Charakterisierung von eADF4 Partikeln wurde die *Colloidal Probe Technique* verwendet. Hierfür wurden an die *Cantilever* (NSC 12) Glas-Kugeln mit einem Durchmesser von 20-50  $\mu\text{m}$  mit einem Zwei-Komponenten Klebstoff befestigt. Vor dem Start der Messungen wurden alle verwendeten *Cantilever* unter Verwendung von Glassubstraten kalibriert. Die Federkonstante wurde hierbei nach dem hookeschen Gesetz berechnet.<sup>223</sup> Die Kraftspektren wurden anschließend nach der Theorie von Hertz<sup>224</sup> ausgewertet und die jeweiligen Elastizitätsmoduln der Partikel berechnet. Die Theorie von Hertz basiert hierbei auf der Annahme, dass es sich bei den gemessenen Partikeln um linear elastische Körper handelt und dass sowohl Reibungskräfte als auch Adhäsionskräfte zwischen der immobilisierten Glas-Kugel und dem zu messenden Partikel vernachlässigt werden können.

Das Verhältnis zwischen der Deformation des Partikels ( $d$ ) und der aufgewendeten Kraft ( $F$ ) ist hierbei in Gleichung 2 für eine Kugel-Kugel-Geometrie dargestellt.

$$F = \frac{4}{3} E d^{\frac{3}{2}} \sqrt{R} \quad \text{Gleichung 2}$$

In dieser Gleichung steht  $E$  für den relativen E-Modul und  $R$  für den relativen Radius, welche nach Gleichung 3 und 4 berechnet wurden, wobei  $\nu$  die Poissonzahl ist. Für eADF4 Partikel wird hier ein Wert von 0,5 angenommen. Die Indizes stehen hier stellvertretend für die Glas-Kugel am *Cantilever* und die zu messenden Partikel.

$$\frac{1}{E} = \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_{21}} \quad \text{Gleichung 3}$$

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \quad \text{Gleichung 4}$$

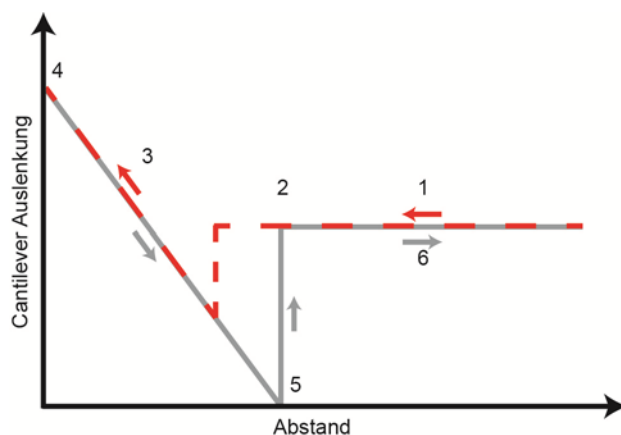


Die Bestimmung der Partikeldurchmesser erfolgte bei diesen Messungen mikroskopisch.

Für die Versuchsdurchführungen wurden 5  $\mu\text{l}$  eADF4 Partikel (5 mg/ml) in mit Polyethylenimin (PEI) beschichtete Glaspetrischalen (Durchmesser 2 cm, Höhe 0,5 cm) pipettiert und mehrmals vorsichtig mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  gewaschen. Die Beschichtung mit PEI dient hierbei der verbesserten Adhäsion der negativ geladenen eADF4 Partikel an der Glasoberfläche. Für die Messungen im hydratisierten Zustand wurden die Partikel in der Petrischale mit 1,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  überschichtet. Für die Messungen unter dehydratisierten Bedingungen wurden die Partikel über Nacht in der trockenen Petrischale gelagert und am nächsten Tag darin gemessen.

#### 4.9.5.3 Direkte Kraft-Messungen mittels der *Colloidal Probe Technique*

Durch direkte Kraft-Messungen in Kugel-Kugel-Geometrie (Abb. 4.5), können Informationen zum Adsorptionsverhalten von Partikeln gewonnen werden (kolloidale Eigenschaften).<sup>222</sup> Dies geschieht, ebenso wie bereits für die mechanischen Messungen beschrieben, indem die auf den *Cantilever* einwirkenden Kräfte gemessen werden. Hierfür wird der *Cantilever* in direkten Kontakt zur Probe gebracht und anschließend wieder entfernt. Durch Auftragen der gemessenen Auslenkung gegen die Höhe, erhält man eine typische Kraft-Abstandskurve (Abb. 4.6) einer ideal elastischen Probe, welche in mehrere Positionen unterteilt werden kann:<sup>225</sup>



**Abb. 4.6:** Ideale, mittels AFM aufgenommene Kraft-Abstandskurve. Die rote Linie symbolisiert die Annäherung des *Cantilevers* an die Probe, die graue Kurve die Rückstellung des *Cantilevers* von der Probe. 1) Der *Cantilever* interagiert aufgrund der Entfernung nicht mit der Probe. 2) Aufgrund von attraktiven Wechselwirkungen nähert sich der *Cantilever* an die Probe an, bis 3) der Schwellenwert erreicht wird. 4) Verweildauer des *Cantilever*. 5) Die attraktiven Wechselwirkungen des *Cantilevers* mit der Oberfläche werden überwunden. 6) Der *Cantilever* ist so weit von der Probe entfernt, dass die Grundlinie wieder erreicht wird.

Befindet sich der *Cantilever* weit entfernt von der Probe, kann dieser nicht mit der Probe interagieren und somit ist keine Auslenkung messbar (1). Verringert man den Abstand zur Probe, kommt man zu einem Punkt, an dem sich der *Cantilever* aufgrund von attraktiven Wechselwirkungen zur Probe hinbiegt und in Kontakt mit der Oberfläche tritt (2). Der *Cantilever* wird daraufhin weiter an die Probe angenähert (3), bis der sogenannte Schwellenwert (*trigger point*) erreicht wird (4). Hier kann es zu einer möglichen Verweildauer (*dwell time*) des *Cantilever* kommen, um das Ausbilden von Bindungen oder Umstrukturierungen zu ermöglichen. Dies war für die hier durchgeführten Messungen allerdings nicht notwendig. Anschließend wird der *Cantilever* wieder von der Probe entfernt bis ein Punkt erreicht ist, an dem die Rückstellkräfte des *Cantilevers* die attraktiven Wechselwirkungen mit der Oberfläche überwinden (5). An diesem Punkt unterscheiden sich die Annäherungs- und die Rückstellkurve, wodurch Informationen zu den Adhäsionskräften der Oberfläche gewonnen werden können. Entfernt man den *Cantilever* noch weiter von der Probe, wird die Ausgangsgrundlinie wieder erreicht (6).<sup>226,227</sup>

Mit Hilfe dieser Methode können unterschiedliche Bereiche der Partikel definiert werden, wodurch sich mögliche Anwendungsgebiete (Wirkstofftransport, -Lagerung, -Schutz, partikelverstärkte Kompositmaterialien) für die analysierten Partikel ergeben.

Für die Durchführung der direkten Kraftmessungen wurde ebenfalls die *Colloidal Probe Technique* verwendet. Hierfür wurden spezielle *Cantilever* (NSC 12) ohne Spitze verwendet, welche eine Federkonstante von 0,3 N/m besaßen. Für die *Colloidal Probe Technique* wurden sie gesäubert und mit Sauerstoffplasma behandelt, anschließend wurden die Silikat-Partikel an den *Cantilever* geklebt. Hierfür wurde ein spezieller, unter UV-Licht aushärtender Klebstoff verwendet. Der *Cantilever* mit dem immobilisierten Partikel wurde als finaler Schritt für zwei Stunden gesintert.<sup>228</sup> Die zu analysierenden eADF4(C16) bzw. Silikat-Partikel wurden für diese Messungen auf einer Glasplatte immobilisiert. Hierfür wurde die Glasplatte durch Ultraschallbehandlung in einer 2%igen Hellmanex-Lösung bei 40 °C und einer anschließenden Ultraschallbehandlung in einem Isopropanol/Wasser-Gemisch (v/v=3:1) bei Raumtemperatur gereinigt und anschließend mit einer Mischung aus H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>, Hydrogenperoxid und Ammoniak (v/v/v=5:1:1) bei 80 °C für 20 min inkubiert. Die

Silanisierung der Glasplatte erfolgte über Nacht mit 3-Aminopropyldiisopropylethoxysilan (ABCRC) im Anschluss an eine O<sub>2</sub>-Plasma Behandlung. Um die Silanisierung zu vervollständigen und unreaktives Silan zu entfernen, wurden die behandelten Glasplatten mit Ethanol gespült und anschließend für zwei Stunden auf 80 °C erhitzt. Für die Messungen wurde ein Gemisch aus der eADF4(C16) Partikelsuspension und der Silikat-Partikelsuspension (Standard) auf den silanisierten Glasträger getropft und getrocknet. Vor jeder Messung wurden die Partikel für zwei Stunden in der jeweiligen Elektrolytlösung equilibriert. Die Kugel-Kugel-Morphologie befand sich während der Messungen in einer halbgeschlossenen Flüssigkeitszelle. Pro eADF4(C16) Partikel wurden 50 Kraft-Abstandskurven mit einer Geschwindigkeit von 800 nm/s und einer Kraft von 15-20 nN aufgenommen. Hierfür wurde die Federkonstante des *Cantilevers* auf Grundlage des thermischen Rauschens bestimmt.<sup>223</sup> Die erhaltenen Daten wurden anschließend auf den effektiven Radius  $R_{eff}$  normiert, welcher sich aus den Radien der Silikat-Partikel und der eADF4 Partikel zusammensetzt (Gleichung 5).

$$R_{eff} = \frac{R_1 \times R_2}{R_1 + R_2} \quad \text{Gleichung 5}$$

$R_1$  bezieht sich auf den Radius des am *Cantilever* immobilisierten Partikels und wurde durch Lichtmikroskopie bestimmt.  $R_2$  ist der Radius des auf dem Glassubstrat immobilisierten Partikels und wurde sowohl kraftmikroskopisch aus sogenannten *Force Maps* über die Bestimmung der Partikelhöhe, als auch lichtmikroskopisch bestimmt. Die Berechnung des Potentials der diffusen Schicht erfolgte durch Fitten auf Basis der Poisson-Boltzmann Gleichung.<sup>229</sup> Die Steifigkeit der eADF4(C16) Partikel wurde unter Verwendung der Gleichung 6 berechnet. Bei  $c_{eADF4}$  und  $c_{SiOx}$  handelt es sich um die Kraftantworten des *Cantilevers*, wenn er in Kontakt zu den immobilisierten Partikeln kommt,<sup>230</sup>  $k_c$  ist die Federkonstante des *Cantilevers*.

$$k_{eADF4} = \frac{k_c}{\frac{c_{eADF4}}{c_{SiOx}} - 1} \quad \text{Gleichung 6}$$

Die Oberflächentopographie der Partikel kann im hydratisierten Zustand durch AFM bestimmt werden. Hierfür wurde das AFM MFP-3D, mit einem Silikon-Nitrit *Cantilever*

(Federkonstante 0,24 N/m) und einer Resonanzfrequenz von 56 kHz, im *Tapping Mode* verwendet.

#### **4.10 Materialanalysen**

Die DSC- und TGA-Messungen wurden am Lehrstuhl für Polymere Werkstoffe der Universität Bayreuth von Ute Kuhn durchgeführt. Die Messungen zur Wasseraufnahme und -Abgabe von eADF4(C16) Partikeln erfolgten durch Elisa Agostini am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie (LMU München).

##### **4.10.1 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)**

Die Dynamische Differenzkalorimetrie dient der Bestimmung von temperaturabhängigen Veränderungen im Material. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von physikalischer und chemischer Vernetzung auf die Materialeigenschaften der eADF4 Partikel analysiert werden und die thermale Zersetzungstemperatur  $T_m$  bestimmt werden. Hierfür wurden 5-7 mg eADF4 Partikel in Aluminiumtiegel unter Stickstoffatmosphäre mit einer Heizrate von 5 °C/min in einem SDTA 821e Differential Scanning Calorimeter auf 400 °C erhitzt. Dieses Gerät ist mit einem Keramik-Sensor mit einem 56-fachen Au-Au-Pd-Thermoelement ausgestattet. Vor dem Start der Messung wurden die Proben zuerst auf 110 °C erhitzt, um Wasserreste zu entfernen. Nach Einstellung eines Gleichgewichts (10 min) wurden die Proben auf -40 °C abgekühlt, daran anschließend erfolgte die eigentliche Messung.

##### **4.10.2 Thermogravimetrische Analyse (TGA)**

Durch die thermogravimetrische Analyse von Partikeln ist es möglich, die Massenänderung der Probe in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit zu bestimmen. Hierfür wurden ca. 10 mg Partikel auf Basis des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4 in Aluminiumoxid-Tiegel überführt und mit einer Heizrate von 10 °C/min unter Stickstoffatmosphäre (50 ml/min) von 25 °C auf 800 °C erhitzt. Die Genauigkeit der Mikrowaage betrug 1 µg. Für die Auswertung wird das Gewicht der Probe auf den Anfangswert normiert und somit nur die Änderung der Masse (%) angegeben.

#### 4.10.3 Wasseraufnahme und –abgabe der eADF4(C16) Partikel

Für viele Anwendungsgebiete der eADF4(C16) Partikel ist ihr Quellverhalten von Interesse. Um sicherzustellen, dass das Quellverhalten der Partikel vollständig reversibel ist, wurde die Wasseraufnahme und –abgabe in 10 Zyklen analysiert. Hierfür wurde ein Feuchtigkeitsanalysegerät (IGASorp) verwendet, welches über eine Mikrowaagen-Auflösung von 0,1 µg verfügt und eine minimale Feuchtigkeitsänderung von 0,2 % durchführen kann. 20 mg dehydratisierte eADF4(C16) Partikel wurden bei einer konstanten Temperatur von 25 °C und unter konstanter Stickstoffatmosphäre inkubiert, wobei gleichzeitig die relative Luftfeuchtigkeit von 0 auf 90 % erhöht (Wasseradsorption der Partikel) und anschließend wieder gesenkt wurde (Wasserdesorption der Partikel). zehn Adsorptions- und Desorptionszyklen wurden für jede Probe durchgeführt.

#### 4.10.4 Zetapotential und Elektrophoretische Mobilität

Die Abhängigkeiten des Zetapotentials von der Ionenstärke und vom pH-Wert wurden von Nicolas Helfricht (Lehrstuhl Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth) gemessen.

Eine wichtige Methode zur Oberflächencharakterisierung von Partikeln ist die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität in Abhängigkeit von der Ionenstärke und des pH-Wertes mittels Mikroelektrophorese. Hierbei wandern die Partikel in einer flüssigen Phase nach Anlegen eines elektrischen Feldes. Aus der Geschwindigkeit dieser Bewegung kann die Mobilität bestimmt werden; hierfür muss auf das angelegte elektrische Feld normiert werden. Um die Ladung der Partikel aus ihrer Mobilität berechnen zu können, werden je nach Größe und Eigenschaften der Partikel verschiedene Modelle verwendet. Mit ihrer Hilfe lässt sich das Zetapotential, also das Potential an der Scherebene, berechnen, welches im Gegensatz zum Oberflächenpotential der Partikel vom elektrischen Feld abhängig ist.<sup>231,232</sup>

Das Zetapotential und die elektrophoretische Mobilität von eADF4(C16) Partikeln wurden an einem Zetaview PMX 100 (Lehrstuhl Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth) bestimmt. Dieses Gerät ist mit einem Laser-Streulicht Video-Mikroskop ausgestattet, wodurch die sich in der Messzelle bewegenden Partikel in Echtzeit beobachtet werden können. Um den Einfluss der chemischen Vernetzung und der Beladung der Partikel auf das Zetapotential zu bestimmen, wurden sowohl beladene als

auch unbeladene Partikel in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$  resuspendiert. 2 ml der Partikelsuspension wurden pro Messung in die Messzelle injiziert, wobei jede Probe drei Mal gemessen wurde. Aus den Werten der elektrophoretischen Mobilität wurde mittels der Theorie von Smoluchowski<sup>231</sup> das Zetapotential der Partikel berechnet.

Um die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität vom pH-Wert und der Ionenstärke zu bestimmen, wurden diese mit KCl, HCl und NaOH eingestellt. Die pH-abhängige elektrophoretische Mobilität wurde für pH-Werte zwischen pH 2 und pH 12 für zwei verschiedene Konzentrationen (1 mM und 10 mM) bestimmt. Die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von der Ionenstärke wurde bei pH 5,5 und pH 10 gemessen. Für die Auswertung der daraus gewonnenen Daten wurde die Theorie nach O'Brien und White, welche auf einem Algorithmus von Hunter basiert, verwendet.<sup>231,232</sup>

## **4.11 Sterilisationsmethoden**

### **4.11.1 Gammastrahlen- und Ethylenoxid-Behandlung**

Die Behandlung der eADF4(C16) Partikel mit Gammastrahlen und Ethylenoxid, ebenso wie die Bestimmung der Vorverkeimung, wurde von der Firma Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG (Neuwied, Deutschland) durchgeführt.

Hierfür wurden die eADF4(C16) Partikel durch Präzipitation mit Kaliumphosphat aus wässriger Lösung hergestellt, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Die lyophilisierten Partikel wurden von der Firma Lohmann & Rauscher auf ihre Vorverkeimung hin untersucht und anschließend mit unterschiedlichen Gamma-Strahlungsintensitäten (0-50 kGy) bzw. Ethylenoxid behandelt. Für die Gammastrahlen-Behandlung wurde das Protein in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen gelagert und mit Co-60 als Strahlungsquelle bestrahlt. Bei den angegebenen Strahlungsintensitäten handelt es sich um die Minimalwerte, die erreicht werden sollten. Für die Behandlung mit Ethylenoxid wurde das Protein in spezielle Plastikfolien überführt, eingeschweißt und anschließend begast.

Die Bestimmung der Vorverkeimung erfolgte gemäß der vom „Europäischen Arzneibuch zur Prüfung von Produkten auf Anwesenheit von Bakterien“ empfohlenen Membranfilter-Methode. Hierfür wurden die Partikel in 0,9 % NaCl und 0,02 % Tween 80

resuspendiert und anschließend durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Dieser Filter wurde auf einen CASO Agar gelegt und für vier Tage bei 32,5 °C inkubiert. Die Auswertung der keimbildenden Einheiten, welche auf dem Agar zu finden waren, erfolgte lichtmikroskopisch.





## 5 Ergebnisse

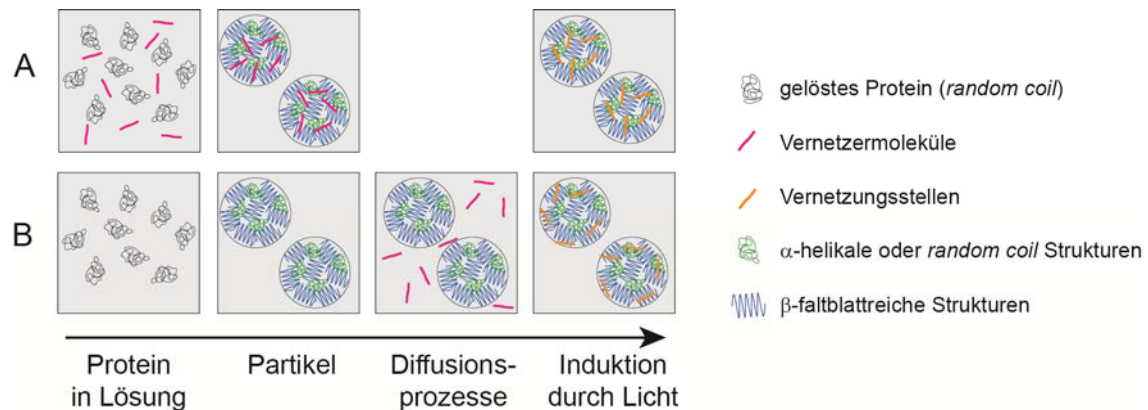
### 5.1 Herstellung und chemische Vernetzung von eADF4 Partikeln

Die Herstellung von eADF4 Partikeln erfolgt durch einen Aussalzungsprozess aus wässriger Proteinlösung. Hierbei kann der Durchmesser der Partikel durch die Proteinkonzentration sowie durch die Mixintensität während des Fällungsprozesses eingestellt werden. Durch Resuspendieren der eADF4(C16) Lösung mit kosmotropen Salzen, z. B. Kaliumphosphat, werden Proteinpartikel erzeugt, deren Durchmesser kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sind. Größere Partikel mit einem Durchmesser von über 1  $\mu\text{m}$  werden durch Dialyse der wässrigen Proteinlösung gegen 1-2 M Kaliumphosphat hergestellt.<sup>103,104</sup>

Für die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Partikel, ebenso wie für die Charakterisierung ihrer Oberflächenladung, wurden Partikel mit einer mittleren Größe von 1 bis 3  $\mu\text{m}$  verwendet, für die Beladungs- und Freisetzungskinetiken, Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 400-600 nm.

Es ist bereits bekannt, dass eADF4(C16) Partikel mit verschiedenen Molekülen beladen und diese Moleküle anschließend wieder freigesetzt werden können.<sup>102,133</sup> Um die zugrunde liegenden Prozesse besser verstehen und beeinflussen und zudem die Eigenschaften der Partikel kontrollieren zu können, wurden eADF4(C16) Partikel chemisch vernetzt. Aufgrund der Aminosäuresequenz von eADF4(C16) eignet sich hierfür ein bereits etabliertes, auf Rubpy und APS basierendes, System (Kapitel 4.6.2).<sup>209,233</sup> Bei dieser lichtinduzierten Vernetzungsstrategie wirken Rubpy und APS als Initiatoren einer radikalischen Reaktion, wodurch aromatische Aminosäuren vernetzt werden. Rubpy wird bei dieser Vernetzungsstrategie in Anwesenheit von APS photolysiert, wodurch Ru(III) entsteht, ein ein-Elektronen-Oxidant. Dieses oxidiert Aminosäurereste, bei eADF4(C16) z. B. Tyrosine, wodurch Tyrosin-Radikale als Zwischenprodukte einer radikalischen Reaktion entstehen (vgl. Abb. 4.1). Für das Einbringen der Startermoleküle Rubpy und APS in die Partikel eignen sich zwei verschiedene Routen (Abb. 5.1). Zum einen können Rubpy und APS zusammen mit dem Protein aus der wässrigen Lösung co-präzipitiert werden (CL\_Fällung, Abb. 5.1A), zum anderen können die Moleküle in die fertig ausgebildeten Partikel eindiffundieren

(CL\_Diffusion, Abb. 5.1B). Die Aktivierung der Vernetzungsreaktion mit Licht erfolgt nach der Kugelpräzipitation bzw. nachdem sich ein Diffusionsgleichgewicht der Vernetzermoleküle zwischen den Partikeln und dem umgebenden Medium eingestellt hat. Die chemisch vernetzten Partikel zeichnen sich makroskopisch durch eine leicht gelbliche Färbung aus.



**Abb. 5.1:** Postulierter Vernetzungsmechanismus der eADF4(C16) Partikel. A) Die Vernetzermoleküle APS und Rubpy werden zusammen mit dem Protein aus wässriger Lösung co-präzipitiert (CL\_Fällung). B) APS und Rubpy diffundieren in die Partikel ein (CL\_Diffusion). Die Aktivierung durch Licht erfolgt bei beiden Routen nach der Kugelpräzipitation bzw. nachdem sich ein Diffusionsgleichgewicht eingestellt hat.

(Modifiziert nach Neubauer et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

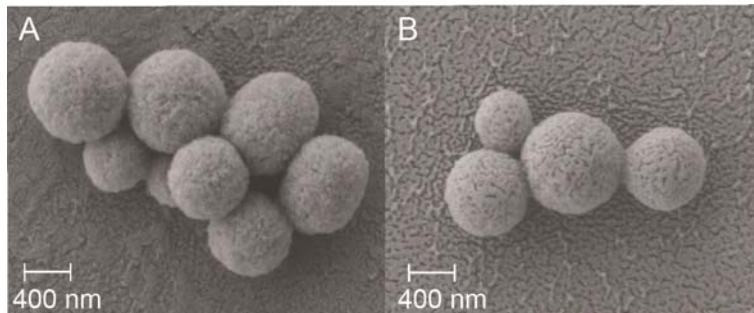
Zusätzlich zur chemischen Vernetzung wird der Einfluss einer physikalischen Vernetzung auf die mechanische und thermische Stabilität der Partikel analysiert. Die Änderung der physikalischen Vernetzung kann mit Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts erzielt werden. eADF4(C8) besitzt acht Wiederholungen des C-Moduls und ein Molekulargewicht von 24,6 kDa, eADF4(C16) besteht aus 16 Wiederholungen des C-Moduls und hat ein Molekulargewicht von 47,7 kDa und eADF4(C32) hat ein Molekulargewicht von 93,8 kDa und besteht aus 32 Wiederholungen des C-Moduls.

## 5.2 Charakterisierung der eADF4 Partikel

### 5.2.1 Morphologische Eigenschaften der eADF4(C16) Partikel

Um einen Eindruck der Oberflächenbeschaffenheit der chemisch vernetzten und unvernetzten eADF4(C16) Partikel zu erhalten, wurden die dehydratisierten Partikel elektronenmikroskopisch analysiert (Kapitel 4.9.3). Abb. 5.2 zeigt chemisch vernetzte (A) und unvernetzte (B) eADF4(C16) Partikel. Die hier gezeigten vernetzten Partikel wurden analog zu der in Abb. 5.1A dargestellten Route hergestellt. Die vernetzten eADF4(C16) Partikel weisen im Bereich des Auflösungsvermögens des verwendeten

Rasterelektronenmikroskops keine morphologischen Unterschiede zu unvernetzten Partikeln auf. Die in Abb. 5.2 gezeigten Partikel wurden durch Resuspension mit Kaliumphosphat hergestellt, die Größenverteilung der Partikel liegt zwischen 400-600 nm.

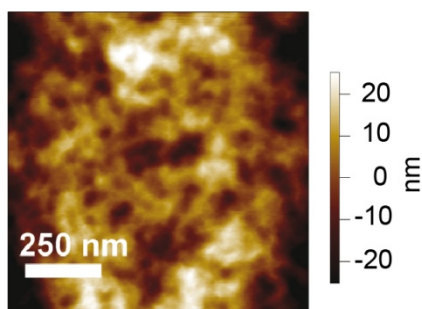


**Abb. 5.2:** Partikel, hergestellt aus eADF4(C16), A) chemisch vernetzt, B) unvernetzt. Die vernetzten Partikel wurden analog zur in Abb. 5.1A dargestellten Route hergestellt.

(Modifiziert nach Blüm & Scheibel, *BioNanoSci* 2012 (2), mit Genehmigung der Springer Science + Business Media)

### 5.2.2 Quellverhalten von eADF4(C16) Partikeln

Mittels REM ist es möglich, die Oberflächenstrukturen von dehydratisierten Partikeln zu bestimmen (Abb. 5.2). Um zusätzlich einen detaillierteren Eindruck von der Oberflächenbeschaffenheit der hydratisierten eADF4(C16) Partikel zu erhalten, wurde ein AFM im bildgebenden Modus verwendet (Kapitel 4.9.5).

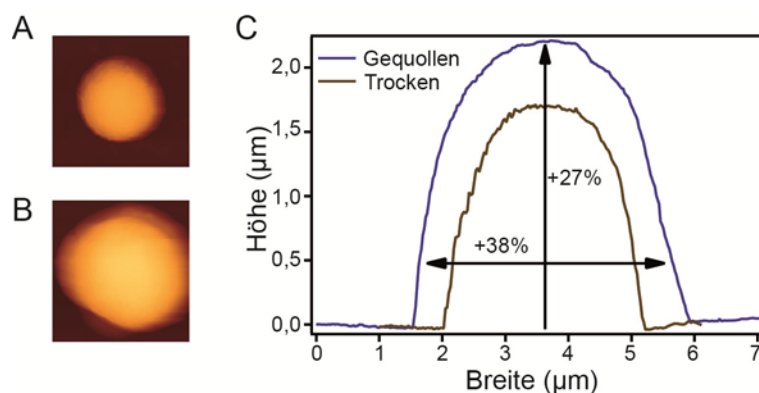


**Abb. 5.3:** Oberflächenrauigkeit eines eADF4(C16) Partikels. Das Rauigkeitsprofil wurde mittels AFM bestimmt (Nicolas Helfricht, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth).

(Modifiziert nach Helfricht et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Das systematische Abtasten des obersten Bereichs des Partikels im *Tapping Mode* des AFM ergibt ein Rauigkeitsprofil, welches in Abb. 5.3 dargestellt ist. Hydratisierte eADF4(C16) Partikel weisen eine relativ glatte Oberfläche mit einer mittleren Rauigkeit von  $17,3 \pm 4,3$  nm auf.

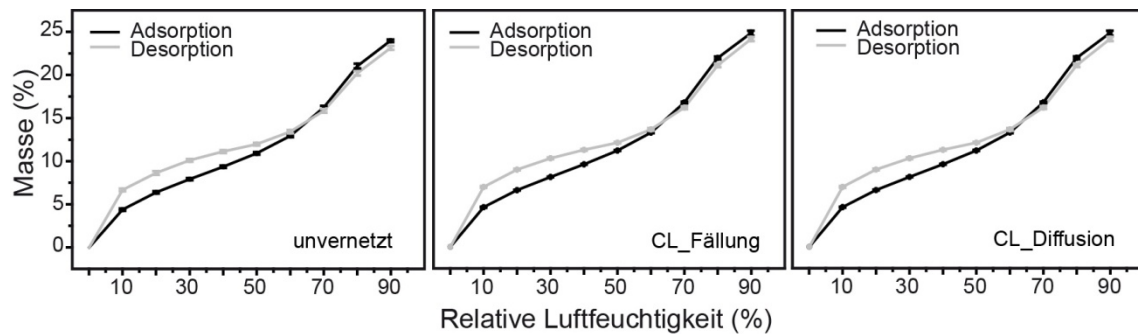
Zusätzlich zur Oberflächenbeschaffenheit der eADF4(C16) Partikel wurde auch das Quellverhalten der Partikel unter Wassereinfluss analysiert (Abb. 5.4). Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Mittels AFM im bildgebenden Modus kann die Volumenänderung der Partikel (Abb. 5.4A und B), durch IGASorp Messungen (Kapitel 4.10.3) die Masseveränderungen der Partikel (Abb. 5.5) gemessen werden. Die rasterkraftmikroskopischen Messungen ergeben ein Quellen der Partikel in der Breite um ca. 38 % und in der Höhe um ca. 27 % (Abb. 5.4C). Daraus ergibt sich für unvernetzte eADF4(C16) Partikel ein Quellfaktor von ca. 2,31; das bedeutet, dass sich das Volumen der Partikel unter Wassereinfluss mehr als verdoppelt.



**Abb. 5.4:** Quellverhalten unvernetzter eADF4(C16) Partikel. A) AFM-Aufnahme eines dehydratisierten eADF4(C16) Partikels. B) AFM-Aufnahme eines hydratisierten eADF4(C16) Partikel. C) Größenzunahme der eADF4(C16) Partikel in Höhe und Breite (Martin Neubauer, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth). (Modifiziert nach Neubauer et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Das Quellverhalten von chemisch vernetzten eADF4(C16) Partikeln unterscheidet sich signifikant von dem der unvernetzten Partikel. Durch co-Präzipitation mit den Vernetzermolekülen quervernetzte Partikel (CL\_Fällung, Abb. 5.1A) zeigen ein geringeres Quellverhalten (Quellfaktor: 1,40) als über Diffusion quervernetzte eADF4(C16) Partikel (CL\_Diffusion, Abb. 5.1B, Quellfaktor: 1,76). Dadurch ergibt sich eine vernetzungsabhängige und vernetzungsroutenabhängige Volumenänderung der Partikel in Wasser.

Die Detektion der Masseänderung von eADF4(C16) Partikeln aufgrund von Wasseraufnahme und -abgabe wurde über Adsorptions- und Desorptionszyklen aufgezeichnet (Abb. 5.5).



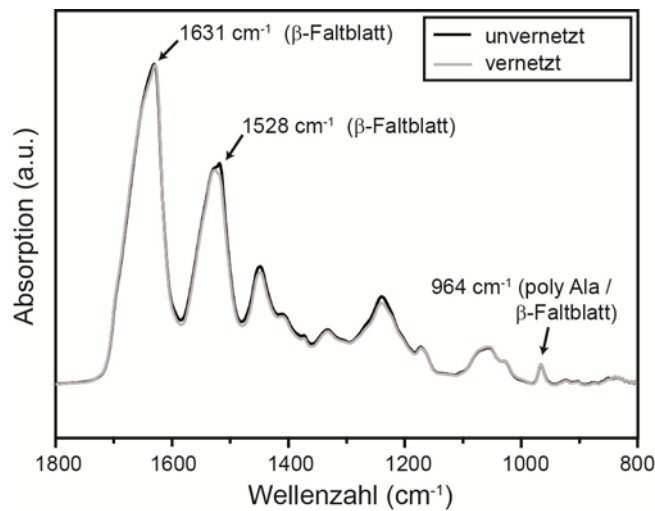
**Abb. 5.5:** IGASorp Messungen zur reversiblen Masseänderung chemisch vernetzter und unvernetzter eADF4(C16) Partikel. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zehn Adsorptions- und Desorptionszyklen (Elisa Agostini, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, LMU München).

(Modifiziert nach Neubauer et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Die maximal erreichte Massezunahme der Partikel bei 90 % Luftfeuchtigkeit liegt bei ca. 25 %. Auch nach zehn Zyklen kann keine Veränderung in der Wasseraufnahme und -abgabe chemisch vernetzter und unvernetzter eADF4(C16) Partikel detektiert werden. Die IGASorp Messungen zeigen, dass das Quellverhalten der Partikel vollständig reversibel ist. Zudem kann kein Einfluss der Vernetzungsrouten auf die Wasseraufnahme und -abgabe der Partikel beobachtet werden.

### 5.2.3 Einfluss der chemischen Vernetzung auf die Sekundärstruktur der eADF4(C16) Partikel

Aufgrund des Vernetzungsmechanismus und der damit einhergehenden Bildung von di-Tyrosinen (Kapitel 4.6.2), kann es sowohl zu inter- als auch zu intramolekularer Vernetzung der Proteine kommen. Ob diese einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine hat, wurde anhand von dehydratisierten eADF4(C16) Partikeln FTIR-spektroskopisch analysiert (Abb. 5.6). Im unvernetzten Zustand weisen die Proteinpartikel einen sehr hohen  $\beta$ -Faltblattanteil auf (ca. 60 %).<sup>104</sup> Dieser kann, unabhängig von der Vernetzungsrouten, auch für die vernetzten Partikel beobachtet werden. Die vernetzten und unvernetzten Partikel weisen vollständig identische FTIR-Spektren mit, für einen hohen  $\beta$ -Faltblattanteil, typischen Maxima auf. Diese Maxima sind bei  $1631\text{ cm}^{-1}$ ,  $1528\text{ cm}^{-1}$  und bei  $964\text{ cm}^{-1}$ , wobei das Maximum bei  $964\text{ cm}^{-1}$  poly-Alanin-Bereichen zugeordnet wird.



**Abb. 5.6:** FTIR-Spektren von chemisch vernetzten (grau) und unvernetzten (schwarz) eADF4(C16) Partikeln.

(Modifiziert nach Blüm & Scheibel, *BioNanoSci* 2012 (2), mit Genehmigung der Springer Science + Business Media)

Die Bildung der di-Tyrosine innerhalb der Partikel hat keinen FTIR-spektroskopisch detektierbaren Einfluss auf die Sekundärstruktur der eADF4(C16) Partikel. Daher wurden weitere Analysemethoden angewandt, um einen möglichen Einfluss der chemischen Vernetzung auf die Partikel detektieren zu können.

#### 5.2.4 Oberflächenpotential der eADF4(C16) Partikel

Der Einfluss der chemischen Vernetzung auf das Oberflächenpotential der eADF4(C16) Partikel wurde elektrophoretisch analysiert (Tab. 5.1). Aus der gemessenen elektrophoretischen Mobilität der Partikel lässt sich das für die Partikel spezifische Zetapotential berechnen (Kapitel 4.10.4).

**Tab. 5.1:** Zetapotential, berechnet nach Smoluchowski<sup>234</sup>, und elektrophoretische Mobilität von chemisch vernetzten und unvernetzten eADF4(C16) Partikeln. Die vernetzten Partikel werden nach ihrer Herstellungs- und Vernetzungsrouten unterschieden (vgl. Abb. 5.1).

(Modifiziert nach Blüm & Scheibel, *BioNanoSci* 2012 (2), mit Genehmigung der Springer Science + Business Media)

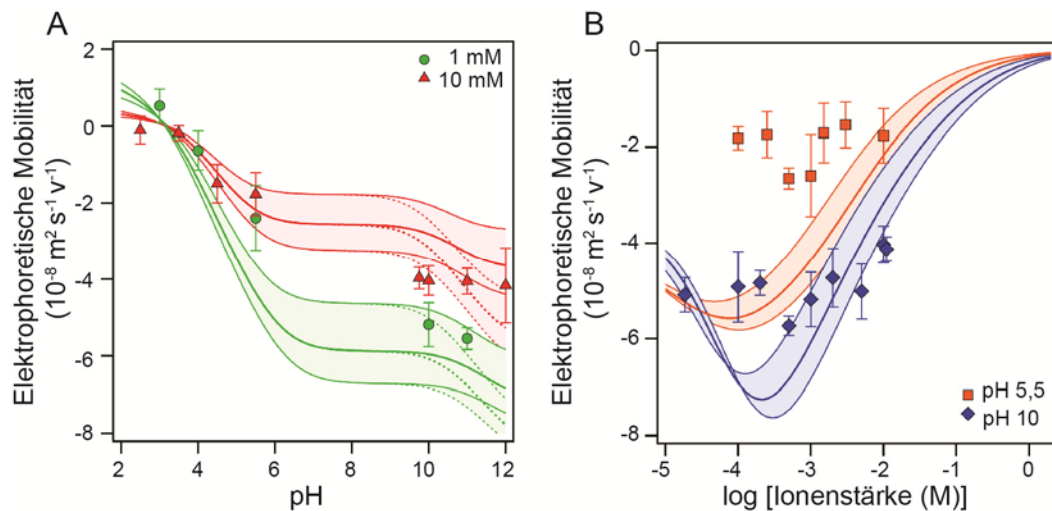
	Zetapotential (mV)	Mobilität ( $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ )
unvernetzt	$-36,6 \pm 0,4$	$-2,8 \pm 0,1$
CL_Fällung	$-42,6 \pm 2,2$	$-2,9 \pm 0,1$
CL_Diffusion	$-44,9 \pm 0,5$	$-3,3 \pm 0,1$

Für die Umrechnung der elektrophoretischen Mobilität in das Zetapotential gibt es verschiedene Modell-Theorien. Berechnet man das Zetapotential nach der Theorie von

Smoluchowski<sup>234</sup>, erhält man für unvernetzte eADF4(C16) Partikel Werte von ca. -36 mV (Tab. 5.1). Durch chemisches Vernetzen mit Rubpy und APS, unabhängig von der verwendeten Vernetzungsrouten, werden die Werte deutlich negativer (-42 bis -45 mV). Es kann somit ein Unterschied im Oberflächenpotential zwischen vernetzten und unvernetzten Partikeln ermittelt werden, jedoch nicht zwischen den zwei verschiedenen Vernetzungsrouten.

Das Zetapotential von Proteinpartikeln wird u. a. durch die Aminosäuresequenz des Proteins bestimmt. Die für das Zetapotential von eADF4(C16) Partikeln wichtigsten, ionisierbaren Aminosäuren sind Glutamate und Tyrosine. Jedes C-Modul verfügt über zwei Tyrosine und ein Glutamat, welche in die Berechnung der Oberflächenladungsverteilung mit einbezogen wird. Des Weiteren besitzt jedes eADF4(C16) Molekül ein Glyzin am C-Terminus, ein Arginin im T7-Tag und theoretisch ein Methionin am N-Terminus, welches allerdings teilweise von *E. coli* posttranslational abgebaut wird<sup>235</sup> und daher im eigentlichen Protein meist nicht mehr vorhanden ist. Die Glutamatreste besitzen aufgrund ihres  $pK_a$  von 4,25 die einzigen funktionellen Gruppen, die bereits bei einem moderaten pH-Wert dissoziiert vorliegen. Die Aminosäuren des N- bzw. C-Terminus von eADF4(C16) spielen aufgrund ihrer sehr basischen/sauren  $pK_a$ -Werte für die Berechnung der Oberflächenladungsverteilung nur eine untergeordnete Rolle. Die Oberflächenladungsverteilung der eADF4(C16) Partikel unterliegt einigen Schwankungen. Diese hängen mit der Anordnung der Aminosäuren innerhalb der Partikel zusammen, wodurch es sowohl zu einer Varianz der Ladungsverteilung innerhalb der Partikel als auch auf der Oberfläche kommt.

Neben der Aminosäurezusammensetzung sind die elektrophoretische Mobilität und somit auch das Zetapotential von eADF4(C16) Partikeln auch von den Umgebungsbedingungen während der Messung abhängig. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die elektrophoretische Mobilität der Partikel sowohl in Abhängigkeit vom pH-Wert, bei zwei verschiedenen Ionenstärken, (Abb. 5.7A) als auch in Abhängigkeit von der Ionenstärke, bei zwei verschiedenen pH-Werten, bestimmt (Abb. 5.7B).



**Abb. 5.7:** Elektrophoretische Mobilität von eADF4(C16) Partikeln in Abhängigkeit von dem pH-Wert (A) und der Ionenstärke (B). Die pH-abhängige elektrophoretische Mobilität wurde bei zwei Ionenstärken bestimmt und die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von der Ionenstärke bei zwei verschiedenen pH-Werten (Nicolas Helfricht, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth).

(Modifiziert nach Helfricht et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

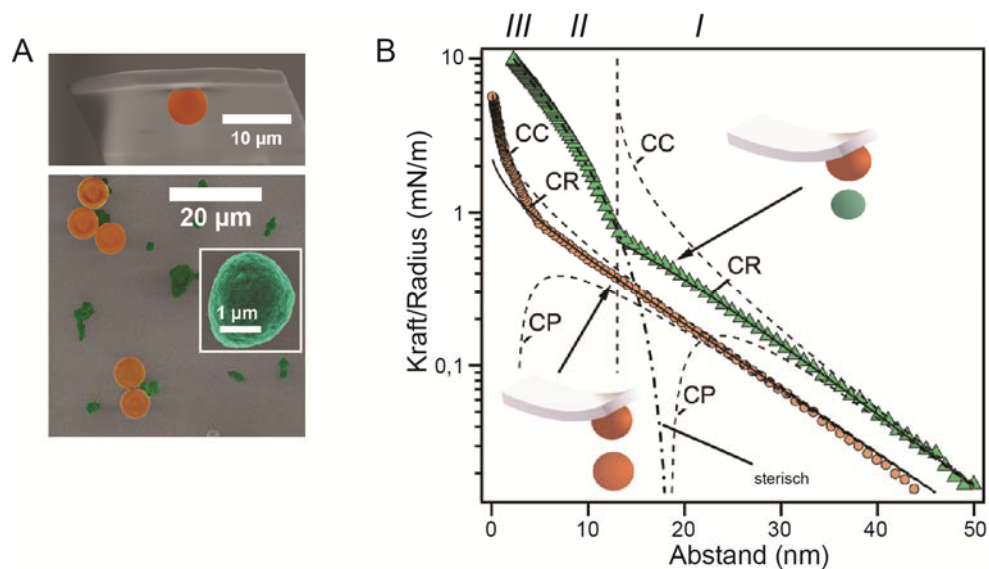
Anstatt auf die Theorie von Smoluchowski zurück zu greifen, wurde diesen Messungen die Theorie von O'Brien und White zugrunde gelegt.<sup>232</sup> Charakteristisch für diese Theorie ist das gemessene Minimum der elektrophoretischen Mobilität als Funktion von der Ionenstärke (Abb. 5.7B). Die Theorie von O'Brien und White hat zusätzlich den Vorteil, dass die Relaxationseffekte der umgebenden Ionenwolke mit berücksichtigt werden. Des Weiteren wurde bei den durchgeführten Messungen berücksichtigt, dass es zu einer Varianz in der Oberflächenzusammensetzung der eADF4(C16) Partikel kommen kann. Diese Varianz ist in Abb. 5.7 durch die farbigen Flächen dargestellt und stellt eine Variabilität von 30% ( $\Gamma_{mob}$  Minimum und Maximum) dar. Die farbigen Linien repräsentieren die aus den Werten für  $\Gamma_{mob}$  berechneten Werte für die elektrophoretische Mobilität, ebenfalls nach der Theorie von O'Brien und White, wobei bei allen Berechnungen immer ein konstanter Partikeldurchmesser von  $2,8 \mu\text{m}$  angenommen wurde.

Die elektrophoretische Mobilität der eADF4(C16) Partikel in Abhängigkeit von der Ionenstärke (Abb. 5.7B) entspricht den theoretischen Werten nach O'Brien und White, so dass deren Theorie auf die eADF4(C16) Partikel anwendbar ist. Die experimentellen Werte sind in Bezug auf die elektrophoretische Mobilität geringer als die theoretischen. Diese Abweichungen gehen auf eine die Partikel umgebende diffuse Schicht zurück, die bereits für andere Materialien beschrieben wurde.<sup>236,237</sup>



Insbesondere im sauren pH-Bereich stimmen die berechneten Werte für die elektrophoretische Mobilität in Abhängigkeit vom pH-Wert gut mit den experimentell ermittelten überein (Abb. 5.7A). Die negativen Werte der elektrophoretischen Mobilität nehmen mit steigendem pH-Wert weiter zu, wobei ab neutralem pH-Wert ein Plateau zu beobachten ist. Dieses theoretische Plateau im neutralen pH-Bereich konnte jedoch bei dem verwendeten Versuchsaufbau experimentell nicht nachgewiesen werden. Aufgrund des sehr basischen  $pK_a$  der Tyrosine konnte jedoch das Plateau im Basischen bestimmt werden.

Proteinpartikel weisen am äußeren Rand als zusätzliche sterische Komponente eine diffuse Schicht auf.<sup>236,237</sup> Um diese, die Partikel umgebende, diffuse Schicht auch experimentell nachzuweisen, wurde die *Colloidal Probe Technique* verwendet (Kapitel 4.9.5). Mit Hilfe eines immobilisierten Silikat-Partikels (Abb. 5.8A, orange) am *Cantilever* werden die Grenzflächeneigenschaften der eADF4(C16) Partikel (grün) und als Vergleichsgröße die Eigenschaften von Silikat-Partikeln bestimmt (Abb. 5.8A).



**Abb. 5.8:** A) REM-Aufnahme der immobilisierten Silikat- (orange) und eADF4(C16) Partikel (grün) und des *Colloidal Probe* Aufbaus B) Repräsentative Kraftprofile für die Interaktion zwischen Silikat-Silikat-Partikeln und zwischen Silikat-eADF4(C16) Partikeln bei pH 5,5 und einer Ionenstärke von 1 mM. Die verwendeten Fits gehen auf die Poisson-Boltzmann Gleichung zurück, welche drei verschiedene Grenzflächenbedingungen berücksichtigt: konstante Ladung (CC), konstantes Potential (CP) und die Regelung der Ladung (CR) (Nicolas Helfricht, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth). (Modifiziert nach Helfricht et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

In Abb. 5.8B wird deutlich, dass die Interaktionsprofile zwischen den Silikat- und den eADF4(C16) Partikeln im Vergleich zu reinen Silikat-Silikat Interaktionsprofilen

komplexer sind. Bei reinen Silikat-Silikat Interaktionsprofilen spielt lediglich die Elektrostatik eine Rolle, was durch den linearen Kurvenverlauf in der semi-logarithmischen Darstellung verdeutlicht wird. Die abgebildeten Wechselwirkungsprofile sind auf den effektiven Radius der Partikel normiert (Abb. 5.8B).

Das komplexe Wechselwirkungsprofil zwischen eADF4(C16) Partikeln und Silikat-Partikeln geht auf unterschiedliche Interaktionen zwischen den Partikeln zurück. Aufgrund der sphärischen Form der Partikel lassen sich durch die *Colloidal Probe Technique* verschiedene Bereiche der eADF4(C16) Partikel verdeutlichen. Nähert man den *Cantilever* langsam an den Partikel an, so kann ab einem Abstand von ca. 50 nm eine erste kraftspektroskopische Reaktion des *Cantilevers* detektiert werden, es handelt sich hierbei um den Bereich der diffuse Schicht (I). Um das Potential dieser diffusen Schicht berechnen zu können, wurden die Wechselwirkungskräfte zwischen Silikat-Partikeln bestimmt (symmetrischer Fall). Über diese Werte kann daraufhin das Potential der eADF4(C16) Partikel bestimmt werden, welches über die Wechselwirkungskräfte zwischen Silikat-Partikel und eADF4(C16) Partikel analysiert wird (asymmetrischer Fall). Durch weiteres Annähern des *Cantilevers* an die Partikel, kommt es zu sterischen Interaktionen (II). Der Beginn dieses Bereiches wird durch die gestrichelte vertikale Linie in Abb. 5.8B symbolisiert. Nähert man den *Cantilever* dem Partikel weiter an, so kommt es zu einer mechanischen Deformation des Partikels (III), welche bereits durch die mikromechanischen Charakterisierungen der eADF4 Partikel beschrieben wurde (Kapitel 4.9.5.2).

### 5.2.5 Chemische Stabilität der eADF4(C16) Partikel

Es konnte bereits anhand anderer eADF4(C16) Morphologien (Hydrogelen und Kapseln) gezeigt werden, dass die chemische Vernetzung der Proteine Einfluss auf ihre Beständigkeit gegenüber Lösungsmittel hat.<sup>100,210,211</sup> Ein potentieller Einfluss der chemischen Vernetzung auf eADF4(C16) Partikel wurde hingegen bisher nicht analysiert. Aus diesem Grund wurden sowohl vernetzte als auch unernetzte eADF4(C16) Partikel in verschiedenen Lösungsmitteln bis zu 25 h inkubiert (Tab. 5.2) (Kapitel 4.6.3). Es kann kein Unterschied zwischen vernetzten Partikel der zwei verschiedenen Routen

beobachtet werden, weshalb die Ergebnisse der zwei Vernetzungsrouten in Tab. 5.2 unter „vernetzte Partikel“ zusammengefasst dargestellt sind.

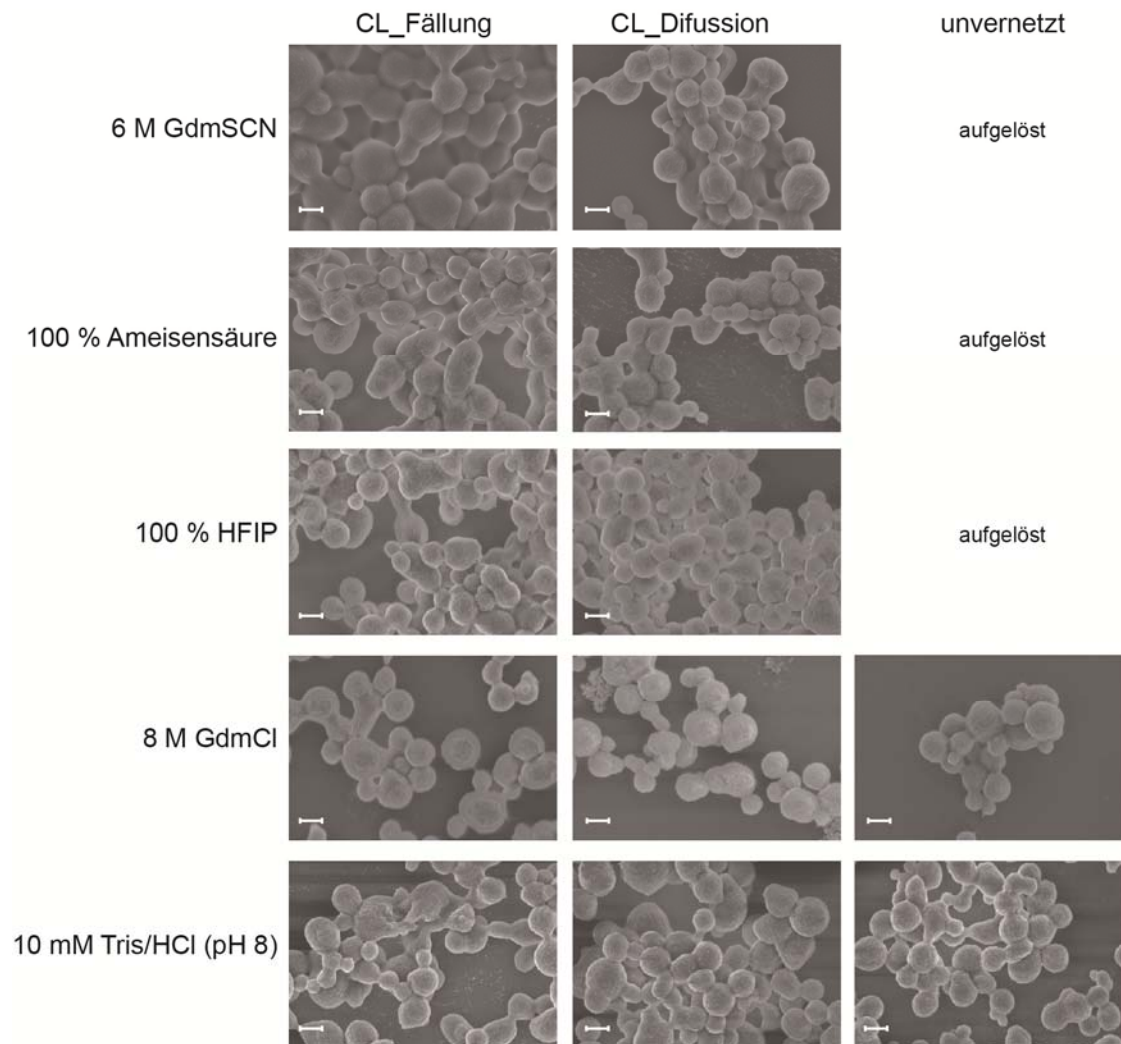
**Tab. 5.2:** Chemische Stabilität vernetzter und unvernetzter eADF4(C16) Partikel. „-“ bedeutet die Partikel wurden innerhalb der angegebenen Zeit vollständig aufgelöst, es konnten keine Partikel mehr sedimentiert werden. „+“ kennzeichnet Partikel, die nach der angegebenen Zeit noch stabil vorlagen und sedimentiert wurden.

(Modifiziert nach Blüm & Scheibel, *BioNanoSci* 2012 (2), mit Genehmigung der Springer Science + Business Media)

Lösungsmittel	vernetzte Partikel		unvernetzte Partikel	
	6h	25h	6h	25h
<b>6 M GdmSCN</b>	+	+	-	-
<b>100 % Ameisensäure</b>	+	+	-	-
<b>100 % HFIP</b>	+	+	-	-
<b>8 M GdmCl</b>	+	+	+	+
<b>10 mM Tris-Puffer (pH 8)</b>	+	+	+	+

Vernetzte eADF4(C16) Partikel sind in allen verwendeten Lösungsmitteln stabil (Tab. 5.2). Die unvernetzten Partikel wurden von 6 M GdmSCN, Ameisensäure und HFIP innerhalb kurzer Zeit vollständig aufgelöst, so dass keine Partikel mehr sedimentiert werden konnten. Sowohl 8 M GdmCl als auch 10 mM Tris-Puffer zeigen keine Auswirkungen auf die Partikelstabilität.

Um einen Eindruck von den Partikeloberflächen nach 25 Stunden Inkubation der Partikel in den verschiedenen Lösungsmitteln zu erhalten, wurden diese sedimentiert, getrocknet und elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. 5.9). Die dehydratisierten Partikel wurden hierfür mit Platin besputtert.



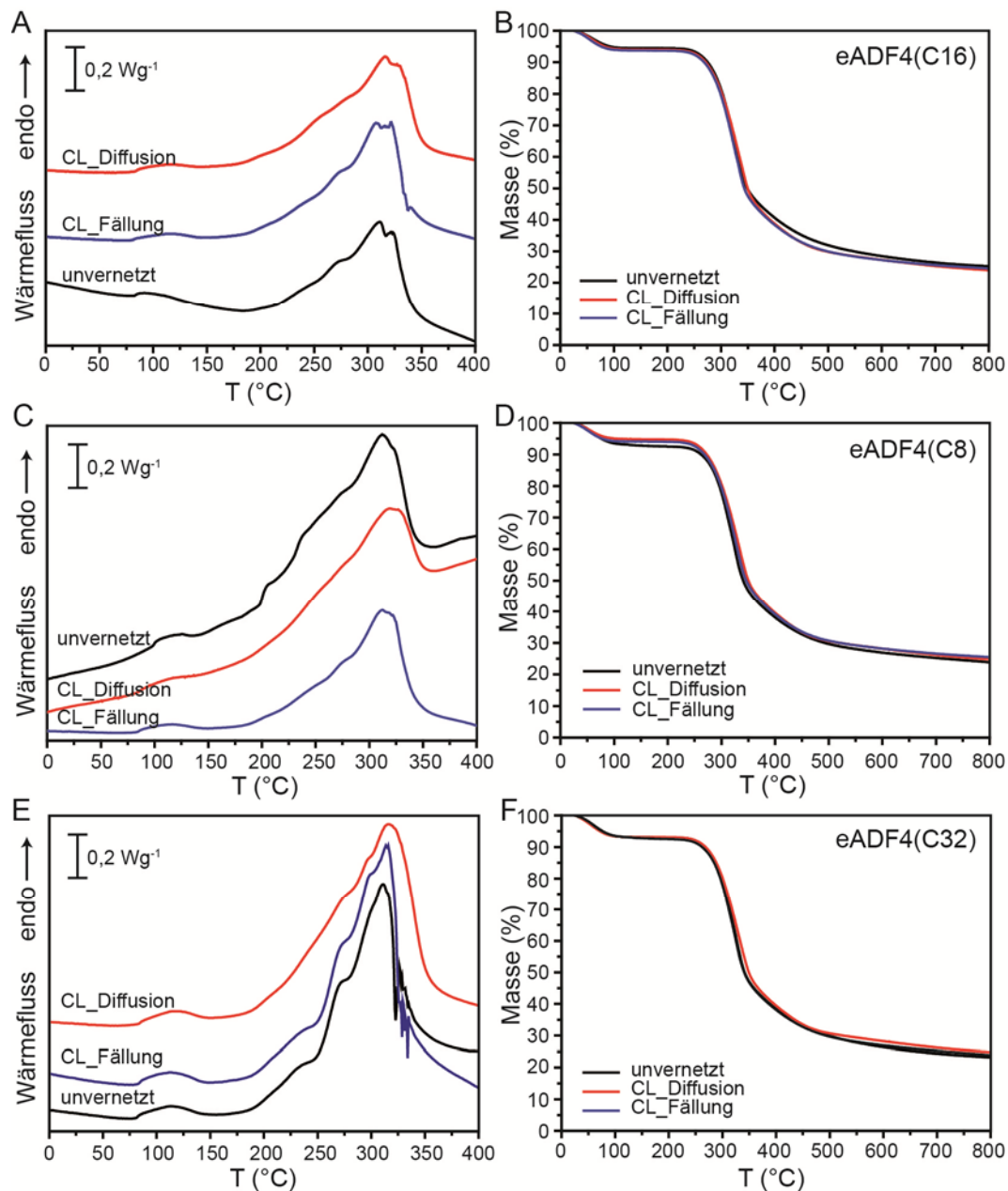
**Abb. 5.9:** Elektronenmikroskopische Analyse der auf ihre chemische Stabilität hin untersuchten, vernetzten und unvernetzten eADF4(C16) Partikel, nach 25 Stunden Inkubation in verschiedenen Lösungsmitteln. Partikel beider Vernetzungsrouten wurden analysiert (vgl. Abb. 5.1). Die Maßbalken entsprechen 300 nm.

Nach Inkubation der Partikel in den verschiedenen Lösungsmitteln kann elektronenmikroskopisch keine Veränderung an der Oberflächenbeschaffenheit der nicht-denaturierten Partikel detektiert werden. Die Oberfläche der Partikel ist glatt und die Partikel zeigen eine runde Form, unabhängig vom verwendeten Denaturierungsmittel. Die in 10 mM Tris-Puffer inkubierten Partikel dienen hierbei als Kontrolle. Durch die chemische Vernetzung kann somit, unabhängig von der verwendeten Vernetzungsrouten, eine verbesserte chemische Stabilität der Partikel erreicht werden.

### 5.2.6 Thermische Stabilität von eADF4 Partikel

Die Eigenschaften von eADF4 Partikeln können sowohl durch die Bildung von di-Tyrosinen, aufgrund der chemischen Vernetzung, als auch durch die Kettenlängen der Proteine (physikalische Vernetzung) beeinflusst werden. Ob diese Vernetzungsarten einen Einfluss auf die thermische Stabilität der Partikel haben, wurde im Folgenden mittels DSC (Kapitel 4.10.1) und TGA (Kapitel 4.10.2) analysiert (Abb. 5.10). Unter Verwendung der dynamischen Differenzkalorimetrie ist es möglich, die abgegebene und aufgenommene Wärmeenergie während des Aufheizens der Partikeln zu detektieren (Abb. 5.10A, C, E).

Für eADF4(C16) Partikel kann ein endothermes Maximum im Wärmefluss bei ca. 310 °C gemessen werden, dieses Maximum ist unabhängig von der chemischen Vernetzungsrouten der Partikel erkennbar. Alle in Abb. 5.10A dargestellten Kurven weisen zusätzlich ein weiteres endothermes Signal bei ca. 100 °C auf. Dieses geht auf verdampfendes Wasser zurück, und wurde zusätzlich durch TGA-Messungen bestätigt (Abb. 5.10B). Diese thermogravimetrischen Analysen zeigten ebenfalls keinen Einfluss der chemischen Vernetzung der Proteine auf die thermische Stabilität der eADF4(C16) Partikel. Die temperaturabhängigen Masseänderungen visualisieren einen Masseverlust von ca. 10 % beim Aufheizen der Partikel auf 100 °C, erst ab einer Temperatur von ca. 280 °C wird ein deutlicher Masseverlust sichtbar. Zwischen 280 °C und 350 °C geht der Masseanteil der eADF4(C16) Partikel auf ca. 30 % der Ausgangsmasse zurück. Dieser Abbau ist auf die thermische Zersetzung des Proteinmaterials zurückzuführen und unabhängig vom chemischen Vernetzungsgrad.



**Abb. 5.10:** Thermische Stabilität vernetzter und unvernetzter eADF4 Partikel, analysiert mittels DSC (A, C, E) und TGA (B, D, F). Die Versuche wurden mit eADF4(C16) Partikeln (A und B), eADF4(C8) Partikeln (C und D) und eADF4(C32) Partikeln (E und F) durchgeführt, um zusätzlich zum Einfluss der chemischen Vernetzung auch einen möglichen Einfluss der Molekülkettenlängen und somit der physikalischen Vernetzung auf die thermische Stabilität zu detektieren.

(Modifiziert nach Neubauer et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Um den Einfluss der Molekülkettenlänge der Proteine auf das thermische Verhalten der Partikel zu bestimmen, wurde für eADF4(C8) bzw. eADF4(C32) ebenfalls sowohl der Wärmefluss (Abb. 5.10C und E) als auch die Massenabnahme (Abb. 5.10D und F) analysiert. Im Vergleich zu eADF4(C16) waren die Kurvenverläufe unverändert. Die durch DSC aufgezeichneten Maxima im Wärmefluss von eADF4(C16) Partikeln bei ca. 100 °C und 310 °C sind auch bei eADF4(C8) und eADF4(C32) Partikeln detektierbar. Die TGA-

Messungen ergeben ebenfalls eine Abnahme der Masse um 10 % bei ca. 100 °C durch verdampfendes Wasser und die thermische Zersetzung zwischen 280 °C und 350 °C.

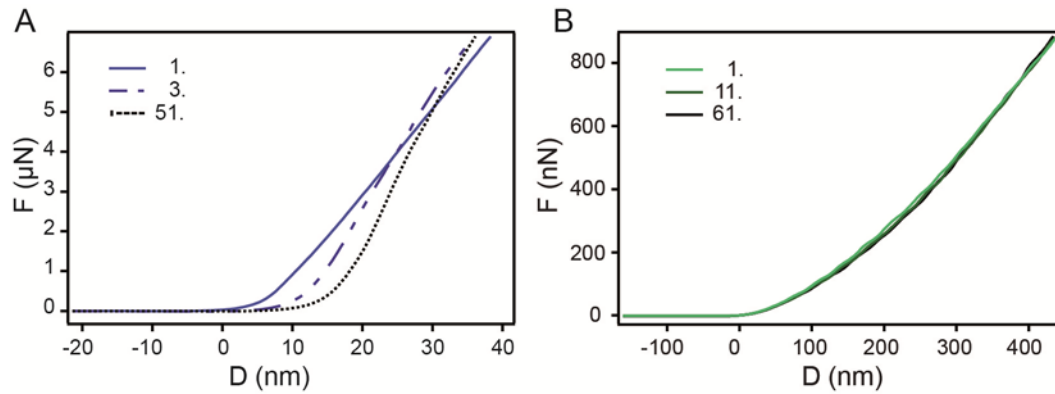
Somit wurde kein Einfluss der analysierten Vernetzungsarten sowie der Molekülkettenlängen der Proteine auf die thermischen Eigenschaften der eADF4 Partikel beobachtet.

### 5.2.7 Mechanische Stabilität von eADF4 Partikeln

Die mechanischen Eigenschaften von Partikeln sind für viele Anwendungen von Bedeutung. Aus diesem Grund wird mittels der *Colloidal Probe Technique* (Kapitel 4.9.5.2) das Deformationsverhalten der eADF4(C16) Partikel bestimmt. Für die Auswertung der dadurch generierten Daten dient Hertz als theoretisches Modell.<sup>224</sup>

Aufgrund des Quellverhaltens der eADF4(C16) Partikel in Gegenwart von Wasser sind Unterschiede in den aus den Kraft-Abstands-Kurven resultierenden Elastizitätsmoduln der Partikel erkennbar. Dehydratisierte, unvernetzte eADF4(C16) Partikel weisen einen mittleren Elastizitätsmodul im Giga-Pascal-Bereich ( $0,8 \text{ GPa} \pm 0,5 \text{ GPa}$ ) auf, hydratisierte, unvernetzte eADF4(C16) Partikel zeigen ein E-Modul im Mega-Pascal-Bereich ( $2,99 \text{ MPa} \pm 0,04 \text{ MPa}$ ).

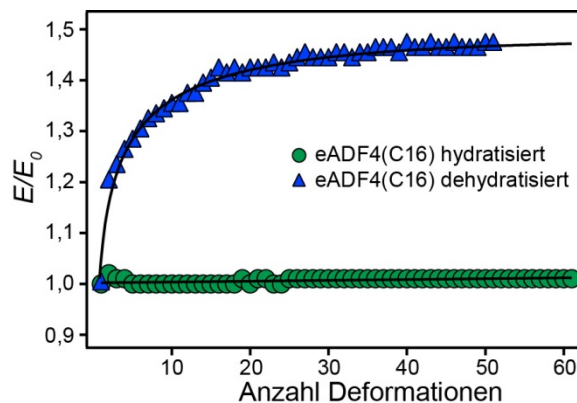
Zusätzlich wurden Ermüdungstests mit 51 bzw. 61 Wiederholungen sowohl an dehydratisierten (Abb. 5.11A) als auch an hydratisierten eADF4(C16) Partikeln (Abb. 5.11B) durchgeführt. Die dehydratisierten eADF4(C16) Partikel (Abb. 5.11A) zeigen hierbei eine Verschiebung des Kontaktpunktes der Kraft-Abstands-Kurven mit zunehmender Deformationszahl. Zusätzlich nimmt die Steigung der Kraft-Abstands-Kurven mit Zunahme der Deformationen zu. Diese Ergebnisse deuten auf ein nicht-elastisches Verhalten der dehydratisierten eADF4(C16) Partikel hin. Die hydratisierten eADF4(C16) Partikel (Abb. 5.11B) hingegen weisen bei der Aufnahme der Kraft-Abstands-Kurven ein ideal elastisches Verhalten auf. Auch die Wiederholung der Deformationsexperimente zeigt keine Veränderungen der Kurven, sowohl der Kontaktpunkt als auch die Steigung der Kurven bleiben nach 61 Wiederholungen gleich.



**Abb. 5.11:** Ermüdungstests an eADF4(C16) Partikeln im dehydratisierten (A) und hydratisierten Zustand (B) (Martin Neubauer, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth).

(Modifiziert nach Neubauer et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Vergleicht man die aus den Kraft-Abstands-Kurven ermittelten mittleren Elastizitätsmoduln der hydratisierten und dehydratisierten Partikel wird ein Unterschied deutlich (Abb. 5.12). Der mittlere E-Modul der hydratisierten Partikel bleibt nach über 60 Wiederholungen konstant auf dem Anfangswert, der mittlere Elastizitätsmodul der dehydratisierten Partikel steigt hingegen an.



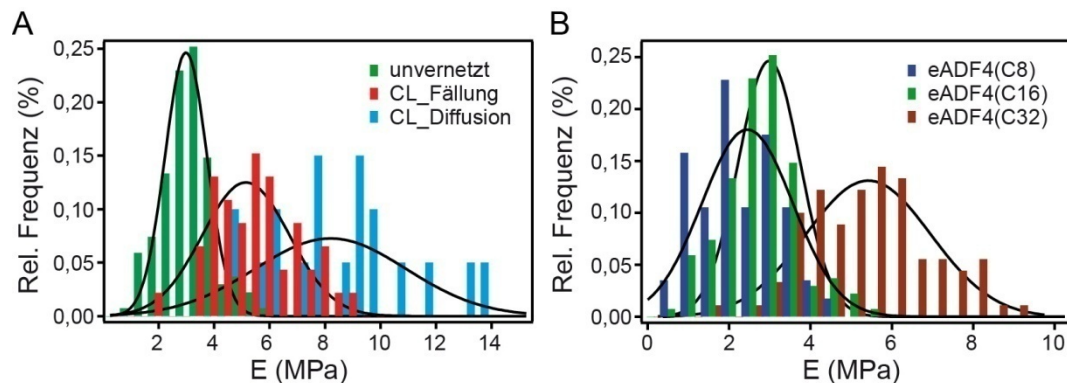
**Abb. 5.12:** Ermüdungstests an eADF4(C16) Partikeln. Vergleichende Darstellung der mittleren Elastizitätsmoduln von hydratisierten (n=17) und dehydratisierten (n=11) Partikeln (Martin Neubauer, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth).

(Modifiziert nach Neubauer et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Als nächstes wurde der Einfluss der chemischen und der physikalischen Vernetzung auf das mechanische Verhalten der Partikel im hydratisierten Zustand (Abb. 5.13) ermittelt. Die den Elastizitätsmoduln entsprechenden Gauß-Fits sind in schwarz dargestellt. Der Einfluss einer chemischen Vernetzung auf die E-Moduln hydratisierter eADF4(C16) Partikel ist in Abb. 5.13A zusammengefasst. Der Mittelwert der E-Moduln unvernetzter Partikel liegt bei ca. 3 MPa. Dieser verschiebt sich nach chemischer Vernetzung mit Rubpy und APS abhängig von der gewählten Vernetzungsrouten. Werden



die Vernetzermoleküle durch co-Präzipitation in die Partikel eingeschlossen (CL\_Fällung), verschiebt sich der mittlere E-Modul hin zu ca. 5,5 MPa, diffundieren Rubpy und APS in die bereits präzipitierten Partikel (CL\_Diffusion), erhöht sich der durchschnittliche E-Modul auf ca. 8,5 MPa. Im dehydratisierten Zustand konnte kein Einfluss der chemischen und physikalischen Vernetzung auf die Elastizitätsmoduln der Partikel gemessen werden.



**Abb. 5.13:** Elastizitätsmoduln der eADF4 Partikel im hydratisierten Zustand mit zugehörigem Gauß-Fit in Abhängigkeit von der chemischen Vernetzung (A) und der Molekülkettenlänge (B) (physikalische Vernetzung) (Martin Neubauer, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth).

(Modifiziert nach Neubauer et al, *Biomater Sci* 2013 (1), mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

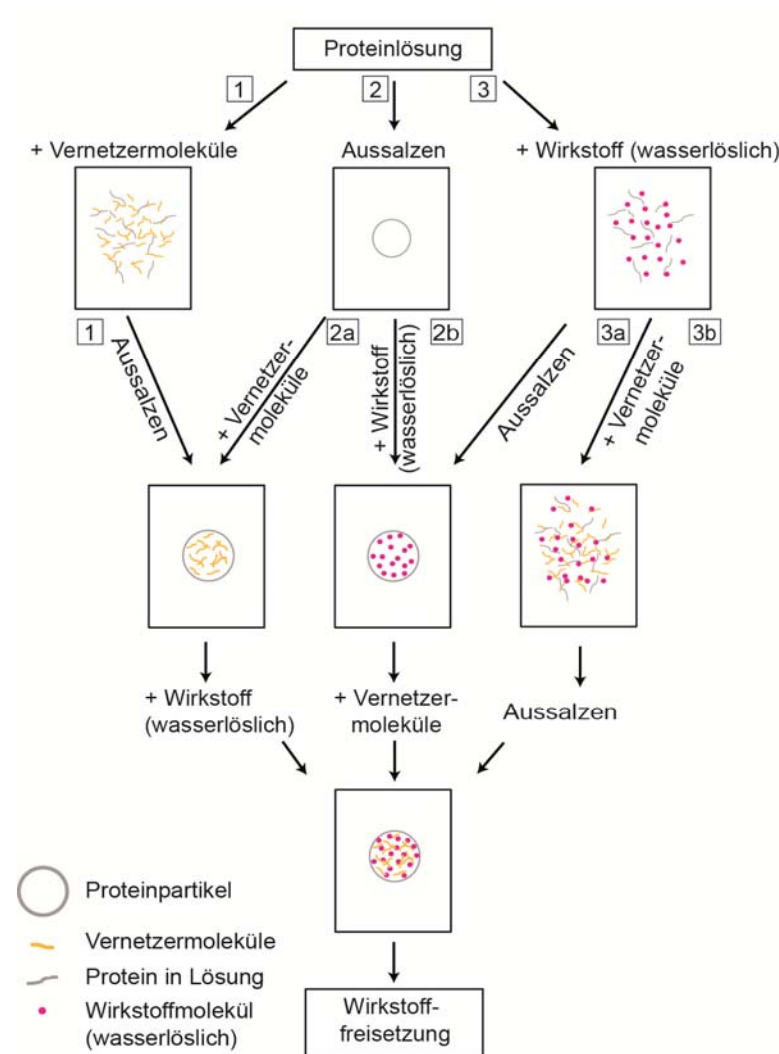
Neben dem Einfluss der chemischen Vernetzung auf die E-Moduln der eADF4(C16) Partikel gibt es auch einen Einfluss, der auf physikalische Vernetzung zurückgeführt werden kann (Abb. 5.13B). Durch Verkürzen der Kettenlänge von 16 Wiederholungen des C-Moduls auf acht Wiederholungen, verringert sich der mittlere E-Modul der zugehörigen Partikel von ca. 3 MPa für eADF4(C16) Partikel auf ca. 2,5 MPa für eADF4(C8) Partikel. Eine Verdopplung der Kettenlänge von 16 Wiederholungen des C-Moduls auf 32 Wiederholungen führt zu einer Erhöhung des mittleren Elastizitätsmoduls auf 5,5 MPa für eADF4(C32).

Somit kann der Einfluss einer chemischen und einer physikalischen Vernetzung auf das mikromechanische Verhalten von hydratisierten eADF4(C16) Partikeln beobachtet werden.

### 5.3 Beladung und Freisetzung von Rhodamin B aus eADF4(C16) Partikeln

Eine mögliche Anwendung der eADF4(C16) Partikel liegt im Bereich des Wirkstofftransports und der kontrollierten Wirkstofffreisetzung. Um modellhaft die Beladung und Freisetzung von Wirkstoffen zu testen, wurden eADF4(C16) Partikel mit

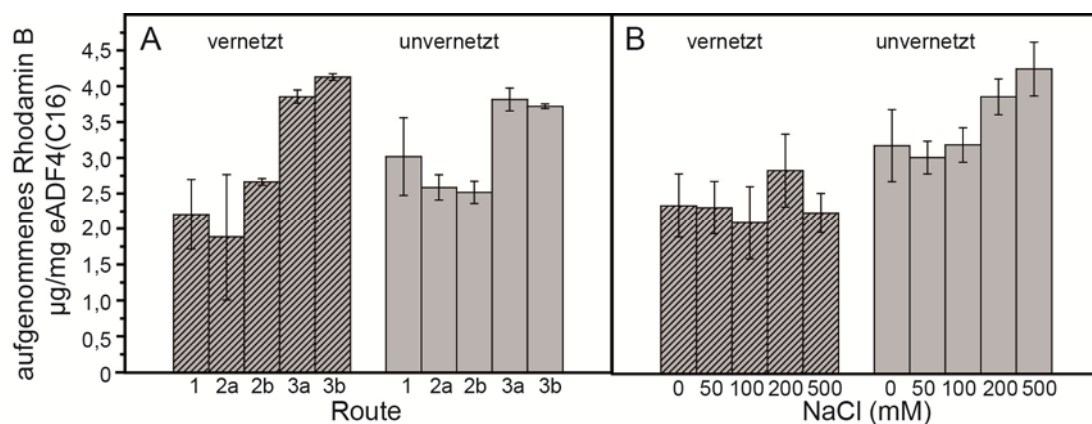
einem Durchmesser von 400 bis 600 nm hergestellt und mit Rhodamin B beladen (Kapitel 4.6.4). Zusätzlich wurden die Partikel chemisch mit Rubpy und APS vernetzt (Kapitel 4.6.2), um dadurch nicht nur die chemische Beständigkeit sondern auch die Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln beeinflussen zu können. Es gibt fünf verschiedene Routen, die zu beladenen und vernetzten eADF4(C16) Partikeln führen, diese sind in Abb. 5.14 zusammengefasst.



**Abb. 5.14:** Fünf Routen, die zu vernetzten und beladenen eADF4(C16) Partikeln führen. Die verschiedenen Routen unterscheiden sich in der Reihenfolge der einzelnen Schritte (Ausfällen, Beladen, Vernetzen). (Modifiziert nach Blüm & Scheibel, *BioNanoSci* 2012 (2), mit Genehmigung der Springer Science + Business Media)

Alle hier vorgestellten Routen resultieren in beladenen und vernetzten eADF4(C16) Partikeln, es kann jedoch zu unterschiedlichen Beladungseffizienzen kommen. Dies wird im Folgenden analysiert.

Vergleicht man die Mengen an aufgenommenem Rhodamin B zwischen den verschiedenen Routen, so wird deutlich, dass durch co-Präzipitation von Rhodamin B und eADF4(C16) sowohl bei vernetzten als auch bei unvernetzten Partikeln (Routen 3a und b) ca. 4  $\mu\text{g}$  Rhodamin B pro mg eADF4(C16) in die Partikel aufgenommen wird (Abb. 5.15A). Die Menge an aufgenommenen Rhodamin B ist hingegen für Partikel, die durch Diffusion beladen wurden (Routen 1, 2a und 2b), deutlich geringer und liegt bei ca. 2 bis 2,5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  eADF4(C16). Bei diesen Beladungsrouten scheint die chemische Vernetzung der Proteine keinen Einfluss auf die Menge an aufgenommenen Rhodamin B zu haben.

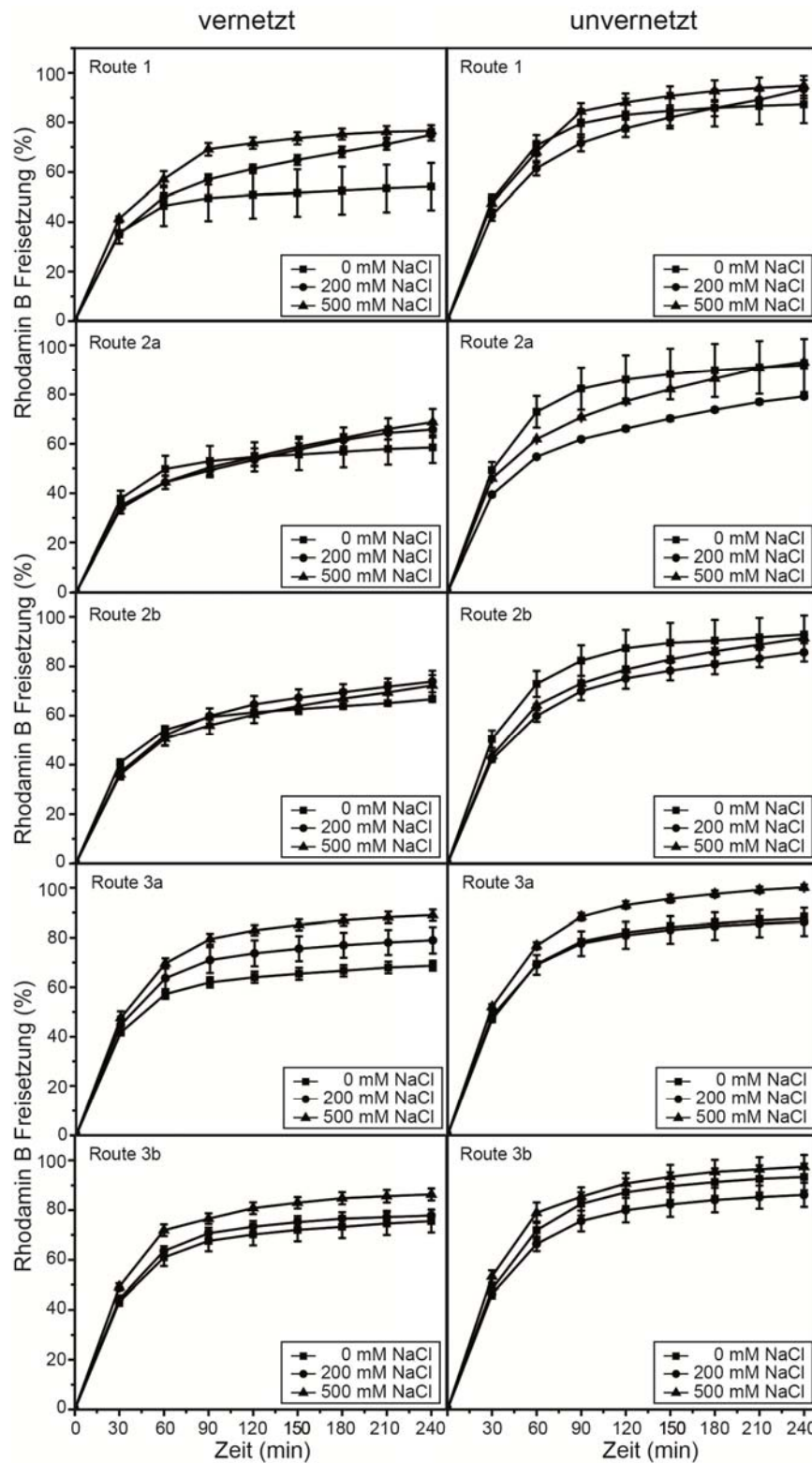


**Abb. 5.15:** Menge an aufgenommenem Rhodamin B, abhängig von den in Abb. 5.14 dargestellten Routen (A) und abhängig von der NaCl-Konzentration (B), dargestellt für Partikel, welche Route 1 folgend hergestellt und beladen wurden.

(Modifiziert nach Blüm & Scheibel, *BioNanoSci* 2012 (2), mit Genehmigung der Springer Science + Business Media)

Um die Menge an aufgenommenem Rhodamin B in bereits präzipitierte Partikel (eindiffundiert) zu erhöhen, wurde NaCl in unterschiedlichen Konzentrationen zur Rhodamin B-Lösung zugegeben. Diese Versuche erfolgten mit nach Route 1 hergestellten und vernetzten Partikeln. Bei unvernetzten Partikeln kann eine geringe Zunahme an aufgenommenem Rhodamin B in Anwesenheit von NaCl beobachtet werden (Abb. 5.15B). Durch Zugabe von 500 mM NaCl kann die Menge an aufgenommenem Rhodamin B von ca. 3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  auf ca. 4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  eADF4(C16) erhöht werden. Auf die Diffusion von Rhodamin B in chemisch vernetzte Partikel haben die getesteten Salzkonzentrationen, von 0 bis 500 mM, keinen Einfluss.

Als nächstes wurde die Freisetzung des Modellwirkstoffes aus den Partikeln analysiert (Kapitel 4.6.5). Über einen Zeitraum von vier Stunden wurde alle 30 min das die Partikel umgebende Medium gewechselt und analysiert (Abb. 5.16).



**Abb. 5.16:** Darstellung der salzabhängigen Rhodamin B-Freisetzung aus vernetzten und unvernetzten Partikeln. Die eADF4(C16) Partikel wurden analog zu den in Abb. 5.14 dargestellten Routen hergestellt und

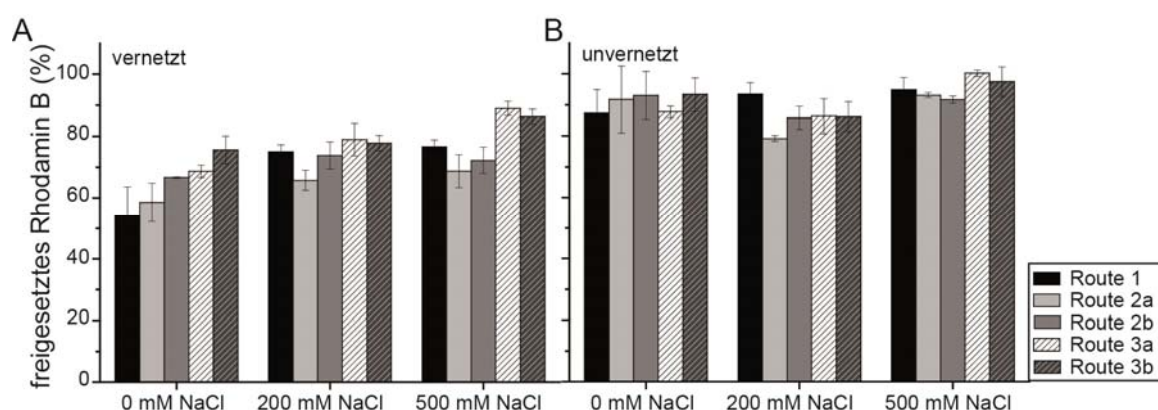
beladen. Am Zeitpunkt 0 min entspricht die Menge an freigesetztem Rhodamin B der Menge, die vor der Zugabe der beladenen Partikel im Freisetzungspuffer vorliegt.

*(Modifiziert nach Blüm & Scheibel, BioNanoSci 2012 (2), mit Genehmigung der Springer Science + Business Media)*

Sowohl bei vernetzten als auch bei unvernetzten Partikeln werden in den ersten 30 min bis zu 45 % des aufgenommenen Rhodamin B wieder freigesetzt. Bei unvernetzten Partikeln liegt die Freisetzungsrates nach den ersten 30 min leicht oberhalb derer der vernetzten Partikel, nach 90 min werden nur noch geringe Mengen Rhodamin B freigesetzt.

Je nach Herstellungs- und Beladungsroute unterscheiden sich die Rhodamin B-Freisetzungsprofile der vernetzten Partikel leicht. Chemisch vernetzte Partikel der Routen 1, 2a und 2b wurden durch Diffusionsprozesse mit Rhodamin B beladen und zeigen die geringste Wirkstofffreisetzung, auch nach 240 min. Vernetzte Partikel der Routen 3a und 3b wurden durch co-Präzipitation von Rhodamin B und eADF4(C16) beladen. Wie bereits in Abb. 5.15A dargestellt, ist die Menge an aufgenommenem Rhodamin B bei diesen Partikeln am höchsten, die Rhodamin B-Freisetzung aus den vernetzten Partikeln ebenfalls (Abb. 5.16). Die Rhodamin B-Freisetzung aus unvernetzten Partikeln unterscheidet sich zwischen den einzelnen Routen kaum. Um die Freisetzungsrates des Modellwirkstoffes beeinflussen zu können, wurde der Einfluss von NaCl auf die Rhodamin B-Freisetzung analysiert. Hierfür wurden 200 und 500 mM NaCl eingesetzt. Abhängig von der Herstellungsroute zeigen chemisch vernetzte und unvernetzte Partikel unterschiedliche Einflüsse des Salzes auf die Wirkstofffreisetzung. Bei Partikeln der Route 1 wird die Freisetzungsrates abhängig von der Salzkonzentration erhöht. Nach vier Stunden sind bei vernetzten Partikeln dieser Route ohne NaCl ca. 50 % des beladenen Rhodamin B aus den Partikeln diffundiert. Die Zugabe von 200 oder 500 mM NaCl erhöht diesen Wert auf ca. 70 %, wobei sich die Wirkstofffreisetzungsprofile leicht unterscheiden. Durch die Zugabe von 100 mM NaCl wird bereits nach 90 min ein Plateau erreicht, bei 200 mM NaCl nicht. Bei unvernetzten eADF4(C16) Partikeln der Route 1 liegt die Freisetzungsrates nach vier Stunden ohne Salz bereits bei ca. 85 %, die Zugabe von NaCl verändert diese Freisetzungsrates nur geringfügig auf ca. 90 %. Auch bei den unvernetzten Partikeln ändern sich durch die Zugabe von Salz die Freisetzungsprofile leicht. Vernetzte Partikel der Routen 2a und 2b werden durch die Zugabe von NaCl nur geringfügig in der Rhodamin B-Freisetzung

beeinflusst, um ca. 5 %. Unvernetzte Partikel dieser beiden Routen reagieren deutlicher auf die Zugabe von Salz. Bei beiden Routen wird die Rhodamin B-Freisetzung durch die Zugabe von 200 mM NaCl leicht verringert, die Zugabe von 500 mM NaCl erhöht die Wirkstofffreisetzung nach 240 min jedoch nicht. Auch eADF4(C16) Partikel der Routen 3a und 3b zeigen eine salzabhängige Modellwirkstofffreisetzung. Die Zugabe von 200 mM NaCl erhöht die Rhodamin B-Freisetzung der vernetzten Partikel der Route 3a um ca. 10 %, die Zugabe von 500 mM NaCl um ca. 20 %. Bei unvernetzten Partikeln der Route 3a beeinflussen lediglich 500 mM NaCl die Rhodamin B-Freisetzung, die Zugabe von 200 mM NaCl hat keinen detektierbaren Einfluss. Die Rhodamin B-Diffusion aus den unvernetzten Partikeln der Route 3b erhöht sich ebenfalls durch Salzzugabe. 500 mM NaCl erhöhen die freigesetzte Menge an Rhodamin B nach 240 min um ca. 10 %. Bei vernetzten Partikeln verringert sich die Rhodamin B-Freisetzung in Anwesenheit von 200 mM NaCl nach 240 min leicht, durch Zugabe von 500 mM NaCl erhöht sich die maximal freigesetzte Menge an Rhodamin B nach 240 min um ca. 5 %. Abb. 5.17 zeigt die salzabhängige Rhodamin B-Freisetzung aller Routen nach 240 min.



**Abb. 5.17:** Menge an freigesetztem Rhodamin B aus eADF4(C16) Partikeln nach vier Stunden Inkubation in Puffer bei Raumtemperatur, in Abhängigkeit von der Herstellungs- und Beladungsrouten und der Salzkonzentration. Vernetzte Partikel (A) und unvernetzte Partikel (B).

(Modifiziert nach Blüm & Scheibel, *BioNanoSci* 2012 (2), mit Genehmigung der Springer Science + Business Media)

Die Rhodamin B-Diffusion aus unvernetzten Partikeln zeigt keine signifikante Salzabhängigkeit, Partikel aller Herstellungsrouten zeigen die gleiche salzunabhängige Rhodamin B-Freisetzung nach vier Stunden (Abb. 5.17B). Bei vernetzten eADF4(C16) Partikeln unterscheiden sich die Mengen an freigesetztem Rhodamin B nach vier Stunden deutlich zwischen den einzelnen Herstellungsrouten (Abb. 5.17A). Ohne Salz wurden nach 240 min zwischen 55 % und 75 % Rhodamin B freigesetzt. Durch die

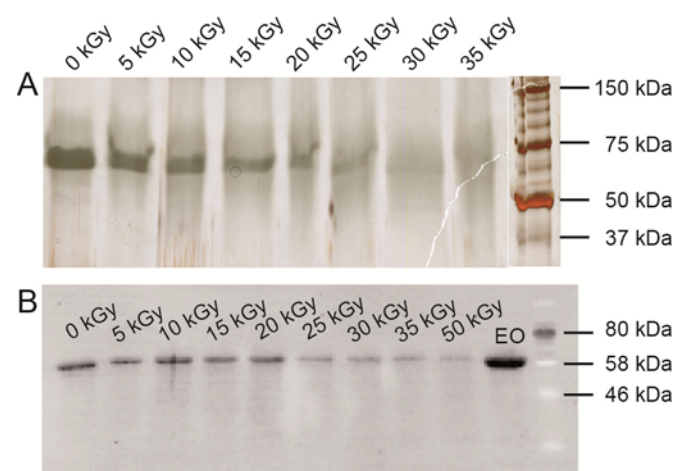
Zugabe von 200 mM NaCl geht der Unterschied verloren, bei allen Partikeln wurden ca. 75 % des Rhodamin B freigesetzt. Höhere Salzkonzentrationen (500 mM NaCl) beeinflussen lediglich die Rhodamin B-Freisetzung aus Partikeln der Route 3, bis zu 90 % des Rhodamin B werden freigesetzt.

## 5.4 Sterilisation von eADF4(C16) Partikeln

Die Sterilisation von Proteinen, welche im medizinischen oder pharmazeutischen Bereich Anwendung finden sollen, ist von großer Bedeutung. Hier wurde der Einfluss von zwei großtechnisch verwendeten Sterilisationsmethoden, Gammastrahlen und Ethylenoxid-Behandlung, auf das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) analysiert (Kapitel 4.11.1).

### 5.4.1 SDS-PAGE mit Silberfärbung und Western Blot

Da es aufgrund von Ionisationsvorgängen während der Behandlung mit Gammastrahlen und den daraus resultierenden Sekundärelektronen zum Spalten von chemischen Bindungen kommen kann, wurde ein möglicher Abbau der Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.3.1) und Silberfärbung (Kapitel 4.3.2) sichtbar gemacht (Abb. 5.18A). Verkürzte Proteine können in denaturierter Form eindeutig nachgewiesen werden. Hierbei kann eine Abnahme der Bandenintensität bei einer Laufhöhe von ca. 70 kDa mit zunehmender Strahlendosis beobachtet werden. Bereits Gammastrahlenintensitäten von 15 kGy führen zu einer Degradation der Proteine. Bei einer Intensität von 30 kGy kann fast kein Protein mehr auf dem Gel nachgewiesen werden.

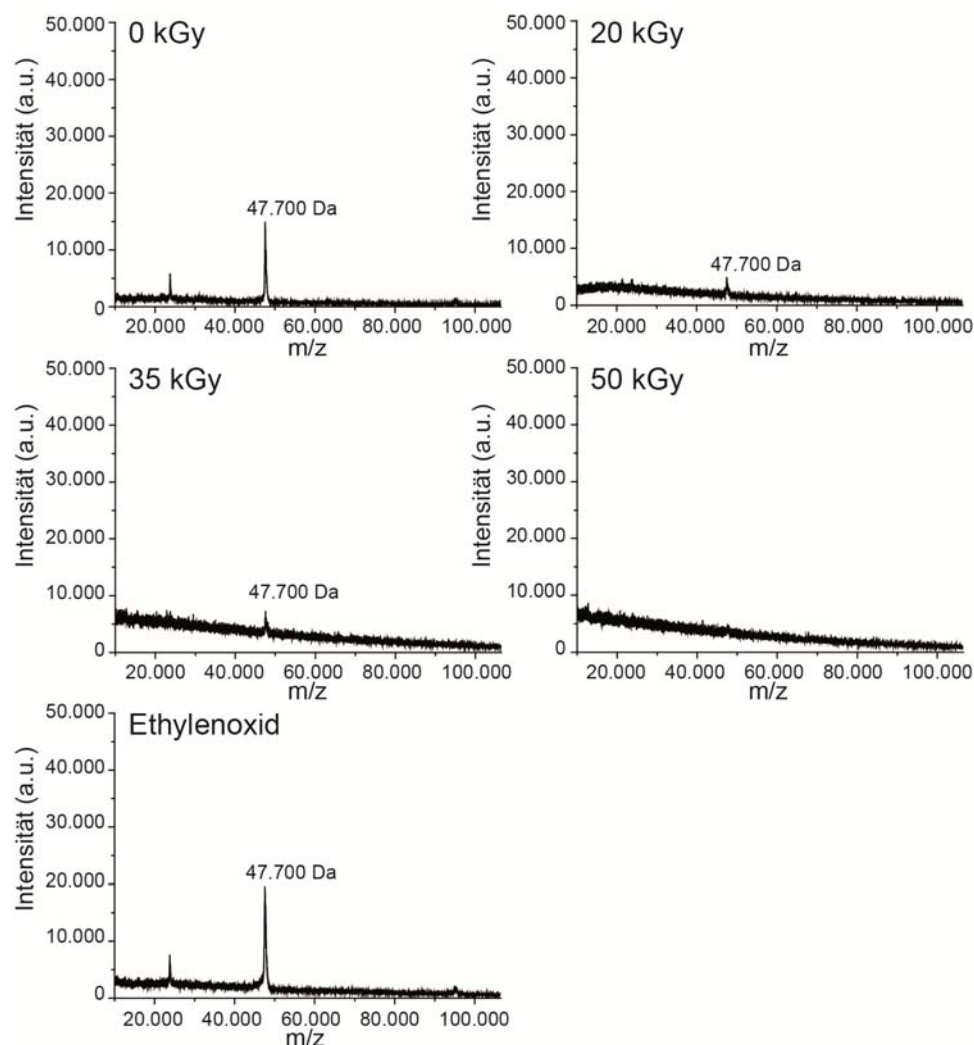


**Abb. 5.18:** Silbergel (A) und Western Blot (B) der sterilisierten Partikel.

Die Ergebnisse der Silberfärbung wurden zusätzlich durch Western Blot bestätigt (Abb. 5.18B) (Kapitel 4.3.3). Da die Nachweisgrenze bei einem Immunoblot deutlich unterhalb der Sensitivität der Silberfärbung liegt, können selbst geringe Proteinmengen nach 35 kGy Gammabestahlung noch sichtbar gemacht werden. Die Ethylenoxid-Behandlung der Partikel führt zu keiner gelelektrophoretisch nachweisbaren Degradation der Proteine. Die Chemilumineszenz zur Detektion des Immunoblots wird durch die EO-Behandlung im Vergleich zum unbehandelten Protein noch verstärkt.

#### 5.4.2 Massenspektrometrie

Die Proteindegradation durch Gammastrahlen und der Einfluss des Ethylenoxids wurden zusätzlich massenspektrometrisch analysiert (Abb. 5.19) (Kapitel 4.4.4). Die dadurch erhaltenen Spektren geben Aufschluss über die Art des Proteinabbaus.



**Abb. 5.19:** MALDI-TOF Spektren ausgewählter sterilisierter eADF4(C16) Proteine. Das nach ExPASy berechnete Molekulargewicht von eADF4(C16) liegt bei 47,7 kDa.

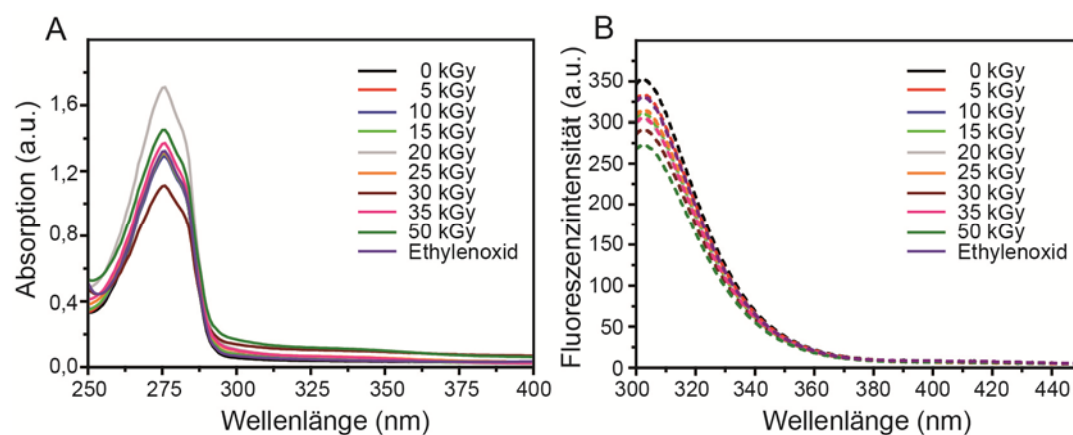


Die massenspektrometrischen Analysen machen deutlich, dass die Gammastrahlen die Proteine degradieren. Insbesondere der Einfluss von hohen Strahlungsdosen (50 kGy) führte zu einem sehr starken Abbau des Proteins, so dass kein Maxima im Masse- zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ -Verhältnis) mehr detektiert werden konnte. Ethylenoxid scheint auf das  $m/z$ -Verhältnis von eADF4(C16) keinen Einfluss zu haben, das Maximum ist exakt bei 47,7 kDa, und somit identisch zu dem unbehandelten Protein.

### 5.4.3 UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Die Konzentration der Proteinproben in wässriger Lösung wurde UV/Vis-spektroskopisch bestimmt (Kapitel 4.4.1) und anschließend alle Lösungen auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt (1 mg/ml). Mit diesen verdünnten Proteinlösungen wurden die fluoreszenzspektroskopischen Analysen in wässriger Lösung durchgeführt (Kapitel 4.4.2).

Die in Abb. 5.20A gezeigten UV/Vis-Spektren der sterilisierten eADF4(C16) Partikel zeigen einen für Proteine typischen Verlauf mit einem Maximum bei 278 nm. Die unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten mit Gammastrahlen ebenso wie die Behandlung mit Ethylenoxid führen zu keiner Veränderung im UV/Vis-Absorptionsspektrum.



**Abb. 5.20.** Spektroskopische Analysen der sterilisierten eADF4(C16) Partikel. A) UV/Vis-Spektren und B) Fluoreszenzspektren der Aminosäure Tyrosin.

Auch die Fluoreszenzspektren zeigen einen für eADF4(C16) Proteine typischen Verlauf (Abb. 5.20B). eADF4(C16) besitzt pro C-Modul zwei Tyrosine. Falls es zu einem Abbau der Proteine durch die Sterilisationsvorgänge kommt, kann dieser weder mit UV/Vis-Spektroskopie noch mit Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Die

Aminosäuren, auf die die spektroskopischen Analysen zurück gehen, werden durch die Sterilisationsversuche mit Gammastrahlen und Ethylenoxid nicht für diese Methoden nachweisbar verändert.

#### 5.4.4 FTIR-Spektroskopie

Der Einfluss der Gammastrahlen auf eADF4(C16) Partikel wurde im Folgenden FTIR-spektroskopisch analysiert (Abb. 5.21A) (Kapitel 4.4.3). Zusätzlich wurde der Einfluss von Ethylenoxid auf die Sekundärstruktur der Proteine untersucht.

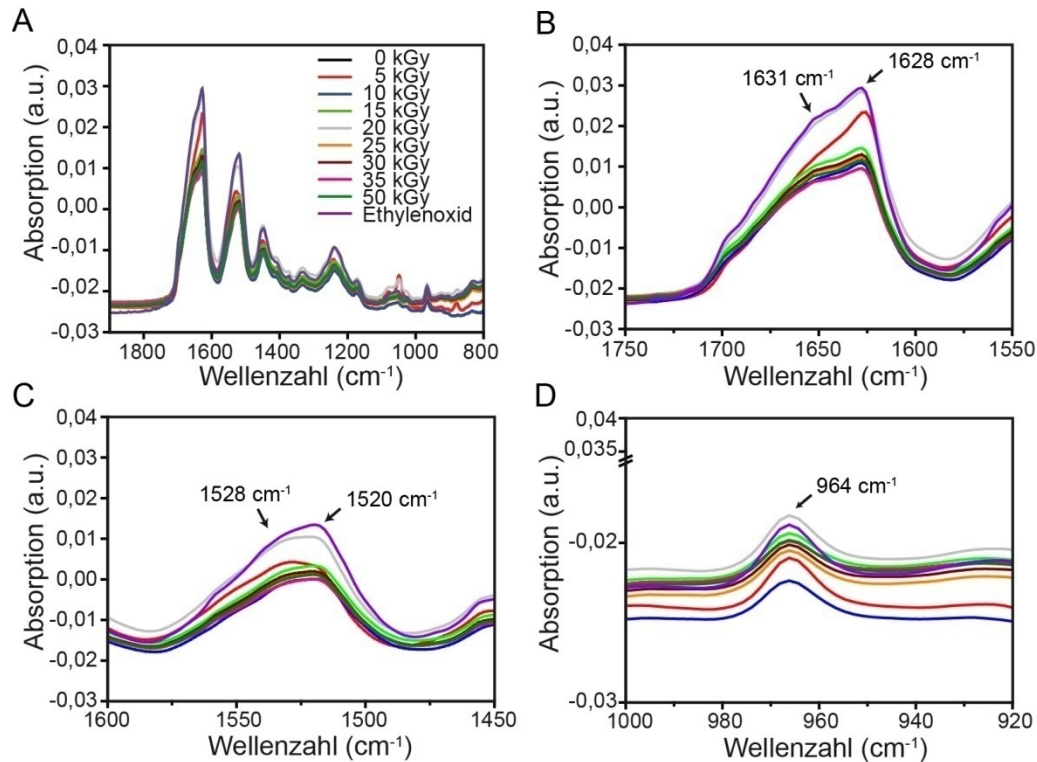
Bei der ATR-Methode kann die genaue Proteinmenge auf dem Kristall nicht bestimmt werden, zudem kommt es zu Streuungseffekten auf den Partikeloberflächen. Um diese Einflüsse zu minimieren und vergleichbare Spektren zu erhalten, wurde eine Grundlinienkorrektur und Normierung der Spektren durchgeführt.

Die Aufnahme von FTIR-Spektren der mit unterschiedlichen Gammastrahlungsintensitäten und Ethylenoxid behandelten Partikel in einem Wellenzahl-Bereich von  $1900\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  ergab identische, für Proteine mit einem hohen  $\beta$ -Faltblattanteil typische Spektren (Abb. 5.21A). Es wurde kein Unterschied zu den unbehandelten eADF4(C16) Partikeln (0 kGy) beobachtet. Selbst eine Gammastrahlenintensität von 50 kGy zeigte keinen Einfluss auf die Sekundärstrukturanteile der rekombinanten Spinnenseidenproteine.

Abhängig von der Vorverkeimung der eingesetzten Proben, ergibt sich die für die Proben erforderliche Gammastrahlenintensität, um eine vollständige Sterilität der Proben zu gewährleisten. Für die Sterilisation von Medizinprodukten wird mit Strahlungsintensitäten zwischen 30 und 35 kGy gearbeitet. Die getesteten 50 kGy liegen somit weit über der üblicherweise eingesetzten Dosis.

In Abb. 5.21B bis D sind die für Proteine wichtigen Bereiche, der Amid I (Abb. 5.21B) und der Amid II Bereich (Abb. 5.21C), vergrößert dargestellt. Ebenso wird ein weiterer, für eADF4 Proteine wichtiger Bereich gezeigt, die Absorptionsbande der poly-Alanine, welche einem Maximum bei  $964\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet wird (Abb. 5.21D).<sup>238</sup> Diese Absorptionsbanden setzen sich aus überlagerten Banden des Peptid-Rückgrates und der Aminosäureseitenketten der Proteine zusammen und können Sekundärstrukturen

zugeordnet werden.<sup>238</sup> Die Absorptionsbanden der drei Bereiche weisen auch nach der Behandlung der Partikel mit Gammastrahlen und Ethylenoxid identische, für einen hohen  $\beta$ -Faltblattanteil typische Maxima bei den Wellenzahlen  $1631\text{ cm}^{-1}$  und  $1628\text{ cm}^{-1}$  im Amid I Bereich und  $1528\text{ cm}^{-1}$  und  $1520\text{ cm}^{-1}$  im Amid II Bereich auf (vgl. Tab. 4.3).

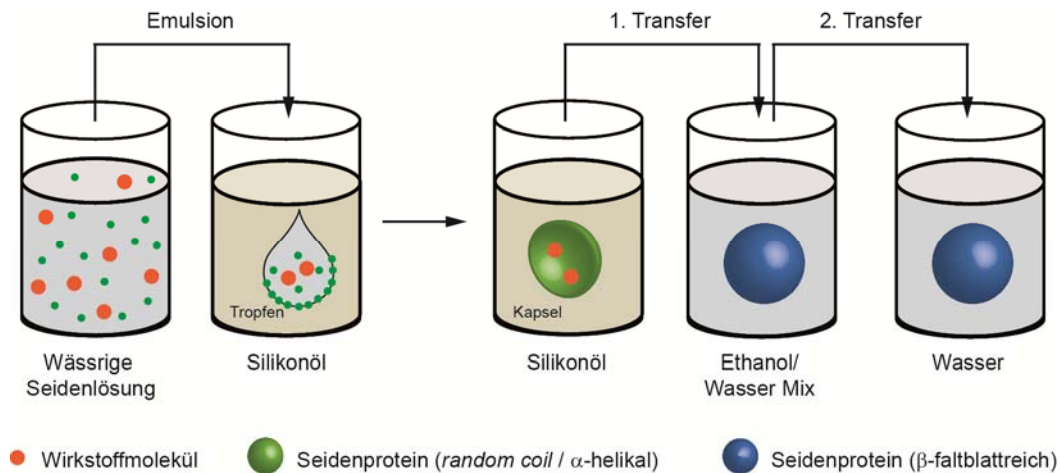


**Abb. 5.21:** A) Übersichtsdarstellung der FTIR-Spektren der sterilisierten eADF4(C16) Partikel. B) Vergrößerte Darstellung des Amid I Bereichs, C) des Amid II Bereichs und D) des Absorptionsbereichs der poly-Alanine.

## 5.5 Herstellung und Charakterisierung von eADF4(C16) Kapseln

### 5.5.1 Modifizierte Herstellung von eADF4(C16) Kapseln

Die Herstellung von Kapseln aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) basiert auf einem bereits für Toluol als Ölphase etablierten Protokoll.<sup>100</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde das bestehende Protokoll für die Verwendung des Silikonöls M100 als Ölphase modifiziert (Abb. 5.22) (Kapitel 4.7.1). Bei dem Silikonöl M100 handelt es sich um ein mittelviskoses Öl, mit einer Viskosität von ca. 130 mPa. Im Gegensatz dazu weist Toluol eine sehr geringe Viskosität von ca. 3 mPa auf.



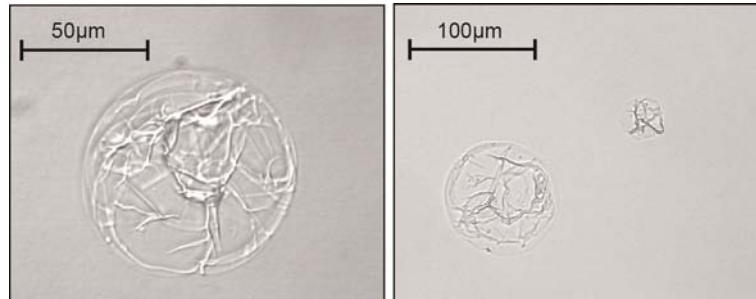
**Abb. 5.22:** Schematische Darstellung des modifizierten Kapselherstellungsprozesses.

Das modifizierte Kapselherstellungsprotokoll basiert auf der Herstellung einer Emulsion aus der wässrigen Proteinlösung und einer Ölphase. Das Protein diffundiert an die Grenzfläche zwischen dem Silikonöl und dem wässrigen Tropfen und assembliert dort. Durch einen zusätzlichen Resuspensionsschritt mit 50 % Ethanol ist es möglich, stabile Kapseln zu generieren und diese in Wasser zu überführen. Zwei weitere Öle wurden für die Herstellung von Kapseln erprobt, das niedrigviskose Silikonöl M5 und das ebenfalls mittelviskose Silikonöl M500. Silikonöl M5 besitzt eine ähnliche Viskosität wie Toluol, dennoch konnten keine stabilen Kapseln hergestellt werden. Auch das Silikonöl M500 eignet sich nur bedingt für die Kapselherstellung, da durch die hohe Viskosität des Öls (ca. 500 mPa) die Herstellung einer Emulsion erschwert wird. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit lediglich die Herstellung von Kapseln mit dem Silikonöl M100 behandelt.

Der Einschluss von Wirkstoffen stellt eine besondere Herausforderung bei der Kapselherstellung dar, denn die Kapseln können nur dann als Schutzhülle fungieren, wenn die eingeschlossenen Substanzen die Kapselhülle nicht passieren können. In Abb. 5.22 (rot) ist die Verpackung von Molekülen schematisch dargestellt. Um Moleküle sicher in eADF4(C16) Kapseln einschließen zu können, werden mögliche Verkapselungsprodukte bereits zur wässrigen Proteinlösung (Abb. 5.22) hinzugegeben, so dass diese während des Assemblierungsvorganges der Proteine an der Grenzfläche in der wässrigen Phase sind und dadurch in die neu gebildete Kapsel eingeschlossen werden.

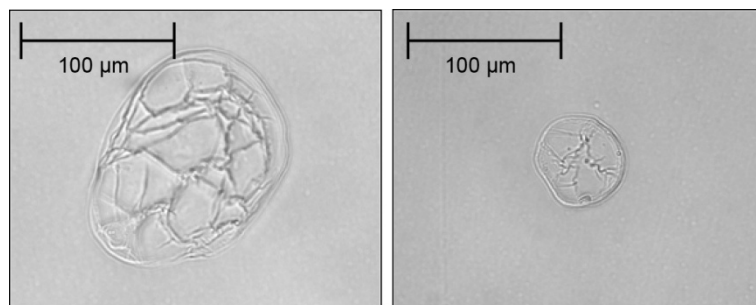
### 5.5.2 Mikroskopische Charakterisierung der Kapseln

Nach der Herstellung der Emulsion können die Kapseln lichtmikroskopisch in der Ölphase detektiert werden (Abb. 5.23).



**Abb. 5.23:** eADF4(C16) Kapseln in Silikonöl M100 nach einem Tag.

Kapseln aus eADF4(C16) bestehen aus einem wässrigen Kern, welcher von einem dünnen Proteinfilm umgeben ist. In Silikonöl unterscheiden sie sich lichtmikroskopisch nicht von den in Wasser überführten Kapseln (Abb. 5.24). Die in Abb. 5.24 dargestellten Kapseln wurden durch den in Abb. 5.22 beschriebenen Vorgang aus dem Silikonöl in Wasser überführt.

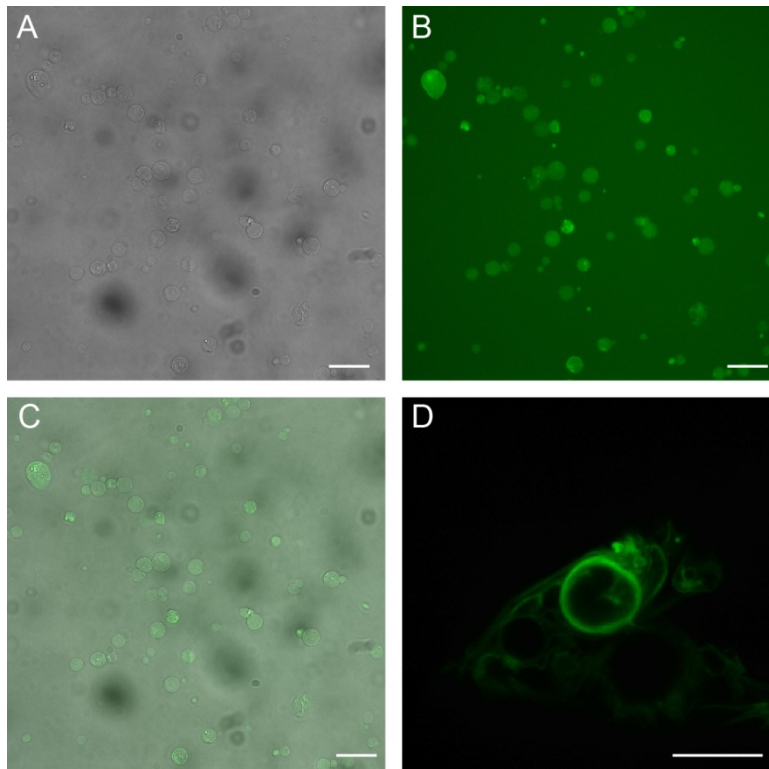


**Abb. 5.24:** eADF4(C16) Kapseln in  $H_2O_{MQ}$ , direkt nach dem Transfer in Wasser.

Ohne den zusätzlichen Resuspensionsschritt mit 50 % Ethanol konnten keine in Wasser stabilen Kapseln generiert werden, sondern lediglich kleine Protein-Filmstücke in der wässrigen Phase beobachtet werden. Die Überführungsversuche ohne Ethanol erfolgten durch Resuspension der Emulsion mit Wasser, durch kurze Zentrifugationsschritte (1 min, 100x g) in Wasser oder durch Zugabe von Emulgatoren (u. a. Tween 20) und anschließendem Resuspendieren bzw. Zentrifugieren in die wässrige Phase.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kapseln (Kapitel 4.9.2), hergestellt aus eADF4(C16) und NHS-Fluoreszein-markiertem eADF4(C16) (Kapitel 4.5.2) in Wasser zeigen, dass sich das Protein an der Öl-Wasser-Grenzfläche angelagert hat und zu einem

Film assembliert ist (Abb. 5.25A-C). Durch CLSM (Kapitel 4.9.4) konnte bestätigt werden, dass sich das Protein an der Kapselgrenzfläche angelagert und dort einen Film gebildet hat. Abb. 5.25D zeigt den Querschnitt durch die Mitte einer einzelnen Kapsel. Hierbei wird deutlich, dass das fluoreszierende Protein nur am Außenrand der Kapsel ist, der wässrige Kern der Kapsel fluoresziert nicht.

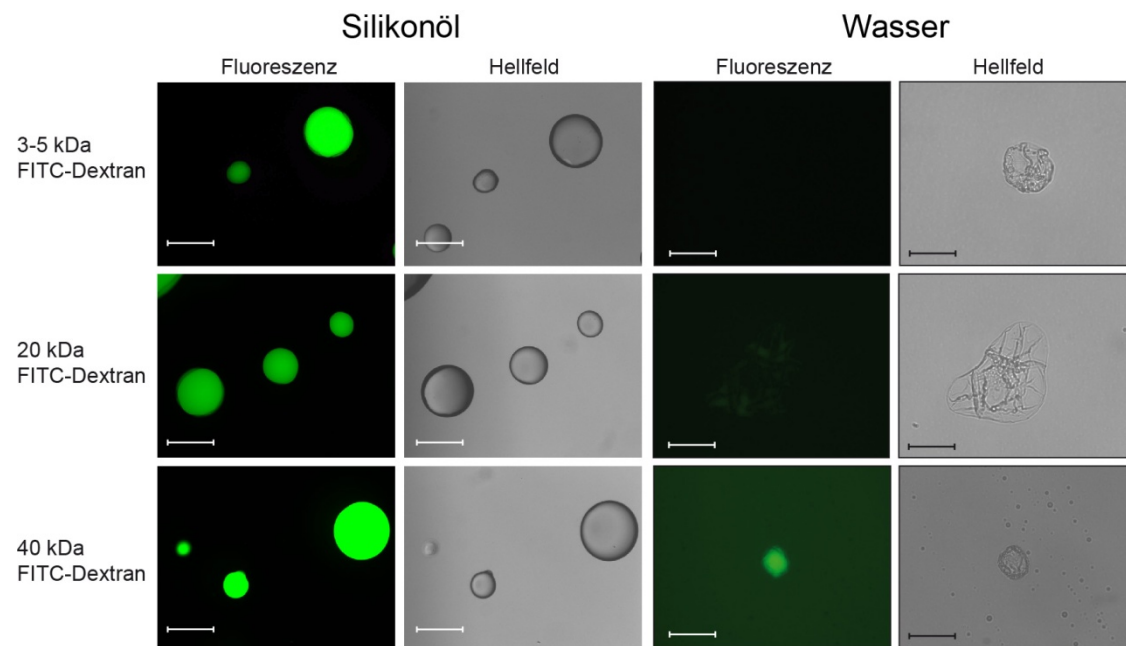


**Abb. 5.25:** Mikroskopische Aufnahmen von Kapseln aus eADF4(C16) und NHS-Fluoreszein-markiertem eADF4(C16) in Wasser. A) Lichtmikroskopische Aufnahme, B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und C) Überlagerung der beiden Aufnahmen. Der Maßbalken in diesen drei Abbildungen entspricht 50  $\mu\text{m}$ . D) CLSM-Aufnahme einer einzelnen Kapsel. Der Maßbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.5.3 Membranpermeabilität

Die Bestimmung der Permeabilität der eADF4(C16) Kapseln ist besonders für die Verpackung von Wirkstoffen oder Enzymen wichtig. Aktive Stoffe können durch den Einschluss in Kapseln nur dann erfolgreich vor der Umgebung geschützt werden, wenn sie nicht durch die Poren der Kapselhülle diffundieren können bzw. wenn Proteasen oder ähnliche unerwünschte Moleküle nicht in die Kapseln hinein gelangen können. Für auf Basis von Toluol hergestellte eADF4(C16) Kapseln wurde die Durchlässigkeit der Kapselmembran bereits detailliert analysiert.<sup>99,100</sup> Die mittlere Ausschlussgröße der

Kapselmembran liegt bei 27 kDa (Kapitel 4.7.3). Um mögliche Änderungen bedingt durch die Umstellung des Herstellungsprozesses zu analysieren, wurden die eADF4(C16) Kapseln bei der Herstellung mit FITC-Dextran unterschiedlichen Molekulargewichts (3-5 kDa, 20 kDa und 40 kDa) beladen. Vor der Überführung der Kapseln aus Silikonöl in Wasser ist deutlich erkennbar, dass alle Kapseln bzw. wässrigen Tropfen grün fluoreszieren (Abb. 5.26). Das umgebende Silikonöl verhindert die Diffusion der fluoreszenzmarkierten Dextrane aus den Kapseln.



**Abb. 5.26:** eADF4(C16) Kapseln mit eingeschlossenem FITC-Dextran verschiedener Größen in Silikonöl M100 und Wasser. Maßbalken: 50  $\mu\text{m}$ .

Nach dem Transfer der Kapseln in Wasser wurden erneut mikroskopische Fluoreszenz- und Hellfeld-Aufnahmen der Kapseln erstellt (Abb. 5.26). Hierbei wurde deutlich, dass lediglich die Kapseln Fluoreszenz aufwiesen, welche Dextrane mit einem Molekulargewicht von mindestens 40 kDa enthielten. Die FITC-Dextrane, welche ein geringeres Molekulargewicht besitzen, waren bereits aus den Kapseln hinaus diffundiert, so dass die Kapseln, die mit 3-5 kDa FITC-Dextranen und 20 kDa FITC-Dextranen beladen waren, keine Fluoreszenz aufwiesen.

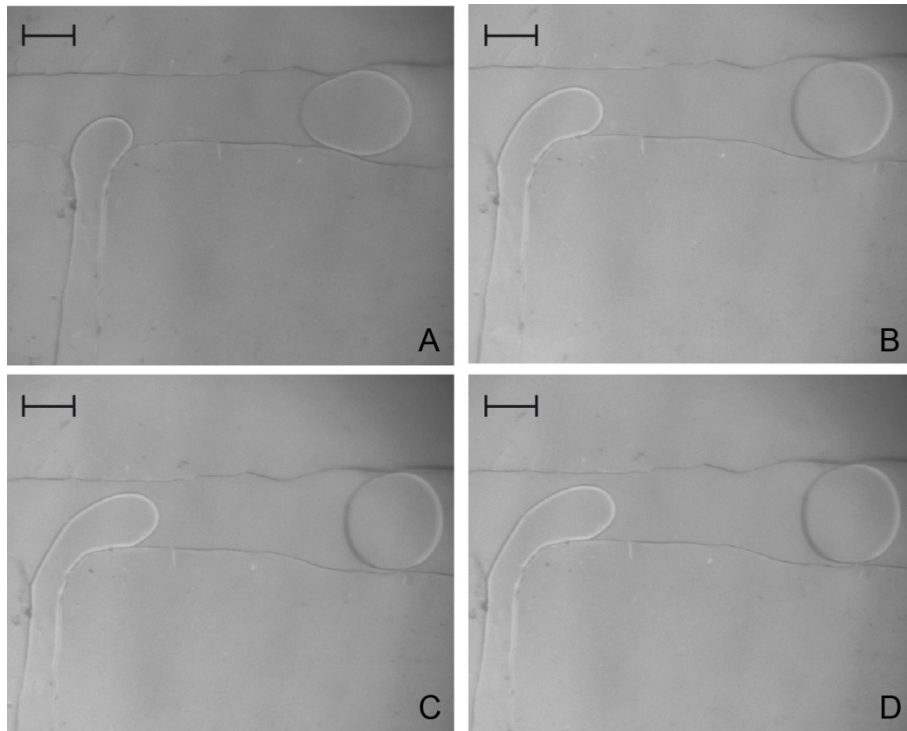
## 5.6 Herstellung von Kapseln mittels Mikrofluidik

In den bisherigen Versuchen zur Kapselherstellung wurde eine manuelle Emulsionsherstellung mittels Pipette verfolgt (Kapitel 4.7.1). Ein Nachteil dieser Methode ist die inhomogene Größenverteilung der Kapseln, die durch die ungleichmäßige Größenverteilung der Emulsionstropfen gegeben ist. Aus diesem Grund, und um möglichst kleine Kapseln herzustellen, wurde im Folgenden ein Ansatz zur Herstellung von eADF4(C16) Kapseln mittels Mikrofluidik verfolgt (Kapitel 4.7.2). Neben den kleinen Dimensionen der Kapseln liegt ein weiterer Vorteil dieser Methode in ihrer Kontinuität und Automatisierbarkeit, welche für viele Anwendungen wichtig ist.

Erste Versuche zur Herstellung von Kapseln aus eADF4(C16) und Toluol unter Verwendung von Mikrofluidik-Kanalstrukturen wurden von Markus Harasim während seiner Diplomarbeit (Prof. Bausch, Lehrstuhl für Zellbiophysik, TU München) verfolgt.<sup>239</sup> Hierbei kam es jedoch zu Problemen, so dass die Kapselherstellung im Mikrofluidik-Maßstab in der Diplomarbeit von Markus Harasim nicht abgeschlossen wurde.

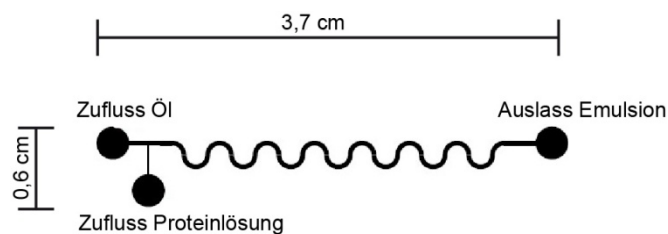
Hier sollte das System von Toluol auf Silikonöl umgestellt und zusätzlich eine bestehende Problematik des Auslaufs aus den Chips gelöst werden. Eine Neuerung stellt das Layout der Kanalstrukturen dar, bei dem die Emulsionstropfen durch Abreißen an einer rechtwinkligen Kante gebildet werden. Bei diesem Verfahren wird die Proteinlösung durch einen im Vergleich zum Öl-Zufluss relativ kleinen Kanal in einer T-Kreuzung in das Öl eingeleitet (Abb. 5.27 und Abb. 5.28). Die Proteinlösung bildet in der kontinuierlichen Ölphase kleine Tropfen, sobald die entstehende Scherspannung die Oberflächenspannung der Grenzschicht übersteigt (Abb. 5.27). Die Größe der Emulsionstropfen wird hierbei von den Fließgeschwindigkeiten des Öls und der Proteinlösung bestimmt.





**Abb. 5.27:** Tropfenbildung (Puffer) an der T-Kreuzung innerhalb der Kanalstruktur. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ .

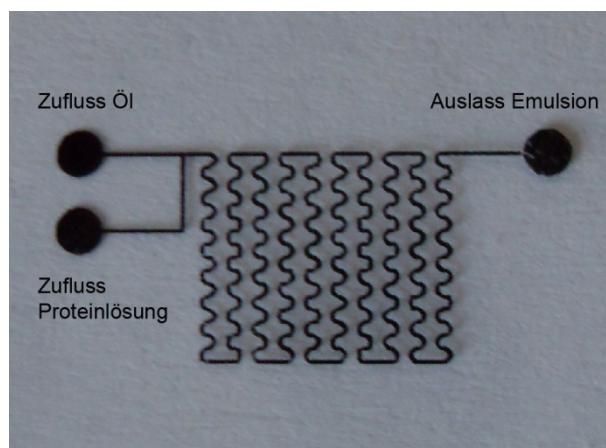
Im Anschluss an die T-Kreuzung, sobald sich die Tropfen gebildet haben, wird der Kanal in gewundener Form weitergeleitet (Abb. 5.28).



**Abb. 5.28:** Einfache Mikrofluidik-Kanalstruktur für die Herstellung von Kapseln aus eADF4(C16).

Unter Verwendung dieser Struktur ist es gelungen, homogene Emulsionstropfen (Puffer), mit einem Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$  herzustellen, welche problemlos durch die Kanalstruktur fließen. Um kleinere Tropfen herzustellen, müssen lediglich die Kanaldurchmesser verringert oder die Flussraten erhöht werden. Bei Versuchen mit eADF4(C16) kam es im Vergleich zu den Versuchen mit Puffer teilweise zu Ablagerungen des Proteins an den Kanalwänden, wodurch dieser blockiert wurde. Dies konnte mit einer Beschichtung der Kanalinnenseiten durch Sigmacote<sup>®</sup> behoben werden. Bei Sigmacote<sup>®</sup> handelt es sich um ein chloriertes Organosiloxan, welches in Hepten gelöst ist. Es reagiert mit den Silanol-Gruppen der PDMS-Oberflächen und bildet einen

farblosen, hydrophoben Film, welcher die Adsorption vieler Proteine verhindert. Mit dieser Beschichtung können über einen Zeitraum von 15 min homogene Emulsionstropfen aus der Proteinlösung generiert werden. Obwohl sich die Emulsionstropfen gleichmäßig bilden und, Dank der Beschichtung, problemlos durch die gewundenen Kanäle fließen, konnten keine gleichmäßigen Kapseln gewonnen werden. Sobald die Tropfen den Auslasskanal erreichten, koagulierte sie mit anderen Tropfen. Das spricht dafür, dass sich kein gleichmäßiger und stabiler Proteinfilm gebildet hat. Versuche zur Kapselherstellung im größeren Maßstab ohne Mikrofluidik (resuspendieren) zeigten jedoch, dass eADF4(C16) bei Silikonöl nicht so schnell stabile Kapseln bildet, wie es bereits für Toluol beobachtet werden konnte.<sup>100</sup> Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt die Wegstrecke, welche die Kapseln innerhalb der Kanalstrukturen zurücklegen müssen, verlängert (Abb. 5.29).



**Abb. 5.29:** Erweitertes Mikrofluidik-Kanallayout für die Kapselherstellung aus eADF4(C16) auf Folie, 5-fach übereinander gedruckt.

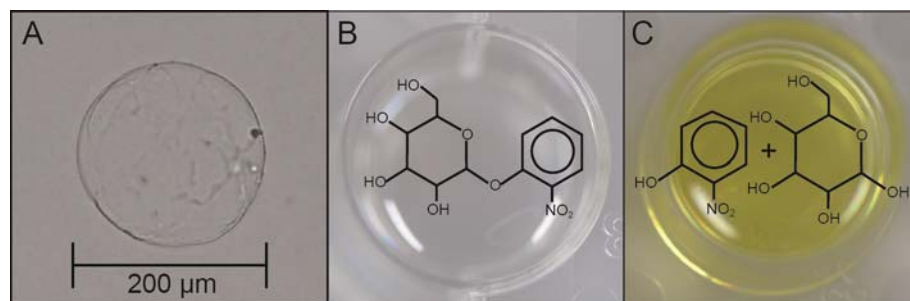
Auch innerhalb dieser Struktur konnte eine gleichmäßige Tropfenbildung sowohl bei Verwendung der Pufferlösung als auch der Proteinlösung beobachtet werden (Abb. 5.27). Die Tropfen koagulierte allerdings auch bei diesem Layout, teilweise sogar schon vor dem Auslass.

Durch viele nachfolgende Versuche zur Kapselherstellung konnte gezeigt werden, dass das hier vorgestellte Layout mit Silikonöl nicht zu stabilen wasserunlöslichen Kapseln führen kann. eADF4(C16) Kapseln, welche mit Silikonöl hergestellt werden, benötigen 50 % Ethanol um einen wasserunlöslichen Proteinfilm an der Öl-Wasser-Grenzfläche zu

bilden. Dieser hierfür notwendige Zulaufkanal ist in diesem Layout nicht gegeben und muss in zukünftigen Ansätzen berücksichtigt werden.

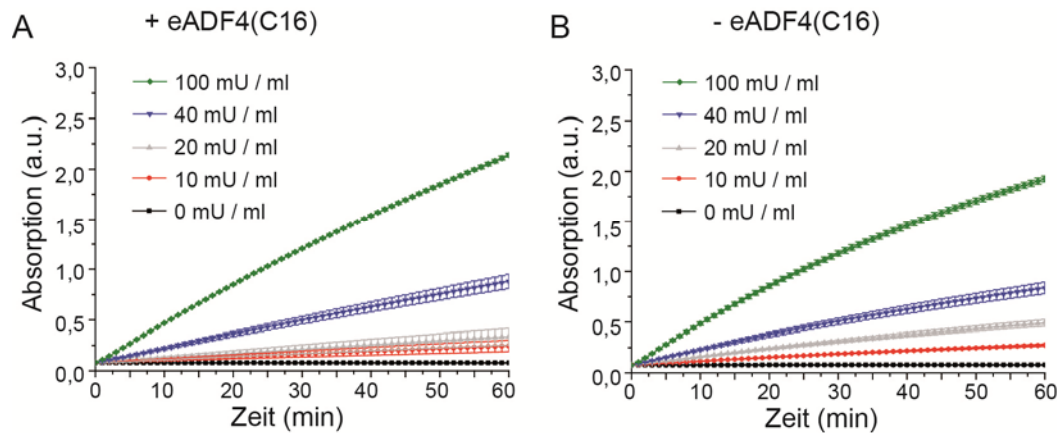
### 5.7 Kapseln als Reaktionscontainer am Beispiel $\beta$ -Galaktosidase

Mit Silikonöl M100 hergestellte eADF4(C16) Kapseln wurden als nächstes für den Einschluss und Schutz von Enzymen getestet (Abb. 5.30A). Hierfür wurde  $\beta$ -Galaktosidase als Enzym und ONPG als Substrat verwendet (Abb. 5.30B). ONPG (farblos) wird von  $\beta$ -Galaktosidase in o-Nitrophenol und Galaktose gespalten, wobei o-Nitrophenol in Lösung eine gelbe Färbung aufweist (Abb. 5.30C), welche photometrisch detektiert werden kann (Kapitel 4.8).



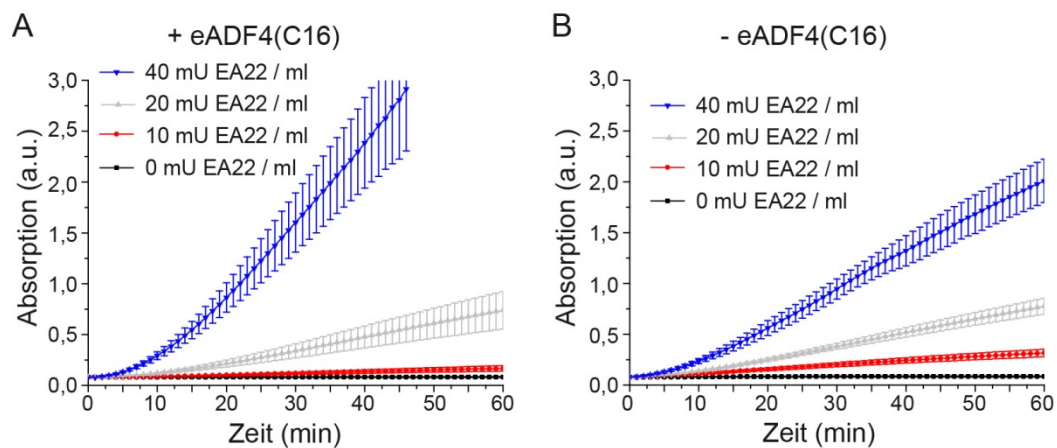
**Abb. 5.30:** A) Kapseln aus eADF4(C16) können für die Verkapselung verschiedener Stoffe verwendet werden. B) Die Aktivität der verkapselten  $\beta$ -Galaktosidase kann mittels ONPG als Substrat nachgewiesen werden. C) Hierbei wird ONPG in o-Nitrophenol (gelb) und Galaktose gespalten.

Um die Aktivität verkapselter  $\beta$ -Galaktosidase bestimmen zu können, wurde zuerst die Aktivität des unverkapselten Enzyms in Anwesenheit und Abwesenheit von gelöstem eADF4(C16) bestimmt (Kapitel 4.8). Hierfür wurden verschiedene Enzymkonzentrationen eingesetzt und ihre Aktivität über den Zeitraum von einer Stunde anhand der Bildung von o-Nitrophenol bestimmt (Abb. 5.31). Sowohl in Anwesenheit (Abb. 5.31A) als auch in Abwesenheit von gelöstem eADF4(C16) (Abb. 5.31B) kann die Zunahme von o-Nitrophenol in Lösung detektiert werden. Die Anwesenheit von eADF4(C16) hat keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase oder die spektroskopischen Eigenschaften des o-Nitrophenols.



**Abb. 5.31:** Aktivität von unverkapselter  $\beta$ -Galaktosidase in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von gelöstem eADF4(C16).

Des Weiteren wurde die  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galaktosidase genutzt, um durch die Verkapselung des inaktiven Akzeptors EA22 die Möglichkeit zu haben, das Enzym durch die Zugabe des  $\alpha$ -Komplementationspeptids ED28 nachträglich zu aktivieren (Abb. 5.32). Bei der  $\alpha$ -Komplementation handelt es sich um eine Eigenschaft der  $\beta$ -Galaktosidase, bei der eine inaktive dimere Form der  $\beta$ -Galaktosidase (EA22) durch Zugabe des Peptids (ED28) nachträglich aktiviert werden kann (Abb. 4.4). Das daraus resultierende Tetramer ist nun aktiv und weist eine zur aktiven  $\beta$ -Galaktosidase ähnliche Substrataffinität auf.



**Abb. 5.32:** Aktivität des unverkapselten  $\alpha$ -Komplementationsfaktors EA22 nach der Aktivierung durch ED28 in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von gelöstem eADF4(C16).

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Bildung von o-Nitrophenol bei vier verschiedenen EA22-Konzentrationen aufgezeichnet, ebenfalls in Anwesenheit (Abb. 5.32A) und Abwesenheit von gelöstem eADF4(C16) (Abb. 5.32B). Die Zugabe von ED28 zur Enzymlösung erfolgte jeweils zusammen mit dem Substrat. Sowohl mit als auch ohne gelöstes eADF4(C16) kann deutlich eine Enzymaktivität anhand der Bildung von o-

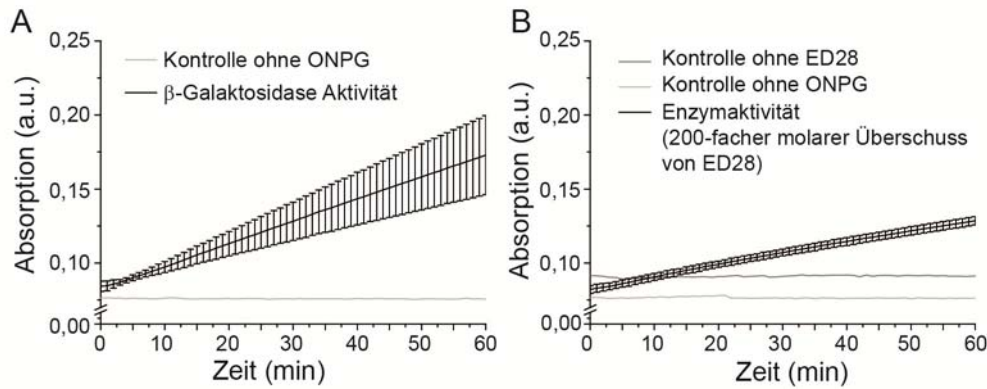
Nitrophenol nachgewiesen werden. eADF4(C16) scheint hierbei die Enzymaktivität zu beeinflussen, die gemessene o-Nitrophenol-Absorption ist in Anwesenheit von eADF4(C16) höher als in Abwesenheit. Des Weiteren ist die Aktivität der  $\alpha$ -komplementierten  $\beta$ -Galaktosidase höher als die der eingesetzten  $\beta$ -Galaktosidase. Die Umsatzraten der Enzyme in den vier verschiedenen Zusammensetzungen sind in Tab. 5.3 zusammengefasst.

**Tab. 5.3:** Umsatzraten (ng/min) der  $\alpha$ -komplementierten  $\beta$ -Galaktosidase und  $\beta$ -Galaktosidase in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von gelöstem eADF4(C16).

Enzymkonzentration	$\beta$ -Galaktosidase + eADF4(C16)	$\beta$ -Galaktosidase - eADF4(C16)	$\alpha$ -Komplementation + eADF4(C16)	$\alpha$ -Komplementation - eADF4(C16)
100 mU/ml	10,0 $\pm$ 0,1	8,9 $\pm$ 0,1	n. d.	n. d.
40 mU/ml	3,9 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,3	21,1 $\pm$ 3,8	10,6 $\pm$ 1,2
20 mU/ml	1,2 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 1,1	3,6 $\pm$ 0,4
10 mU/ml	0,8 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1

Die Anwesenheit von eADF4(C16) scheint keinen Einfluss auf die ONPG-Umsatzrate der nativen  $\beta$ -Galaktosidase zu haben (Tab. 5.3). Sowohl bei niedrigen Enzymkonzentrationen (10 mU/ml) als auch bei höheren Konzentrationen von bis zu 100 mU/ml liegen die Unterschiede der Umsatzraten im Bereich der Standardabweichung. Die Aktivität der  $\alpha$ -komplementierten  $\beta$ -Galaktosidase unterscheidet sich leicht, abhängig von eADF4(C16) und der Enzymkonzentration. Bei einer  $\alpha$ -Akzeptor-Konzentration von 40 mU/ml liegt die Umsatzrate des Enzyms für ONPG in Anwesenheit von eADF4(C16) bei ca. 21 ng/min, in Abwesenheit von eADF4(C16) ist die Umsatzrate etwa halb so hoch. Bei einer Enzymkonzentration von 20 mU/ml ist kein Unterschied in den Umsatzraten in Anwesenheit oder Abwesenheit von eADF4(C16) erkennbar, bei 10 mU/ml ist die Umsatzrate der  $\alpha$ -komplementierten  $\beta$ -Galaktosidase in Anwesenheit von eADF4(C16) bei etwa 1,1 ng/min, ohne eADF4(C16) ist der Wert nur halb so hoch.

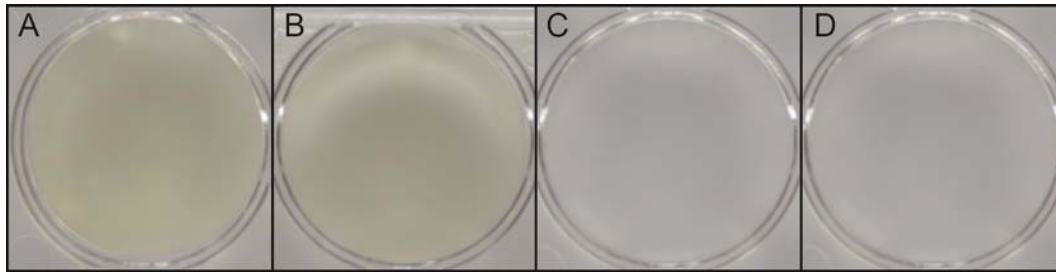
Im Folgenden wurde die Enzymaktivität beider Enzyme in verkapselter Form analysiert (Abb. 5.33).



**Abb. 5.33:** Aktivität der verkapselten Enzyme. A)  $\beta$ -Galaktosidase und B)  $\beta$ -Galaktosidase nach der Aktivierung durch  $\alpha$ -Komplementation. Bestimmt wurde die Absorption des gebildeten o-Nitrophenols.

Sowohl die verkapselte  $\beta$ -Galaktosidase als auch die verkapselte  $\alpha$ -komplementierte  $\beta$ -Galaktosidase zeigen eine deutliche Enzymaktivität in Anwesenheit von ONPG. Das deutet darauf hin, dass ONPG durch die Kapselmembran in die Kapseln hinein diffundieren kann und dort umgesetzt wird. Für die  $\alpha$ -komplementierte Form der  $\beta$ -Galaktosidase bedeutet das gleichzeitig, dass zusätzlich zu ONPG auch ED28 in die Kapseln hinein diffundiert und an EA22 bindet, so dass sich das aktive Tetramer bildet (Abb. 5.33B).

Eine Funktion der Verkapselung ist der Schutz vor Proteasen. Um sicherzustellen, dass das verkapselte Enzym vor Proteasen geschützt ist, müssen die Proteasen größer als der *Cut-Off* der Kapselmembran sein und  $\beta$ -Galaktosidase zuverlässig schneiden. Diese beiden Anforderungen erfüllt die Endoproteinase AspN, sie schneidet  $\beta$ -Galaktosidase an 64 Stellen (Tab. 4.4). Die Aktivität von  $\beta$ -Galaktosidase nach Inkubation mit Endoproteinase AspN wurde im Folgenden analysiert (Abb. 5.34). Das verkapselte Enzym zeigt nach Inkubation mit der Endoproteinase AspN eine deutliche Enzymaktivität (Abb. 5.34B), vergleichbar mit der Positivkontrolle ohne AspN (Abb. 5.34A), Unverkapselte  $\beta$ -Galaktosidase zeigt nach Inkubation mit Endoproteinase AspN keine Enzymaktivität (Abb. 5.34C), es wird kein o-Nitrophenol gebildet.



**Abb. 5.34:** Aktivität der verkapselten  $\beta$ -Galaktosidase nach Inkubation mit Endoproteinase AspN und ONPG, A) Positivkontrolle: verkapselte  $\beta$ -Galaktosidase ohne AspN, B) Kapseln mit eingeschlossener  $\beta$ -Galaktosidase in Anwesenheit von AspN, C) Negativkontrolle: unverkapselte  $\beta$ -Galaktosidase mit AspN, D) Negativkontrolle: unverkapselte  $\beta$ -Galaktosidase in Anwesenheit von AspN und eADF4(C16) Kapseln.

Als weitere Kontrolle wurde unverkapselte  $\beta$ -Galaktosidase in Anwesenheit von eADF4(C16) Kapseln mit AspN inkubiert. Auch hier zeigt  $\beta$ -Galaktosidase keine detektierbare Enzymaktivität (Abb. 5.34D).





## 6 Diskussion

Spinnenseide verfügt über außerordentliche Eigenschaften, sowohl hinsichtlich ihrer Mechanik<sup>26,27,41,240</sup> als auch hinsichtlich ihrer natürlichen Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit.<sup>240,241</sup> Einige dieser Eigenschaften finden sich auch in den verschiedenen, auf dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) basierenden, Morphologien wieder.

### 6.1 eADF4 Partikel als Wirkstofftransportsystem

Partikel auf Basis von eADF4(C16) eignen sich u. a. als Wirkstofftransportsystem für niedermolekulare wasserlösliche und wasserunlösliche Stoffe.<sup>101,102</sup> Durch die kontrollierte Wirkstofffreisetzung sollen toxische Nebenreaktionen, aufgrund von kurzzeitigen sehr hohen lokalen Dosierungen, vermieden werden.<sup>117</sup> Es konnte bereits gezeigt werden, dass eADF4(C16) Partikel erfolgreich mit unterschiedlichen Modellwirkstoffen beladen, und diese, je nach Wirkstoffmolekül und Umgebungsbedingungen, wieder freigesetzt werden können.<sup>102,105,133</sup> Sowohl der Herstellungsprozess der Partikel, als auch ihre Beladungs- und Freisetzungsvorgänge können ausschließlich auf wässriger Basis ablaufen, und es kann auf organische Lösungsmittel und hohe Temperaturen, wie es oftmals bei der Verarbeitung von synthetischen Polymeren der Fall ist,<sup>242</sup> verzichtet werden.<sup>98,102-104</sup> Der bisher erprobte Beladungsmechanismus der eADF4(C16) Partikel für hydrophile Wirkstoffe beruht auf Diffusionsvorgängen, wodurch die maximale Beladung durch das Diffusionsgleichgewicht zwischen Partikel und umgebendem Medium bestimmt wird.<sup>102</sup> Neben der Beladung der Partikel ist auch die Wirkstofffreisetzung diffusionsgetrieben,<sup>102</sup> sie kann allerdings zusätzlich durch proteolytischen Verdau der eADF4(C16) Proteine beschleunigt werden.<sup>101</sup> Die Beladung der Partikel mit hydrophoben Wirkstoffen beruht auf co-Präzipitation, ihre Freisetzung erfolgt ausschließlich über chemische oder enzymatische Degradation der Partikel.<sup>101</sup>

In dieser Arbeit wurde eine weitere Beladungsmethode unter Verwendung der co-Präzipitation der Partikel mit hydrophilen Wirkstoffen erprobt und zudem der Einfluss einer chemischen und physikalischen Vernetzung der Proteine auf die Partikel und ihre

biochemischen Eigenschaften, ebenso wie auf deren Wirkstoffbeladungs- und Wirkstofffreisetzungverhalten analysiert.

### 6.1.1 Einfluss der Vernetzung auf eADF4(C16) Partikel

Chemische Vernetzungsreaktionen sind bei Polymeren und Biopolymeren weit verbreitet um Netzwerke zu verfestigen, Porengrößen zu beeinflussen oder die chemische und enzymatische Stabilität zu verändern. Benzochinone beispielsweise, können durch Aktivierung mit UV-Licht Netzwerke ausbilden und somit Hydrogele bilden.<sup>243,244</sup> Ein weiteres Beispiel ist die photoinitierte Polymerisation von Polyethylenglykol zu makroporösen, vernetzten Hydrogelen.<sup>245</sup> Aber auch bei Biopolymeren ist die chemische Vernetzung ein weitverbreitetes Werkzeug. Durch die Vernetzung von Chitosan mit Glutaraldehyd können sich einige Eigenschaften wie beispielsweise die Wasserabsorption, Hydrophobizität, Ionenpermeabilität, sowie chemische und mechanische Eigenschaften des Materials ändern.<sup>246</sup>

Für die chemische Vernetzung des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) eignet sich ein auf Rubpy und APS basierendes System. Hierbei wirken Rubpy und APS als Initiatoren einer radikalischen Reaktion, welche zur Vernetzung von aromatischen Aminosäuren, bei eADF4(C16) zur Vernetzung von Tyrosinen, führt (Kapitel 5.1 und 4.6.2, Abb. 4.1).<sup>209</sup> Es wurde bereits gezeigt, dass diese Moleküle unterschiedliche Assemblierungsformen des rekombinanten Spinnenseidenproteins vernetzen können, z. B. Hydrogele und Kapseln,<sup>100,210,211</sup> und dadurch die chemische und enzymatische Stabilität dieser Morphologien verbessern. Des Weiteren konnte anhand von Zellkulturversuchen mit Fibrinogen gezeigt werden, dass das Vernetzen von Hydrogelen mit Rubpy keine negativen Auswirkungen auf neonatale humane Hautfibroblasten hat.<sup>247</sup>

Neben der chemischen Vernetzung der Proteine kann auch eine physikalische Vernetzung die Eigenschaften der Partikel beeinflussen. Unterschiedliche Molekülkettenlängen von eADF4(C8), eADF4(C16) und eADF4(C32) können zu veränderten inter- und intramolekularen Wechselwirkungen der Proteine führen (Kapitel 5.2.5, 5.2.6 und 5.2.7).

Das Einbringen der chemischen Vernetzermoleküle Rubpy und APS in die Partikelmatrix wurde anhand zwei verschiedener Routen getestet, co-Präzipitation der Vernetzermoleküle mit dem Protein (CL\_Fällung, Abb. 5.1A) und Eindiffundieren von Rubpy und APS in die fertig ausgebildeten Partikel (CL\_Diffusion, Abb. 5.1B) (Kapitel 5.1). Bei beiden Routen war es wichtig, die Vernetzung erst nach der Partikelassemblierung durch Licht zu initiieren, wobei eine vorherige Aktivierung der Vernetzungsreaktion lediglich zu amorpher Aggregation führte. eADF4(C16) Proteine liegen in gelöster Form unstrukturiert (*random coil*) vor,<sup>42,104</sup> wobei die Ausbildung der di-Tyrosine zu einer Strukturierung der Proteinketten führen kann, was wiederum die Löslichkeit des Proteins herabsetzt.

Die zwei unterschiedlichen Vernetzungsrouten führten zu Partikeln mit verschiedenen Vernetzungsmustern und daraus resultierenden Eigenschaften. Die chemische Vernetzung beeinflusst jedoch nicht alle Partikeleigenschaften. Hier konnte gezeigt werden, dass die Vernetzung der Partikel mit Rubpy und APS keinen Einfluss auf ihre Morphologie oder Sekundärstruktur hat (Kapitel 5.2.1 und 5.2.3), da der Vernetzungsprozess erst nach der Partikelassemblierung initiiert wird. Die zusätzliche Ausbildung der di-Tyrosine, ebenso wie die veränderten Molekülkettenlängen und die damit einhergehende physikalische Vernetzung der Partikel, hat zudem keinen detektierbaren Einfluss auf die thermische Stabilität der Partikel (Kapitel 5.2.6).

Durch die Vernetzung mit Rubpy und APS nimmt aber die chemische Stabilität der Partikel deutlich zu (Tab. 5.2). Durch die Bildung der di-Tyrosine kommt es zur Ausbildung von zusätzlichen kovalenten Bindungen, welche die Partikelstruktur stabilisieren. Die verwendete Vernetzungsrouten hat auf diese Beobachtungen jedoch keinen Einfluss, es können keine Unterschiede zwischen den zwei analysierten Routen detektiert werden. Das hat viele Vorteile in Bezug auf mögliche technische Anwendungen. Chemisch vernetzte eADF4(C16) Partikel sind nicht nur gegenüber wässrigen Lösungen stabil sondern auch gegenüber vielen organischen Lösungsmitteln (Tab. 5.2). Dadurch können die Partikel auch in partikelverstärkten Kompositmaterialien zusammen mit synthetischen Polymeren verwendet werden.

Zusätzlich zur chemischen Stabilität ist für viele Anwendungen auch die kolloidale Stabilität der Partikel in Lösung von Bedeutung. Bei Kolloiden handelt es sich um heterogene Systeme, die aus mikroskopisch kleinen, geladenen Partikeln bestehen, welche gleichmäßig verteilt in einem Medium vorliegen. Viele wichtige Eigenschaften eines kolloidalen Systems hängen direkt oder indirekt mit der elektrischen Ladung bzw. dem elektrischen Potential der Partikel zusammen.<sup>231</sup> Das Potential bestimmt hierbei die Interaktionsenergie zwischen den Partikeln. Meist ist diese Interaktionsenergie direkt für das kolloidale Verhalten der Partikel verantwortlich (Stabilität gegenüber Koagulation).<sup>231</sup> Drei verschiedene abstoßende Mechanismen der Partikel sind für ihre gleichmäßige Verteilung im Medium und ihre Stabilität gegenüber Koagulation entscheidend, elektrostatische, sterische und elastische Abstoßung.<sup>234</sup> Der größte Anteil der Abstoßungsmechanismen geht auf die sterische und elektrostatische Abstoßung zurück. Beide hindern die Partikel daran, sich zu nahe zu kommen und somit Van-der-Waals-Bindungen auszubilden. Diese könnten möglicherweise zu Koaleszenz führen.

Für die Grenzflächenladung der Partikel sind verschiedene elektronegative Seitengruppen der Proteine verantwortlich, welche auf der Partikeloberfläche zugänglich sind. Abhängig von der Ionenstärke und dem pH-Wert des umgebenden Mediums ergeben sich Oberflächenladungsverhältnisse der Partikel, aus welchen durch Elektrophorese das Zetapotential abgeleitet werden kann. Durch die chemische Vernetzung kommt es zur Ausbildung von di-Tyrosinen, welche sich von den Tyrosinen im  $pK_a$  ihrer Seitenketten unterscheiden können. Dadurch kann auch das Zetapotential der eADF4(C16) Partikel beeinflusst werden. Prinzipiell gilt hierbei die Faustformel, je höher das Zetapotential, desto stärker ist die elektrostatische Abstoßung der Partikel und desto besser sind die Partikel in der Dispersion stabilisiert.<sup>234</sup> Die Änderung des Potentials der eADF4(C16) Partikel aufgrund der chemischen Vernetzung der Proteine hat allerdings nur einen geringen Einfluss auf das kolloidale Verhalten der Partikel. Das liegt zum einen daran, dass die Veränderungen des Zetapotentials nur gering waren ( $\pm 8$  mV) (Tab. 5.1, Kapitel 5.2.4), zum anderen daran, dass sich der Einfluss der sterischen Abstoßung durch die chemische Vernetzung nur geringfügig verändert haben sollte. Tab. 6.1 zeigt eine allgemeine Einschätzung der physikalischen Stabilität von Dispersionen anhand des Zetapotentials.<sup>234</sup> Berechnet man das Zetapotential der

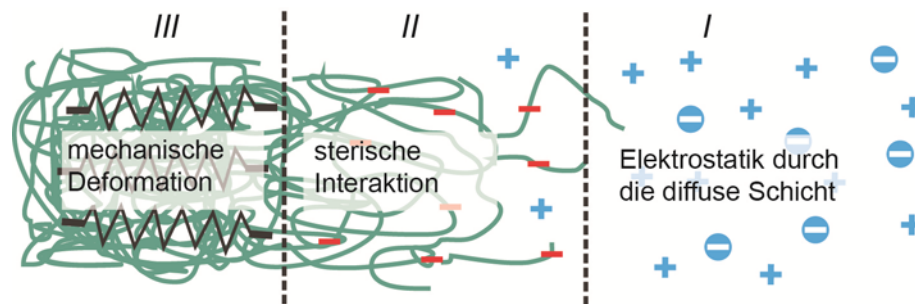
eADF4(C16) Partikel nach der Theorie von Smoluchowski, so erhält man für unvernetzte Partikel in  $H_2O_{MQ}$  einen Wert von ca. -36 mV, das Zetapotential der vernetzten Partikel liegt bei ca. -44 mV. Somit weisen die unvernetzten eADF4(C16) Partikel in  $H_2O_{MQ}$  nach der Unterteilung von Riddick<sup>234</sup> in Dispersionen keine Agglomeration auf, die chemisch vernetzten Partikel zeigen in Dispersionen sogar eine gute Stabilität.

**Tab. 6.1:** Unterteilung der Stabilitäten von Dispersionen anhand des Zetapotentials nach Riddick.<sup>234</sup>

Kennzeichen der Stabilität	Zetapotential (mV)
Maximale Agglomeration und Sedimentation	+3 bis 0
Ausgeprägte Agglomeration und Sedimentation	-1 bis -4
leichte Agglomeration und Sedimentation	-5 bis -10
Schwelle zur Agglomeration	-11 bis -20
Geringe Agglomeration	-21 bis -30
Keine Agglomeration	-31 bis -40
Gute Stabilität	-41 bis -50
Sehr gute Stabilität	-51 bis -60
Ausgezeichnete Stabilität	-61 bis -80
Maximale Stabilität	-81 bis -100

Die elektrophoretische Mobilität ist, wie bereits erwähnt, nicht nur von der Aminosäurezusammensetzung und dem Vernetzungsgrad der Partikel, sondern auch von den Umgebungsbedingungen abhängig. Unter Verwendung der Theorie von O'Brien und White<sup>232</sup> ist es gelungen, die elektrophoretische Mobilität von eADF4(C16) Partikeln in Abhängigkeit von der Ionenstärke und dem pH-Wert mit einer Varianz von 30 % zu berechnen (Abb. 5.7, Kapitel 5.2.4). Die Varianz geht hierbei auf die Variabilität der Oberflächenladungsverteilung zurück, welche u. a. durch die Verteilung der Aminosäuren im Inneren der Partikel und auf der Oberfläche bestimmt ist. Lediglich bei der Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von der Ionenstärke, weichen die theoretischen und die gemessenen Werte stärker voneinander ab. Diese Abweichungen gehen auf die Steifigkeit der Partikel und die sterischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der umgebenden Lösung zurück. Die verwendete Theorie von O'Brien und White bezieht sich eigentlich auf harte Partikel, bei hydratisierten eADF4(C16) Partikeln handelt es sich jedoch um ein im Vergleich weiches Material,

wodurch es zu leichten Abweichungen bei der Bestimmung der elektroforetischen Mobilität kommen kann.



**Abb. 6.1:** Bereiche der eADF4(C16) Partikel, welche durch die elektroforetische Mobilität und die kraftspektroskopischen Analysen der Partikel bestimmt werden konnten (Nicolas Helfricht, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth).

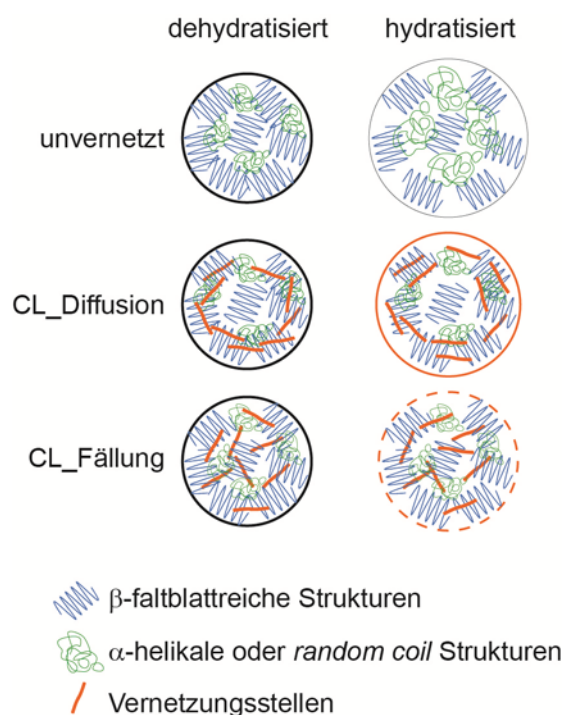
(Modifiziert nach Helfricht et al, 2013, eingereicht bei *Biomater Sci*, mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Kombiniert man die Ergebnisse der elektroforetischen Mobilitätsmessungen mit den Grenzflächeneigenschaften der Partikel, so wird deutlich, dass es sich bei den Interaktionsprofilen zwischen den immobilisierten Silikat-Probenkörpern und den eADF4(C16) Partikeln um sehr komplexe Profile handelt (Abb. 5.8, Kapitel 5.2.4). Das liegt daran, dass bei der *Colloidal Probe Technique* bei unterschiedlichen Abständen der Partikel, verschiedene Interaktionen zwischen diesen auftreten. Aus den daraus gewonnenen Profilen kann durch Fitten auf Basis der Poisson-Boltzmann Gleichung ein spezieller Bereich der Partikel definiert werden, die diffuse Schicht (Abb. 6.1).<sup>229</sup> Es handelt sich bei dieser äußersten, die Partikel umgebenden Schicht um elektrostatische Wechselwirkungen, welche auf Ladungen auf der Partikeloberfläche und den entsprechenden Gegenionen in der umgebenden Lösung zurück gehen (I). Dieser Bereich geht in einen zweiten Bereich über, in welchem die sterischen Interaktionen zwischen Partikel und *Cantilever* im Vordergrund stehen (II). Der dritte Bereich wird durch die mechanische Deformation des eADF4(C16) Partikels bestimmt (III), welche durch die mechanischen Analysen charakterisiert wurde.

Sowohl das Quellverhalten der Partikel (Abb. 5.4, Kapitel 5.2.2) als auch ihre mechanische Stabilität (Kapitel 5.2.7) sind, im Gegensatz zu verschiedenen anderen Eigenschaften, von der Vernetzungsrute abhängig. Das Quellverhalten spielt bei Partikeln, welche in medizinischen und pharmazeutischen Bereichen Anwendung finden sollen, eine wichtige Rolle. Viele Partikel werden meist im dehydratisierten Zustand

analysiert (REM) aber im hydratisierten Zustand verabreicht. Bei vernetzten eADF4(C16) Partikeln werden die unstrukturierten Regionen des Proteins durch die Bildung der di-Tyrosine zusätzlich stabilisiert, so dass diese unter Wassereinfluss weniger stark quellen (Kapitel 5.2.2). Durch co-Präzipitation hergestellte Partikel weisen hierbei eine Verteilung der durch die di-Tyrosine entstandenen zusätzlichen kovalenten Bindungen über den ganzen Partikel auf, die Partikel sind dadurch in sich besser stabilisiert (Quellfaktor 1,4) (Kapitel 5.2.2). Durch Diffusion mit Rubpy und APS beladene Partikel weisen lediglich eine zusätzliche Stabilisierung in den äußeren Bereichen der Partikel auf, so dass diese stärker quellen, als dies für Partikel der anderen Vernetzungsrouten beobachtet werden konnte (Quellfaktor 1,76) (Kapitel 5.2.2).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Wasseraufnahme und -abgabe der vernetzten und unernetzten eADF4(C16) Partikel auch nach zehn Wiederholungen vollständig reversibel sind (Kapitel 5.2.2, Abb. 5.5). Abb. 6.2 fasst den Einfluss der chemischen Vernetzung auf eADF4(C16) Partikel in einem Modell nochmals zusammen.



**Abb. 6.2:** Modell zum Einfluss der chemischen Vernetzung auf die mechanischen Eigenschaften und das Quellverhalten von eADF4(C16) Partikeln. Unterschiede im Quellverhalten werden durch die Partikelgrößen symbolisiert. Im dehydratisierten Zustand hat die chemische Vernetzung keinen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Partikel. Der mittlere E-Modul der dehydratisierten Partikel ist deutlich größer als der E-Modul der hydratisierten Partikel. Die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften werden durch die unterschiedlichen Liniendicken vereinfacht dargestellt.

(Modifiziert nach Neubauer et al, 2013, eingereicht bei *Biomater Sci*, mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry)

Die mechanische Stabilität von Partikeln spielt in vielen Anwendungsbereichen eine wichtige Rolle.<sup>248</sup> Daher ist es wichtig, die Materialien vor einem möglichen Einsatz auf ihre mechanische Widerstandsfähigkeit hin zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mechanischen Eigenschaften von hydratisierten und dehydratisierten Partikeln analysiert (Kapitel 5.2.7). Hydratisierte eADF4(C16) Partikel weisen hierbei ein elastisches Verhalten auf, dehydratisierte Partikel hingegen sind mechanisch wesentlich stabiler, wodurch sie sich für eine mögliche Anwendung im Bereich der partikelverstärkten Kompositmaterialien eignen. Hydratisierte eADF4(C16) Partikel weisen einen mittleren E-Modul im Mega-Pascal-Bereich auf (ca. 3 MPa), dehydratisierte eADF4(C16) Partikel im Giga-Pascal-Bereich (ca. 1 GPa). Mögliche Einflüsse einer chemischen oder physikalischen Vernetzung konnten lediglich für hydratisierte Partikel beobachtet werden. Sowohl die Molekülkettenlängen der Proteine als auch die Bildung der di-Tyrosine wirken sich deutlich auf das elastische Verhalten der Partikel aus (Abb. 5.13). Di-Tyrosine sorgen für eine Stabilisierung der unstrukturierten Partikelbereiche, wodurch die vernetzten Partikel im hydratisierten Zustand einen höheren E-Modul als die unvernetzten aufweisen. Die Vernetzungsrouten haben ebenfalls einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Partikel (Abb. 5.13A). Das gleichmäßige Einbringen der Vernetzermoleküle in die Partikel (CL\_Fällung) führt zu einer homogenen Vernetzung. Durch die zusätzlichen kovalenten Bindungen entsteht ein stabiles, aber trotzdem elastisches Netzwerk. Der mittlere E-Modul hydratisierter, vernetzter Partikel liegt bei ca. 5,5 MPa, der der unvernetzten bei ca. 3 MPa. Die Diffusion der Vernetzermoleküle in die Partikel führt hingegen zu einer ungleichmäßigen Verteilung von Rubpy und APS über die Partikel, insbesondere in den Randbereichen kommt es zu einer starken Vernetzung. Das wirkt sich auch auf das mechanische Verhalten aus, hydratisierte Partikel dieser Route weisen im Vergleich zu den unvernetzten und über die zweite Route vernetzten Partikeln den höchsten E-Modul (ca. 8,5 MPa) auf. Die physikalische Vernetzung der Proteine hat einen ähnlichen Einfluss auf die Mechanik der Partikel. Je kürzer die Molekülkettenlänge der Proteine, desto geringer ist der mittlere E-Modul der hydratisierten Partikel (Abb. 5.13B). Hydratisierte eADF4(C8) Partikel besitzen einen mittleren E-Modul von ca. 2,5 MPa, eADF4(C16) Partikel von ca. 3 MPa und eADF4(C32) Partikel von ca. 5,5 MPa. Das hängt



mit den inter- und intramolekularen Wechselwirkungen der Molekülketten zusammen. Insbesondere die  $\beta$ -Faltblätter sorgen durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen poly-Alanin-Bereichen für die Stabilität der Partikel. Je mehr poly-Alanin-Bereiche in einem Molekül vorkommen, desto stärker können die daraus gebildeten  $\beta$ -Faltblätter miteinander wechselwirken und sorgen dadurch für die zusätzliche Stabilität der Partikel. Eine ähnliche Stabilität durch  $\beta$ -Faltblätter kann auch im natürlichen Spinnenfaden beobachtet werden, da im Seidenfaden die Stabilität des Fadens auf die  $\beta$ -faltblattreichen Bereiche zurückgeführt wird.<sup>32-34</sup>

Auch bei anderen Polymeren kann ein Einfluss der Kettenlänge bzw. des Molekulargewichts auf die mechanischen Eigenschaften oder auf das Wirkstofffreisetzungverhalten der Partikel beobachtet werden. Anhand von Chitosan konnte gezeigt werden, dass das Molekulargewicht des verwendeten Chitosans einen entscheidenden Einfluss auf die Festigkeit und Flexibilität der resultierenden Partikel hat.<sup>249-251</sup> Des Weiteren hängt beispielsweise das Molekulargewicht von Kollagenen direkt mit den daraus resultierenden Partikelgrößen zusammen.<sup>252</sup> Ein ähnliches Verhalten kann für synthetische Polymere beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass die Beladungseffizienz von Partikeln auf Basis von PEG u. a. vom Molekulargewicht abhängig ist.<sup>253,254</sup> Auch auf die Partikelgröße hat die Kettenlänge des PEG einen Einfluss, mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Partikelgröße zu.<sup>253</sup> Zusätzlich konnte ein Einfluss der PEG-Kettenlänge auf die Hydrophilie und Flexibilität der co-Polymere beobachtet werden.<sup>255</sup> Als weiteres Beispiel für synthetische Polymere wird auch bei Polyethylenterephthalat (PET) eine Anhängigkeit der mechanischen Eigenschaften von dem Molekulargewicht beschrieben.<sup>256</sup>

### 6.1.2 Wirkstofftransport und Wirkstofffreisetzung

Das Wirkstoffaufnahme- und Freisetzungverhalten von eADF4(C16) Partikeln wurde anhand von Rhodamin B als Modellwirkstoff analysiert. Es handelt sich bei Rhodamin B um einen hydrophoben, wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff, welcher bei neutralem pH-Wert zwitterionisch vorliegt.<sup>257</sup> Mit Hilfe dieses Modellwirkstoffes war es möglich, zwei verschiedene Beladungsstrategien zu verfolgen, co-Präzipitation und Diffusion (Kapitel 5.3). Es konnte hierbei beobachtet werden, dass co-Präzipitation des

Wirkstoffes zusammen mit dem Protein eine höhere Beladung der Partikel im Vergleich zur Beladung über Diffusionsvorgänge erlaubt (Abb. 5.15A). Die Beladung der Partikel durch Diffusion wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, durch den Konzentrationsgradienten, die elektrostatischen und die hydrophoben Wechselwirkungen, ebenso wie durch die Größe der Wirkstoffpartikel. Aufgrund der zwitterionischen Form des Rhodamin B bei pH 8 spielt die Elektrostatik eine untergeordnete Rolle. Durch Wechselwirkungen der Rhodamin B Moleküle mit den Partikeln wird die Diffusion der Moleküle in die Partikel behindert und es kann davon ausgegangen werden, dass die Rhodamin B Moleküle nicht vollständig in die Partikel eindiffundieren, sondern in den Randbereichen und auf der Oberfläche der Partikel akkumulieren. Durch co-Präzipitation gelangen die Wirkstoffe unabhängig von den Diffusionsprozessen in die Partikel und liegen dort wahrscheinlich gleichmäßig verteilt vor. Es treten jedoch trotzdem hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und dem Rhodamin B auf, welche wahrscheinlich die Verteilung der Modellwirkstoff-Moleküle innerhalb der Partikel beeinflussen.

Chemisches Vernetzen mit Rubpy und APS beeinflusst die Wirkstoffbeladung der Partikel geringfügig (Abb. 5.15A). Ein Ansatz die Wirkstoffaufnahme zu erhöhen ist die Zugabe von Salzen in das umgebende Medium (Abb. 5.15B). In Gegenwart von steigenden NaCl-Konzentrationen akkumuliert bei unvernetzten Partikeln aufgrund der Ladung das Salz rund um die Partikel. Dadurch werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Rhodamin B und den Partikeln, welche die Diffusion behindern, abgeschirmt und die Diffusion des Rhodamin B in die Partikel verbessert. Des Weiteren kann durch die Zugabe des Salzes ein sogenannter Einsalzungseffekt beobachtet werden. In Lösung sorgen geringe Mengen Salz für eine Erhöhung der Löslichkeit der Proteine. In Partikelform sorgen die Salzionen für eine minimale Umstrukturierung der Proteinaggregate wodurch die Porenstruktur der eADF4(C16) Partikel verändert wird. Die leicht veränderte Strukturierung der Proteine kann die Aufnahme der Rhodamin B Moleküle in die Partikel beeinflussen (Abb. 5.15B). Bei vernetzten Partikeln konnte keine salzabhängige Beladung beobachtet werden (Abb. 5.15). Das kann zum einen an der, durch die Vernetzung bedingten, geringeren Porengröße der Partikel liegen, zum anderen an der zusätzlichen Stabilisierung der Proteine durch die di-Tyrosine. Die di-

Tyrosine verhindern eine Umstrukturierung der Proteinaggregate durch die Salzionen, so dass die Diffusion der Rhodamin B Moleküle in die vernetzten eADF4(C16) Partikel salzunabhängig ist .

Für die Analysen des Einflusses der chemischen Vernetzung und der Salzkonzentration auf die Rhodamin B-Freisetzung wurden Partikel aller Herstellungs- und Beladungsrouten verwendet (Abb. 5.14,). Die Wirkstofffreisetzung aus eADF4(C16) Partikeln folgt einer Kinetik 2. Ordnung. In einem ersten Schritt diffundieren die Wirkstoffmoleküle aus dem Inneren des Partikels in die Randbereiche und erst in einem zweiten Schritt diffundieren sie aus den Partikeln hinaus.<sup>102</sup> Diese Diffusionsvorgänge werden zusätzlich von einem weiteren Prozess begleitet, von der Diffusion der nur äußerlich gebundenen Rhodamin B Moleküle in das umgebende Medium. Diese drei Prozesse lassen sich in dem hier gewählten Versuchsaufbau allerdings nur schwer voneinander trennen.

Die Rhodamin B-Freisetzung aus unvernetzten Partikeln ist unabhängig von der Herstellungsrouten bei allen fünf Routen gleich (Abb. 5.16). Es macht für die Wirkstofffreisetzung somit keinen Unterschied, ob die Beladung über Diffusionsvorgänge oder durch co-Präzipitation erfolgt, lediglich die Menge an aufgenommenem Rhodamin B variiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Wirkstofffreisetzung bei unvernetzten Partikeln nach 240 min um ca. 20-30 % über dem Wert der vernetzten Partikel liegt (Abb. 5.16). Das kann auf das Quellverhalten und die damit einhergehenden unterschiedlichen Porengrößen der Partikel zurückgeführt werden. Die zusätzliche Stabilität durch die chemische Vernetzung verhindert ein zu den unvernetzten Partikeln vergleichbares Quellverhalten, wodurch auch die Rhodamin B Moleküle in ihrer Diffusion behindert werden.

Ein weiterer Faktor, welcher bei den Diffusionseigenschaften des Rhodamin B berücksichtigt werden sollte, ist die Ladungsverteilung der Partikel. Diese ist, wie bereits in Kapitel 6.1.1 diskutiert, von der Aminosäuresequenz der Proteine und den Umgebungsbedingungen der Partikel abhängig. Durch die Anwesenheit von Rubpy und APS bzw. Rhodamin B während des Präzipitationsschrittes kann die Ladungsverteilung innerhalb der Partikel und dadurch auch die Oberflächenladungsverteilung beeinflusst

werden. Dies wird insbesondere anhand der Rhodamin B-Freisetzung aus den vernetzten Partikeln der Routen 1, 2a und 2b deutlich (Abb. 5.14 und 5.16). Partikel der Route 1 werden in Anwesenheit der Vernetzermoleküle Rubpy und APS präzipitiert. Im Vergleich zu Partikeln der Routen 2a und 2b reagieren diese Partikel deutlich stärker auf die Anwesenheit von Salz im Freisetzungsmedium. Auch die Rhodamin B-Freisetzung aus vernetzten Partikeln der Routen 3a und 3b wird durch die Zugabe von NaCl beeinflusst. Das spricht für eine veränderte Ladungs- und Hydrophobizitätsverteilung innerhalb der Partikel und an ihrer Oberfläche.

Es sind somit verschiedene Faktoren, die auf die Diffusion der Rhodamin B Moleküle aus den Partikeln Einfluss nehmen. Dazu zählen die teilweise elektrostatische Abschirmung der Rhodamin B Moleküle durch die Salzionen, der durch das Salz bedingte erhöhte osmotische Druck, eine veränderte Hydrophobizität der Proteine aufgrund der Bildung von di-Tyrosinen und die Ladungsverteilung auf der Partikeloberfläche sowie im Inneren des Partikels.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bisher keine optimale Kontrolle der Rhodamin B-Freisetzung aus eADF4(C16) Partikeln möglich ist. Auch die zusätzliche chemische Vernetzung erzielte lediglich eine geringfügig verlangsamte Wirkstofffreisetzung. Ziel des kontrollierten Wirkstofftransports und der Wirkstofffreisetzung ist eine langsame, über einen längeren Zeitraum andauernde, gleichmäßige Freisetzung. Dieses Ziel kann jedoch möglicherweise über andere Strategien erreicht werden. Beispielsweise können Wirkstoffmoleküle an die Proteine gekoppelt werden und über *Trigger* (z. B. pH-Wertänderung oder Temperaturänderung) gezielt am Wirkungsort freigesetzt werden.<sup>258</sup>

## 6.2 Sterilisation von eADF4(C16) Partikeln

Zwei unterschiedliche, industriell genutzte Methoden zur Sterilisation von Medizinprodukten sind die Bestrahlung mit Gammastrahlen oder die Begasung der Materialien mit Ethylenoxid.<sup>195,197,259</sup> Beide Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit für die Sterilisation von Partikeln auf Basis des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) erprobt (Kapitel 5.4). Hierbei wurde deutlich, dass bereits niedrige Dosen Gammastrahlen zu einer Degradation der Proteine führen. Dies

konnte sowohl gelelektrophoretisch (Abb. 5.18) als auch massenspektrometrisch (Abb. 5.19) gezeigt werden. Die Bestrahlung hat jedoch keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur der verwendeten Proteine (Abb. 5.21).

Es wird schon länger über die Auswirkungen der Gammastrahlen auf Proteine diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass sich die Elastizitätseigenschaften von Fibroinfasern durch die Sterilisation mit Gammastrahlen stark verändern, die Festigkeit und Dehnbarkeit verringerten sich jeweils etwa um die Hälfte, es konnte jedoch kein detektierbarer Einfluss auf die kristallinen Strukturen beobachtet werden.<sup>192,193</sup> Bei einigen Proteinen führte die Behandlung mit Gammastrahlen auch zu Kettenabbrüchen und Vernetzungsreaktionen, hierbei genügten bereits geringe Dosen.<sup>194,195</sup> Diese Einflüsse durch Gammastrahlen treten allerdings nicht nur bei der Behandlung von Proteinen auf, auch bei anderen Biomaterialien konnten Einflüsse der Gammastrahlen auf die Glasübergangstemperatur, die elastischen Eigenschaften und die Viskosität der sterilisierten Materialien beobachtet werden.<sup>196,197</sup>

Gammastrahlen werden auch für die Sterilisation anderer Materialien eingesetzt, z. B. von festen Lipid-Nanopartikel. Hierbei wurden allerdings nicht wie bei eADF4(C16), die dehydratisierten Partikel, sondern eine Suspension sterilisiert. Eine wichtige Vorgabe hierbei war, dass die Eigenschaften der Suspension hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Stabilität, sowie die Freisetzungskinetiken der verpackten Wirkstoffe, nicht verändert werden sollten.<sup>260</sup> Es konnte jedoch beobachtet werden, dass durch Gammastrahlen freie Radikale erzeugt werden, welche Folgereaktionen sowohl bei Lipiden als auch bei Proteinen auslösen können. Dies kann einerseits zu chemischen Veränderungen der Proben und andererseits zu Problemen hinsichtlich der physikalischen Stabilität der Partikel führen und dadurch die Partikelaggregation fördern.<sup>260</sup>

Ob die Sterilisation von Proteinmaterialien mit Gammastrahlen sinnvoll ist oder nicht, ist abhängig von der gewünschten Anwendung. Möglicherweise ist es nicht störend, wenn in einem Vliesstoff, der als Wundauflage verwendet wird und auf der Wunde verbleiben soll, Kettenbrüche im Protein vorliegen. Es ist, im Gegenteil, sogar denkbar, dass der Abbau der Wundauflage durch körpereigene Proteasen durch die Kettenbrüche

beschleunigt wird. Wird ein Proteinfaden jedoch als Wundnaht verwendet, wären die Veränderungen in den mechanischen Eigenschaften, wie sie bereits für Fibroinfasern beobachtet wurden, unerwünscht.

Die zweite analysierte Sterilisationsmethode für Proteine ist die Sterilisation mittels Ethylenoxid (Kapitel 5.4). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass EO keinen detektierbaren Einfluss auf die Sekundärstruktur der eADF4(C16) Partikel hat und dass es zu keinem Abbau der Proteine kommt, es konnten keine Kettenbrüche nachgewiesen werden. Es kam jedoch zu Veränderungen in der Chemielumineszenz bei der Detektion des Western Blots, diese wurde verstärkt. Ethylenoxid ist dafür bekannt, dass es mit verschiedenen Aminosäuren z. B. Lysin oder Hydroxylysin reagieren kann.<sup>194,195</sup> Möglicherweise reagiert es auch mit eADF4(C16), wodurch es zu Veränderungen am Protein kommt, welche die Bindung des T7-Antikörpers, für die Detektion des Western Blots, verstärken. Aufgrund der Sensitivität der hier eingesetzten Methoden, konnten bisher allerdings keine Veränderungen am Protein nachgewiesen werden.

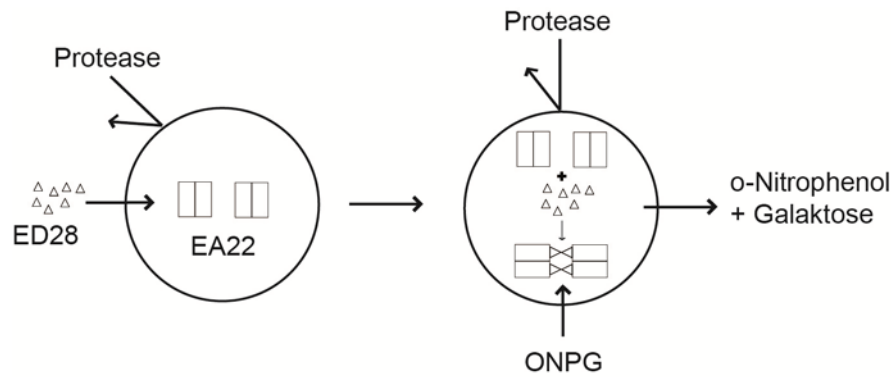
### 6.3 eADF4(C16) Kapseln als Reaktionscontainer

Die Verkapselung und der damit einhergehende Schutz von aktiven Substanzen vor den jeweiligen Umgebungsbedingungen ist ein wichtiges biotechnologisches Forschungsgebiet.<sup>113,123,130,261,262</sup> Wichtige Punkte sind, dass der Kapselbildungsprozess keine negativen Auswirkungen auf die Aktivität des zu verpackenden Moleküls hat, und dass die Kapselhülle das verpackte Molekül sicher vor der Umgebung schützt. eADF4(C16) Kapseln bilden sich aufgrund des amphiphilen Charakters des Proteins an einer Öl-Wasser-Grenzschicht über einen Selbstassemblierungsschritt (Abb. 3.7, Kapitel 3.2.2.2). Die Kapselgröße wird hierbei über die Emulsion eingestellt. Ein großer Vorteil dieses Herstellungsprozesses ist, dass das verpackte Material von Beginn an in wässriger Umgebung vorliegt bzw. in einem entsprechenden Puffersystem gelagert werden kann. Bei der herkömmlichen Herstellungsmethode wurde auf Toluol zurückgegriffen,<sup>99,100</sup> dieses hat jedoch insbesondere im biomedizinischen Bereich große Nachteile, da es toxisch ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf Toluol als organische Phase verzichtet werden kann. Durch die Verwendung des Silikonöls M100 ist es gelungen, Kapseln durch Grenzflächenpolymerisation ohne toxische Substanzen

herzustellen. Silikonöl hat im Vergleich zu Toluol den Nachteil, dass es keine  $\beta$ -Faltblattstruktur bei den Proteinen induziert. Bei der Selbstassemblierung der Proteine an der Toluol-Wasser-Grenzschicht werden die  $\beta$ -Faltblattstrukturen vermutlich durch den aromatischen Ring des Toluols induziert. Bei dem verwendeten Silikonöl M100 handelt es sich hingegen um ein Polydimethylsiloxan, welches keinen aromatischen Ring aufweist. Dadurch entsteht allein durch die Emulsionsherstellung mit Silikonöl kein stabiler Film an der Grenzfläche, so dass eine Nachbehandlung der Proteine erforderlich ist. Hierfür wurde auf Ethanol zurückgegriffen. Ethanol wird bereits für die Nachbehandlung von eADF4(C16) Filmen, auf einem festen Substrat, erfolgreich angewendet.<sup>206,263,264</sup> Ein weiterer Vorteil dieses Lösungsmittels ist, dass durch die Zugabe von Ethanol die Überführung der Kapseln aus der Ölphase in die wässrige Phase erleichtert wird, da Ethanol die Oberflächenspannung der wässrigen Phase herabsetzt.

Aufgrund der veränderten Herstellungsmethode kann es auch zu veränderten Kapseleigenschaften kommen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und FITC-gekoppelten Dextranen (Kapitel 5.5.3) konnte gezeigt werden, dass sich die Permeabilität der mit Silikonöl hergestellten Kapselhülle nicht von der der Toluolkapseln unterscheidet.<sup>99,100</sup>

Die Porengröße der Kapseln ermöglichte es,  $\beta$ -Galaktosidase und die  $\alpha$ -komplementierte Form der  $\beta$ -Galaktosidase<sup>217-219</sup> in die Kapseln einzuschließen und ihre Aktivität nachzuweisen. Sowohl die Produkte und Edukte als auch das  $\alpha$ -Komplementationspeptid ED28 können aufgrund der semi-permeablen Membran problemlos über die Kapselmembran diffundieren, die Enzyme sind jedoch vor vielen Proteasen, z. B. vor Endoproteinase AspN geschützt (Abb. 5.34 Kapitel 5.7).<sup>220</sup> Der modifizierte Kapselherstellungsprozess eignet sich somit zur Verpackung und zum Schutz von höher molekularen aktiven Substanzen (Abb. 6.3). Durch die Möglichkeit, eine inaktive Enzymform (EA22) in die Kapseln einzuschließen und nachträglich zu aktivieren, können verkapselte Enzyme direkt am gewünschten Wirkort aktiviert werden, wodurch weitere Nebenreaktionen minimiert werden können (Abb. 5.33).



**Abb. 6.3:** Schematische Darstellung der Schutzfunktion der eADF4(C16) Kapsel.

Die Versuche zur Enzymaktivität von  $\beta$ -Galaktosidase und seiner  $\alpha$ -komplementierten Form zeigten, dass die alleinige Anwesenheit von gelöstem eADF4(C16) die Aktivität des  $\alpha$ -komplementierten Enzyms erhöht (Abb. 5.32, Tab. 5.3). Diese Eigenschaft geht auf bereits beobachtete Stabilisierungseffekte der Seidenproteine auf Enzyme zurück.<sup>265,266</sup> Kontrollen haben allerdings gezeigt, dass die Anwesenheit von gelöstem eADF4(C16) oder von leeren Kapseln aus eADF4(C16) nicht als Schutzsystem für die Enzyme gegenüber Proteasen ausreicht (Abb. 5.34), die Verpackung in einer Kapsel ist als Schutz notwendig.

Die Größe der hergestellten Kapseln lässt sich bisher lediglich über die Emulsion einstellen. Mikrofluidik ist eine elegante Lösung, homogene Kapseln definierter Größe herzustellen. Dieser Ansatz konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht abschließend bearbeitet werden. Durch die modifizierte Kapselherstellung mit Silikonöl kommt es zu keiner direkten  $\beta$ -Faltblattbildung, welche für die Herstellung von stabilen, wasserunlöslichen Kapseln notwendig ist.

Das Deformations- und Fließverhalten von Partikeln in Mikrofluidik-Kanälen lässt sich relativ genau simulieren.<sup>267</sup> Dadurch kann das Strömungsverhalten innerhalb einer Kapsel, während sie durch die Kanäle fließt, vorhergesagt, und die für die Kapselbildung wichtigen Diffusionsvorgänge des Proteins an die Öl-Wasser-Grenzschicht optimiert werden. Um die Ausbildung einer mechanisch stabilen Kapselhülle im Mikrofluidik-Kanal zu gewährleisten, ist eine Nachbehandlung der Proteine mit Ethanol notwendig. Hierfür muss dem Layout ein zusätzlicher Kanal hinzugefügt werden. Die geschwungenen Kanäle sollten jedoch erhalten bleiben, da durch die Form und die dadurch gegebenen Fließeigenschaften der Tropfen, die Durchmischung innerhalb der Emulsionstropfen



verbessert wird<sup>239</sup> und dadurch für eine beschleunigte Diffusion des Proteins an die Öl-Wasser-Grenzfläche, wo es zu einem dünnen Film assembliert, sorgen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Strömungsverhalten der Partikel durch den neuen Zufluss nicht negativ beeinflusst wird. Turbulente Strömungen können die gebildeten Emulsionstropfen vor der Stabilisierung durch Ethanol zerstören. Der Einfluss solcher Strömungen kann jedoch ebenfalls durch Simulationsversuche vorab analysiert werden, so dass das Layout optimal angepasst werden kann. Mögliche Anwendungsgebiete von artifiziellen Kapseln sind u. a. im Bereich des kontrollierten Wirkstofftransports oder auch als Mikroreaktoren.<sup>267</sup>

#### **6.4 Rekombinante Spinnenseidenproteine als Wirkstofftransportsystem im Vergleich zu anderen Polymeren**

Die Anforderungen an Polymere im Bereich der kontrollierten Wirkstofffreisetzung sind groß und wurden bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben. Hierzu zählt u. a. eine gute Kontrolle über die Struktur und Funktion des Materials, eine gute mechanische Stabilität und eine einfache Verarbeitung der Materialien in unterschiedliche Morphologien. Hinzu kommen zusätzliche Anforderungen, welche sich auf die Verträglichkeit der eingesetzten Polymere beziehen, z. B. Bioabbaubarkeit in ungiftige Produkte und Biokompatibilität.<sup>130</sup> Es werden bereits eine Vielzahl unterschiedliche natürliche und synthetische Polymere für den Einsatz als Wirkstofftransportsystem erfolgreich getestet, dazu zählen neben vielen anderen, Alginat, Kollagen, Fibroin und Spinnenseide als Vertreter der natürlichen Polymere (Tab. 3.5) und PLG oder PEG als Beispiele für synthetische Polymere (Tab. 3.4).<sup>74,79,102,113,123,130,268</sup> So vielfältig wie die verwendeten Materialien sind auch ihre Morphologien und Verarbeitungsmethoden.<sup>104,262,269</sup>

eADF4(C16) vereint viele der genannten Anforderungen für einen Einsatz im Bereich des kontrollierten Wirkstofftransports, im Vergleich zu etablierten synthetischen Polymeren. Es kann beispielsweise durch Proteasen in Peptide metabolisiert werden, wodurch es einer möglichen Akkumulation im Organismus entgegen wirkt. Synthetische Polymere hingegen akkumulieren oftmals im Körper oder werden in toxische Degradationsprodukte abgebaut. Um diese Materialien trotzdem im Körper anwenden zu können, müssen die Partikel und Kapseln entweder nach der Wirkstofffreisetzung

explantiert werden oder eine andere Möglichkeit gefunden werden, um die toxischen Abbauprodukte zu vermeiden.<sup>270</sup> Vorteile des rekombinanten Proteins gegenüber synthetischen Materialien sind die gute Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und geringe Immunogenität.

Insbesondere die Verpackung von aktiven Wirkstoffen auf Proteinbasis stellt eine Herausforderung dar. Viele proteinbasierte Wirkstoffe weisen in Lösung eine sehr geringe Halbwertszeit auf, durch die Immobilisierung dieser Wirkstoffe in Kapseln oder Partikeln kann die Halbwertszeit deutlich verlängert werden. Die Verpackung hat somit zusätzlich zu ihrer Schutzfunktion auch einen stabilisierenden Einfluss auf die verpackten Proteine oder Enzyme.<sup>130</sup> Nicht nur eADF4(C16), auch andere natürliche Biomaterialien haben insbesondere in diesem Bereich einen entscheidenden Vorteil gegenüber synthetischen Polymeren. Durch die Verarbeitung natürlicher Polymere unter wässrigen Bedingungen wird die Aktivität der verpackten Proteine und Enzyme nicht negativ beeinflusst, ganz im Gegenteil zur Nutzung synthetischer Polymere. Synthetische Polymere benötigen meist hohe Temperaturen, organische Lösungsmittel oder Ultraschallbehandlung, um in die gewünschten Morphologien überführt zu werden.<sup>242</sup> Diese Behandlungen können sich negativ auf die Aktivität der zu verpackenden Materialien auswirken.

Eine Eigenschaft, welche Proteine als Wirkstofftransportsystem weiter hervorhebt ist die Vielzahl an Beladungsmöglichkeiten und Bindekapazitäten für Wirkstoffe. Hierzu zählen sowohl die Interaktionen der Wirkstoffmoleküle mit den Proteinen über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen, als auch mögliche Oberflächenmodifikationen über funktionelle Gruppen, die einen gezielten Transport der Wirkstoffe an den Zielort ermöglichen.<sup>136</sup> Viele dieser genannten Eigenschaften finden sich auch bei Polysacchariden wieder. Proteine und somit auch eADF4(C16) weisen jedoch aufgrund ihrer Vielfalt an Morphologien und ihrer Fähigkeit zu Emulgieren, Wasser zu binden und selbst zu assemblieren,<sup>136,270</sup> ein größeres Potential für medizinische, pharmazeutische und technische Anwendungen auf.

Ein Nachteil von natürlichen Proteinen tierischen Ursprungs ist ihr starkes Quellen in Wasser, wodurch Wirkstoffmoleküle leichter aus den Partikeln freigesetzt werden

können. Eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung über einen langen Zeitraum ist dadurch nicht möglich.<sup>270</sup> Eine Möglichkeit das zu verhindern ist beispielsweise eine zusätzliche chemische Vernetzung der Proteine, welche einerseits Einfluss auf die Hydrophobizität der Partikel nehmen und andererseits die Porengrößen der Partikel beeinflussen. Diese Problematik tritt bei synthetischen Polymeren weniger ausgeprägt auf. Ein Weiteres, insbesondere bei Materialien tierischen Ursprungs auftretendes Problem sind mögliche virale Kontaminationen.<sup>271</sup> Einige Viren können beim Menschen gefährliche Krankheiten auslösen, hierzu zählen z. B. Hepatitis B-Viren, Hepatitis C-Viren oder der Humane Immunodefizienz-Virus (HIV). Auch Kontaminationen durch Prionen, welche ebenfalls zu schweren Erkrankungen beim Menschen führen können, sind möglich. Ein bekanntes Beispiel für eine auf Prionen zurückgehende Erkrankung beim Menschen ist die Creutzfeld-Jakob-Krankheit.<sup>271</sup> Es werden bereits verschiedene Ansätze verfolgt, die Kontaminationen von biopharmazeutischen Produkten mit Viren, Bakterien und Prionen zu reduzieren. So gibt es beispielsweise spezielle Nanofilter,<sup>272</sup> welche Viren aus Lösungen herausfiltern sollen, teilweise kombiniert mit Säulenchromatographie<sup>272,273</sup> oder die Behandlung der Proben mit UV-Strahlen oder mit Ozon.<sup>198</sup>

Nicht nur eADF4(C16), auch andere Proteine eignen sich für medizinische und pharmazeutische Anwendungen. eADF4(C16) hat jedoch den Vorteil, dass es durch die rekombinante Herstellung unabhängig von Umwelteinflüssen, natürlichen Kontaminationen und Krankheitserregern mit einer gleichbleibend hohen Qualität hergestellt werden kann und trotzdem viele der Eigenschaften der natürlichen Seide aufweist. Hierzu zählen die gute Biokompatibilität,<sup>274-276</sup> die Bioabbaubarkeit und die guten mechanischen Eigenschaften der Partikel, die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurden. Durch die biotechnologische Herstellungsweise ist es zudem möglich, die Proteine an die gewünschten Anforderungen anzupassen, beispielsweise durch Einfügen spezieller Peptide um die endozytotische Aufnahme in Zellen zu begünstigen oder spezielle Sequenzen, wodurch die Zelladhäsion verbessert, die Oberflächeneigenschaften verändert oder zusätzliche enzymatische Schnittstellen eingefügt werden.<sup>216,274</sup>



## 7 Literatur

- 1 Vollrath, F., Madsen, B. & Shao, Z. Z. The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. *P Roy Soc Lond B Bio* **268**, 2339-2346 (2001).
- 2 Sutherland, T. D. *et al.* Single honeybee silk protein mimics properties of multi-protein silk. *PLoS One* **6**, e16489 (2011).
- 3 Hepburn, H. R. & Kurstjens, S. P. The Combs of Honeybees as Composite-Materials. *Apidologie* **19**, 25-36 (1988).
- 4 Weisman, S. *et al.* Honeybee silk: Recombinant protein production, assembly and fiber spinning. *Biomaterials* **31**, 2695–2700 (2009).
- 5 Bauer, F. & Scheibel, T. Artificial egg stalks made of a recombinantly produced lacewing silk protein. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 6521-6524 (2012).
- 6 Weisman, S. *et al.* Fifty years later: The sequence, structure and function of lacewing cross-beta silk. *J Struct Biol* **168**, 467-475 (2009).
- 7 Weisman, S. *et al.* An Unlikely Silk: The Composite Material of Green Lacewing Cocoons. *Biomacromolecules* **9**, 3065-3069 (2008).
- 8 Sutherland, T. D., Young, J. H., Weisman, S., Hayashi, C. Y. & Merritt, D. J. Insect silk: One name, many materials. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 171-188 (2010).
- 9 Zhao, H.-P., Feng, X.-Q., Yu, S.-W., Cui, W.-Z. & Zou, F.-Z. Mechanical properties of silkworm cocoons. *Polymer* **46**, 9192-9201 (2005).
- 10 Danks, H. V. The roles of insect cocoons in cold conditions. *Eur J Entomol* **101**, 433-437 (2004).
- 11 Winkler, S. & Kaplan, D. L. Molecular biology of spider silk. *J Biotechnol* **74**, 85-93 (2000).
- 12 Acharya, C., Ghosh, S. K. & Kundu, S. C. Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med* **19**, 2827-2836 (2008).
- 13 Liu, T. L. *et al.* Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. *Journal of Zhejiang University-Science B* **11**, 10-16 (2010).
- 14 Yaltirik, M. *et al.* Comparison of four different suture materials in soft tissues of rats. *Oral Dis* **9**, 284-286 (2003).
- 15 Moy, R. L., Lee, A. & Zalka, A. Commonly used suture materials in skin surgery. *Am Fam Physician* **44**, 2123-2128 (1991).
- 16 Vollrath, F. & Knight, D. P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **410**, 541-548 (2001).
- 17 Vepari, C. & Kaplan, D. L. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci* **32**, 991-1007 (2007).
- 18 Altman, G. H. *et al.* Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **24**, 401-416 (2003).
- 19 Kuhbier, J. W. *et al.* First investigation of spider silk as a braided microsurgical suture. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **97B**, 381-387 (2011).
- 20 Dams-Kozłowska, H. *et al.* Purification and cytotoxicity of tag-free bioengineered spider silk proteins. *J Biomed Mater Res A* **101**, 456-464 (2013).
- 21 Vendrely, C. & Scheibel, T. Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromolecular Bioscience* **7**, 401-409 (2007).
- 22 Zschokke, S. Nomenclature of the orb-web. *J Arachnol* **27**, 542-546 (1999).
- 23 Guerette, P. A., Ginzinger, D. G., Weber, B. H. & Gosline, J. M. Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* **272**, 112-115 (1996).
- 24 Humenik, M., Smith, A. M. & Scheibel, T. Recombinant spider silks—Biopolymers with potential for future applications. *Polymers* **3**, 640-661 (2011).
- 25 Aprhisiart, A. & Vollrath, F. Design-Features of the Orb Web of the Spider, *Araneus-Diadematus*. *Behav Ecol* **5**, 280-287 (1994).

- 26 Gosline, J. *et al.* Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos T Roy Soc B* **357**, 121-132 (2002).
- 27 Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S. & Savage, K. N. The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function. *Journal of Experimental Biology* **202**, 3295-3303 (1999).
- 28 Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. & Lewis, R. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science* **291**, 2603-2605 (2001).
- 29 Keten, S. & Buehler, M. J. Nanostructure and molecular mechanics of spider dragline silk protein assemblies. *J R Soc Interface* **7**, 1709-1721 (2010).
- 30 Vollrath, F. & Knight, D. P. Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 243-249 (1999).
- 31 Lefèvre, T., Paquet-Mercier, F., Rioux-Dubé, J.-F. & Pérolet, M. Structure of silk by raman spectromicroscopy: From the spinning glands to the fibers. *Biopolymers* **97**, 322-336 (2012).
- 32 Lefevre, T., Rousseau, M. E. & Pezolet, M. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy. *Biophysical Journal* **92**, 2885-2895 (2007).
- 33 Hardy, J. G., Romer, L. M. & Scheibel, T. R. Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* **49**, 4309-4327 (2008).
- 34 Simmons, A., Ray, E. & Jelinski, L. W. Solid-State <sup>13</sup>C NMR of *Nephila clavipes* Dragline Silk Establishes Structure and Identity of Crystalline Regions. *Macromolecules* **27**, 5235-5237 (1994).
- 35 Brooks, A. E., Steinkraus, H. B., Nelson, S. R. & Lewis, R. V. An investigation of the divergence of major ampullate silk fibers from *Nephila clavipes* and *Argiope aurantia*. *Biomacromolecules* **6**, 3095-3099 (2005).
- 36 Liu, Y., Sponner, A., Porter, D. & Vollrath, F. Proline and processing of spider silks. *Biomacromolecules* **9**, 116-121 (2008).
- 37 Askarieh, G. *et al.* Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature* **465**, 236-238 (2010).
- 38 Hagn, F. *et al.* A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* **465**, 239-244 (2010).
- 39 Hedhammar, M. *et al.* Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprostheno australis*: implications for fiber formation. *Biochemistry-Us* **47**, 3407-3417 (2008).
- 40 Rising, A., Hjalms, G., Engstrom, W. & Johansson, J. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins. *Biomacromolecules* **7**, 3120-3124 (2006).
- 41 Heim, M., Keerl, D. & Scheibel, T. Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. *Angew Chem Int Edit* **48**, 3584-3596 (2009).
- 42 Lefevre, T. *et al.* Conformation of spider silk proteins in situ in the intact major ampullate gland and in solution. *Biomacromolecules* **8**, 2342-2344 (2007).
- 43 Hayashi, C. Y., Shipley, N. H. & Lewis, R. V. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 271-275 (1999).
- 44 Hijirida, D. H. *et al.* C-13 NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophysical Journal* **71**, 3442-3447 (1996).
- 45 Dicko, C., Vollrath, F. & Kenney, J. M. Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. *Biomacromolecules* **5**, 704-710 (2004).
- 46 Jaudzems, K. *et al.* pH-dependent dimerization of spider silk N-terminal domain requires relocation of a wedged tryptophan side chain. *J Mol Biol* **422**, 477-487 (2012).

- 47 Landreh, M. *et al.* A pH-Dependent Dimer Lock in Spider Silk Protein. *J Mol Biol* **404**, 328-336 (2010).
- 48 Dicko, C., Kenney, J. M., Knight, D. & Vollrath, F. Transition to a beta-sheet-rich structure in spidroin in vitro: The effects of pH and cations. *Biochemistry-Us* **43**, 14080-14087 (2004).
- 49 Vollrath, F., Knight, D. P. & Hu, X. W. Silk production in a spider involves acid bath treatment. *P Roy Soc Lond B Bio* **265**, 817-820 (1998).
- 50 Hagn, F., Thamm, C., Scheibel, T. & Kessler, H. pH-Dependent Dimerization and Salt-Dependent Stabilization of the N-terminal Domain of Spider Dragline Silk-Implications for Fiber Formation. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 310-313 (2010).
- 51 Eisoldt, L., Hardy, J. G., Heim, M. & Scheibel, T. R. The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J Struct Biol* **170**, 413-419 (2010).
- 52 Cranford, S. W., Tarakanova, A., Pugno, N. M. & Buehler, M. J. Nonlinear material behaviour of spider silk yields robust webs. *Nature* **482**, 72-76 (2012).
- 53 Denny, M. Physical-Properties of Spiders Silk and Their Role in Design of Orb-Webs. *Journal of Experimental Biology* **65**, 483-506 (1976).
- 54 Kluge, J. A., Rabotyagova, O., Leisk, G. G. & Kaplan, D. L. Spider silks and their applications. *Trends in Biotechnology* **26**, 244-251 (2008).
- 55 Thiel, B. L., Guess, K. B. & Viney, C. Non-periodic lattice crystals in the hierarchical microstructure of spider (major ampullate) silk. *Biopolymers* **41**, 703-719 (1997).
- 56 Eom, K., Li, P. C., Makarov, D. E. & Rodin, G. J. Relationship between the mechanical properties and topology of cross-linked polymer molecules: Parallel strands maximize the strength of model polymers and protein domains. *Journal of Physical Chemistry B* **107**, 8730-8733 (2003).
- 57 Ketten, S., Xu, Z., Ihle, B. & Buehler, M. J. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of beta-sheet crystals in silk. *Nat Mater* **9**, 359-367 (2010).
- 58 Bratzel, G. & Buehler, M. J. Molecular mechanics of silk nanostructures under varied mechanical loading. *Biopolymers* **97**, 408-417 (2012).
- 59 Bratzel, G. & Buehler, M. J. Sequence-structure correlations in silk: Poly-Ala repeat of N. clavipes MaSp1 is naturally optimized at a critical length scale. *J Mech Behav Biomed Mater* **7**, 30-40 (2012).
- 60 Xiao, S. B., Stacklies, W., Cetinkaya, M., Markert, B. & Gräter, F. Mechanical response of silk crystalline units from force-distribution analysis. *Biophysical Journal* **96**, 3997-4005 (2009).
- 61 Cetinkaya, M., Xiao, S., Markert, B., Stacklies, W. & Gräter, F. Silk fiber mechanics from multiscale force distribution analysis. *Biophys J* **100**, 1298-1305 (2011).
- 62 Bauer, F., Bertinetti, L., Masic, A. & Scheibel, T. Dependence of mechanical properties of lacewing egg stalks on relative humidity. *Biomacromolecules* **13**, 3730-3735 (2012).
- 63 Hayashiya, K., Kato, M. & Hamamura, Y. Amino Acid Composition of Silk Proteins Resulting from Artificial Diet Fed Bombyx Mori. *P Jpn Acad* **40**, 349-350 (1964).
- 64 Andersen, S. O. Amino acid composition of spider silks. *Comparative Biochemistry and Physiology* **35**, 705-711 (1970).
- 65 Work, R. W. & Young, C. T. The Amino-Acid Compositions of Major and Minor Ampullate Silks of Certain Orb-Web-Building Spiders (Araneae, Araneidae). *J Arachnol* **15**, 65-80 (1987).
- 66 Harker, J. S. & Giammara, B. L. Biomaterials and Biomedical Devices. *Science* **242**, 885-892 (1988).
- 67 Meinel, L. *et al.* The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* **26**, 147-155 (2005).
- 68 Wright, S. & Goodacre, S. L. Evidence for antimicrobial activity associated with common house spider silk. *BMC Res Notes* **5**, 326 (2012).

- 69 Panilaitis, B. *et al.* Macrophage responses to silk. *Biomaterials* **24**, 3079-3085 (2003).
- 70 Sofia, S., McCarthy, M. B., Gronowicz, G. & Kaplan, D. L. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* **54**, 139-148 (2001).
- 71 Li, C. M., Vepari, C., Jin, H. J., Kim, H. J. & Kaplan, D. L. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3115-3124 (2006).
- 72 Jin, H. J., Fridrikh, S. V., Rutledge, G. C. & Kaplan, D. L. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* **3**, 1233-1239 (2002).
- 73 Elia, R. *et al.* Silk-hyaluronan-based composite hydrogels: A novel, securable vehicle for drug delivery. *J Biomater Appl* **27**, 749-762 (2013).
- 74 Lammel, A. S., Hu, X., Park, S. H., Kaplan, D. L. & Scheibel, T. R. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials* **31**, 4583-4591 (2010).
- 75 Shchepelina, O., Drachuk, I., Gupta, M. K., Lin, J. & Tsukruk, V. V. Silk-on-silk layer-by-layer microcapsules. *Adv Mater* **23**, 4655-4660 (2011).
- 76 Hofmann, S. *et al.* Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. *J Control Release* **111**, 219-227 (2006).
- 77 Kaplan, D. L. & Numata, K. Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Adv Drug Deliver Rev* **62**, 1497-1508 (2010).
- 78 Karageorgiou, V. *et al.* Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* **78**, 324-334 (2006).
- 79 Numata, K. & Kaplan, D. L. Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 1497-1508 (2010).
- 80 Pritchard, E. M., Szybala, C., Boison, D. & Kaplan, D. L. Silk fibroin encapsulated powder reservoirs for sustained release of adenosine. *J Control Release* **144**, 159-167 (2010).
- 81 Candelas, G., Candelas, T., Ortiz, A. & Rodriguez, O. Translational Pauses during a Spider Fibroin Synthesis. *Biochem Biophys Res Co* **116**, 1033-1038 (1983).
- 82 Candelas, G. C. & Cintron, J. A Spider Fibroin and Its Synthesis. *J Exp Zool* **216**, 1-6 (1981).
- 83 Work, R. W. & Emerson, P. D. An Apparatus and Technique for the Forcible Silking of Spiders. *J Arachnol* **10**, 1-10 (1982).
- 84 Thiel, B., Kunkel, D., Guess, K. & Viney, C. Composite Microstructures of Spider (Nevila Clavipes) Dragline. *MRS Proceedings* **330** (1993).
- 85 Fahnestock, S. R. & Bedzyk, L. A. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biot* **47**, 33-39 (1997).
- 86 Bogush, V. G. *et al.* A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J Neuroimmune Pharmacol* **4**, 17-27 (2009).
- 87 Fahnestock, S. R., Yao, Z. & Bedzyk, L. A. Microbial production of spider silk proteins. *J Biotechnol* **74**, 105-119 (2000).
- 88 Lazaris, A. *et al.* Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* **295**, 472-476 (2002).
- 89 Yang, J. J., Barr, L. A., Fahnestock, S. R. & Liu, Z. B. High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Res.* **14**, 313-324 (2005).
- 90 Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F. & Conrad, U. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol* **19**, 573-577 (2001).
- 91 Scheller, J. & Conrad, U. Plant-based material, protein and biodegradable plastic. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 188-196 (2005).
- 92 Karatzas, C. N., Turner, J. D. & Karatzas, A.-L. Production of Biofilaments in Transgenic Animals. Canada patent (1999).
- 93 Slotta, U., Mougin, N., Romer, L. & Leimer, A. H. Synthetic Spider Silk Proteins and Threads. *Chem Eng Prog* **108**, 43-49 (2012).
- 94 Gellissen, G. *et al.* Heterologous protein-production in yeast. *Anton Leeuw Int J G* **62**, 79-93 (1992).



- 95 Omenetto, F. G. & Kaplan, D. L. New opportunities for an ancient material. *Science* **329**, 528-531 (2010).
- 96 Fahnestock, S. R. & Irwin, S. L. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot* **47**, 23-32 (1997).
- 97 Vendrely, C., Ackerschott, C., Romer, L. & Scheibel, T. Molecular design of performance proteins with repetitive sequences: Recombinant flagelliform spider silk as basis for biomaterials. *Methods in Molecular Biology* **474**, 3-14 (2008).
- 98 Huemmerich, D. *et al.* Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry-Us* **43**, 13604-13612 (2004).
- 99 Hermanson, K. D., Harasim, M. B., Scheibel, T. & Bausch, A. R. Permeability of silk microcapsules made by the interfacial adsorption of protein. *Phys Chem Chem Phys* **9**, 6442-6446 (2007).
- 100 Hermanson, K. D., Huemmerich, D., Scheibel, T. & Bausch, A. R. Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk. *Adv Mater* **19**, 1810-1815 (2007).
- 101 Liebmann, B., Huemmerich, D., Scheibel, T. & Fehr, M. Formulation of poorly water-soluble substances using self-assembling spider silk protein. *Colloid Surface A* **331**, 126-132 (2008).
- 102 Lammel, A., Schwab, M., Hofer, M., Winter, G. & Scheibel, T. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials* **32**, 2233-2240 (2011).
- 103 Lammel, A., Schwab, M., Slotta, U., Winter, G. & Scheibel, T. Processing conditions for the formation of spider silk microspheres. *ChemSusChem* **1**, 413-416 (2008).
- 104 Slotta, U. K., Rammensee, S., Gorb, S. & Scheibel, T. An engineered spider silk protein forms microspheres. *Angew Chem Int Edit* **47**, 4592-4594 (2008).
- 105 Hofer, M., Winter, G. & Myschik, J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials* **33**, 1554-1562 (2012).
- 106 Ivanovska, I. L. *et al.* Bacteriophage capsids: tough nanoshells with complex elastic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7600-7605 (2004).
- 107 Ismagilov, R. F. *et al.* Pressure-driven laminar flow in tangential microchannels: an elastomeric microfluidic switch. *Anal Chem* **73**, 4682-4687 (2001).
- 108 Kenis, P. J., Ismagilov, R. F. & Whitesides, G. M. Microfabrication inside capillaries using multiphase laminar flow patterning. *Science* **285**, 83-85 (1999).
- 109 Anna, S. L., Bontoux, N. & Stone, H. A. Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Appl Phys Lett* **82**, 364-366 (2003).
- 110 Pannacci, N. *et al.* Equilibrium and nonequilibrium states in microfluidic double emulsions. *Phys Rev Lett* **101**, 164502 (2008).
- 111 Kinahan, M. E. *et al.* Tunable Silk: Using Microfluidics to Fabricate Silk Fibers with Controllable Properties. *Biomacromolecules* **12**, 1504-1511 (2011).
- 112 Breslauer, D. N., Muller, S. J. & Lee, L. P. Generation of monodisperse silk microspheres prepared with microfluidics. *Biomacromolecules* **11**, 643-647 (2010).
- 113 Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S. & Shakesheff, K. M. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews* **99**, 3181-3198 (1999).
- 114 Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. & Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 6288-6308 (2010).
- 115 Wang, X., Kim, H. J., Xu, P., Matsumoto, A. & Kaplan, D. L. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. *Langmuir* **21**, 11335-11341 (2005).
- 116 Liang, D., Hsiao, B. S. & Chu, B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1392-1412 (2007).
- 117 Langer, R. New Methods of Drug Delivery. *Science* **249**, 1527-1533 (1990).

- 118 Freiberg, S. & Zhu, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* **282**, 1-18 (2004).
- 119 Herrmann, J. & Bodmeier, R. The Effect of Particle Microstructure on the Somatostatin Release from Poly(Lactide) Microspheres Prepared by a W/O/W Solvent Evaporation Method. *J Contr Release* **36**, 63-71 (1995).
- 120 Schmidt, J. J., Rowley, J. & Kong, H. J. Hydrogels used for cell-based drug delivery. *J Biomed Mater Res A* **87**, 1113-1122 (2008).
- 121 Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* **101**, 1869-1879 (2001).
- 122 Gepp, M. M., Ehrhart, F., Shirley, S. G., Howitz, S. & Zimmermann, H. Dispensing of very low volumes of ultra high viscosity alginate gels: a new tool for encapsulation of adherent cells and rapid prototyping of scaffolds and implants. *Biotechniques* **46**, 31-32, 34, 36-38 passim (2009).
- 123 Grund, S., Bauer, M. & Fischer, D. Polymers in Drug Delivery-State of the Art and Future Trends. *Adv Eng Mater* **13**, B61-B87 (2011).
- 124 Wang, X. *et al.* Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery. *Biomaterials* **28**, 4161-4169 (2007).
- 125 Lu, C., Mu, B. & Liu, P. Stimuli-responsive multilayer chitosan hollow microspheres via layer-by-layer assembly. *Colloids Surf B Biointerfaces* **83**, 254-259 (2011).
- 126 George, M. & Abraham, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J Contr Release* **114**, 1-14 (2006).
- 127 Banerjee, T., Mitra, S., Singh, A. K., Sharma, R. K. & Maitra, A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **243**, 93-105 (2002).
- 128 Choy, Y. B., Cheng, F., Choi, H. & Kim, K. K. Monodisperse gelatin microspheres as a drug delivery vehicle: release profile and effect of crosslinking density. *Macromol Biosci* **8**, 758-765 (2008).
- 129 Wenk, E., Wandrey, A. J., Merkle, H. P. & Meinel, L. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. *J Control Release* **132**, 26-34 (2008).
- 130 Wang, X. *et al.* Silk microspheres for encapsulation and controlled release. *J Control Release* **117**, 360-370 (2007).
- 131 Pritchard, E. M., Valentin, T., Boison, D. & Kaplan, D. L. Incorporation of proteinase inhibitors into silk-based delivery devices for enhanced control of degradation and drug release. *Biomaterials* **32**, 909-918 (2011).
- 132 Liu, X. M., Sun, Q. S., Wang, H. J., Zhang, L. & Wang, J. Y. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials* **26**, 109-115 (2005).
- 133 Spiess, K., Lammel, A. & Scheibel, T. Recombinant Spider Silk Proteins for Applications in Biomaterials. *Macromol Biosci* **10**, 998-1007 (2010).
- 134 Berklund, C., Kim, K. & Pack, D. W. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions. *J Control Release* **73**, 59-74 (2001).
- 135 Berklund, C., Pollauf, E., Pack, D. W. & Kim, K. Uniform double-walled polymer microspheres of controllable shell thickness. *J Control Release* **96**, 101-111 (2004).
- 136 Nitta, S. K. & Numata, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int J Mol Sci* **14**, 1629-1654 (2013).
- 137 Mi, F. L. *et al.* Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug delivery system: a new delivery system for protein. *Biomaterials* **24**, 5023-5036 (2003).
- 138 Eliaz, R. E. & Kost, J. Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. *J Biomed Mater Res* **50**, 388-396 (2000).
- 139 Gin, H. *et al.* Biocompatibility of Polyacrylamide Microcapsules Implanted in Peritoneal-Cavity or Spleen of the Rat - Effect on Various Inflammatory Reactions In Vitro. *Biomater Artif Cell* **18**, 25-42 (1990).

- 140 Christensen, L. H., Breiting, V. B., Aasted, A., Jorgensen, A. & Kebuladze, I. Long-term effects of polyacrylamide hydrogel on human breast tissue. *Plast Reconstr Surg* **111**, 1883-1890 (2003).
- 141 You, E. S. *et al.* In vitro biocompatibility of surface-modified poly(DL-lactide-co-glycolide) scaffolds with hydrophilic monomers. *J Ind Eng Chem* **13**, 219-224 (2007).
- 142 Fernandez-Cossio, S. & Castano-Oreja, M. T. Biocompatibility of two novel dermal fillers: Histological evaluation of implants of a hyaluronic acid filler and a polyacrylamide filler. *Plast Reconstr Surg* **117**, 1789-1796 (2006).
- 143 Torchilin, V. P., Shtilman, M. I., Trubetskoy, V. S., Whiteman, K. & Milstein, A. M. Amphiphilic vinyl polymers effectively prolong liposome circulation time in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1195**, 181-184 (1994).
- 144 Tojo, K., Sun, Y., Ghannam, M. M. & Chien, Y. W. Characterization of a Membrane Permeation System for Controlled Drug Delivery Studies. *Aiche J* **31**, 741-746 (1985).
- 145 Li, C. & Wallace, S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 886-898 (2008).
- 146 Romberg, B. *et al.* Poly(amino acid)s: promising enzymatically degradable stealth coatings for liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **331**, 186-189 (2007).
- 147 Blume, G. & Cevc, G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1029**, 91-97 (1990).
- 148 Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T. & Davis, F. F. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem* **252**, 3582-3586 (1977).
- 149 Chanan-Khan, A. *et al.* Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol* **14**, 1430-1437 (2003).
- 150 Han, S., Kim, C. & Kwon, D. Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol. *Polymer* **38**, 317-323 (1997).
- 151 Afih-Effat, A. M. & Hay, J. N. Thermal Stabilization of Polyethylene Oxide. *Eur Polym J* **8**, 289-297 (1972).
- 152 Ishida, T., Maeda, R., Ichihara, M., Irimura, K. & Kiwada, H. Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. *J Control Release* **88**, 35-42 (2003).
- 153 Herold, D. A., Keil, K. & Bruns, D. E. Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* **38**, 73-76 (1989).
- 154 Jager, M., Schubert, S., Ochrimenko, S., Fischer, D. & Schubert, U. S. Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. *Chem Soc Rev* **41**, 4755-4767 (2012).
- 155 Akinc, A., Thomas, M., Klivanov, A. M. & Langer, R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med* **7**, 657-663 (2005).
- 156 Berthold, A., Cremer, K. & Kreuter, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. *J Contr Release* **39**, 17-25 (1996).
- 157 Kawashima, Y. *et al.* Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan. *J Pharm Sci* **74**, 264-268 (1985).
- 158 Hou, W. M., Miyazaki, S., Takada, M. & Komai, T. Sustained release of indomethacin from chitosan granules. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **33**, 3986-3992 (1985).
- 159 Bodmeier, R., Oh, K. H. & Prammar, Y. Preparation and Evaluation of Drug-Containing Chitosan Beads. *Drug Dev Ind Pharm* **15**, 1475-1494 (1989).
- 160 Calvo, P., RemunanLopez, C., VilaJato, J. L. & Alonso, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polymer Sci* **63**, 125-132 (1997).

- 161 Berscht, P. C., Nies, B., Liebendorfer, A. & Kreuter, J. Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidinone chitosan fleeces and determination of the in vitro release characteristics. *Biomaterials* **15**, 593-600 (1994).
- 162 Lehr, C. M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H. & Junginger, H. E. In vitro Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan and Some Other Natural Polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **78**, 43-48 (1992).
- 163 Calvo, P., RemunanLopez, C., VilaJato, J. L. & Alonso, M. J. Chitosan and chitosan ethylene oxide propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical Research* **14**, 1431-1436 (1997).
- 164 Larson, C. Dextran prodrugs - structure and stability in relation to therapeutic activity. *Adv Drug Deliver Rev* **3**, 103-154 (1989).
- 165 Panyam, J. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliver Rev* **55**, 329-347 (2003).
- 166 Larsen, N. E. & Balazs, E. A. Drug Delivery Systems Using Hyaluronan and Its Derivatives. *Adv Drug Deliver Rev* **7**, 279-293 (1991).
- 167 Jork, A. *et al.* Biocompatible alginate from freshly collected *Laminaria pallida* for implantation. *Appl Microbiol Biot* **53**, 224-229 (2000).
- 168 Klock, G. *et al.* Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**, 638-643 (1994).
- 169 Steinert, A. *et al.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* **21**, 1090-1097 (2003).
- 170 Zimmermann, H. *et al.* Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med* **16**, 491-501 (2005).
- 171 de Vos, P., Faas, M. M., Strand, B. & Calafiore, R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* **27**, 5603-5617 (2006).
- 172 Goosen, M. F., O'Shea, G. M., Gharapetian, H. M., Chou, S. & Sun, A. M. Optimization of microencapsulation parameters: Semipermeable microcapsules as a bioartificial pancreas. *Biotechnol Bioeng* **27**, 146-150 (1985).
- 173 Kim, K. *et al.* Elastic and viscoelastic characterization of microcapsules for drug delivery using a force-feedback MEMS microgripper. *Biomed Microdevices* **11**, 421-427 (2009).
- 174 Mandal, B. B. & Kundu, S. C. Calcium alginate beads embedded in silk fibroin as 3D dual drug releasing scaffolds. *Biomaterials* **30**, 5170-5177 (2009).
- 175 Smidsrod, O. & Skjak-Braek, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* **8**, 71-78 (1990).
- 176 Torre, M. L. *et al.* Formulation and characterization of calcium alginate beads containing ampicillin. *Pharm Dev Technol* **3**, 193-198 (1998).
- 177 Palmieri, G. F., Michelini, S., Di Martino, P. & Martelli, S. Polymers with pH-dependent solubility: possibility of use in the formulation of gastroresistant and controlled-release matrix tablets. *Drug Dev Ind Pharm* **26**, 837-845 (2000).
- 178 Sannino, A., Demitri, C. & Madaghiele, M. Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. *Materials* **2**, 353-373 (2009).
- 179 Numata, K., Reagan, M. R., Goldstein, R. H., Rosenblatt, M. & Kaplan, D. L. Spider silk-based gene carriers for tumor cell-specific delivery. *Bioconjug Chem* **22**, 1605-1610 (2011).
- 180 Kundu, J., Chung, Y. I., Kim, Y. H., Taeb, G. & Kundu, S. C. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *International Journal of Pharmaceutics* **388**, 242-250 (2010).
- 181 Gupta, V., Aseh, A., Rios, C. N., Aggarwal, B. B. & Mathur, A. B. Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy. *Int J Nanomedicine* **4**, 115-122 (2009).

- 182 Zhang, Y. Q., Wang, Y. J., Wang, H. Y., Zhu, L. & Zhou, Z. Z. Highly efficient processing of silk fibroin nanoparticle-L-asparaginase bioconjugates and their characterization as a drug delivery system. *Soft Matter* **7**, 9728-9736 (2011).
- 183 Wenk, E., Meinel, A. J., Wildy, S., Merkle, H. P. & Meinel, L. Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering. *Biomaterials* **30**, 2571-2581 (2009).
- 184 Wang, X. *et al.* Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J Control Release* **134**, 81-90 (2009).
- 185 Zhong, Q. X., Tian, H. L. & Zivanovic, S. Encapsulation of Fish Oil in Solid Zein Particles by Liquid-Liquid Dispersion. *J Food Process Pres* **33**, 255-270 (2009).
- 186 Zhong, Q. X. Zein as a carrier polymer for delivery of bioactive food compounds. *Abstr Pap Am Chem S* **238**, 245-245 (2009).
- 187 Maeda, M., Tani, S., Sano, A. & Fujioka, K. Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J Control Release* **62**, 313-324 (1999).
- 188 Burger, S. R. Design and operation of a current good manufacturing practices cell-engineering laboratory. *Cytotherapy* **2**, 111-122 (2000).
- 189 Hedhammar, M. *et al.* Sterilized recombinant spider silk fibers of low pyrogenicity. *Biomacromolecules* **11**, 953-959 (2010).
- 190 Pekkarinen, T., Hietala, O., Lindholm, T. S. & Jalovaara, P. Influence of ethylene oxide sterilization on the activity of native reindeer bone morphogenetic protein. *Int Orthop* **28**, 97-101 (2004).
- 191 Gomes, S. C., Leonor, I. B., Mano, J. F., Reis, R. L. & Kaplan, D. L. Antimicrobial functionalized genetically engineered spider silk. *Biomaterials* **32**, 4255-4266 (2011).
- 192 Cheung, D. T., Perelman, N., Tong, D. & Nimni, M. E. The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers. *J Biomed Mater Res* **24**, 581-589 (1990).
- 193 Tsukada, M., Freddi, G. & Minoura, N. Changes in the fine structure of silk fibroin fibers following gamma irradiation. *J Appl Polym Sci* **51**, 823-829 (1994).
- 194 Wiegand, C. *et al.* Effect of the sterilization method on the performance of collagen type I on chronic wound parameters in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **90**, 710-719 (2009).
- 195 Olde Damink, L. H. *et al.* Influence of ethylene oxide gas treatment on the in vitro degradation behavior of dermal sheep collagen. *J Biomed Mater Res* **29**, 149-155 (1995).
- 196 Vieira, F. F. & Del Mastro, N. L. Comparison of gamma-radiation and electron beam irradiation effects on gelatin. *Radiat Phys Chem* **63**, 331-332 (2002).
- 197 Lim, L. Y., Khor, E. & Koo, O. Gamma irradiation of chitosan. *J Biomed Mater Res* **43**, 282-290 (1998).
- 198 Johnson, C. J., Gilbert, P. U., McKenzie, D., Pedersen, J. A. & Aiken, J. M. Ultraviolet-ozone treatment reduces levels of disease-associated prion protein and prion infectivity. *BMC Res Notes* **2**, 121 (2009).
- 199 Cataldo, F. On the action of ozone on proteins. *Polymer Degradation and Stability* **82**, 105-114 (2003).
- 200 Vink, P. & Pleijsier, K. Aeration of ethylene oxide-sterilized polymers. *Biomaterials* **7**, 225-230 (1986).
- 201 Rehm, H. & Letzel, T. Der Experimentator Proteinbiochemie / Proteomics. *Spektrum Akademischer Verlag* **6. Auflage**, 8-11 (2010).
- 202 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).

- 203 Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. & Ebert, M. H. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**, 1437-1438 (1981).
- 204 Beekes, M., Lasch, P. & Naumann, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet Microbiol* **123**, 305-319 (2007).
- 205 Krimm, S. & Bandekar, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem* **38**, 181-364 (1986).
- 206 Slotta, U., Tammer, M., Kremer, F., Koelsch, P. & Scheibel, T. Structural analysis of spider silk films. *Supramol Chem* **18**, 465-471 (2006).
- 207 Hu, X., Kaplan, D. & Cebe, P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared- spectroscopy. *Macromolecules* **39**, 6161-6170 (2006).
- 208 Nelson, R. W., Mclean, M. A. & Hutchens, T. W. Quantitative-Determination of Proteins by Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* **66**, 1408-1415 (1994).
- 209 Fancy, D. A. & Kodadek, T. Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6020-6024 (1999).
- 210 Rammensee, S., Huemmerich, D., Hermanson, K. D., Scheibel, T. & Bausch, A. R. Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk. *Appl Phys a-Mater* **82**, 261-264 (2006).
- 211 Schacht, K. & Scheibel, T. Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules* **12**, 2488-2495 (2011).
- 212 Almeria, B., Fahmy, T. M. & Gomez, A. A multiplexed electrospray process for single-step synthesis of stabilized polymer particles for drug delivery. *J Control Release* **154**, 203-210 (2011).
- 213 Park, M. K., Deng, S. & Advincula, R. C. Sustained release control via photo-cross-linking of polyelectrolyte layer-by-layer hollow capsules. *Langmuir* **21**, 5272-5277 (2005).
- 214 Bao, N., Zhang, Q., Xu, J. J. & Chen, H. Y. Fabrication of poly(dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer. *J Chromatogr A* **1089**, 270-275 (2005).
- 215 Eddings, M. A., Johnson, M. A. & Gale, B. K. Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices. *J Micromech Microeng* **18**, 067001 (2008).
- 216 Spiess, K., Wohlrab, S. & Scheibel, T. Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter* **6**, 4168-4174 (2010).
- 217 Nichtl, A., Buchner, J., Jaenicke, R., Rudolph, R. & Scheibel, T. Folding and association of beta-galactosidase. *J Mol Biol* **282**, 1083-1091 (1998).
- 218 Langley, K. E., Villarejo, M. R., Fowler, A. V., Zamenhof, P. J. & Zabin, I. Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1254-1257 (1975).
- 219 Olson, K. R. & Eglén, R. M. Beta galactosidase complementation: a cell-based luminescent assay platform for drug discovery. *Assay Drug Dev Technol* **5**, 137-144 (2007).
- 220 Gasteiger, E. *et al.* ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-2788 (2003).
- 221 Kappl, M. & Butt, H. J. The colloidal probe technique and its application to adhesion force measurements. *Part Part Syst Char* **19**, 129-143 (2002).
- 222 Butt, H. J., Cappella, B. & Kappl, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports* **59**, 1-152 (2005).

- 223 Hutter, J. L. & Bechhoefer, J. Calibration of Atomic-Force Microscope Tips. *Rev Sci Instrum* **64**, 1868-1873 (1993).
- 224 Hertz, H. Über die Berührung fester elastischer Körper. *Reine Ang Math* **92**, 156-171 (1881).
- 225 Siedlecki, C. A. & Marchant, R. E. Atomic force microscopy for characterization of the biomaterial interface. *Biomaterials* **19**, 441-454 (1998).
- 226 Burnham, N. A., Dominguez, D. D., Mowery, R. L. & Colton, R. J. Probing the Surface Forces of Monolayer Films with an Atomic-Force Microscope. *Physical Review Letters* **64**, 1931-1934 (1990).
- 227 Vanderwerf, K. O., Putman, C. A. J., Degrooth, B. G. & Greve, J. Adhesion Force Imaging in Air and Liquid by Adhesion Mode Atomic-Force Microscopy. *Appl Phys Lett* **65**, 1195-1197 (1994).
- 228 Kuznetsov, V. & Papastavrou, G. Note: mechanically and chemically stable colloidal probes from silica particles for atomic force microscopy. *Rev Sci Instrum* **83**, 116103 (2012).
- 229 Pericet-Camara, R., Papastavrou, G., Behrens, S. H. & Borkovec, M. Interaction between charged surfaces on the Poisson-Boltzmann level: The constant regulation approximation. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 19467-19475 (2004).
- 230 Ducker, W. A., Xu, Z. G. & Israelachvili, J. N. Measurements of Hydrophobic and Dlvio Forces in Bubble-Surface Interactions in Aqueous-Solutions. *Langmuir* **10**, 3279-3289 (1994).
- 231 Hunter, R. J. *Zeta Potential in Colloid Science*. (Academic Press 1981).
- 232 OBrien, R. W. & White, L. R. Electrophoretic Mobility of a Spherical Colloidal Particle. *J Chem Soc Farad T 2* **74**, 1607-1626 (1978).
- 233 Blüm, C. & Scheibel, T. R. Control of Drug Loading and Release Properties of Spider Silk Sub-Microparticles *BioNanoSci* **2**, 67-74 (2012).
- 234 Müller, R. H. *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996).
- 235 Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G. & Blanquet, S. Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8247-8251 (1989).
- 236 Ohshima, H. Electrophoretic Mobility of Soft Particles. *J Colloid Interf Sci* **163**, 474-483 (1994).
- 237 Duval, J. F. & van Leeuwen, H. P. Electrokinetics of diffuse soft interfaces. 1. Limit of low Donnan potentials. *Langmuir* **20**, 10324-10336 (2004).
- 238 Papadopoulos, P., Solter, J. & Kremer, F. Structure-property relationships in major ampullate spider silk as deduced from polarized FTIR spectroscopy. *Eur Phys J E Soft Matter* **24**, 193-199 (2007).
- 239 Harasim, M. Herstellung und Charakterisierung von Mikrokapseln aus rekombinanter Spinnenseide. *Technische Universität München* (2007).
- 240 Lewis, R. V. Spider silk: Ancient ideas for new biomaterials. *Chemical Reviews* **106**, 3762-3774 (2006).
- 241 Vollrath, F., Barth, P., Basedow, A., Engstrom, W. & List, H. Local tolerance to spider silks and protein polymers in vivo. *In Vivo* **16**, 229-234 (2002).
- 242 Arshady, R. Review : Biodegradable microcapsular drug delivery systems: Manufacturing methodology, release control and targeting prospects. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **5**, 315-342 (1990).
- 243 Bunte, C., Prucker, O., Konig, T. & Ruhe, J. Enzyme containing redox polymer networks for biosensors or biofuel cells: a photochemical approach. *Langmuir* **26**, 6019-6027 (2010).

- 244 Dorman, G. & Prestwich, G. D. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry-Us* **33**, 5661-5673 (1994).
- 245 Choi, D. *et al.* Fabrication of macroporous hydrogel membranes using photolithography for enzyme immobilization. *J Chem Technol Biot* **83**, 252-259 (2008).
- 246 Beppu, M. M., Vieira, R. S., Aimoli, C. G. & Santana, C. C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science* **301**, 126-130 (2007).
- 247 Syedain, Z. H., Bjork, J., Sando, L. & Tranquillo, R. T. Controlled compaction with ruthenium-catalyzed photochemical cross-linking of fibrin-based engineered connective tissue. *Biomaterials* **30**, 6695-6701 (2009).
- 248 Draget, K. I., SkjakBraek, G. & Smidsrod, O. Alginate based new materials. *Int. J. Biol. Macromol.* **21**, 47-55 (1997).
- 249 Mcknight, C. A., Ku, A., Goosen, M. F. A., D. Sun, D. & Penney, C. Synthesis of Chitosan-Alginate Microcapsule Membranes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **3**, 334-355 (1988).
- 250 Polk, A., Amsden, B., Deyao, K., Peng, T. & Goosen, M. F. A. Controlled-Release of Albumin from Chitosan-Alginate Microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **83**, 178-185 (1994).
- 251 Illum, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* **15**, 1326-1331 (1998).
- 252 Rossler, B., Kreuter, J. & Scherer, D. Collagen microparticles: preparation and properties. *J Microencapsul* **12**, 49-57 (1995).
- 253 Tomar, L. *et al.* In vivo evaluation of a conjugated poly(lactide-ethylene glycol) nanoparticle depot formulation for prolonged insulin delivery in the diabetic rabbit model. *Int J Nanomedicine* **8**, 505-520 (2013).
- 254 Akbarzadeh, A. *et al.* Preparation and in vitro evaluation of doxorubicin-loaded Fe(3)O(4) magnetic nanoparticles modified with biocompatible copolymers. *Int J Nanomedicine* **7**, 511-526 (2012).
- 255 Ren, J., Yu, X., Ren, T. & Hong, H. Preparation and characterization of fenofibrate-loaded PLA-PEG microspheres. *J Mater Sci Mater Med* **18**, 1481-1487 (2007).
- 256 Tao, J., Wang, T., Dong, X. & Xiaoqian, S. Mechanical properties and crystallization behaviors of nanostructured-Zno/PET in-situ composites. *J Nanosci Nanotechnol* **6**, 3939-3942 (2006).
- 257 Mchedlov-Petrosyan, N. O., Vodolazkaya, N. A. & Doroshenko, A. O. Ionic equilibria of fluorophores in organized solutions: The influence of micellar microenvironment on protolytic and photophysical properties of rhodamine B. *J Fluoresc* **13**, 235-248 (2003).
- 258 Benoit, D. S. W., Gray, W., Murthy, N. S., Li, H. & Duvall, C. L. pH-Responsive Polymers for the Intracellular Delivery of Biomolecular Drugs. *Comprehensive Biomaterials*, 357-375 (2011).
- 259 Darbord, J. C. & Laizier, J. A Theoretical Basis for Choosing the Dose in Radiation Sterilization of Medical Supplies. *International Journal of Pharmaceutics* **37**, 1-10 (1987).
- 260 Mehnert, W. & Mader, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* **47**, 165-196 (2001).
- 261 Tan, E. Y., Law, J. W., Wang, C. H. & Lee, A. Y. Development of a cell transducible RhoA inhibitor TAT-C3 transferase and its encapsulation in biocompatible microspheres to promote survival and enhance regeneration of severed neurons. *Pharm Res* **24**, 2297-2308 (2007).
- 262 Sato, K., Yoshida, K., Takahashi, S. & Anzai, J. pH- and sugar-sensitive layer-by-layer films and microcapsules for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **63**, 809-821 (2011).
- 263 Spiess, K. *et al.* Impact of initial solvent on thermal stability and mechanical properties of recombinant spider silk films. *J Mater Chem* **21**, 13594-13604 (2011).



- 264 Rajkhowa, R. *et al.* Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions. *J Biomed Mater Res A* **97A**, 37-45 (2011).
- 265 Zhang, J. *et al.* Stabilization of vaccines and antibiotics in silk and eliminating the cold chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11981-11986 (2012).
- 266 Pritchard, E. M., Dennis, P. B., Omenetto, F., Naik, R. R. & Kaplan, D. L. Review physical and chemical aspects of stabilization of compounds in silk. *Biopolymers* **97**, 479-498 (2012).
- 267 Kuriakose, S. & Dimitrakopoulos, P. Deformation of an elastic capsule in a rectangular microfluidic channel. *Soft Matter* **9**, 4284-4296 (2013).
- 268 Zolnik, B. S. & Burgess, D. J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J Control Release* **122**, 338-344 (2007).
- 269 Herrmann, J. & Bodmeier, R. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *Eur J Pharm Biopharm* **45**, 75-82 (1998).
- 270 Elzoghby, A. O., Samy, W. M. & Elgindy, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J Control Release* **161**, 38-49 (2012).
- 271 Henzler, H. J. & Kaiser, K. Avoiding viral contamination in biotechnological and pharmaceutical processes. *Nat Biotechnol* **16**, 1077-1079 (1998).
- 272 Cai, K. *et al.* Prion removal capacity of plasma protein manufacturing processes: A data collection from PPTA member companies. *Transfusion* (2012).
- 273 Trejo, S. R. *et al.* Evaluation of virus and prion reduction in a new intravenous immunoglobulin manufacturing process. *Vox Sang* **84**, 176-187 (2003).
- 274 Wohlrab, S. *et al.* Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* **33**, 6650-6659 (2012).
- 275 Leal-Egana, A. & Scheibel, T. Interactions of cells with silk surfaces. *J Mater Chem* **22**, 14330-14336 (2012).
- 276 Leal-Egana, A. *et al.* Interactions of Fibroblasts with Different Morphologies Made of an Engineered Spider Silk Protein. *Adv Eng Mater* **14**, B67-B75 (2012).



## 8 Abkürzungen

<i>A. diadematus</i>	<i>Araneus diadematus</i> (Gratenkreuzspinne)
a. u.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
ABCR	3-Aminopropyl-diisopropylethoxysilan
ADF 3/4	<i>Araneus diadematus</i> Fibroin 3/4
AFM	<i>Atomic Force Microscope</i> (Rasterkraftmikroskop)
APS	Ammoniumpersulfat
ATR	<i>attenuated total reflexion</i> (abgeschwächte Totalreflexion)
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i> (Seidenspinner)
BIMF	Bayreuther Institut für Makromolekülforschung
c	Konzentration
C-Modul	von der repetitive Kernsequenz von ADF4 abgeleitetes Modul
CL	<i>crosslinked</i> (quervernetzt)
CLSM	Konfokales <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop
Co-60	Isotop von Cobalt
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>dots per inch</i>
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> (Dynamische Differenzkalorimetrie)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Modul	Elastizitätsmodul
eADF3/4	engineered <i>Araneus diadematus</i> Fibroin 3/4
eADF4(C8)	von ADF4 abgeleitetes Protein mit 8 Wiederholungen des C-Moduls
eADF4(C16)	von ADF4 abgeleitetes Protein mit 16 Wiederholungen des C-Moduls
eADF4(C32)	von ADF4 abgeleitetes Protein mit 32 Wiederholungen des C-Moduls
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
endo	endotherm
EO	Ethylenoxid
Ex	Extinktion
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Behörde zur Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassung, USA)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanate
Fix I/II	Fixierlösung I/II
FTIR-Spektroskopie	Fourier transformierte Infrarot Spektroskopie
g	Erdbeschleunigung
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid

GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i> (Gute Herstellungspraxis)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>MQ</sub>	Reinstwasser
HEPES-Na	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure, Natriumsalz
HFIP	1,1,1,3,3,3 Hexafluor-2-Propanol
HIV	Humaner Immunodefizienz-Virus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
kGy	Kilo-Gray, Maß für die absorbierte Strahlenenergie (1 kGy $\triangleq$ 1000 J/kg)
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption and ionization</i>
MaSp 1/2	<i>Major ampullate Spidroin 1/2</i>
min	Minuten
MiSp 1	<i>Minor ampullate Spidroin 1</i>
m/z	Masse- zu Ladungsverhältnis
n. d.	<i>not determined</i> (nicht bestimmt)
<i>N. clavipes</i>	<i>Nephila clavipes</i> (Goldene Radnetzspinne)
<i>N. edulis</i>	<i>Nephila edulis</i>
NHS	N-hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NR	nicht-repetitiv
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
p. a.	<i>pro analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PEG	Poly(ethylenglycol)
PEI	Polyethylenimin
PET	Polyethylenterephthalat
PGA	Polyglycolsäure
PGS	Polyglutaminsäure
PHEA	Polyhydroxyethyl-L-asparagin
PHEG	Polyhydroxyethyl-L-glutamin
pI	Isoelektrischer Punkt
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PLA	Poly lactide
PLG	Poly lactid-co-Glykolid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	relativer Radius
REM	Raster-Elektronenmikroskop
RES	Retikuloendotheliales System
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
Rubpy	(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II)

SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SOP	<i>Standard Operating Procedures</i>
T	Temperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGA	Thermogravimetrische Analyse
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TOF	<i>Time of flight</i>
TPP	Tripolyphosphat
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Tween 80	Polyoxyethylen-80-sorbitanmonooleat, Polysorbat 80
U	Units (Einheit für Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vis	visuell
w/v	Gewicht pro Volumen
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
Γ <sub>mob</sub>	Oberflächenladungsverteilung
%	Prozent
v	Poissonzahl



## 9 Publikationen

Blüm, C. and Scheibel, T. (2012) Control of Drug Loading and Release Properties of Spider Silk Sub-Microparticles. *BioNanoSci* 2:67-74

Blüm, C., Nichtl, A., and Scheibel, T. (2013) Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes. *Adv Funct Mater*, DOI: 10.1002/adfm.201302100

Helfricht, N., Klug, M., Mark, A., Kuznetsov, V., Blüm, C., Scheibel, T., and Papastavrou, G. (2013) Surface Properties of Spider Silk Particles: Combining Direct Force Measurements and Electrophoretic Mobility. *Biomater Sci* 1, 1166-1171

Neubauer, M.P.\*, Blüm, C.\*, Agostini, E., Engert, J., Scheibel, T., and Fery, A. (2013) Micromechanical Characterization of Recombinant Spider Silk Particles. *Biomater Sci* 1, 1160-1165

\* gleichberechtigte Co-Autorenschaft

### Andere:

Lammel, A., Spieß, K., Blüm, C., Schwab, M., Winter, G. and Scheibel, T. (2009) Spinnenseiden-proteine – Biopolymerische Materialien für medizintechnische Anwendungen. In *Verbundwerkstoffe*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 683-688.





## 10 Anhang

### LATEX-Quellcode für die in Abb. 5.28 gezeigte Struktur

```

\documentclass[a4paper]{article}

\usepackage[a4paper, left=0.5cm]{geometry}
\usepackage{tikz}
\usepgflibrary{shapes.geometric}

\tikzset{trapezium stretches=true}
\tikzset{every picture/.style={fill=black}}
\tikzset{every node/.style={isosceles triangle, inner sep=0pt, anchor=east, shape
border rotate=180}}

\begin{document}
\begin{tikzpicture}[scale=0.1, line width=0.25mm,shape border rotate=60]

\filldraw (8,12) circle (1.25);
\filldraw (11,8) circle (1.25);
\filldraw (45,12) circle (1.25);

\draw (7,12) -- (12,12);
\draw[line width=0.15mm] (11,8) -- (11,12);
\node[fill=black, minimum height=0.4mm,minimum width=0.4mm] at (12.15,12) {};
\draw[line width=0.4mm] (12.025,12) -- (13,12);

\draw[line width=0.4mm] (13,12) arc (90:0:1);
\foreach \i in {0,1,...,5}
\draw[line width=0.4mm] (\i*4+14,11) arc (-180:0:1) arc(180:0:1) ;
\draw[line width=0.4mm] (38,11) arc (-180:0:1) arc (180:90:1);
\draw[line width=0.4mm] (41,12) -- (45,12);

\end{tikzpicture}
\end{document}

```



## Danksagung

Diese Arbeit wurde zwischen Juni 2008 und Mai 2013 am Lehrstuhl Biomaterialien der Universität Bayreuth unter der Anleitung von Prof. Dr. Thomas Scheibel erstellt. Ihm möchte ich besonders für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung und das Vertrauen in den letzten Jahren danken.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Andreas Fery und Prof. Dr. Olaf Stemmann für die Übernahme meines Mentorats.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei meinen Kooperationspartnern für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken:

- Nicolas Helfricht und Prof. Dr. Georg Papastavrou für die Oberflächencharakterisierung der Partikel
- Martin Neubauer und Prof. Dr. Andreas Fery für die mikromechanische Charakterisierung der Partikel
- Martin Trebbin und Prof. Dr. Stephan Förster für die Versuche zur Herstellung eines Spinnenseidenfadens im Mikrofluidik-Maßstab
- Elisa Agostini und Dr. Julia Engert für die IGASorp Messungen
- Ute Kuhn für die Durchführung der DSC und TGA Messungen
- Annette Hacker für die Hilfe bei der Erstellung der Platinen
- Prof. Dr.-Ing Uwe Glatzel und dem Lehrstuhl Metallische Werkstoffe für die Unterweisung am REM und die Hilfestellungen während meiner Messzeiten
- Dr. Peter Ruth von der Firma Lohmann & Rauscher GmbH & Co.KG für die Durchführung der Sterilisationsversuche
- Dr. Alfons Nichtl für die Synthese der  $\alpha$ -Komplementationsfaktoren und –peptide

Jasmin, Dani, Anderl, Johannes und Claudia danke ich für die vielen kleinen und großen Labortätigkeiten, die im Alltag oft angefallen sind und die großartige Unterstützung. Susanne Schramm danke ich ebenfalls für ihre großartige Unterstützung bei allen administrativen Problemen und ihr allzeit offenes Ohr.

Mein besonderer Dank gilt all meinen Kollegen, die mich während meiner Zeit in Bayreuth begleitet und unterstützt haben. Vielen Dank für die schöne Zeit, die vielen Diskussionen, Tipps und Messungen, bei denen ihr mich unterstützt habt. Ich bedanke mich besonders bei den *alt-Fibers*, die mich herzlich in Bayreuth aufgenommen und mich kollegial und freundschaftlich unterstützt haben. Die Zeit mich Euch in Bayreuth war super! Vielen Dank an Martin, Steffi, Martina, Felix und Markus für die vielen Diskussionen, das geduldige Korrekturlesen und die vielen hilfreichen Tipps zu meiner Doktorarbeit. Vielen Dank an meine Bürokollegen Steffi, Martina, John, Markus, Felix, David und Susanne für die tolle und konstruktive Zeit, die gute Stimmung und eure Geduld, wenn die Gummibärchen mal wieder aus waren. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Reit-Mädels, Jasmin, Dani, Elena und Steffi für die schönen Stunden in und um Hummeltal.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich immer ermutigt und unterstützt hat. Vielen Dank! Ohne euch wäre das nicht möglich gewesen.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth noch an einer anderen Universität mit oder ohne Erfolg versucht habe, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder eine Promotionsprüfung abzulegen.

Abschließend erkläre ich, dass ich zu keiner Zeit die Hilfe eines gewerblichen Promotionsberaters bzw. Promotionsvermittlers in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht in Anspruch nehmen werde.

Bayreuth, 04.06.2013

---

Claudia Blüm