

Modifizierungen des Enzyms Silicatein  $\alpha$   
zur direkten Immobilisierung auf  
verschiedenen Oberflächen – neuartige  
Herstellung von Kompositmaterialien  
unter physiologischen Bedingungen

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
"Doktor der Naturwissenschaften"  
am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

vorgelegt von  
Thorben Link  
geb. in Seeheim

Mainz, 2012

Dekan:

Erster Berichtstatter:

Zweiter Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2012

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Biominalisation</i> .....	1
1.2 <i>Silizium</i> .....	4
1.3 <i>Silikat in biologischen Systemen</i> .....	5
1.4 <i>Porifera</i> .....	7
1.5 <i>Biominalisation in Schwämmen</i> .....	9
1.5.1 <i>Spiculogenese</i> .....	9
1.5.2 <i>Silicatein und Silintaphin-1</i> .....	11
1.5.3 <i>Biomedizinische Anwendungen des Silicatein</i> .....	14
1.5.4 <i>Biotechnologische Anwendungen des Silicatein</i> .....	15
1.6 <i>Modifizierung von Proteinen</i> .....	17
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Material .....</b>	<b>20</b>
3.1 <i>Geräte</i> .....	20
3.2 <i>Chemikalien</i> .....	21
3.3 <i>Puffer</i> .....	22
3.4 <i>Nährmedien</i> .....	23
3.5 <i>Verbrauchsmaterial</i> .....	24
3.6 <i>Kits</i> .....	24
3.7 <i>Enzyme mit jeweiligem Puffer</i> .....	25
3.8 <i>Molekulargewichtsmarker</i> .....	25
3.9 <i>Bakterienstämme</i> .....	26
3.10 <i>cDNA-Banken</i> .....	26
3.11 <i>Primer</i> .....	26
3.11.1 <i>Sequenzspezifische Primer</i> MWG, Ebersberg .....	26
3.11.2 <i>Vektorspezifische Primer</i> MWG, Ebersberg.....	27
3.11.3 <i>Gelabelte Primer (Sequenzierprimer)</i> .....	27
3.12 <i>Vektoren</i> .....	27
3.13 <i>Computerprogramme</i> .....	28
3.14 <i>Versuchstiere</i> .....	28
<b>4. Methoden.....</b>	<b>29</b>
4.1 <i>Primerdesign</i> .....	29
4.1.1 <i>Genspezifische Primer</i> .....	29
4.1.2 <i>Primer für Restriktionsverdau</i> .....	30
4.1.3 <i>Primer für Expressionen</i> .....	30
4.2 <i>Polymerase-Kettenreaktion</i> .....	31
4.2.1 <i>Standard PCR</i> .....	32

4.2.2 Checking PCR.....	33
4.3 Agarosegelelektrophorese.....	34
4.3.1 Vorbereitung des Agarosegels .....	34
4.3.2 Färbung des Gels.....	35
4.4 DNA-Isolierung.....	36
4.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden.....	36
4.4.2 Aufreinigung von PCR-Produkten .....	36
4.4.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA .....	36
4.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	37
4.6 Klonierung .....	38
4.6.1 Grundlagen.....	38
4.6.2 Ligation .....	39
4.6.3 Transformation.....	40
4.6.4 Selektion der transformierten Bakterien.....	40
4.6.5 Herstellung der Agar-Platten für die Selektion .....	42
4.6.6 Herstellung von Flüssigkulturen .....	42
4.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	42
4.8 Sequenzierung.....	43
4.8.1 Sequenzierreaktion.....	44
4.8.2 Herstellung des Sequenziergels.....	45
4.8.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	45
4.8.4 Sequenzanalyse .....	46
4.9 Expression von Fusionsproteinen in Prokaryoten .....	46
4.9.1 Expression mit dem pTrc-His2 TOPO TA Vektor.....	47
4.9.2 Expression im pBAD/gIII A Vektor .....	47
4.9.3 Expression eines Fusionsproteins.....	48
4.9.4 Kryokonservierung.....	48
4.9.5 Aufreinigung eines Fusionsproteins.....	48
4.9.5.1 Extraktion unter nativen Bedingungen.....	49
4.9.5.2 Extraktion unter denaturierten Bedingungen.....	50
4.9.6 Quantifizierung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	50
4.9.7 Renaturierung des denaturiert aufgereinigten Proteins .....	51
4.10 Herstellung polyklonaler Antikörper .....	51
4.10.1 Immunisierung und Serumzubereitung .....	52
4.10.2 Bestimmung des Antikörpertiters.....	52
4.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	53
4.11.1 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant-Blue .....	54
4.11.2 Western Blotting .....	55
4.12 Immobilisierung von Silicatein $\alpha$ auf verschiedenen Oberflächen.....	57
4.12.1 Immobilisierung von Glu-tag-Silicatein $\alpha$ auf Hydroxyapatit-Plättchen.....	57
4.12.2 Immobilisierung von Glu-tag-Silicatein $\alpha$ auf Kalknadeln .....	58
4.12.3 Immobilisierung von Glu-tag-Silicatein $\alpha$ auf TiO <sub>2</sub> -Nanodrähte .....	58
4.12.3 Immobilisierung von Cys-tag-Silicatein $\alpha$ auf Goldoberflächen.....	59
4.13 Screening nach Interaktionspartnern.....	60
4.14 Biosynthese von Titandioxid und Biosilikat durch das immobilisierte Glu-tag-Silicatein.....	61

4.14.1	Titandioxidsynthese durch auf Hydroxyapatit-Plättchen immobilisiertes Silicatein $\alpha$ .....	61
4.14.2	Titandioxidsynthese durch auf Kalknadeln immobilisiertes Silicatein $\alpha$ .....	62
4.14.3	Biosilikatsynthese durch auf TiO <sub>2</sub> -Nanodrähten immobilisiertem Glu-tag-Silicatein $\alpha$ .....	62
4.14.4	Titandioxidsynthese durch auf Gold immobilisiertes Cys-tag-Silicatein $\alpha$ .....	63
4.15	Immunofluoreszenzmikroskopie .....	63
4.16	Rasterelektronenmikroskopie (REM / SEM) .....	63
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
5.1	Glu-tag Modifizierung des Silicatein $\alpha$ .....	65
5.2	Immobilisierung des Glu-tag-Silicatein auf verschiedenen Oberflächen.....	68
5.2.1	Immobilisierung auf Hydroxyapatit-Plättchen .....	68
5.2.2	Immobilisierung auf Kalkspiculae des Schwammes <i>Paraleucilla magna</i> .....	71
5.2.3	Immobilisierung auf TiO <sub>2</sub> -Nanodrähte.....	73
5.3	Biosynthese von Titandioxid und Biosilikat durch das immobilisierte Glu-tag-Silicatein .....	74
5.3.1	Synthese von Titandioxid durch das auf Hydroxyapatit-Plättchen immobilisierte Glu-tag-Silicatein.....	74
5.3.2	Synthese von Titandioxid durch das auf Hydroxyapatit-Nanopartikeln immobilisierte Glu-tag-Silicatein .....	77
5.3.3	Synthese von Titandioxid durch das auf Kalknadeln immobilisierte Glu-tag-Silicatein.....	79
5.3.4	Synthese von Biosilikat durch das auf TiO <sub>2</sub> -Nanodrähten immobilisierte Glu-tag-Silicatein .....	82
5.4	Expression des Interaktionspartners Silintaphin-1 .....	82
5.5	Screening nach Interaktionspartnern des Silicatein $\alpha$ durch einen modifizierten Pulldown-Assay.....	84
5.5.1	Detektion von rekombinantem Silintaphin-1 .....	84
5.5.2	Detektion von nativem Silintaphin-1 .....	86
5.5.3	Detektion von Silicatein $\beta$ .....	88
5.5.4	Detektion des Silicatein $\alpha$ .....	89
5.5.5	Detektion von unbekanntem Proteinen .....	90
5.6	Cys-tag Modifizierung des Silicatein $\alpha$ .....	92
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>99</b>
6.1	Modifizierung des Silicatein $\alpha$ mit einem Glu-tag.....	101
6.2	Oberflächenmodifikation durch Glu-tag-Silicatein.....	106
6.2.1	Synthese einer TiO <sub>2</sub> -Beschichtung durch Glu-tag-Silicatein .....	106
6.2.2	Synthese einer Biosilikat-Beschichtung durch immobilisiertes Glu-tag-Silicatein.....	108
6.3	Screening nach Interaktionspartnern.....	110
6.4	Modifizierung des Silicatein $\alpha$ mit einem Cys-tag.....	114
6.5	Schlussfolgerung .....	117
6.6	Ausblick.....	118
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>119</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>9.</b>	<b>Verzeichnisse.....</b>	<b>138</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	138
9.2	Tabellenverzeichnis.....	141
9.3	Abkürzungsverzeichnis.....	142

<b>Danksagung .....</b>	<b>147</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>148</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>149</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>150</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Biomineralisation

Der Prozess der Biomineralisation beschreibt die Bildung von anorganischen (mineralischen) Materialien in organischen Systemen. Die wichtigsten Biomineralien bestehen aus Calciumcarbonat, Calciumphosphat, Calciumoxalat, Eisenoxid und Silikat.

Mineralien	Formel	Funktion / Struktur
Calciumcarbonat	$\text{CaCO}_3$	Otolithen (Pisces) Spiculae (Porifera)
Calciumphosphat Hydroxyapatit	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \text{OH}$	Endoskelett (Vertebrata) Calciumspeicher
Calciumoxalat	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Calciumspeicher (Flora)
Eisenoxid	$\text{Fe}_3\text{O}_4$ $\alpha \text{FeO}(\text{OH})$	Magnetorezeption (Ornithida) Zähne (Mollusca)
Silikate	$m\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Exoskelett (Algen) Spiculae (Porifera)

**Tabelle 1.1:** Übersicht über einige Biomineralien und deren Funktion

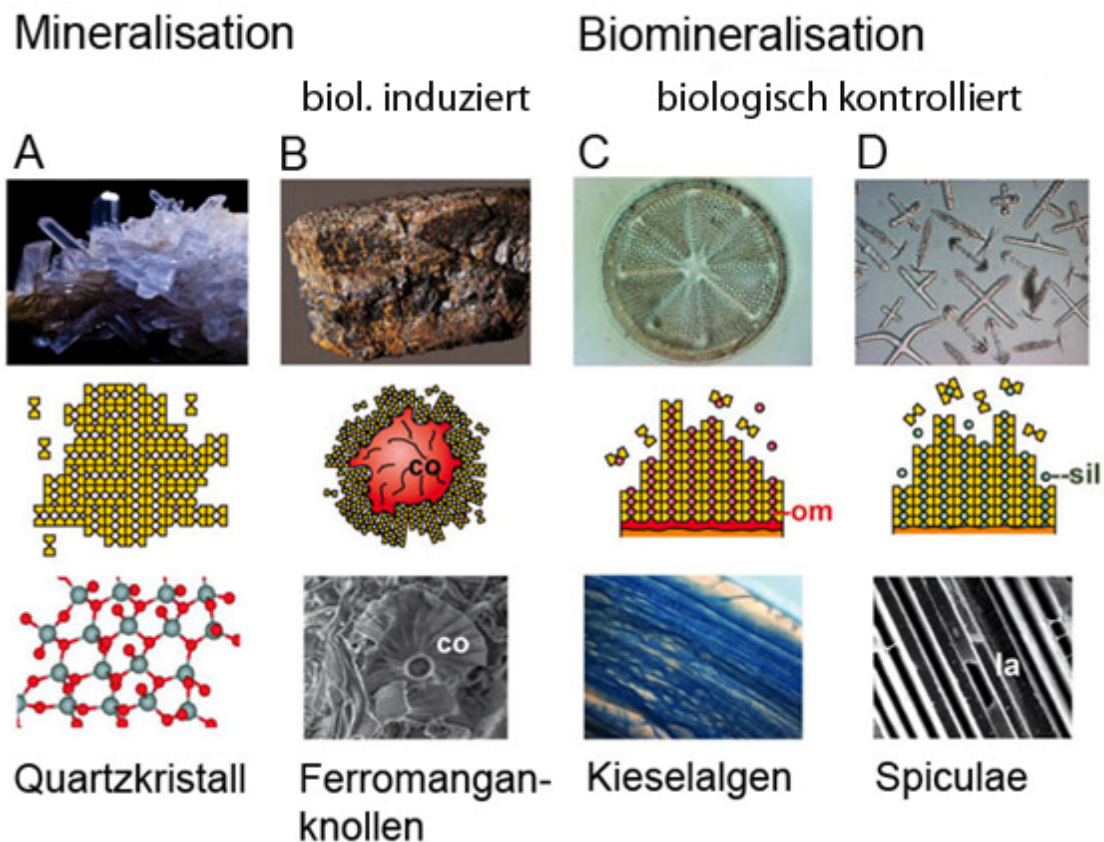
Eine Vielzahl von Organismen, beginnend mit Bakterien und einfachen Einzellern, über die ersten Metazoen (Porifera) bis zu den Säugetieren bedient sich der Biomineralisation zur Synthese von Strukturen mit verschiedenen Funktionen. Dazu gehören neben dem Schneiden und Mahlen von Nahrung, auch die Fortbewegung, die optische, die magnetische und die Schwerkraftorientierung, die Regulation des Auftriebs sowie der Schutz vor Fressfeinden (Mann, 2001).

Die Biomineralisation beruht auf der selektiven Extraktion und Aufnahme von bestimmten Elementen aus der Umgebung und deren Inkorporation in funktionelle Strukturen unter strikter biologischer Kontrolle. Jedoch gibt es Unterschiede in den Mechanismen und den verwendeten Elementen (Mann, 2001).

Um die Bildung der hochkomplexen Kompositstrukturen zu erreichen, muss der jeweilige Organismus an verschiedenen Stellen dieses Prozesses in hohem Maße regulieren. Ansonsten kann es zu pathologischen bzw. unkontrollierten Kristallbildungen oder Polykondensationen kommen,



Die Biomineralisation, also die Entstehung von Biomineralien lässt sich nach Weiner und Dove in zwei Prozesse gliedern (s. Abb. 1.1): 1. die biologisch induzierte und 2. die biologisch kontrollierte Mineralisation (Weiner and Dove, 2003).



**Abbildung 1.1: Mineralisation vs. Biomineralisation:** (A) Mineralisation von Quarzkristallen. (B) Biologisch induzierte Mineralisation: Ferromanganknollen aus der Tiefsee. Cocosphären (co) dienen hierbei als Template zur Ablagerung von Mineralien. (C) Biologisch kontrollierte Mineralisation: Bildung der Frustel bei Diatomeen. Eine organische Matrix (organic guiding macro molecule (om)) kontrolliert den Beginn und das Wachstum der Biominerale. (D) Spezielle Form der biologisch kontrollierten Mineralisation, die Spiculogenese bei Schwämmen wird durch das Enzym Silicatein (sil) kontrolliert (Verändert nach Müller et al., 2009a).

Bei der anorganischen Mineralisation wird ein Monomer (z.B.: Metalle oder deren Salze) meist durch eine endotherme Reaktion in einen Festkörper überführt. Die entstehenden Mineralien sind durch eine festgelegte chemische Anordnung bzw. räumliche Struktur gekennzeichnet und können entweder eine kristalline oder amorphe Form haben. Als Beispiel sei hier Quarz ( $\text{SiO}_2$ ) genannt, welches in wässriger Lösung unter hoher Temperatur und hohem Druck entsteht. Für das Kristallwachstum wird gelöstes Orthosilikat benötigt, welches sich schichtweise auf der Oberfläche des Kristalles anlagert (s. Abb. 1.1A).

Im Vergleich dazu resultiert die biologisch induzierte Mineralisation aus einer Interaktion zwischen einer biologischen Struktur und der Umgebung in der sie stattfindet (Weiner and Dove, 2003). Polymere oder Proteine an der Oberfläche von

Zellen oder ausgeschiedene Sekundärmetabolite eines Organismus können den Prozess der Keimbildung bzw. das Kristallwachstum induzieren. Dabei hat der Organismus oder die Zelle keine Kontrolle über Beschaffenheit und Art des Minerals (Weiner and Dove, 2003). Die Mineralien werden hierbei oft entlang der Zelloberfläche gebildet und verbleiben dort (Mann, 2001). Die Zelle oder der Organismus kann in manchen Fällen komplett von einer Kruste überzogen werden. Bei Coccolithen und „marine snow“ (Meeres-Schnee) konnte eine solche Mineralisierungsaktivität nachgewiesen werden, wobei erstere als Keim bei der Bildung von Ferromanganknollen in der Tiefsee fungieren (Müller et al., 2009a; Wang et al., 2009b) (s. Abb. 1.1 B).

Bei der biologisch kontrollierten Mineralisation hingegen handelt es sich um einen hoch regulierten Prozess, bei dem Biomineralien wie Schalen, Knochen und Zähne entstehen, die eine spezifische Morphologie aufweisen, um ihre biologischen Funktionen zu erfüllen (Mann, 2001) (s. Abb. 1.1 C und D). Der Aufbau dieser Mineralien ist äußerst komplex. Sie besitzen eine einheitliche Partikelgröße mit einer definierten Struktur bzw. Zusammensetzung und einem hohen Maß an räumlicher Organisation (Mann, 2001). Diese Form der Mineralisation kann hierbei innerhalb des biologischen Systems ablaufen (Knochen- und Zahnbildung) oder außerhalb des Organismus, wie die  $\text{CaCO}_3$ -Schalen der meisten *Foraminifera* (Lowenstamm 1989). Eine spezielle Form der biologisch kontrollierten Mineralisation stellt der Prozess der Biosilifikation bei Schwämmen dar (Müller et al., 2008; Simpson and Volcani, 1981). In marinen Schwämmen (*Demospongiae* und *Hexactinellidae*) katalysiert das Enzym Silicatein (silica protein) die Bildung von Biosilikat (Cha et al., 1999; Müller et al., 2005) und dient dabei auch gleichzeitig als organisches Gerüst für die Ablagerung von anorganischen Polysilikaten. Seit der Entdeckung des Enzyms wurden viele Strategien entwickelt, um mit den erhaltenen Informationen über die Skelettbildung bei Schwämmen, neue Biomaterialien mit hervorragenden (bio)chemischen und (bio)physikalischen Eigenschaften herzustellen (Mayer, 2005).

## 1.2 Silizium

Silizium ist mit 27,7% eines der häufigsten Elemente der Erdkruste. Aufgrund der hohen Affinität zu Sauerstoff kommt Silizium nicht elementar vor, sondern nur in gebundener Form, als Salze vom Anhydrid  $\text{SiO}_2$  abgeleiteter Kieselsäuren der Formel  $m\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ .

In Silikaten ist das Siliziumatom meist tetraedrisch von vier Sauerstoffatomen umgeben, dabei herrschen zwischen den Silizium- und Sauerstoffatomen starke kovalente Bindungskräfte. In der Natur kommt Silizium im Wesentlichen in Form silikatischer Minerale oder als reines Siliziumdioxid vor. In Schwämmen und den einzelligen Diatomeen (Kieselalgen), welche zu den wichtigsten silikatverstoffwechselnden Organismen gehören, liegt das polymerisierte Silikat hydratisiert als nichtkristalliner Opal vor.

Die einfachste wasserlösliche Form von Siliziumverbindungen ist die monomere Orthokieselsäure ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) mit einem pKa von 9,8 (Iler, 1979). Diese Verbindung kommt nicht nur in allen Gewässern vor, sondern auch in den Körperflüssigkeiten von Pflanzen und Tieren. Meerwasser enthält zwischen 3  $\mu\text{M}$  gelöstem Silikat an der Oberfläche und bis zu 180  $\mu\text{M}$  in der Tiefsee (Treguer et al., 1995). In menschlichem Blut liegt die Konzentration von Silikat bei ca. 140  $\mu\text{M}$  (Müller et al., 2003). Monomere Orthokieselsäure ist bei 25°C und einer Konzentration unter 100 ppm stabil. Eine Erhöhung auf 100-200 ppm führt zur Autopolykondensation und somit zur Bildung von Dimeren bzw. im späteren Verlauf zu Oligomeren (Perry and Keeling-Tucker, 2000). Die Polykondensation von Silikat ist stark vom pH-Wert der Lösung abhängig. Bei einem niedrigen pH von ca. 2 findet dieser Prozess nur sehr langsam statt, erhöht sich der pH-Wert, dann läuft auch die Polykondensation schneller ab. Nicht nur die Geschwindigkeit, sondern auch die Form des Produktes ist von der Änderung des pH-Wertes abhängig. Unter sauren Bedingungen besteht nur eine geringe elektrostatische Abstoßung zwischen den Silikatpartikeln, was zu einer fibrillären Aggregation führt. Im basischen Bereich limitieren elektrostatische Kräfte diesen Prozess und es kommt durch die sogenannte Ostwald-Reifung zu wenigen, aber größeren Partikeln (Coradin and Lopez, 2003).

### 1.3 Silikat in biologischen Systemen

Der Prozess der Biosilifikation, die Bildung von amorphem, hydratisiertem Silikat ist in verschiedenen Organismen wie Protozoen, Pflanzen und Tieren zu finden (s. Tab. 1.3).

Organismus	Silikatstruktur
Protozoen	Verkieseltes Mikroskelett
Kieselalgen	Zellwände
Pflanzen	Silikateinschlüsse
Schwämme	Mega- und Mikroskleren

**Tabelle 1.3:** Auswahl von Organismen, die für die Silikatbiomineralisation von Bedeutung sind.

Auch in Vertebraten scheint das Silizium eine wichtige Rolle bei der Knochenbildung zu spielen. Es wird angenommen, dass es dort an der Vernetzung von Kollagen mit Proteoglykanen beteiligt ist (Hott et al., 1993). Der genaue Mechanismus ist aber noch nicht vollständig geklärt.

Der menschliche Körper enthält zwischen 1 und 2 g Silizium. Die Aufnahme des dritthäufigsten Spurenelements, nach Zink und Eisen, erfolgt über Trinkwasser oder durch den Verzehr von pflanzlichen Nahrungsmitteln. Gerade Gemüse wie zum Beispiel Spinat, Bohnen, Wurzelgemüse oder Kräuter, aber auch Silizium akkumulierende Pflanzen, wie Gräser (Reis) und Getreide besitzen eine hohe Siliziumkonzentration. Allerdings ist der Resorptionsmechanismus bzw. Metabolismus von Silizium im menschlichen Körper noch nicht hinreichend bekannt. In Tierversuchen mit vier Wochen alten Küken verursachte siliziumarme Kost Malformationen des Skeletts, wohingegen siliziumreiches Futter zu normalem Wachstum führte (Carlisle, 1972). Die Verteilung von Silizium im Körper wurde bis jetzt nur an Ratten untersucht. Dabei konnten die höchsten Werte in Knochen und Bindegewebe sowie in Haut, Nägeln, Haaren, Sehnen, Trachea und Aorta gefunden werden (Jugdaohsingh, 2007). Weitere Studien zeigten eine positive Korrelation zwischen Knochendichte und Siliziumaufnahme (Jugdaohsingh et al., 2004; Wiens et al., 2010c). Nicht nur Silizium hat einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung sondern auch Biosilikat, welches durch das Enzym Silicatein katalysiert wird. Zum einen induziert Biosilikat die Bildung von Hydroxyapatit in Osteoblasten-ähnlichen SaOS-2 Zellen (Müller et al., 2007a) und zum anderen steigert es die Expression von

Osteoprotegerin (OPG) in Osteoblasten (Wiens et al., 2010c). OPG kann an den *receptor activator of NF- $\kappa$ B* Liganden (RANKL) binden und verhindert dadurch dessen Bindung an den RANK Rezeptor von Präosteoklasten und Osteoklasten. Somit wird die Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung, die bei einer positiven Interaktion von RANK und RANKL erfolgt, verhindert.

Neben dem Menschen sind auch andere Organismen auf die Aufnahme von Silizium angewiesen. Viele Pflanzen nehmen Silizium aus dem Boden auf und nutzen sogenannte Silikateinschlüsse für die Festigkeit ihrer Stängel. Protozoen und Kieselalgen verstärken ihre Zellwände mit Silikat oder bilden verkieselte Mikroskelette aus. Die größten und komplexesten Silikatstrukturen findet man aber in Schwämmen.

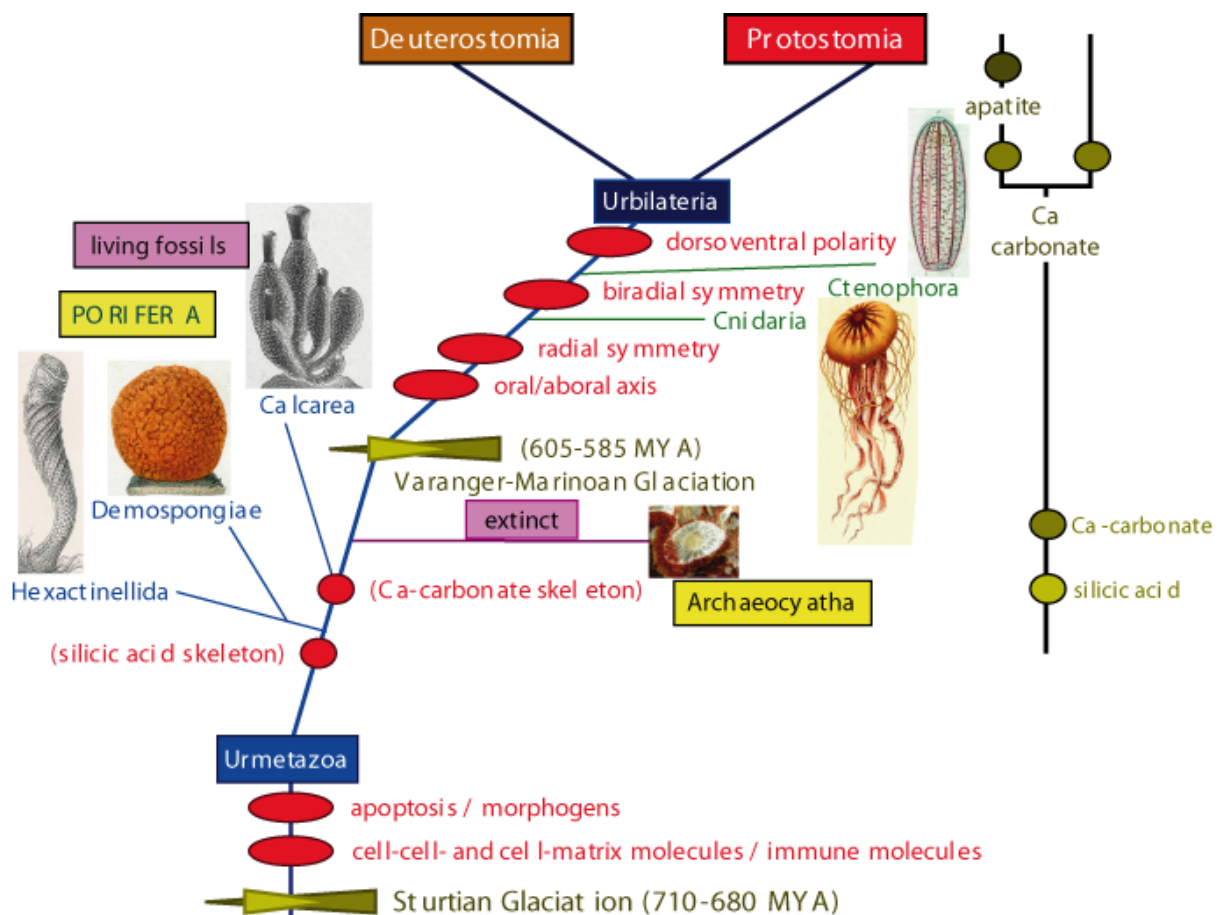
## 1.4 Porifera

Schwämme (Porifera) gehören zu den ältesten noch heute existierenden Metazoa. Der Ursprung der Porifera (Porenträger; lat. *porus*=Pore, Öffnung; *ferre*=tragen) kann basierend auf phylogenetischen und paläontologischen Untersuchungen auf einen Zeitraum von 600 bis 800 Millionen Jahren vor unserer Zeit in das jüngere Präkambrium datiert werden (Mehl and Müller, 1998; Müller, 1995; Müller et al., 2004). Schwämme sind bis auf wenige Ausnahmen sessile Organismen mit einem hohen Maß an Diversität in Morphologie, Größe (1 cm bis 2 m) und Farbgebung (Storch and Welsch, 1996). Von den rund 8000 beschriebenen rezenten Arten bewohnen nur rund 150 limnische Biotope (Familie Spongillidae), die Mehrzahl ist marin vorkommend (Campbell, 1997; Westheide and Rieger, 1996). Ihre Verbreitung reicht vom Flachwasser bis in Tiefen von 8500 Metern.

Aufgrund ihres relativ einfachen Aufbaus wurden die Schwämme im Laufe der Jahre den unterschiedlichsten Organismen zugeordnet. Lange Zeit wurden sie als Parazoa den Metazoa gegenüber gestellt (Müller, 2001) oder zu den Protozoa gezählt (Spencer, 1864). Zwar ordnete Haeckel 1896 aufgrund von ontogenetischen Untersuchungen die Porifera zu den Metazoa, doch erst die Anwendung von molekularbiologischen Techniken an den marinen Schwämmen *Suberites domuncula* und *Geodia cydonium* ermöglichte es, die Porifera phylogenetisch den Metazoa zuzuordnen (Müller et al., 2004). Heute geht man davon aus, dass sie die ältesten noch lebenden multizellulären Organismen und somit die ursprünglichen Metazoen darstellen (Wiens, 2004). Bestätigt wurde dies, durch das Auffinden von charakteristischen Metazoenproteinen, wie z.B. das Rezeptorprotein Integrin (Pancer et al., 1997), die Zelladhäsionsmoleküle Fibronectin (Pahler et al., 1998), Galektin (Wagner-Hülsmann et al., 1996) und Lectin (Gundacker et al., 2001), die V-Domäne der Immunglobuline (Schäcke et al., 1994), AIF-1 (Allograftinflammatoryfactor) und GPX (Glutathion Peroxidase) als Bestandteile des Immunsystems (Müller et al., 1999), die 2'5'-Oligoadenylatsynthetase, die Rezeptor-Tyrosinphosphatasen (Müller, 2001; Müller et al., 2001) und die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Anhand dieser Ergebnisse wurde der monophyletische Ursprung aller Metazoa (Cavalier-Smith et al., 1996; Reitner and Mehl, 1995), die Eingliederung der Porifera an der Basis (Müller, 1995) und die Abstammung von gemeinsamen Vorfahren, den Urmetazoa

bestätigt (Müller et al., 2001). Aufgrund der chemischen Zusammensetzung der inneren Skelette besteht die moderne Einteilung aus drei Subphyla, den *Calcarea*, den *Hexactinellida* (Glasschwämme) und den *Demospongia* (Hornschwämme) (Storch and Welsch, 1996).

Die zwei Unterklassen der *Calcarea* kommen nur im Ascon- und Sycontyp vor und besitzen ein Skelett aus ein-, drei- oder vierstrahligen Kalknadeln. Die *Hexactinellida* umfassen 300 Gattungen in zwei Unterklassen mit drei- bis sechsstrahligen Kieselnadeln, die nur den Sycontyp bilden. Die *Demospongia* umfassen ca. 600 Gattungen, untergliedert in drei Unterklassen. Mit 95% aller rezenten Arten stellen sie die bedeutendste Gruppe dar, wobei sie lediglich im Leucontyp vorkommen. Sie bilden ein Skelett aus ein- oder vierstrahligen Silikatnadeln und/oder Spongin (Storch and Welsch, 1996).



**Abbildung 1.4.:** Evolutionsdiagramm mit Einordnung der Schwämme (Porifera) zwischen den putativen Urmetazoen und den Urbilaterien (Müller et al., 2009b).

## 1.5 Biomineralisation in Schwämmen

### 1.5.1 Spiculogenese

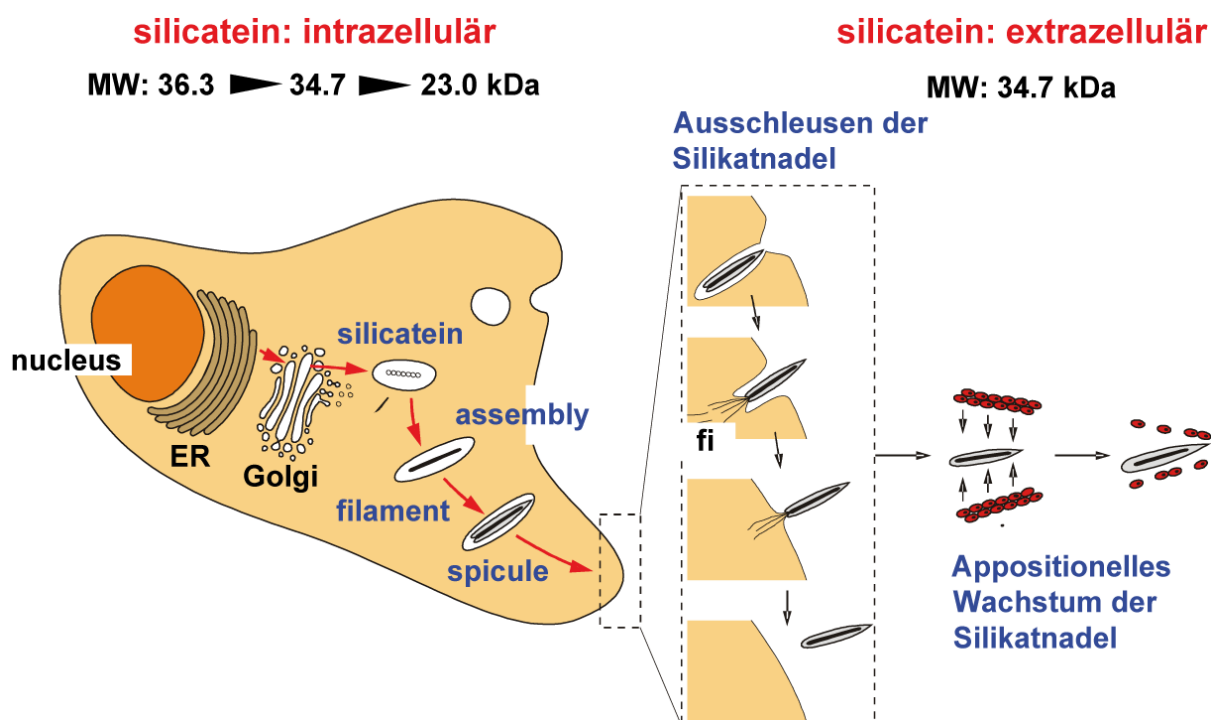
Vor etwa 800 Millionen Jahren, als die Schwämme das erste Mal auftraten (Müller et al., 2007b), war die  $\text{CaCO}_3$ -Konzentration in den Ozeanen wesentlich höher als heute (Anbar and Knoll, 2002; Holland, 1992). Dies führte zu einer Erhöhung des pH-Wertes auf größer neun und somit auch zu einem Anstieg an gelöstem Silikat. Dieses Milieu begünstigte den Einbau von Biosilikat, da dieses im Meerwasser eine höhere Beständigkeit aufweist, als Strukturen aus Calciumcarbonat.

Da die heutige geringe Konzentration an gelöstem Silikat für den Schwamm kein Problem darstellt bis zu drei Meter große Pfahlnadeln zu bilden, müssen die *Demospongia* und die *Hexactinellida* über eine Möglichkeit verfügen, Silikat anzureichern. In dem Schwamm *Suberites domuncula* wurde zum ersten Mal ein solcher Natrium/Bicarbonat/Orthokieselsäure (NBCSA) Cotransporter beschrieben (Schröder et al., 2004). Auch der Mechanismus der Nadelbildung wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Bereits 1984 postulierte Simpson, dass die Nadelbildung genetisch kontrolliert sein muss (Simpson, 1984). In *Suberites domuncula* konnten nach Erhöhung der Silikatkonzentration sogenannte *silica responsive genes* identifiziert werden, deren Transkriptionsraten dadurch stark angestiegen waren. Zu diesen Genen gehören Kollagen, Silicatein und Myotrophin (Krasko et al., 2000). Myotrophin, welches von den Sclerocyten gebildet und ausgeschieden wird, veranlasst die Exopinacocyten zur Produktion von Spongin (Krasko et al., 2000). Dieses kollagenartige Protein dient bei der Nadelbildung als organisches Rahmenwerk (Junqua et al., 1974). Auch die in den Sclerocyten synthetisierten Kollagenpeptide sind daran beteiligt. Den Sclerocyten kommt während der Spiculogenese eine entscheidende Rolle zu, denn dieser Prozess ist in eine intra- bzw. extrazelluläre Phase unterteilt (Müller et al., 2009a). Während der (i) intrazellulären Phase wird in den Silicasomen, speziellen Organellen der Sclerocyten, durch den NBCSA Cotransporter die Konzentration an Orthokieselsäure erhöht und gleichzeitig das Silicatein  $\alpha$  zu seiner reifen Form prozessiert (s. Abb. 1.5.1). Mit Hilfe von anderen Proteinen (Silicatein  $\beta$  und Silintaphin-1) lagert es sich zu Bündeln, dem späteren Axialfilament, zusammen. An diesem Gerüst kann nun enzymatisch gebildetes Silikat angelagert werden. Nach der Bildung der primären



Silikatschicht (Lamella), werden die kleinen Nadelstrukturen in den extrazellulären Raum entlassen.

Im Verlauf der (ii) extrazellulären Phase wachsen die Nadeln durch appositionelles Wachstum zu ihrer endgültigen Größe heran (Müller et al., 2005). Dabei wird die aus den Sclerocyten entlassene Lamella von einer Schicht aus Gallectin, welches bei der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit Kollagen und Silicatein assoziiert ist, umhüllt. An dieser organischen Matrix kann sich nun erneut enzymatisch synthetisiertes Silikat anlagern, auf das sich wieder eine neue organische Matrix legt (Wang et al., 2011). Somit entsteht ähnlich einer „layer by layer deposition“ ein Kompositmaterial aus organischen und anorganischen Schichten mit außergewöhnlichen optischen und mechanischen Eigenschaften (Wiens et al., 2010d). In Hexactinelliden kann ein solcher lamellarer Aufbau durch das appositionelle Wachstum der Spiculae aus über 1000 Ringen bestehen (Wang et al., 2009a).



**Abbildung 1.5.1:** Schematischer Ablauf der Nadelbildung in *Suberites domuncula* (nach W. E. G. Müller 2004).

### 1.5.2 Silicatein und Silintaphin-1

An der Spiculogenese sind viele verschiedene Proteine beteiligt. Die wichtigsten davon zählen zu den sogenannten *silica responsive genes*, die Silicateine. Die Anzahl der Isoformen kann von Schwamm zu Schwamm variieren. Im Süßwasserschwamm *Lubomirskia baicalensis* sind zum Beispiel vier Isoformen des Silicatein isoliert worden, in *Suberites domuncula* hingegen nur drei (alpha, beta und gamma). Vor allem das Silicatein  $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle, da es die Synthese von Biosilikat aus Orthokieselsäure  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$  katalysiert (Cha et al., 1999).

Zuerst wurde das Silicatein  $\alpha$  aus dem Schwamm *Tethya aurantia* isoliert und charakterisiert (Cha et al., 1999; Shimizu et al., 1998). Anschließend konnte das Enzym auch im Schwamm *Suberites domuncula* beschrieben werden (Krasko et al., 2000). Das unprozessierte Polypeptid besteht aus 331 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 36 kDa. Nach Durchlaufen des Reifungsprozesses, einer Phosphorylierung und Abspaltung der Signalsequenz (AA<sub>1</sub>-AA<sub>17</sub>) bzw. des benachbarten Propeptids (AA<sub>18</sub>-AA<sub>112</sub>), besteht das reife Enzym aus 218 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 23 kDa und einem pI von 5,5.

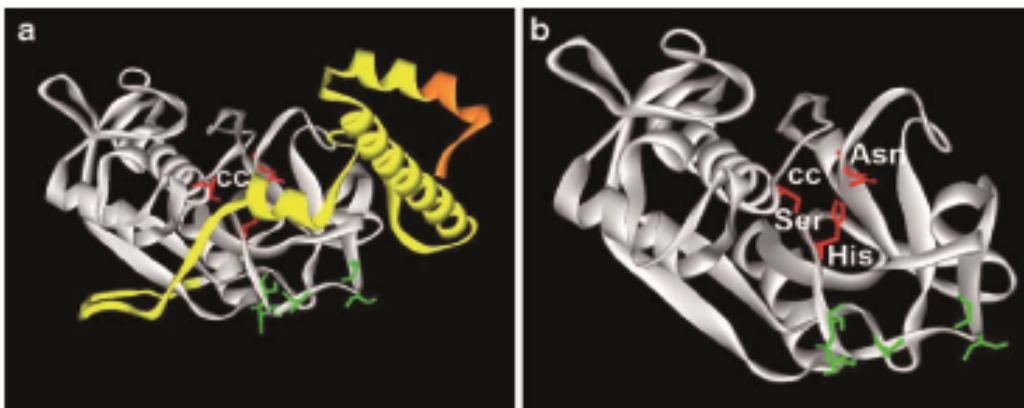


Abbildung 1.5.2: Strukturmodell des Silicatein  $\alpha$  aus *Suberites domuncula*. (a): Unprozessiertes Silicatein- $\alpha$  mit Signalpeptid (orange) und Propetid (gelb). (b): Reifes Silicatein- $\alpha$  mit den Aminosäuren des katalytischen Zentrums (rot) und des Serinclusters (grün) (nach Schröder et al., 2007).

Durch den Reifungsprozess wird der Zugang zum aktiven Zentrum des Silicateins, welcher vorher durch das Propeptid blockiert ist, freigelegt (Schröder et al., 2007). Silicatein  $\alpha$  ist nicht nur in der Lage Biosilikat aus Orthokieselsäure zu katalysieren. Auch Metalloxide wie Titandioxid, Galliumdioxid und Zirkoniumdioxid kann es aus in Wasser gelösten Substraten bei Raumtemperatur und niedrigem pH bzw. Druck synthetisieren (Kisailus et al., 2006; Schröder et al., 2007; Tahir et al., 2005). Durch

die Entdeckung des Silicateins konnte der Mechanismus der Silikatpolykondensation aufgeklärt werden (Natalio et al., 2010b; Schröder et al., 2008).

Jedoch erst durch die Entdeckung des Silintaphin-1 (Silicatein  $\alpha$  interactor with PH-domain-1) im Schwamm *Suberites domuncula* konnten stabförmige Strukturen erzeugt werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Silintaphin-1 Gens umfasst 386 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 40,509 kDa und einem theoretischen pI von 4,34. Strukturelle Analysen des Silintaphin-1 ergaben eine signifikante Homologie mit der Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH Domäne) eukaryotischer Proteine (Wiens et al., 2009). PH-Domänen findet man in vielen verschiedenen eukaryotischen Proteinen mit den unterschiedlichsten Funktionen. Einige PH-Domänen sind Teil von Proteinen des Zell-Signal-Weges, wie zum Beispiel der Serin/Threonin-Kinase, der Tyrosin-Kinase oder von G-Proteinen. Andere wiederum sind involviert bei der Bindung von Proteinen an der Plasmamembran (Lemmon und Ferguson, 2000) oder als Bestandteil von Proteinen, die am Aufbau des Cytoskelets beteiligt sind (Lemmon, 2004). Die Spezifität der einzelnen PH-Domänen wird durch die Loop Region oder durch Unterschiede im N-Terminus der Domäne festgelegt. Da diese Bereiche aber nicht konserviert sind, ist eine Zuordnung der einzelnen Domänen zu bestimmten Funktionen nicht oder nur schwer möglich.

Neben der PH-Domäne enthält das Silintaphin-1 Bereiche, die eine hohe Anzahl von Prolin, Valin und geladenen bzw. polaren Aminosäuren aufweisen, welche die PH-Domäne flankieren. Diese Bereiche kommen auch im Titin, einem 3,6 MDa großen elastischen Protein vor (Labeit und Kolmerer, 1995). Dieses Protein ist Teil des Sarkomers und zentriert dort die Myosinköpfe zwischen den Aktinfilamenten, um den kontraktilem Apparat nach der Dehnung zurückzustellen. Die Elastizität wird durch die sogenannten PEVK Segmente erreicht, welche erstens eine hohe Anzahl der Aminosäuren P, E, V und K aufweisen und zweitens an beiden Seiten an Immunglobulin-like-Domänen gebunden sind (Trombitas et al., 1998). Auch im Silintaphin-1 könnte die Kombination aus sich wiederholenden PEDT-Sequenzen, die die PH-Domäne flankieren, für eine solche Flexibilität und Elastizität während des Prozesses der Spiculogenese verantwortlich sein (Wiens et al., 2009). Desweiteren kann auch die erleichterte Bindung der PH-Domäne an phosphorylierte S/T/Y Reste (Gibson et al., 1994; Liu und Makowske, 1999), die auch im Silicatein  $\alpha$  zu finden sind, für eine Interaktion beider Proteine während der Nadelbildung sprechen. Wiens

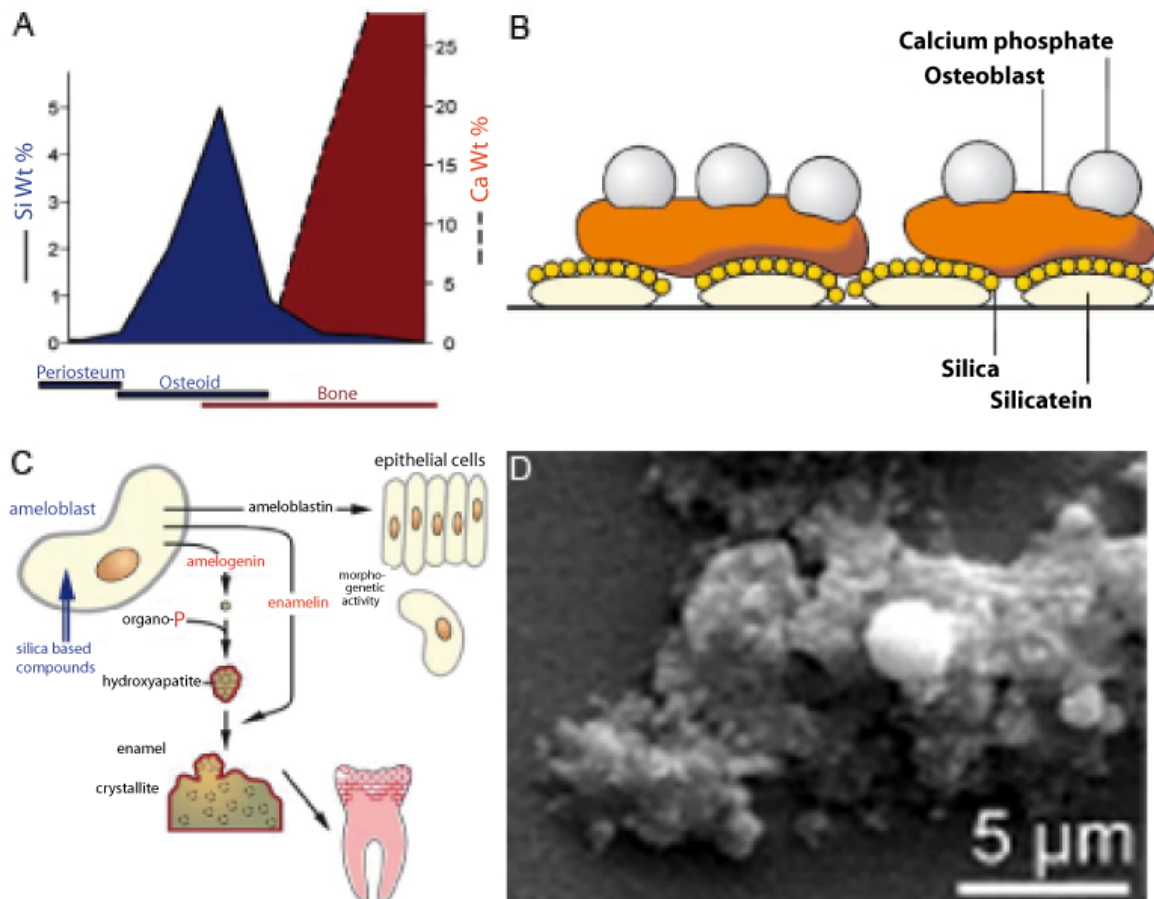
et al (2009) konnten verifizieren, dass das Silintaphin-1 die gleichen Eigenschaften in regenerierendem Schwammgewebe und bei Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Natriummetasilika aufweist wie das Silicatein  $\alpha$ . In weiterführenden Untersuchungen konnte auch die Funktionsweise des Silintaphin-1 dargestellt werden. Hierzu wurde Silicatein  $\alpha$  an  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nanopartikel mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA immobilisiert und anschließend mit Silintaphin-1 inkubiert. Die Negativ-Kontrolle, ohne das Silintaphin-1 zeigt unorganisierte amorphe Aggregate, während die Probe, die mit Silintaphin-1 inkubiert wurde deutlich stabförmige Strukturen aufweist (Müller et al., 2009a). Bei einem Verhältnis von Silicatein  $\alpha$  zu Silintaphin-1 von 4:1 wurden die besten Ergebnisse erzielt (Schlossmacher et al., 2011).

Die hervorragenden Eigenschaften des Silicatein  $\alpha$  neben Biosilikat auch Metalloxide bei neutralem pH und Raumtemperatur zu synthetisieren, macht dieses Enzym interessant in Gebieten wie der Nanobiotechnologie und der Biomedizin (Müller et al., 2009a; Schröder et al., 2009). Auch die Entdeckung des Silintaphin-1 hat dazu beigetragen. So können nun die durch Silicatein synthetisierten Stoffe in ihrer Morphologie und Zusammensetzung reguliert werden (Müller et al., 2009a).

Ein weiteres Protein das aus dem Schwamm *Suberites domuncula* isoliert werden konnte und in der Nanobiotechnologie eingesetzt werden könnte ist die Silicase. Dieses Biosilikat abbauende Enzym hat ein Molekulargewicht von 43,1 kDa und gehört zu der Familie der Carboanhydrasen (Schröder et al., 2003). Wie andere Carboanhydrasen besitzt die Silicase drei konservierte Histidine (AA<sub>181, 183, 206</sub>), die für die Bindung des wichtigen Zink-Ions verantwortlich sind (Schröder et al., 2007). Wie auch bei der Umwandlung von Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) zu Hydrogencarbonat (HCO<sub>3</sub>) greift das an das Zink-Ion angelagerte Hydroxid-Ion nukleophil ein Silizium des Polysilikat an. Die so abgespaltene Kieselsäure kann durch die Bindung eines Wassermoleküls aus dem aktiven Zentrum der Silicase freigesetzt werden und der Zyklus kann von Neuem beginnen. Durch spezifische Antikörper konnte die Silicase sowohl auf der Oberfläche der Nadel als auch im Axialfilament detektiert werden (Eckert et al., 2006). Beide Enzyme bilden in einem zyklische Auf- und Abbauprozess die Nadeln, ähnlich der Osteogenese (Schröder et al., 2003).

### 1.5.3 Biomedizinische Anwendungen des Silicatein

Silikat ist nicht nur ein essentieller Baustein im natürlichen Ökosystem, sondern spielt auch eine wichtige Rolle für den Menschen und andere Vertebraten (Carlisle, 2007; Van Dyck et al., 2000), da ein Mangel an Silizium zu Knochenmissbildungen führen kann (Carlisle, 1972). In Tierversuchen verringerte die Gabe von Silizium bei ovariectomierten Ratten den Verlust von Knochendichte. Zudem konnte eine räumliche Korrelation zwischen der Zone der Knochenbildung und der Anreicherung von Silizium in tierischem Gewebe festgestellt werden (Müller et al., 2009a). Gerade um das Osteoid und die Knochenhaut (Periosteum) wurde eine Anreicherung von Silizium beobachtet, was darauf schließen lässt, dass diese anorganische Komponente wichtig ist bei der Knochenbildung (Müller et al., 2009a) (s. Abb. 1.5.3 A). Infolgedessen wurde der Effekt von Biosilikat, katalysiert durch das Enzym Silicatein  $\alpha$ , auf die Aktivität von Osteoblasten näher erforscht. Hierzu wurden *human osteogenic sarcoma cells* kurz SaOS-2 Zellen als Modell verwendet und es konnte eine erhöhte Mineralisierungsaktivität dieser Zellen beobachtet werden, wenn sie auf einem Biosilikat Untergrund kultiviert wurden. Nicht nur ein Anstieg von Calciumphosphat-Ablagerungen, sondern auch eine Stimulierung der Zellproliferation konnte dabei beobachtet werden (s. Abb. 1.5.3 B). In anderen Studien wurde der Einfluss von Biosilikat und Silikat basierenden Stoffen auf das Expressionslevel von Schlüssel-Genen wie *Amelogenin*, *Ameloblastin* und *Enamelin* die bei der Bildung des Zahnschmelzes beteiligt sind, erforscht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Biosilikat und  $\beta$ -Glycerophosphat für einen Anstieg des Expressionslevels dieser Gene verantwortlich ist (s. Abb. 1.5.3 C). Darüber hinaus konnte auch eine erhöhte Ablagerung von Hydroxyapatitkristallen auf der Oberfläche dieser Zellen beobachtet werden (Schröder et al., 2007; Wiens et al., 2010b) (s. Abb. 1.5.3 D). Mit diesen Daten wurde ein Zwei-Komponenten-Implantat-Material, bestehend aus Poly(D,L-Lactid)-Silicatein-Silica-enthaltenen Mikrosphären (SSM) und einer Plastik-ähnlichen Füllmatrix die auch Kieselsäure enthält (PMSA), entwickelt. Erfolgreich konnte diese Füllmatrix an Hasen-Femora getestet werden (Wiens et al., 2010a). Neun Wochen nach der Behandlung von Knochenschäden zeigten Computertomographie und morphologische Analysen eine vollständige Resorption des eingepflanzten Materials sowie eine komplette Regeneration des Knochens.



**Abbildung 1.5.3:** Biomedizinische Anwendungen von Biosilikat und Silicatein. (A) Zeitliches Verhältnis zwischen der Siliziumaufnahme und der Calciumeinlagerung während der frühen Phase der Knochenbildung in Ratten. (B) Schematische Darstellung der Kultivierung von SaOS-2 Zellen auf einem Biosilikat Untergrund. (C) Schema zur Darstellung des Effekts von Biosilikat auf das Expressionslevel der Schlüssel-Gene, die an der Bildung des Zahnschmelzes beteiligt sind. (D) SEM-Aufnahme eines Hydroxyapatitkristalls der durch SaOS-2 Zellen gebildet wurde (verändert nach Schröder et al., 2007).

### 1.5.4 Biotechnologische Anwendungen des Silicatein

Rekombinantes Silicatein  $\alpha$  eignet sich nicht nur für Anwendungen in der Biomedizin, sondern es findet auch immer häufiger Verwendung in der Biotechnologie. Gerade die Eigenschaft neben Biosilikat auch Metalloxide wie Galliumdioxid, Zirkoniumdioxid oder Titandioxid zu synthetisieren, macht dieses Enzym beispielsweise interessant für Beschichtungen von Biomaterialien. Normalerweise benötigt die Herstellung dieser Metalloxide hohe Temperaturen bzw. starken Druck oder es kommen ätzende Chemikalien zum Einsatz, was zu einer Beschädigung des zu beschichtenden Biomaterials führen kann. Durch den Einsatz des Silicatein  $\alpha$  kann eine solche Beschichtung bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert ablaufen. Das Erhalten

der Silicatein-Aktivität nach der Immobilisierung auf verschiedenen Oberflächen konnte bereits gezeigt werden (Tahir et al., 2009; Tahir et al., 2005; Tahir et al., 2004). Bei der Immobilisierung auf einer (111)-Goldoberfläche wurde das rekombinante Silicatein  $\alpha$  über den vorhandenen His-tag, der zur Proteinaufreinigung benötigt wird, an eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix gebunden. Diese Matrix ist wiederum an ein Polymer gebunden, welches über Thiolgruppen der Cysteamin-Reste auf der Goldoberfläche verankert ist. In weiteren Versuchen konnte das Silicatein auch auf  $\text{TiO}_2$ - und  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Oberflächen mittels dieser Matrix immobilisiert werden. Dazu mussten nur die Amin-Reste des Polymers ausgetauscht werden. Hierbei zeigte sich, dass das Silicatein ebenfalls Goldnanopartikel aus einer Tetrachloroaurat-Anionen-Lösung ( $\text{AuCl}_4^-$ ) synthetisieren kann (Kisailus et al., 2005). Die Einzigartigkeit des Enzym Silicatein  $\alpha$  neben Biosilikat und Metalloxiden sogar Gold- und Silbernanopartikel (Schröder et al., 2007) zu synthetisieren eröffnet neue Wege bei der Herstellung von Kompostmaterialien, die in verschiedenen Anwendungsbereichen (Polini et al., 2011), wie in der Halbleitertechnik, für piezoelektrische Sensoren, in Solarzellen oder LED (Rai and Perry, 2009; Wolf et al., 2010) zum Einsatz kommen können. Eine weitere Möglichkeit stellt die Herstellung von antimikrobiellen Beschichtungen dar, die in der Biomedizin eingesetzt werden könnten.

Die Nutzung des über  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA immobilisierten Silicateins ist gerade bei Biomaterialien und in der Biomedizin sehr begrenzt, denn die Herstellung dieser Matrix ist ein mehrstufiger Prozess, der verschiedene Lösungsmittel benötigt. Außerdem können die mit der Zeit freigesetzten Monomere aus dem Polymergerüst toxische oder mutagene Wirkung auf das umliegende Gewebe haben (Natalio et al., 2010a).

## 1.6 Modifizierung von Proteinen

Modifizierungen von Proteinen, ob durch kurze Aminosäuresequenzen oder ganze Proteine, kommen in verschiedenen Anwendungsbereichen zum Einsatz (Whaley et al., 2000). Wie unter 1.5.4 erwähnt kann eine Modifizierung mit einem His-tag zur Aufreinigung des Silicatein genutzt werden. Ebenso eignet sich dieser zur Immobilisierung des Enzyms auf verschiedenen Oberflächen, wenn sie vorher mit einem Kopolymer beschichtet wurden. Daneben gibt es auch noch mehrere Möglichkeiten Proteine zu modifizieren. Drei Beispiele sollen im Folgenden genannt werden.

Erstens besteht die Möglichkeit das zu untersuchende Protein fluoreszenz-mikroskopisch über eine Fusion mit einem *green fluorescent protein* (GFP) zu detektieren (Chalfie et al., 1994; Wiedenmann et al., 2009).

Zweitens lässt sich über einen Nus-tag, eine bessere Löslichkeit des Proteins erzielen (Kim and Lee, 2008; Terpe, 2003). Das aus *E. coli* gewonnene bakterielle Protein ist eines der Löslichsten. Durch Fusion eines unlöslichen Zielproteins mit dem NusA-Protein, wird dessen Löslichkeit erhöht (Terpe, 2003).

Drittens kann mit einem GST-tag nicht nur eine Aufreinigung von Proteinen erreicht, sondern auch ein GST-Pulldown durchgeführt werden (Roder et al., 1999). Bei diesem Assay wird ein bekanntes Protein in einen Fusionsvektor, der eine Glutathion-S-Transferase enthält, kloniert. Da die Glutathion-S-Transferase eine hohe Affinität zu Glutathion besitzt, kann das Protein an eine entsprechende Matrix gebunden werden. Wird dieser Komplex mit einem Zellysat inkubiert, können eventuelle Interaktionspartner über SDS-PAGE detektiert werden.

In der Natur sind spezielle Domänen von Proteinen bekannt, die Interaktionen zwischen Proteinen untereinander oder mit verschiedenen Oberflächen (Zelloberflächen oder Knochen) erlauben. Gerade im Hinblick auf die biomedizinische Anwendung des Silicatein  $\alpha$  wurde in dieser Arbeit nach einer Möglichkeit gesucht, das Protein direkt an Hydroxyapatit zu binden. Bekannte Proteine die an Hydroxyapatit binden, sind unter anderem Osteonectin oder das Bone Sialoprotein (BSP) (Fujisawa et al., 1996), die beide glutamatreiche Sequenzen besitzen und somit diese Bindung ermöglichen. Im Falle des Osteonectin besteht diese aus fünf Glutamaten, beim BSP sind es sogar zwei Sequenzen aus je acht



Glutamaten. Über ionische Wechselwirkung kann das Glutamat an das Calcium des Hydroxyapatit binden (Moradian-Oldak et al., 1992; Sawyer et al., 2005). Dabei werden mindestens drei Glutamate benötigt, um eine Einheitszelle (*single unit cell*) des Hydroxyapatit zu umspannen (Fujisawa et al., 1996). Je größer die glutamatreiche Sequenz ist, umso stärker ist die Bindung an das Hydroxyapatit.

## 2. Zielsetzung

Zur Immobilisierung des Silicatein  $\alpha$  auf verschiedene Oberflächen sollte das Protein am N-terminalen Ende mit verschiedenen Tags modifiziert werden. Zuerst sollte der Glu-tag entwickelt werden, um Silicatein direkt an Hydroxyapatit als Trägermatrix zu binden. Zur Aktivitätsprüfung des Proteins sollte dieses mit Titanium(IV) bis(ammonium lactato) dihydroxid (Ti[BALDH]) oder Tetraethylorthosilikat (TEOS) inkubiert werden. Mittels XRD, SEM/EDX und TEM/EDX sollte ein etwaiger Umsatz der Substrate, in Form einer Schichtbildung untersucht werden. Eine gelungene Beschichtung mit diesen Substraten könnte zur Herstellung neuer Kompositmaterialien genutzt werden. Gerade eine Beschichtung von Hydroxyapatit mit Biosilikat würde bei Knochentransplantationen das Verwachsen von Implantat und Knochen verbessern. Mit dem an HA immobilisierten Glu-tag-Silicatein sollte ein Pulldown-Assay durchgeführt werden, um weitere Interaktionspartner zu finden und die schon bekannten Daten über den Interaktionspartner Silintaphin-1 zu verifizieren. Neben Hydroxyapatit findet auch Calciumcarbonat als Knochenersatzmaterial Verwendung. Calciumcarbonat könnte dabei als Trägermaterial für Metalloxide nutzbar gemacht werden. Hierzu sollte das Glu-tag-Silicatein auf biogene Kalknadeln immobilisiert werden. Durch die Inkubation mit dem Substrat Ti[BALDH] in An- und Abwesenheit des Silintaphin-1, sollten neben der Titanschichtdeposition auch Rückschlüsse auf die Interaktion beider Proteine gezogen werden.

Eine Immobilisierung an  $\text{TiO}_2$ -Nanodrähte sollte zeigen, dass mit einem Glu-tag eine Bindung an dieses Metalloxid möglich ist. Die Aktivität des Enzyms sollte wie in den Versuchsreihen zuvor durch Zugabe von TEOS überprüft werden.

Neben Calcium und Titan kommen in der Biotechnologie auch goldbeschichtete Oberflächen zum Einsatz. Durch Modifikation des Silicatein mit einem Cys-tag sollte dieses in einem weiteren Ansatz an Goldoberflächen gebunden werden. Die erfolgreiche Immobilisierung über den Tag sollte durch Antikörperfärbung und AFM-Aufnahmen bestätigt werden. Die Aktivität des gebundenen Proteins sollte sodann durch Zugabe von Ti[BALDH] und anschließenden SEM/EDX-Aufnahmen untersucht werden. Durch die Verwendung von PDMS-Stempeln, sollte das Cys-tag-Silicatein in strukturierter Form auf die Goldoberfläche übertragen werden.

## 3. Material

### 3.1 Geräte

Heizblock: Wealtec HB-1	PEQLAB, Erlangen
Heizplatte	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Inkubationsschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen
Kolbenhubpipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	GILSON, Frankreich
Laminar Flow, Sterilbank	KÖTTERMANN <sup>®</sup> , Hänigsen
Li-Cor Sequenzierer Global Edition IR <sup>2</sup> Long readir 4200	MWG, Ebersberg Global
Magnetrührer Heidolph MR 3000	HEIDOLPH, Kelheim
pH-Meter (Typ CG 840)	SCHOTT, Mainz
Phenom/SEM	FEI, Niederlande
Photometer GeneQuant II	PHARMACIABIOTECH, Cambridge (England)
Thermocycler:	
BIO-RAD i-cycler	BIO-RAD, München
BIO-RAD MyCycler™	BIO-RAD, München
UVP White/UV Transilluminator	UVP LIMITED, Cambridge (England)
Vortexer	LABOTECH, Wiesbaden
Waage Adventure-Pro	OHAUS Corporation, NJ (USA)
Wasserbad Julabo Exatherm electronic U3	JUCHHEIM Labortechnik, Seelbach
Zentrifugen (Eppendorf 5415C und -5415R)	EPPENDORF, Hamburg

### 3.2 Chemikalien

2-Propanol	APPLICHEM, Darmstadt
Agarose NEE0	ROTH, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumperoxosulfat (APS)	ROTH, Karlsruhe
Ampicillin	SIGMA, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	APPLICHEM, Darmstadt
Blocking Reagenz	ROCHE, Mannheim
Bromphenolblau	SIGMA, Deisenhofen
Carbenicilin	ROTH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant-Blue R250	SERVA, Heidelberg
Dimethylformamid	MERCK, Darmstadt
DNA-Leiter GeneRuler	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
dNTP-Mix	ROTH, Karlsruhe
EDTA	SIGMA, Deisenhofen
Ethanol absolut	APPLICHEM, Darmstadt
Ethidiumbromid	APPLICHEM, Darmstadt
Fetales Kälberserum (BSA)	Böhringer, Mannheim
Formaldehyd	ROTH, Karlsruhe
Formamid (deionisiert)	ROTH, Karlsruhe
Glycerol	ROTH, Karlsruhe
Harnstoff	ROTH, Karlsruhe
HCl, konz.	ROTH, Karlsruhe
Hydroxyapatit (HA)	SIGMA, Deisenhofen
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH, Karlsruhe
L-Arabinose	ROTH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid x 7 H <sub>2</sub> O	MERCK, Darmstadt
Maleinsäure	ROTH, Karlsruhe
MOPS/SDS-Laufpuffer	INVITROGEN, Karlsruhe
Natriumacetat	ROTH, Karlsruhe
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Natriumcitrat	ROTH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	SIGMA, Deisenhofen

Natriumhydroxid	ROTH, Karlsruhe
SEQUAGEL <sup>®</sup> Complete <i>Buffer Reagent</i>	NATIONAL DIAGNOSTICS, Georgia (USA)
SequaGel <sup>®</sup> XR	NATIONAL DIAGNOSTICS, Georgia (USA)
SimplyBlue Safestain	INVITROGEN, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SIGMA, Deisenhofen
TBE-Puffer (10 x)	APPLICHEM, Darmstadt
TBS-Puffer (20x)	APPLICHEM, Darmstadt
Tetraethylorthosilicate (TEOS)	SIGMA, Deisenhofen
Titanium(IV) bis(ammonium lactato) dihydroxid	
Ti[BALDH]	SIGMA, Deisendorf
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin	APPLICHEM, Darmstadt
Tween <sup>®</sup> 20	ROTH, Karlsruhe
X-Gal	ROTH, Karlsruhe

### 3.3 Puffer

#### SDS-Laufpuffer:

- Tris	15,1 g
- Glycin	94 g
- SDS 10%	50 ml

→ In *Aqua dest.* lösen und pH-Wert auf 8,30 einstellen.

#### P3:

- Tris-	100 mM
- NaCl	100 mM

→ In *Aqua dest.* lösen, pH-Wert auf 9,5 einstellen.

Probenpuffer für SDS-Gele (4x):

- 0,5 M Tris pH 6,8                      1,2 ml
- Glycerol                                      1 ml
- 10% SDS                                      2 ml
- 0,1% Bromphenolblau                      0,5 ml

→ In *Aqua dest.* lösen und aliquotieren zu je 475 µl, bei -20°C lagern

→ Kurz vor Gebrauch 25 µl β-Mercaptoethanol hinzugeben.

Probenpuffer für Agarosegele (6x):

- Saccharose                                      40%
- Bromphenolblau                              wenige Kristalle

→ In *Aqua dest.* lösen

Blockierungslösung:

- TBS mit 5% (w/v) Blocking Reagens Roche

BSA-Stammlösung:

- 10% (w/v) BSA (Albumin bovin, fraction V) in destilliertem Wasser

**3.4 Nährmedien**

LB Agar LAB M<sup>TM</sup>

ROTH, Karlsruhe

LB Broth LAB M<sup>TM</sup>

ROTH, Karlsruhe

SOC-Medium

NOVAGEN, Darmstadt

### 3.5 Verbrauchsmaterial

Einmalspritzen	AMEFA, Luisburg
Falcon Reaktionsgefäße	BECTON & DICKINSON, New Jersey, USA
iBlot-Transfer Stack	INVITROGEN, Karlsruhe
Nylonmembran	ROCHE, Mannheim
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	INVITROGEN, Karlsruhe
Pasteurpipetten	POULTON & GRAF GmbH, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	ABGENE, Epsom, England
Petrischalen	NUNC, Wiesbaden
Pipettenspitzen	ROTH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	BRAND, Wertheim
SEM-Stub	PLANO GmbH, Wetzlar
Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
TEM-Grid	PLANO GmbH, Wetzlar
Whatman 3MM-Papier	WHATMAN, über Fischer, Frankfurt

### 3.6 Kits

High Pure Plasmid Isolation Kit	ROCHE, Mannheim
High Pure PCR Product Purification System	ROCHE, Mannheim
PCR Dig Probe Synthesis Kit	ROCHE, Mannheim
pGEM-T Vector System I	PROMEGA, Madison (USA)
Thermo Sequinase Fluorescent	AMERSHAM, Freiburg
Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP	
Nucleo Spin Extract II PCR Purification Kit	MACHERY NAGEL, Düren
pTrc-His 2 TOPO TA Expression Kits	INVITROGEN, Karlsruhe

### 3.7 Enzyme mit jeweiligem Puffer

DNA <i>Taq</i> Polymerase (1 U/μl)	FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot
10x <i>Taq</i> Puffer	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	
Platinum Pfx DNA Polymerase	INVITROGEN, Karlsruhe
10x Pfx Amplifikationspuffer	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	PEQLAB, Erlangen
Reaktionspuffer S (mit 25 mM MgCl <sub>2</sub> )	
<i>T4</i> DNA Ligase (3 U/μl)	PROMEGA, Madison (USA)
2x PCR Master Mix	FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase (0.05 U/μl)	
MgCl <sub>2</sub> (4 mM)	
dNTPs (0.4 mM)	
Proteinase K	MERCK, Darmstadt
<i>Hind III</i>	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
<i>Nco I</i>	SIGMA-ALDRICH; Taufkirchen

### 3.8 Molekulargewichtsmarker

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot
Novex Sharp Unstained Protein Standard	INVITROGEN, Karlsruhe
Precision Plus Protein Standard	BIO-RAD, München
peqGold Protein-Marker I	PEQLAB, Erlangen



### 3.9 Bakterienstämme

#### NovaBlue™ Competent Cells (*E. coli*)

NOVAGEN, Darmstadt

Genotyp: endA1 hsdR17( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ) supE44

thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac

F<sup>+</sup>[proA<sup>+</sup> B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>ZΔM15::Tn10 (Tc<sup>R</sup>)]

#### One Shot TOP 10 Competent Cells (*E. coli*)

INVITROGEN, Karlsruhe

Genotyp: F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)

Φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139

Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>)

endA1 nupG

#### BL21 (DE3) Competent Cells (*E. coli*)

NOVAGEN, Darmstadt

Genotyp: F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> ( $r_B^- m_B^-$ )

gal dcm (DE3)

### 3.10 cDNA-Banken

Die verwendeten cDNA Banken sind in den pBK-CMV Vektor von STRATAGENE, Heidelberg ligiert und wurden von Dr. M. Kruse (Mainz) hergestellt.

### 3.11 Primer

#### 3.11.1 Sequenzspezifische Primer

MWG, Ebersberg

PH Exp F1: 5'-TCA TCA GAA GAG ACC CCA GTA GA-3'

PH Exp R2: 5'-CTG CTT TTG TCT CCT CAC CTC-3'

Sili α mod F1: 5'- GAA GAG GAA GAG GAA GAG GAA GAG CCT GAA GCT GTA  
GAC TGG -3'

Sili  $\alpha$  mod R1: 5'- TAG GGT GGG ATA AGA TGC ATC GGT -3'

Sili  $\alpha$  mod F2: 5'- CAT GCC ATG GTG GAA GAG GAA GAG GAA GAG GAA GAG  
CCT GAA GC -3'

Sili  $\alpha$  mod R2: 5'- CCC AAG CTT ATT AGG GTG GGA TAA GAT GCA TCG GT -3'

Sili  $\alpha$  Cys F: 5'-TGT TGC TGT TGC TGT TGC TGT TGC CCT GAA GCT GTA GAC  
TGG TGT TGC TGT -3'

### 3.11.2 Vektorspezifische Primer

MWG, Ebersberg

T7: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

Sp6: 5'-TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C-3'

pTrcHis2 F: 5`-GAG GTA TAT ATT AAT GTA TCG-3'

pTrcHis2 R: 5`-GAT TTA ATC TGT ATC AGG-3'

pBAD/gIII A F: 5`-ATC CTA CCT GAC GCT TTT TAT C-3'

pBAD/gIII A R: 5`-TGA AAA TCT TCT CTC ATC CG-3'

### 3.11.3 Gelabelte Primer (Sequenzierprimer)

Sp6\*IRD 800: 5'-TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C-3'

T7\*IRD 800: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'

pTrcHis2 F IRD 700: 5`-GAG GTA TAT ATT AAT GTA TCG-3'

pTrcHis2 R IRD 800: 5`-GAT TTA ATC TGT ATC AGG-3'

pBAD/gIII A F IRD 800: 5`-ATC CTA CCT GAC GCT TTT TAT C-3'

pBAD/gIII A R IRD 700: 5`-TGA AAA TCT TCT CTC ATC CG-3'

## 3.12 Vektoren

pGEM®-T Vector System I

PROMEGA, Madison (USA)

pTrc-His2 TOPO TA

INVITROGEN, Karlsruhe

pBAD/gIII A

INVITROGEN, Karlsruhe

### **3.13 Computerprogramme**

Base ImagelR Data collector LI-COR  
and Image Analysis (Version 2.0)

über MWG, Ebersberg

BLAST Service NIH-NCBI

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

DNAS tar (Version 4.04)

DNAS tar Inc., Madison, USA

Vector NTI V9.0

INVITROGEN, Karlsruhe

GeneDoc (Version 2.6.001)

Karl Nicolas, [Pittsburgh](#), USA

### **3.14 Versuchstiere**

Die für die Versuche verwendeten Schwämme wurden in der Nähe von Rovinj (Kroatien) in der nördlichen Adria aus einer Tiefe von 10-30 m eingesammelt. Sie wurden in gefiltertem, artifiziellem Meerwasser, welches mit Meersalz „Tropic Marine“ hergestellt wurde, gehalten. Das Wasser hatte eine Temperatur von 16°C und wurde belüftet. Zweimal pro Woche wurde Phytoplankton („Marin – Niedere Tiere Futter“; 30 µl/L) als Futter zugegeben.

## 4. Methoden

### 4.1 Primerdesign

Primer sind kurze Oligonukleotide, welche spezifische Dimere mit einer Zielsequenz eingehen können. Bei der Zielsequenz kann es sich um DNA oder RNA handeln, die spezifisch amplifiziert, markiert oder sequenziert werden soll.

#### 4.1.1 Genspezifische Primer

Bei der Herstellung eines Primers sollten folgende Kriterien beachtet werden:

Die Zielsequenz sollte keine Elemente wie z.B. *inverted repeats* enthalten, die zur Entstehung von Sekundärstrukturen wie *hairpins* oder *loops* führen könnten. Des Weiteren sollte eine 3'-terminale Komplementarität vermieden werden, damit sich keine Primerdimere bilden und so eine Bindung an die Zielsequenz verhindert wird. Die Schmelztemperatur des Primers ( $T_m$ ), bei der 50% der Primer an die Zielsequenz gebunden sind, sollte hoch genug sein, um unspezifische Hybridisierungen zu vermeiden ( $> 50^\circ\text{C}$ ) und bei einem Primerpaar nur wenig voneinander abweichen ( $< 2^\circ\text{C}$ ). Sie wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = n_{GC} * 4 + n_{AT} * 2$$

$n_{GC}$  =Anzahl der GC Basenpaare

$n_{AT}$  =Anzahl der AT Basenpaare

Der G:C-Gehalt des Primers sollte zwischen 40% und 60% liegen, um eine hinreichend hohe  $T_m$  zu erreichen. Da die DNA Polymerase die Elongation am 3'-Ende beginnt, sollten sich dort Purin-Nukleotide befinden, da diese durch ihre drei Wasserstoffbrückenbindungen für eine stabilere Hybridisierung sorgen.

Oligonukleotide mit einer Länge von 18 bis 25 bp besitzen günstige Dimerisierungseigenschaften und sind gut als Primer geeignet.

#### **4.1.2 Primer für Restriktionsverdau**

Um einen Restriktionsverdau durchführen zu können, müssen die passenden Schnittstellen an ein PCR-Fragment angeführt werden. Dies erfolgt über eine PCR mit genspezifischen Primern, die vor der eigentlichen Gensequenz die Sequenz für die Schnittstellen der Restriktionsenzyme enthalten. Hierbei gibt es, je nach verwendetem Enzym und Vektor, in den später ligiert werden soll, verschiedene Regeln. Immer ist jedoch darauf zu achten, dass zwischen Schnittstelle und Start- bzw. Stoppcoden einige Basen zusätzlich eingefügt werden um zu vermeiden, dass das Gen beim Schneiden wichtige Sequenzteile verliert, falls das Enzym nicht korrekt arbeitet.

#### **4.1.3 Primer für Expressionen**

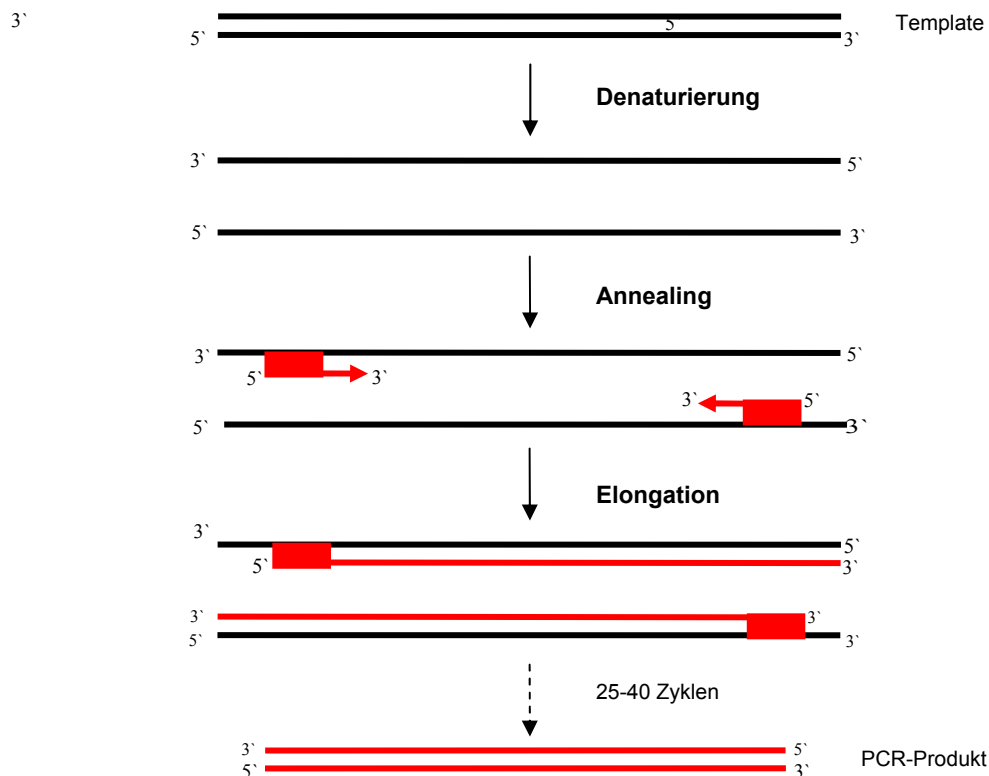
Für die Ligation der Gensequenz in Expressionsvektoren ist es essentiell, spezifische Sequenzen an das Fragment anzufügen. Dies geschieht über Primer, an die die gewünschte Basenfolge vor bzw. nach dem genspezifischen Teil angefügt wurde. Es ist darauf zu achten, dass der genspezifische Teil des Primers ausreichend lang ist, um eine spezifische Bindung zu gewährleisten, und dass der Leserahmen des Gens erhalten bleibt. Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer wurden manuell nach den genannten Regeln konstruiert.

## 4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte, deren flankierende Bereiche bekannt sind. Mit dieser Methode lassen sich sehr kleine Mengen von DNA in kürzester Zeit so oft kopieren, dass sie für weitere Verfahren verwendet werden können.

Eine PCR besteht aus 25 bis 40 Zyklen, die wiederum aus jeweils drei Schritten bestehen (s. Abb. 4.2):

1. Während der Denaturierung werden die DNA-Stränge durch Erhitzen auf 95°C getrennt.
2. In der *Annealing*-Phase lagern sich die Primer an die Einzelstränge an. Die Temperatur ist vom  $T_m$ -Wert der Primer abhängig und wird für gewöhnlich ca. 2°C niedriger als der  $T_m$ -Wert gewählt.
3. Schließlich folgt die Elongation, bei welcher der neue DNA-Strang enzymatisch synthetisiert wird. Dies erfolgt durch die *Taq*-Polymerase bei 74°C.



**Abbildung 4.2:** Schematischer Ablauf einer PCR

Zum Durchführen einer PCR benötigt man die zu vervielfältigende Matrizen-DNA (Template), einen *forward*- und einen *reverse*-Primer, eine hitzestabile DNA-Polymerase mit zugehörigem PCR-Puffer, Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs, d.h. ein Gemisch aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP) sowie einen Thermocycler. Als Polymerase dient für gewöhnlich eine *Taq*-Polymerase (aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*), die ihr Temperaturoptimum bei 72°C besitzt. Um sicherzustellen, dass zu Beginn der PCR alle DNA-Stränge denaturiert vorliegen, wird dem ersten Zyklus eine fünfminütige Phase der initialen Denaturierung bei 95°C vorangestellt. Dem letzten Zyklus folgt eine Phase der terminalen Elongation bei 72°C, in welcher die Polymerase den 3'-Enden der PCR-Produkte ein für die spätere Ligation erforderliches Adenosinphosphat anhängt.

#### 4.2.1 Standard PCR

In der Standard-PCR werden DNA-Fragmente amplifiziert, die im Anschluss in einen Vektor ligiert werden sollen. Auf Eis werden je Gesamtansatz von 50 µl folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

##### Reaktionsansatz (50 µl):

5 µl	10x Puffer (spezifisch für die jeweilige <i>Taq</i> -Polymerase)
5 µl	MgCl <sub>2</sub> (falls nicht im Puffer enthalten) (25 mM)
1 µl	dNTP's (10 mM)
1 µl	<i>Forward</i> -Primer (10 mM)
1 µl	<i>Reverse</i> -Primer (10 mM)
1 µl	PCR-Matrize
1 U	<i>Taq</i> -Polymerase

→ mit *Aqua dest.* Auf 50 µl auffüllen

**PCR-Programm:**

1 x	95°C	5 min
30-35 x	95°C	30 sec
	abhängig von $T_m$	45 sec
	74°C	1 min - 2 min (abhängig von Produktlänge)
1 x	74°C	10 min

**4.2.2 Checking PCR**

Diese PCR wird zur Überprüfung der Länge eines Inserts in einem Plasmid verwendet. Hierbei handelt es sich im Grunde um eine Standard-PCR, bei der zwei vektorspezifische, das Insert flankierende, Primer verwendet werden. Als Matrize wird die Bakterienkultur eingesetzt, die das entsprechende Plasmid enthält. Im Programm wird auf die finale Elongation verzichtet, da das Produkt nicht für eine Ligation verwendet wird.

Die Länge des Inserts kann anschließend auf einem Agarosegel überprüft werden.

**Reaktionsansatz (10 µl):**

1 µl	10x Puffer (spezifisch für die jeweilige <i>Taq</i> -Polymerase)
1 µl	MgCl <sub>2</sub> (falls nicht im Puffer enthalten) (25 mM)
0,2 µl	dNTPs (10 mM)
0,1 µl	<i>Forward</i> -Primer (10 mM)
0,1 µl	<i>Reverse</i> -Primer (10 mM)
0,2 U	<i>Taq</i> -Polymerase

→ mit *Aqua dest.* Auf 10 µl auffüllen

→ Anschließend 1 µl Bakterienkultur als *Template* hinzufügen

**PCR-Programm:**

1 x	95°C	5 min
35 x	95°C	30 sec
	abhängig von $T_m$	45 sec
	74°C	1 min, 10 sec



### **4.3 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Sie beruht auf der unterschiedlichen Beweglichkeit von Molekülen im elektrischen Feld. Dies ist abhängig von deren Nettoladung, Größe und Struktur. Auch die elektrische Feldstärke und die Porengröße des Gels beeinflussen die Wandergeschwindigkeit der Nukleinsäurefragmente.

Agarose wird aus Meeresalgen gewonnen und besteht aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose. Nach Lösen des Agarosepulvers entsteht eine Matrix mit Poren, durch welche die Fragmente in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode wandern. Doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel reziprok proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes, sodass sich kurze Fragmente mit geringerem Molekulargewicht schneller durch die Gelmatrix bewegen als lange. Die Wandergeschwindigkeit der Moleküle wird außerdem durch die Agarosekonzentration, die Stärke des elektrischen Feldes, Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren, Temperatur und verwendeten Puffer beeinflusst.

#### **4.3.1 Vorbereitung des Agarosegels**

Es wurden 1 %ige Agarosegele verwendet, welche eine gute Auftrennung von Fragmenten im Bereich von 0,4 bis 1,5 kb ermöglichten. Die Agarose wurde mit einer entsprechenden Menge Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer vermischt und aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf ca. 50-60°C wurde sie in einen vorbereiteten Gelträger mit Kamm gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde der Kamm entfernt, der Gelträger in eine Laufkammer platziert und mit 1 x TBE überschichtet. Die Proben wurden mit 6 x Probenpuffer vermengt und in die durch den Kamm gebildeten Taschen pipettiert. Die Fragmentgrößen der aufgetrennten DNA-Moleküle konnten durch das zusätzliche Auftragen eines Markers bestimmt werden, welcher DNA-Fragmente bekannter Größe und Konzentration enthielt. Die angelegte Spannung richtete sich nach der Größe des Gels und sollte maximal 10 V/cm<sup>2</sup> betragen. Anhand der Bromphenolblau-Front des Laufpuffers

konnte die Entfernung, welche die DNA im Gel zurückgelegt hatte, abgeschätzt werden.

#### **4.3.2 Färbung des Gels**

Die während der Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäurefragmente können durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Ringsysteme benachbarter Nukleotide und kann durch Bestrahlung mit UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Fluoreszenz liegt bei einer Wellenlänge von ca. 590 nm.

Zu diesem Zweck wurde das Gel 5-10 min in ein Färbebad aus Ethidiumbromid in TBE-Puffer (1,25 U /  $\mu$ l) gelegt, anschließend mit UV-Licht bestrahlt und fotografiert. Die Konzentration der aufgetrennten Nukleinsäuren konnte über die Bandenstärke und den Vergleich mit dem Marker bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

## **4.4 DNA-Isolierung**

### **4.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden**

Um Kontaminationen von DNA-Fragmenten durch unverbrauchte dNTP's und Primer nach einer PCR auszuschließen, ist eine Aufreinigung von DNA beim molekularbiologischen Arbeiten unerlässlich. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf einer Bindung der DNA an eine Glasfaser-Matrix. Diese kann durch einen Elutionspuffer von der Matrix gelöst werden, nachdem unerwünschte Bestandteile der PCR-Ansätze nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten entfernt wurden.

### **4.4.2 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem *NucleoSpin® Extract II Kit* (Machery Nagel) und dem *High Pure PCR Product Purification System* (Roche) nach den Angaben des Herstellers. Beide Systeme nutzen die Eigenschaft von Nukleinsäuren, sich in Anwesenheit von chaotrophen Salzen an die Oberfläche einer Silikatmembran zu binden. Ein Fehlen dieser Salze verhindert, aufgrund der Hydrathülle der DNA, eine Interaktion mit der Matrix-Oberfläche. Das Entfernen von kontaminierenden Substanzen, wie Salzen, Proteinen und anderen zellulären Bestandteilen erfolgt bei diesen Systemen durch mehrmaliges Waschen. Mit einer Lösung niedriger Salzkonzentration kann die DNA anschließend von der Matrix eluiert und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

### **4.4.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA**

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde das *High Pure Plasmid Isolation Kit* von ROCHE verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach dem beiliegenden Protokoll. Dieses basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von

Zellen. Hierbei wird die Bakterienkultur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einem EDTA- und RNase-haltigen Puffer resuspendiert. Durch anschließende Zugabe von NaOH- und SDS-haltigen Lysis-Puffer werden die Zellen aufgeschlossen. Bakterielle Proteine werden denaturiert, RNA wird durch zugegebene RNase degradiert und die bakterielle, chromosomale DNA an die Zellwandreste gebunden. Das Lysat wird anschließend mit Kaliumacetat-haltigem Puffer neutralisiert, Proteine und Zellwandreste mit der gebundenen chromosomalen DNA, sowie andere unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt. Das ebenfalls im Puffer enthaltene chaotrophe Salz Guanidin-HCl sorgt für eine Dehydratisierung der DNA und ermöglicht dadurch eine Bindung an die Glasfasermatrix der ebenfalls im Kit enthaltenen Filtersäulen. An diese Matrix gebunden wird die Plasmid-DNA mit ethanolhaltigen Puffern gewaschen, wodurch verbliebene Kontaminationen entfernt werden. Außerdem führen diese Waschschrte zu einer Entfernung der chaotrophen Salze, wobei durch die Hydrophobizität dieser Puffer die Bindung der DNA an die Silikamembran erhalten bleibt. Schließlich erfolgt die Elution mit einem wässrigen Puffer, wodurch die DNA rehydratisiert wird und so die Bindung zur Silikamembran aufgebrochen wird.

#### **4.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche durch das Lösen von Phosphodiesterbindungen doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen schneiden können. Diese Stellen sind für jedes Enzym spezifische, meist palindromartige Erkennungssequenzen aus etwa vier bis acht Basenpaaren. Viele derartige Enzyme schneiden den DNA-Doppelstrang versetzt, so dass die entstehenden Fragmente an ihren Enden kurze, überstehende Einzelstrangfragmente besitzen (*sticky ends*). Andere Enzyme schneiden die DNA in der Mitte der Sequenz, so dass glatte Enden entstehen (*blunt ends*). Viele Vektoren verfügen über Bereiche mit einer hohen Dichte an Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, sogenannte *multiple cloning sites*. Wird der Vektor an einer solchen Stelle mit zwei Enzymen geschnitten, ermöglichen die so erzeugten *sticky ends* dessen Ligation mit einem DNA Fragment, welches die gleichen kohäsiven Enden aufweist.

3 µg DNA wurden 5 µl eines enzymespezifischen 10 x Puffers zugesetzt, um die optimale Salzkonzentration einzustellen. Nach Zugabe von 3 Units jedes Enzyms wurde der Ansatz mit *Aqua bidest.* auf 50 µl aufgefüllt. Nach einer 16 stündigen Inkubation bei 37°C folgte eine Inaktivierung der Enzyme bei 65°C für 20 min, sowie die Aufreinigung der geschnitten DNA bzw. des Vektors (s. 4.4.1).

## 4.6 Klonierung

### 4.6.1 Grundlagen

Als Klonierung von DNA bezeichnet man die Insertion von DNA-Fragmenten in geeignete Zielmoleküle (Vektoren), um diese anschließend in Wirtszellen zu übertragen. Die Fusion von Vektor und DNA-Fragment, die Ligation, nutzt den Umstand, dass DNA-Moleküle in Gegenwart von entsprechenden Enzymen (Ligasen, Topoisomerasen) miteinander fusioniert (ligiert) werden können und das entstehende DNA-Konstrukt, geeignete Enden vorausgesetzt, zirkularisiert wird (Cohen et al., 1973). Als Zielmoleküle dienen in der Regel Vektoren, welche, je nach späterem Einsatzgebiet des Konstrukts, für die Expression oder Amplifizierung des eingefügten DNA-Fragments optimiert wurden. Bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuchen wurde als Vektor pGEM<sup>®</sup>-T System I (Promega) verwendet. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein synthetisches Bakterienplasmid, welches speziell für die Amplifizierung des inserierten DNA-Fragments generiert wurde. Dieser Vektor nutzt die Tatsache, dass DNA-Fragmente, welche durch die *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden, an ihren Enden überhängende Adenosinphosphate aufweisen, was durch die terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase bedingt wird (s. 4.2). Diese sogenannten *sticky ends* eignen sich für die Hybridisierung mit überhängenden Thymidinphosphaten, welche sich an den Enden des genannten Vektors befinden. Das Vektormolekül trägt außerdem noch mehrere funktionelle DNA-Sequenzen, die eine spätere Selektion, Amplifizierung und Exzision des ligierten DNA Fragments ermöglichen. Namentlich ist dies die *multiple cloning site* (MCS), ein Bereich in welchem mehrere Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen angeordnet sind. Außerdem enthält der Vektor

Antibiotikaresistenzen - sie ermöglichen die spätere Selektion der erfolgreich transformierten Zielzellen -, sowie das Gen der  $\beta$ -Galaktosidase, das ebenfalls der Selektion dient (s. 4.6.4). Nach erfolgter Ligation werden die Vektormoleküle in speziell vorbereitete Bakterienzellen (chemisch kompetente Zellen) übertragen. Dieser Vorgang, die Transformation (s. 4.6.3), wird durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung (Hitzeschock) oder eine elektrische Entladung innerhalb des Mediums (Elektroporation) ausgelöst. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Transformationen wurden ausschließlich unter Anwendung des Hitzeschocks durchgeführt.

Die transformierten Zellen werden dann auf einem Selektivmedium, welches auf die vektorkodierten Antibiotikaresistenzen abgestimmt ist, ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und die positiven Klone durch die Blau-Weiß-Selektion ermittelt.

#### 4.6.2 Ligation

Für die Ligation wurde das pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I (Promega) verwendet, welches bereits alle für die Ligation benötigten Komponenten enthielt. Lediglich das zu ligierende PCR-Fragment musste bereitgestellt werden. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Alternativ wurden Ligationen auch für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, die Ausbeute hierbei ist jedoch geringer.

Reaktionsansatz (10 $\mu$ l):

5 $\mu$ l	Ligasepuffer (2x)
1 $\mu$ l	pGEM-T Vektor (linearisiert)
1 $\mu$ l	PCR-Produkt
1 $\mu$ l	T4- DNA-Ligase
2 $\mu$ l	<i>Aqua dest.</i>

### 4.6.3 Transformation

Bei der Transformation werden Vektormoleküle in ein Bakterium eingeschleust, um die darin enthaltenen Sequenzen entweder zu amplifizieren oder zu exprimieren. Auch unter natürlichen Bedingungen sind Bakterien in der Lage in geringem Maße DNA-Moleküle aufzunehmen. Um die Effizienz dieses Vorgangs für experimentelle Zwecke zu erhöhen, bedient man sich so genannter „kompetenter Zellen“, deren Zellwand z. B. durch eine Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  verändert wurde. Diese Zellwandveränderungen können durch einen Hitze- bzw. Elektroschock soweit verstärkt werden, dass Vektormoleküle in die Zellen eindringen können.

Bei den im Verlauf der hier beschriebenen Versuche verwendeten Zellen handelte es sich um NovaBlue<sup>TM</sup> Competent Cells der Firma NOVAGEN. Diese wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert und vor Gebrauch für 5 min auf Eis aufgetaut. Danach wurden 25  $\mu\text{l}$  der Zellen mit 1  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes vermischt und nochmals 5 min auf Eis gehalten. In dieser Zeit lagerte sich die DNA an die Zellen an und wurde dann während des folgenden Hitzeschocks (30 sek.) von den Zellen aufgenommen. Daraufhin wurde der Ansatz noch 2 min auf Eis belassen, damit sich die Zellwand stabilisieren konnte. Um den Zellen Zeit zu geben, die Antibiotikaresistenz auszubilden, wurden anschließend 125  $\mu\text{l}$  SOC-Medium zugegeben und der Ansatz für 45 min bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Schüttler inkubiert. Danach wurden 40-70  $\mu\text{l}$  davon auf Ampicillin, X-Gal und IPTG- haltigen Nährböden (s. 4.6.5) ausplattiert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 4.6.4 Selektion der transformierten Bakterien

Die Bakterien, welche das PCR-Fragment enthalten, müssen nun einerseits von jenen getrennt werden, die kein Plasmid aufgenommen haben und von jenen, die nur den religierten Vektor ohne Insert oder ein zirkularisiertes PCR-Fragment enthalten. Erstere und letztere werden schon von vornherein ausgeschlossen, da sie auf dem ampicillinhaltigen Nährboden nicht wachsen können. Um Bakterien mit religiertem Vektor auszuschließen bedient man sich der „Blau-Weiß-Selektion“. Diese basiert auf der so genannten  $\alpha$ -Komplementation. Hierbei wird ein Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase, das  $\alpha$ -Fragment, vom Klonierungsvektor kodiert, während ein

weiteres, das  $\omega$ -Fragment, vom Genom des *E. coli*-Stammes kodiert wird. Beide Fragmente zusammen ergeben ein funktionelles Enzym, dessen Aktivität über das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) nachgewiesen werden kann. Dieses wird abgebaut, und es entsteht der blaue Farbstoff 5-Bromo-4-Chlor-Indigo, welcher die Bakterienkolonien anfärbt. Durch Insertion eines DNA-Fragments in die *multiple cloning side* des Vektors kann kein funktionelles  $\alpha$ -Fragment exprimiert werden. Somit kann auch keine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase entstehen und die Kolonien bleiben weiß. Das dem Nährboden zugegebene IPTG dient als Induktor der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression wird aber, im Gegensatz zum eigentlichen Induktor der Allolaktose, nicht abgebaut.

Mit diesen weißen Kolonien wurden 12  $\mu$ l ampicillinhaltiges LB-Medium beimpft und nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde mit diesen Kulturen eine Checking-PCR durchgeführt (s. 4.2.2)

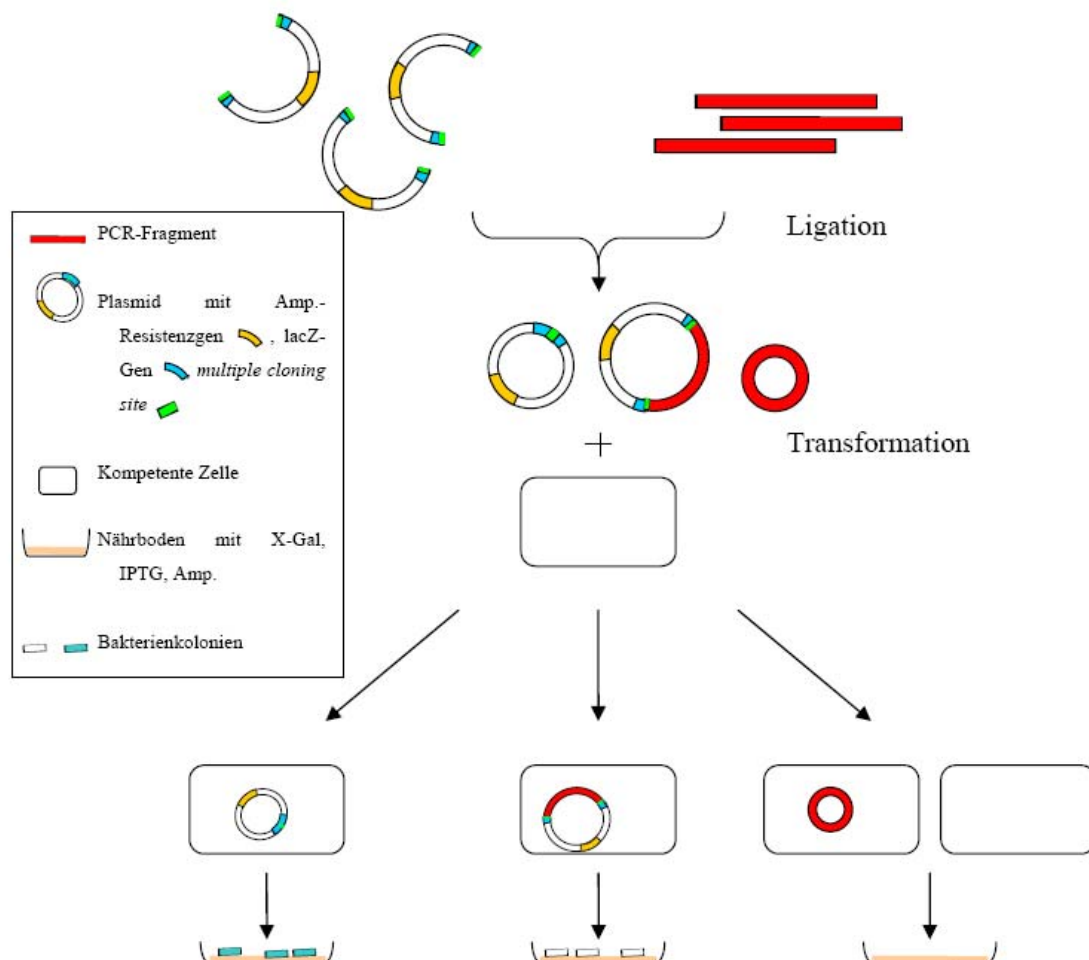


Abbildung 4.6.4: Blau-Weiß-Selektion (Beschreibung siehe Text)



#### 4.6.5 Herstellung der Agar-Platten für die Selektion

Zunächst wurde LB-Agar (Lab M) nach Herstellerangaben angesetzt, autoklaviert und im Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Danach konnte Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (0,5 mM) und in DMF gelöstes X-Gal (80 µg/ml) unter Rühren zugegeben werden. Nach dem Ausgießen dieses Mediums in Petrischalen wurden die erkalteten Platten luftdicht bei 4°C gelagert.

#### 4.6.6 Herstellung von Flüssigkulturen

Während Bakterienkulturen auf festen Nährmedien (Agar-Platten) der Isolation einzelner Klone dienen, findet für die quantitative Vermehrung eines einzelnen Klons bzw. des enthaltenen Plasmids die Flüssigkultur Verwendung.

Hierzu wurden 3-4 ml mit Ampicillin (100 µg/ml) versetztes LB-Medium (Lab M) mit 1,5 µl der durch die Checking-PCR als positiv ermittelten Bakterienkulturen angeimpft. Die Inkubation der Kulturen bei 37°C erfolgte über Nacht in einem Schüttler bei 250 U/min.

#### 4.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine OD-Messung der entsprechend verdünnten Nukleinsäurelösung bei dieser Wellenlänge ermöglicht das Errechnen der DNA- bzw. RNA-Konzentration aus der ermittelten Absorption (Ausubel et al., 1994):

Nukleinsäurekonzentration [µg/ml]	Formel
doppelsträngige DNA	$50 \times OD_{260}$
einzelsträngige DNA	$37 \times OD_{260}$
einzelsträngige RNA	$40 \times OD_{260}$

Diese Konzentrationsmessung wurde unter anderem nach einer Plasmidpräparation und vor einer Sequenzierreaktion durchgeführt (s. 4.4.2 und 4.8.1).

## 4.8 Sequenzierung

Unter Sequenzierung versteht man die Bestimmung der Abfolge der Nukleotide in einer Nukleinsäuresequenz. Die hier verwendete Technik wurde aus dem enzymatischen Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) entwickelt. Dieses basiert auf dem statistischen Einbau von 2', 3'-Dideoxyribonukleotiden (ddNTPs) in ein DNA-Molekül während der Replikation. Wird ein ddNTP in den wachsenden DNA-Strang eingebaut, so bricht die Replikation an dieser Stelle ab, da die DNA-Polymerase ein 3'-OH benötigt um weitere dNTPs anzufügen (Kettenabbruch). Die ddNTPs sind im Reaktionsgemisch neben den "normalen" dNTPs vorhanden. Da der Einbau der ddNTPs zufällig erfolgt, werden DNA-Moleküle mit unterschiedlichen Längen synthetisiert, welche jeweils identische ddNTPs an ihrem 3'-Ende tragen. Diese Reaktion wird für alle ddNTPs getrennt mit der gleichen DNA-Matrize durchgeführt. Trennt man diese Ansätze nun nebeneinander auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe auf, kann man die Basenabfolge anhand des Bandenmusters ablesen (s. Abb. 4.8).

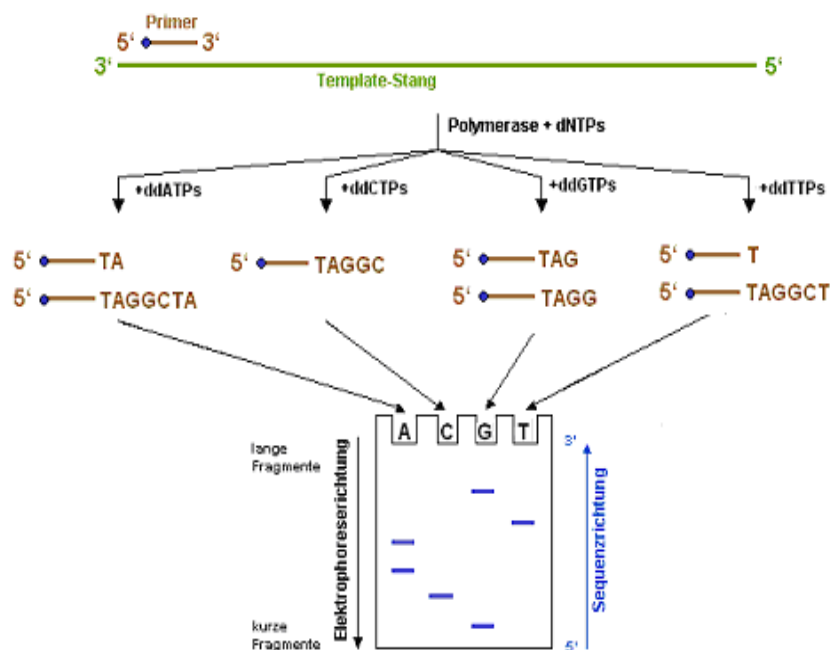


Abbildung 4.8: Schematischer Ablauf einer Sequenzierung

### 4.8.1 Sequenzierreaktion

Für eine Sequenzierreaktion (*Cycle-Sequencing*) wird das zu sequenzierende PCR-Fragment in einem Plasmid, die DNA-Polymerase, der markierte Primer, dNTP's und für jede Base das entsprechende ddNTP benötigt. Da bei dieser Reaktion nur ein Primer eingesetzt wird und so nur die zu Anfang eingesetzte DNA als Matrize dienen kann, ergibt sich keine exponentielle Amplifikation wie bei einer PCR, sondern eine lineare. Durch den zufälligen Kettenabbruch entstehen Produkte unterschiedlicher Länge, deren 5'-Ende aus dem fluoreszenzmarkierten, vektorspezifischen Primer und deren 3'-Ende aus dem jeweiligen ddNTP besteht. Die eigentliche Sequenzierreaktion ist eine Abwandlung der „normalen“ PCR und wird unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt.

Verwendet wurden ddNTP Reaktionsmische (Amersham Pharmacia), welche außer dem zu sequenzierenden Plasmid und dem gelabelten Primer bereits alle benötigten Komponenten enthielten. Von diesen Mixen wurden jeweils 1,5 µl vorgelegt. Plasmid und Primer wurden für alle vier Einzelreaktionen pro Probe zusammen angesetzt. Anschließend wurden je 4,5 µl dieses Ansatzes zu den vorgelegten Reaktionsmischungen gegeben.

Reaktionsansatz:

1,5 µg Plasmid

1-2 µl IR<sub>800</sub> gelabelter Primer (2mM) je nach Alter des Primers

→ mit *Aqua dest.* (sterilfiltriert) auf 18,75 µl auffüllen

→ je 4,5 µl dieses Ansatzes zu 1,5 µl Reaktionsmix (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) zugeben

Cycle-Sequenzierung-Programm:

1 x	95°C	5 min
30-35 x	$\left\{ \begin{array}{l} 95^\circ\text{C} \\ 55^\circ\text{C} \\ 70^\circ\text{C} \end{array} \right.$	30 sek.
		20 sek.
		45 sek.

Im Anschluss an die Reaktion wurden die Ansätze noch einmal für 4 min bei 95°C denaturiert und direkt auf Eis abgekühlt, um ein Renaturieren zu verhindern. Schließlich wurden pro Ansatz noch 3 µl Ladepuffer zugegeben, welcher durch das

enthaltene Formamid ebenfalls dazu beitrug, dass die DNA einzelsträngig blieb. Danach wurden die Proben entweder direkt auf das Sequenziergel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

#### 4.8.2 Herstellung des Sequenziergels

Als Träger für das Gel wurden spezielle Glasplatten verwendet, welche eine Laserabtastung bei der benötigten Wellenlänge erlauben. Diese Glasplatten wurden mit *Aqua dest.* und Isopropanol gereinigt und, durch zwei seitliche *Spacer* mit einer Dicke von 0,25 mm getrennt, aufeinander gelegt. Zur Herstellung des Gels wurde das System *Sequagel complete* von *NATIONAL DIAGNOSTICS* verwendet. Dieses besteht aus zwei Komponenten, von denen die erste (SequaGel XR) Harnstoff, Acrylamid und N,N`-Methylenbisacrylamid enthält und die zweite (Sequagel complete, Buffer Reagent) 5 x TBE und TEMED. Die beiden Komponenten wurden gemischt, sterilfiltriert und mit Amoniumperoxodisulfat (APS) versetzt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Ein Vorkamm sorgte für die Bildung der Geltasche während das Gel 2h polymerisierte.

Gelansatz (30 ml pro Gel):

6 ml	Buffer Reagent
24 ml	SequaGel XR
175 µl	APS (10%)

#### 4.8.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Nachdem das Gel polymerisierte, wurde der Vorkamm entfernt, die entstandene Tasche von Gelresten befreit und die Glasplatten noch einmal gereinigt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Während eines 40 minütigen Vorlaufs (1500 V) wurde das Gel auf 50°C erwärmt und mit dem Laufpuffer äquilibriert.

Nachdem der Vorlauf beendet war, wurde der Probenkamm (*48 well shark-tooth comb*) in die Geltasche eingesetzt und mit jeweils 1,3 µl der Sequenzieransätze in der Reihenfolge ACGT beladen. Die Elektrophorese dauerte 9 h und wurde ebenfalls

mit 1500 V durchgeführt. Das vom Laser erfasste Signal wurde als *TIFF*-Datei gespeichert und von einem Image-Analyse-Programm (Li-Cor e-Seq) in eine Basensequenz übersetzt, welche aber noch zusätzlich manuell überprüft wurde.

#### 4.8.4 Sequenzanalyse

Die erhaltenen Sequenzen wurden miteinander aliniert (DNA-Star; DNASTar Inc., Madison) um das komplette Gen zu erhalten. Um die Identität der sequenzierten Fragmente zu bestimmen, wurden die Sequenzen mit Gendatenbanken im World Wide Web verglichen. Hierzu wurde das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) verwendet. Die vollständig sequenzierten Gene wurden miteinander und mit Sequenzen desselben Gens anderer Organismen computergestützt aliniert (Vector NTI, Invitrogen, Karlsruhe). Nukleotidsequenzen wurden mit DNAsis (Hitachi Software Engineering Co., Ltd, Japan) in die jeweilige Aminosäuresequenz übersetzt.

#### 4.9 Expression von Fusionsproteinen in Prokaryoten

Fusionsproteine lassen sich unter Verwendung des *QIAexpress*-Expressionssystems in hohen Konzentrationen in Bakterienzellen *in vivo* synthetisieren und durch Affinitätschromatographie aufreinigen. Anschließend können diese Proteine für vielfältige Anwendungen verwendet werden, z.B. Antikörperherstellung (s. 4.10).

Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wird dazu über TA-Klonierung in einen Expressionsvektor so *in frame* ligiert, dass sie zwischen einem starken Promotor am 5'-Ende und einer 6 x His-kodierenden Sequenz (*His-Tag*) am 3'-Ende zu liegen kommt. Anschließend folgt eine Transformation des Konstrukts in einen geeigneten *E. coli*-Stamm, welcher nach Induktion mit IPTG das Fusionsprotein synthetisiert. Über die Oligohistidinsequenz und unter Verwendung einer  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie, lässt sich das Protein aus lysierten Zellen isolieren.

#### 4.9.1 Expression mit dem pTrc-His2 TOPO TA Vektor

Der pTrcHis2-TOPO-Vektor ist ein linearer Vektor, der einzelne 3'-Thymidin Überhänge, sowie kovalent gebundene Topoisomerase I für die TA Klonierung enthält. Der Vektor besitzt am 5'-Ende des Polylinkers neben dem Promotor noch ein Start-ATG und am 3'-Ende nach dem His-Tag ein Stoppcodon. Weitere Eigenschaften des Vektors sind: ein *trc*-Promotor, welcher von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird, eine *lac*-Operator-Sequenz, zur Bindung des *lac*-Repressors, ein Ampicillin-Resistenz-Gen (*bla*) und ein pBR322 ori (Bolivar, 1978). Zur Transformation (s. 4.6.3) wurde der *TOP10*-Stamm von *E. coli* eingesetzt, welcher ausreichende Mengen des *lac*-Repressors produziert, um die Transkription des ligierten Fragments zu verhindern. Die Expression des rekombinanten Proteins wird erst durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert, welches an das *lac*-Repressor-Protein bindet und dieses inaktiviert. Erst dann kann die RNA-Polymerase die Sequenz stromabwärts des Promotors transkribieren.

#### 4.9.2 Expression im pBAD/gIII A Vektor

Der pBAD/gIII A-Vektor von Invitrogen verfügt, genauso wie der pTrcHis2-Vektor über ein C-terminales *c-myc* Epitop, sowie eine Polyhistidinregion. Im Gegensatz zum pTrcHis2 liegt dieser Vektor zirkulär vor und verfügt über mehrere Restriktionsschnittstellen. Um das gewünschte Gen in diesen Vektor ligieren zu können, müssen die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen mittels PCR angefügt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnittstellen nicht ebenfalls innerhalb der Gensequenz vorkommen, da das Gen sonst innerhalb des kodierenden Bereiches geschnitten wird. Ebenso wurde kontrolliert, dass der offene Leserahmen auch nach der Ligation erhalten bleibt, was die korrekte Expression des gesamten Gens gewährleistet. Nachdem die Schnittstellen mittels PCR an das Gen angefügt wurden, konnte ein Restriktionsverdau des Vektors und der PCR-Produkte wie unter 4.5 beschrieben, durchgeführt werden.

Die Ligation wurde über Nacht bei 4°C im Verhältnis 1:2 von PCR-Produkt zu Vektor durchgeführt. Nach Transformation in kompetente *E. coli TOP10* Zellen, konnte der Klon durch Sequenzierung identifiziert werden, der das gewünschte Zielgen in

korrekter Orientierung, Sequenz und in voller Länge enthält. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch die Zugabe von 0,2% L-Arabinose (Endkonzentration) induziert.

#### **4.9.3 Expression eines Fusionsproteins**

Um größere Mengen des Fusionsproteins zu erhalten, wurden 200 ml LB/Amp (100 µg/ml) mit einer über Nacht inkubierten Starterkultur angeimpft und bei 37°C/200 rpm gehalten. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 (als Maß für die Zelldichte) wurde mit 1 mM IPTG oder 0,2% L-Arabinose induziert (16 h, 200 rpm, 37°C). Zum Schluss wurden die Bakterien durch Zentrifugation (20 min, 5000 x g, RT) pelletiert.

#### **4.9.4 Kryokonservierung**

Die Kryokonservierung dient der Langzeit-Lagerung von Bakterien bei -80°C. Hierzu wird der Bakterienstock mit glycerolhaltigem Puffer versetzt, dieser schützt die Zellen dabei vor einer eventuellen Schädigung durch Eiskristalle.

Zwecks Kryokonservierung wurde die jeweilige Bakteriensuspension mit 15 %igem sterilfiltrierten Einfriermedium (v/v) versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### **Zusammensetzung des verwendeten Einfriermediums:**

- 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 100 mM MgSO<sub>4</sub>
- 65% Glycerol

#### **4.9.5 Aufreinigung eines Fusionsproteins**

Die Aufreinigung erfolgte nach Anleitung des *QIAexpressionist*-Handbuchs. Das Prinzip hierbei beruht auf einer Bindung des rekombinanten Proteins über den *His*-

*Tag* (einem Schwanz aus 6 Histidinresten) an immobilisierte  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen, welche zusammen mit NTA (Nitrilotriacetidacid) einen Chelatkomplex ausbilden (Hochuli et al., 1987). Dieser Komplex, gekoppelt an Agarose, stellt zugleich das Säulenmaterial dar (Porath et al., 1975; Sulkowski, 1985). Gebundene *His-Tag*-Proteine können durch Erhöhung der Imidazolkonzentration (konkurriert mit den  $\text{Ni}^{2+}$  Bindungsstellen des  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA) oder durch Absenken des pH-Wertes (Protonierung der Histidinreste) von der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix gelöst werden.

Die notwendigen Materialien und Puffer zur Isolierung von Fusionsproteinen entstammen dem *QIAexpressionist* Typ V.

#### 4.9.5.1 Extraktion unter nativen Bedingungen

Das Bakterienpellet wurde in 5 ml Lysis-Puffer (10 mM Imidazol) pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und für eine Stunde bei 4°C gerührt, um die Lyse der Zellen herbeizuführen. Anschließend folgte noch eine Sonifizierung für 4 x 5 Sekunden bei 300 W auf Eis. Durch eine folgende Zentrifugation (5000 x g, 30 min, 4°C) wurde die Zelldebris von den löslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde dann mit 1 ml  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose pro 4 ml Lysat versetzt und eine Stunde bei 4°C gerührt. Diese Suspension, welche das an die Matrix gebundene rekombinante Protein enthält, wurde auf eine Polypropylensäule (Pierce) gegeben und der Durchfluss verworfen. Nach dreimaligen waschen mit je 4 ml Wasch-Puffer (20 mM Imidazol), konnte das Protein mit je 2 x 3 ml Elutions-Puffer (250 mM Imidazol) eluiert werden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 4.9.6) wurde eine SDS-PAGE (s. 4.11) zur Kontrolle der Expression durchgeführt.

Lysispuffer pH 8,0	Waschpuffer pH 8,0	Elutionspuffer pH 8,0
10 mM Imidazol 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 300 mM NaCl	20 mM Imidazol 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 300 mM NaCl	250 mM Imidazol 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 300 mM NaCl

**Tabelle 4.9.5.1:** Zusammensetzung der Puffer zur nativen Aufreinigung



#### 4.9.5.2 Extraktion unter denaturierten Bedingungen

Die Aufreinigung unter denaturierten Bedingungen wird durchgeführt, da ein großer Teil der Proteine von Bakterien in sogenannten *inclusion bodies* gespeichert wird. Um diese aufzuschließen wurde das Bakterienpellet in 5 ml Solubilisierungspuffer (Puffer B) resuspendiert. Dieser Puffer enthält 8 M Harnstoff, welcher die *inclusion bodies* aufschließt und die enthaltenen Proteine entfaltet. Nach einer Inkubation von einer Stunde, folgten 3 bis 4 Ultraschallbehandlungen für 10 Sekunden und anschließend eine Zentrifugation von 30 Minuten bei 10.000 x g und 4°C. Der Überstand wurde mit 1 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose pro 4 ml Lysat versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ende der Inkubation wurde das Protein Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Gemisch in eine Polypropylensäule geladen. Nachdem sich das Gemisch abgesetzt hatte, wurde der Durchfluss geöffnet und die Lösungen aufgefangen. Es folgten zwei Waschschrte mit dem Puffer C und zwei Elutionsschritte mit den Puffern D und E.

Lysispuffer B pH 8,0	Waschpuffer C pH 6,3	Elutionspuffer D pH 5,9	Elutionspuffer E pH 4,5
8 M Urea 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM Tris/HCl	8 M Urea 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl	8 M Urea 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl	8 M Urea 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl

**Tabelle 4.9.5.2:** Zusammensetzung der Puffer zur denaturierten Aufreinigung

#### 4.9.6 Quantifizierung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines Extraktes wurde die photometrische Methode nach Bradford eingesetzt (Bradford, 1976). Das dabei verwendete Roti-Quant enthält *Coomassie Brilliant-Blue R250*, welches in drei Zuständen vorkommt (kationisch, neutral und anionisch), die bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Dies kann im ELISA-Reader nachgewiesen werden. Durch Bindung eines Proteins, hauptsächlich mit seinen basischen Aminosäuren, wird der Farbstoff in den anionischen Zustand überführt. Dieser Übergang führt zu einer Absorptionsänderung, welche bei 595 nm gemessen werden kann. Für die Messung wurden 25 µl eines Proteinextraktes bzw. diverser BSA-Verdünnungen (Bovines Serumalbumin) mit definierter Proteinkonzentration mit 1 ml Roti-Quant gemischt und

fünf Minuten inkubiert. Die Blindprobe, bestehend aus dem jeweiligen Probenpuffer, wurde der gleichen Prozedur unterzogen. In jeweils zwei benachbarte *wells* einer 96-*well* Platte wurden je 100 µl der BSA-Verdünnung, sowie der Probenlösung pipettiert und die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Aus den gemessenen Werten wurden die Mittelwerte berechnet und anhand der durch die BSA-Verdünnungsreihe ermittelten Eichkurve, konnten die Proteinkonzentrationen der Extrakte bestimmt werden.

#### **4.9.7 Renaturierung des denaturiert aufgereinigten Proteins**

Ziel dieser Methode ist es, Proteine, die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurden, zu renaturieren. Im Anschluss können dann Tests zur Funktionsweise am aktiven Protein durchgeführt werden.

Hierzu wurde das aufgereinigte Protein in eine Dialyse Kassette (Slide-A-Lyzer Dialyse Kassette; Pierce, #66380) geladen und über Nacht bei 4°C gegen einen Liter Renaturierungspuffer (0,7 M L-Arginine, 5.0 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 10 mM reduziertes Glutathion (GSH), 1 mM oxidiertes Glutathion (GSSG), pH 7,2) unter rühren dialysiert. Anschließend wurde eine weitere Dialyse gegen einen Liter Aufbewahrungspuffer (TBS pH 7,5) durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte vor und nach der Renaturierung nach der Methode von Bradford (s. 4.9.6).

#### **4.10 Herstellung polyklonaler Antikörper**

Polyklonale Antikörper lassen sich durch mehrfache Immunisierung von z. B. Kaninchen oder Mäusen erzeugen (Ausubel et al., 1994). Dabei wird der Antikörper nach Injektion des Antigens von verschiedenen B-Zellen des Kaninchens gebildet und stellt eine Mischung von Immunglobulin-Molekülen dar, die die verschiedenen Epitope des Antigens erkennen und an ihnen binden. Damit steht ein wichtiges Werkzeug für den Nachweis des Antigens mittels immunologischer Methoden, wie z. B. einer Immundetektion im Rahmen eines Western Blots (s. 4.11.2) oder bei der

immuncytochemischen Färbung von Gewebeschnitten, zur Verfügung. Die Immunisierung, die Serumzubereitung und die Titerbestimmung erfolgte durch die freundliche Unterstützung von Frau Dr. Bärbel Diehl-Seifert (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W.E.G. Müller).

#### **4.10.1 Immunisierung und Serumzubereitung**

Zur Immunisierung weiblicher Kaninchen (Weiße Neuseeländer) wurde ein, in einem prokaryotischen System exprimiertes, rekombinantes Protein (s. 4.9) als Antigen eingesetzt. Nach Abnahme von Blut, welches zur Herstellung des Präimmunserums diente, erfolgt die Immunisierung insgesamt dreimal in einem Abstand von je vier Wochen subkutan. Als Immunantwort bilden die B-Lymphozyten IgG-Immunglobuline gegen das Antigen. Jeweils 12 Tage nach der zweiten bzw. dritten Immunisierung wurde dem Versuchstier Blut aus der Ohrvene, zur Überprüfung des Antikörpertiters, entnommen (s. 4.10.2). Bei Vorlage eines ausreichenden Titers wurde dem Kaninchen 15 ml Blut abgenommen. Dieses Blut, wie auch das vor der Immunisierung entnommene, wurde zur Serumzubereitung 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an eine weitere einstündige Inkubation, diesmal auf Eis, wurde es dann 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nachfolgend ließ sich das Serum von geronnenen Bestandteilen trennen und bei -20°C lagern.

#### **4.10.2 Bestimmung des Antikörpertiters**

Zur Überprüfung der Immunisierungseffizienz wurden ELISA-Platten mit dem entsprechenden Antigen beschichtet und mit Antiserum (bzw. Präimmunserum als Kontrolle) inkubiert. Im Anschluss daran wurde gebundener Primärantikörper durch einen weiteren Antikörper detektiert und die gebildeten Komplexe durch eine Farbstoffreaktion des an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms sichtbar gemacht. Zum Zwecke der Beschichtung von ELISA-Platten wurden 100 µl Antigenlösung (1 µg/ml Carbonatpuffer) in die *wells* einer 96-*well* Platten pipettiert. Nach einem dreistündigen Trocknungsschritt bei RT wurden nichtgebundene Komponenten durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anlässlich der

Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die *wells* jeweils mit 150 µl 3 %igem BSA (w/v) in PBS bei 4°C ü.N. inkubiert. Im Anschluss an drei Waschschriffe mit PBS wurden für die folgende Antikörperreaktion verschiedene Verdünnungen des Präimmun- und Antiserum in PBS eingesetzt (1:100 bis 1:2000; bei Serum nach der dritten Immunisierung 1:500000). Dazu wurden pro *well* 100 µl der jeweiligen Verdünnung für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBS wurden in jedes *well* 100 µl des mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Rabbit-Sekundärantikörper gegeben (Verdünnung 1:2000 in PBS). Im Anschluss an eine 30 minütige Inkubation bei RT und drei folgenden Waschschriffen mit PBS wurden 100 µl einer gebrauchsfertigen Substratlösung in jedes *well* pipettiert. Die enzymatisch katalysierte Farbreaktion wurde nach 10 minütiger Inkubation im Dunkeln durch Zugabe von 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) abgestoppt und bei 450 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers ausgewertet.

PBS-Puffer, pH 7,2	Carbonatpuffer	Substratlösung
137 mM NaCl 2,7 mM KCl 9,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 mM NaHCO <sub>3</sub>	1,25 mM Tetramethylbenzidin 2,2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

**Tabelle 4.10.2:** Verwendete Medien für Bestimmung des Antikörpertiters

#### 4.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt (Laemmli, 1970), um dies zu erreichen verwendet man negativ geladenes SDS (Natriumdodecylsulfat). Dieses bewirkt nicht nur eine Denaturierung der Proteine, sondern lagert sich auch in konstantem Gewichtsverhältnis an jene an, was dazu führt, dass die so entstandenen Komplexe in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Die negative Nettoladung der Komplexe ist dabei proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte (Weber and Osborn, 1969). Durch Zugabe von β-Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken kovalent verknüpfter Proteinuntereinheiten voneinander getrennt.

Für die SDS-PAGE wurden neben den verwendeten NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> Bis-Tris Mini Gelen mit einer Gelmatrix aus einem 4 – 12 %igen Acrylamid/Bisacrylamid-

Gradienten weitere Polyacrylamid-Gele angefertigt. Zunächst wurde das 12 %ige Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht stattfindet, nach angegebenem Schema pipettiert (s. Tab. 4.11). Durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisation der Gellösung gestartet bzw. beschleunigt.

	Trenngel (12%)	Sammelgel (6%)
Rotiphorese Gel 30	4,0 ml	2,0 ml
1,0 M Tris HCl, pH 6,8	-	2,5 ml
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
10 %iges SDS (w/v)	0,05 ml	0,05 ml
<i>A. bidest</i>	3,3 ml	5,3 ml
10 %iges APS (w/v)	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

**Tabelle 4.11:** Pipettierschema für die eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele

Da die Proteinaufreinigung mittels eines diskontinuierlichen Verfahrens stattfinden sollte, wurde auf das polymerisierte Trenngel ein niederprozentiges Sammelgel gegossen. Der Einsatz eines Kammes sorgte hierbei für die Aussparung der Probenaschen. Zur Herstellung der Gele und zum anschließenden vertikalen Gellauf wurde vom Mini-Protean II System von Bio-Rad oder vom XCell SureLock™ Mini-Cell Gebrauch gemacht.

Nach dem Mischen der Proben mit 4 x Probenpuffer (s. 3.3) wurden diese 10 min bei 95°C denaturiert und gegebenenfalls mit Ultraschall für weiteren Zellaufschluss behandelt. Die verwendeten Polyacrylamidgele wurden mit gleicher Menge denaturiertem Protein beladen und die Elektrophorese unter Verwendung eines Tris-Laufpuffers (Laemmli-Puffer für angefertigte Gele) bzw. MOPS-SDS-Laufpuffers (NuPAGE Gele) bei 120 V / 90 min durchgeführt.

#### 4.11.1 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant-Blue

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen wird Coomassie Brilliant-Blue eingesetzt, da es unspezifisch an Proteine, nicht aber an die Gelmatrix bindet. Proteine erscheinen daher nach der Färbung des Gels als blaue Banden auf

farblosem Hintergrund. Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Gel für 3 x 5 min mit 200 ml *Aqua dest.* gewaschen, um das SDS und Puffersalze zu entfernen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Färbelösung inkubiert. Durch erneutes mehrmaliges Waschen wurde der Hintergrund solange entfärbt, bis sich die blauen Proteinbanden deutlich abzeichneten.

Für das Färben der gegossenen Polyacrylamid-Gele wurde die Färbelösung GelCode Blue Stain Reagent (Pierce) verwendet und für die in NuPAGE-Gele aufgetrennten Proteine wurde die Färbelösung SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) genutzt.

#### 4.11.2 Western Blotting

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden beim Western Blotting quantitativ aus dem Gel an die Oberfläche einer Membran transferiert. Auf diese Weise werden die Proteine, deren Trennmuster erhalten bleibt, für den Nachweis mit immunologischen Methoden zugänglich (Towbin et al., 1979). Der Nachweis der auf die Membran transferierten Proteine erfolgt durch Bindung geeigneter Antikörper.

Für den Transfer der Proteine wurde das „iBlot™ Dry Blotting System“ von Invitrogen verwendet. Dieses System besteht aus mehreren Komponenten, die einen schnellen und erfolgreichen Transfer ermöglichen.

Zuerst wurde das SDS-Gel in Wasser gewaschen und anschließend auf die „iBlot™ Anode Stack Bottom“ platziert. Diese besteht aus drei Teilen, einer Kupferelektrode, einer Gelschicht und einer Nitrozellulosemembran. Um das Gel vor Austrocknung zu schützen, wurde als nächstes ein angefeuchtetes Filterpapier darüber gelegt. Danach wurde die „iBlot™ Cathode Stack Top“ so aufgelegt, dass die darin enthaltene Gelmatrix auf dem Filterpapier lag und die Kupferkathode nach oben zeigte. Zum Abschluss wurde in den Deckel noch ein Einmalschwamm gelegt, der sich eventuell bildende oder überschüssige Flüssigkeit aufsaugen und für den nötigen Druck sorgen sollte. Der Transfer dauert mit diesem System maximal 7 Minuten, je nach Größe des zu transferierenden Proteins.

Nach dem Blotten wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einer 5%igen Milchlösung (Milchpulver in TBS-T) inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen und so eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu unterbinden.

Nach dem Blockierungsschritt wurde der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 ebenfalls in 5 %iger Milchlösung zugegeben und für 3 h bei RT inkubiert. Die anschließenden Waschschriffe dienten zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern.

Die Proteindetektion erfolgte auf indirektem Weg durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper, welche gegen das spezifische Immunglobulin des Primärantikörpers gerichtet waren. Diese Sekundärantikörper, meist Anti-Maus oder Anti-Kaninchen, besitzen eine „Alkalische Phosphatase“, welche eine Detektion der Antikörper durch Umsetzung eines enzyspezifischen Farbstoffsubstrates ermöglicht.

Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für ein bis zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper, Verdünnung 1:3000, inkubiert. Dieser war mit einer „Alkalischen Phosphatase“ gekoppelt, so dass im Anschluss an einen letzten Waschschriffe (4 x 5 min mit TBS-T, 2 x 5 min mit TBS) die Membran mit dem enzyspezifischen Substrat inkubiert und die Proteinbanden detektiert werden konnten.

<b>Blockierlösung:</b>	<b>TBS:</b>	<b>TBS-T:</b>
5% Milchpulver in TBS-T	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl	0,1% Tween 20 in TBS (v/v)

**Tab. 4.11.2:** Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Western Blot

## **4.12 Immobilisierung von Silicatein $\alpha$ auf verschiedenen Oberflächen**

### **4.12.1 Immobilisierung von Glu-tag-Silicatein $\alpha$ auf Hydroxyapatit-Plättchen**

Mit diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass modifiziertes Silicatein  $\alpha$  auf Hydroxyapatit-Plättchen gebunden werden kann. Die Modifizierung des Silicateins erfolgte mittels PCR und speziellen *Forward*-Primern, die am 5'-Ende eine für acht Glutamate (Glu) kodierende Sequenz besitzen. Dieser Glu-Tag, der sich am C-terminalen Ende des Silicateins befindet, kann an das Calcium des Hydroxyapatits binden. Anschließend konnte das gebundene Silicatein  $\alpha$  mittels Antikörperfärbung auf der Oberfläche des Hydroxyapatit detektiert werden.

Hierzu wurden zu 30 mg Hydroxyapatit-Plättchen (Invitrogen) 300  $\mu$ g modifiziertes Silicatein  $\alpha$  in TBS (pH 7,5) gegeben und für 2 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Überstand abgezogen und es folgten drei Waschschrte mit TBS für je 10 min bei RT. Nach der Inkubation wurden die Plättchen über Nacht bei 4°C in einer 5 %igen Milchlösung (Milchpulver in TBS) geblockt, um freie Bindungsstellen abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Plättchen zu unterbinden. Nach dem Blockierungsschritt wurde der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 ebenfalls in 5 %ige Milchlösung gegeben und für 3 h bei RT inkubiert. Die anschließenden Waschschrte dienten zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern.

Die Proteindetektion erfolgte auf indirektem Weg durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper, welche gegen das spezifische Immunglobulin des Primärantikörpers gerichtet waren. Diese Sekundärantikörper, meist Anti-Maus oder Anti-Kaninchen, waren entweder Cy3 oder Cy2 gekoppelt. Die Antikörper wurden 1:2000 verdünnt und für 2 h bei RT appliziert. Es folgten drei Waschschrte mit TBS für je 5 Minuten. Die Auswertung erfolgte am Stereomikroskop AHBT3 von Olympus. Als Negativ-Kontrolle wurde in allen Versuchen unmodifiziertes Silicatein  $\alpha$  verwendet und den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt.



#### 4.12.2 Immobilisierung von Glu-tag-Silicatein $\alpha$ auf Kalknadeln

Um Silicatein  $\alpha$  auf Kalknadeln des Schwammes *Paraleucilla magna* zu immobilisieren mußten diese zuerst mit 20% Natriumhypochlorid gewaschen werden, um evtl. noch vorhandenes organisches Material zu entfernen. Hierzu wurden die Nadeln für 3 Tage unter ständigem schütteln mit 1 M Natriumhypochlorit inkubiert und anschließend noch mit 20% SDS gewaschen. Mittels Coomassie Färbung wurde überprüft ob sich noch Verunreinigungen, wie zum Beispiel Proteine auf der Nadeloberfläche befinden. 30 mg der so gereinigten Nadeln konnten nun mit 500  $\mu$ g modifiziertem Silicatein  $\alpha$  für 2 Stunden in TBS Puffer pH 7,5 inkubiert werden. Im Anschluß folgten mehrere Waschschrte mit TBS um nicht gebundenes Silicatein zu entfernen.

Nach der Inkubation wurden die Nadeln über Nacht bei 4°C in einer 5 %igen Milchlösung (Milchpulver in TBS) geblockt, um freie Bindungsstellen abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Nadeln zu unterbinden. Nach dem Blockierungsschritt wurde der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 ebenfalls in 5 %ige Milchlösung gegeben und für 3 h bei RT inkubiert. Die anschließenden Waschschrte dienten zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern.

Die Proteindetektion erfolgte auf indirektem Weg durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper, welche gegen das spezifische Immunglobulin des Primärantikörpers gerichtet waren. Diese Sekundärantikörper, meist Anti-Maus oder Anti-Kaninchen, waren entweder Cy3 oder Cy2 gekoppelt. Die Antikörper wurden 1:2000 verdünnt und für 2 h bei RT appliziert. Es folgten drei Waschschrte mit TBS für je 5 min. Die Auswertung erfolgte am Stereomikroskop AHBT3 von Olympus.

Als Negativ-Kontrolle wurde in allen Versuchen unmodifiziertes Silicatein  $\alpha$  verwendet und den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt.

#### 4.12.3 Immobilisierung von Glu-tag-Silicatein $\alpha$ auf TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte

Die verwendeten TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte wurden am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Johannes-Gutenberg Universität hergestellt. Bevor die Nanodrähte verwendet werden konnten, mussten diese zuerst für acht mal 20

Sekunden in ein Ultraschallbad gegeben werden, um sie voneinander zu separieren. TiO<sub>2</sub>-Nanodrahnte aggregieren miteinander nach mehreren Stunden, weshalb alle Versuchsansätze eine Inkubationszeit von zwei Stunden nicht überschritten haben. Nach der Ultraschallbehandlung wurde 1 mg der Nanodrahnte mit 100 µg modifiziertem Silicatein für 2 h in TBS-Puffer (pH 7,5) inkubiert. Nach mehrfachen Waschschritten mit TBS, erfolgte die Detektion mittels Antikörperfärbung wie unter 4.12.1 beschrieben. Als Negativ-Kontrolle wurde in allen Versuchen unmodifiziertes Silicatein α verwendet und den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt.

#### 4.12.3 Immobilisierung von Cys-tag-Silicatein α auf Goldoberflächen

Um das Silicatein direkt auf Goldoberflächen zu immobilisieren, wurde es in einem weiteren Versuch mit einem Cys-tag modifiziert. Die Modifizierung erfolgte mittels PCR und genspezifischer Primer, die am 5′-Ende eine für acht Cystein-Reste codierende Sequenz besitzen (s. 3.11.1). Zur Überprüfung der korrekten Modifizierung wurde das PCR-Produkt nach Aufreinigung in den pGEM-T-Vektor kloniert (s. 4.6) und sequenziert (s. 4.8). Anschließend konnte das modifizierte Silicatein über eine TA-Klonierung (s. 4.6) in den Expressionsvektor pTrc-His2 kloniert (s. 4.9.1) werden. Die Aufreinigung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (s. 4.9.5.2) ber Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. Bevor das aufgereinigte Protein für Immobilisierungsversuche genutzt werden konnte, wurde eine Dialyse gegen TBS (pH 7,5) durchgeführt, um Stoffe wie Urea zu entfernen.

Die verwendeten Goldoberflächen, sogenannte (111) Goldoberflächen mit einer Größe von 2 x 2 cm, wurden im Institut für Anorganische Chemie hergestellt. Diese wurden mit 300 µg Cys-tag-Silicatein für 12 Stunden inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit MilliQ-Wasser wurden die Plättchen über Nacht in 15% Milchlösung geblockt. Anschließend erfolgte die Detektion mittels Antikörperfärbung wie unter 4.12.1 beschrieben.

In einem weiteren Versuch wurde die Goldoberfläche nach Immobilisierung des Cys-tag-Silicatein zu AFM-Messungen an das Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPI-P) gegeben.

Eine weitere Möglichkeit das Cys-tag-Silicatein auf Goldoberflächen zu immobilisieren besteht durch die Verwendung von Polydimethylsiloxan (PDMS)-

Stempeln. Durch das sogenannte Microcontact-Printing konnte das Silicatein in geordneten Strukturen auf die Goldoberfläche übertragen werden. Hierzu wurden 200 µl Cys-tag-Silicatein (50 µg) auf den PDMS-Stempel gegeben, nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde der Überstand abgezogen und der Stempel unter einem Stickstoffstrom angetrocknet. Anschließend wurde der Stempel auf die mit Isopropanol gereinigte Goldoberfläche gelegt. Nach einer Minute wurde der Stempel vorsichtig entfernt und die Oberfläche mehrmals mit TBS gewaschen. Anschließend wurde eine Antikörperfärbung zur Detektion des Cys-tag-Silicatein durchgeführt oder eine Inkubation mit Ti[BALDH] um die Aktivität des immobilisierten Proteins zu zeigen (s. 4.14.4). Als negative Kontrolle wurde immer unmodifiziertes Silicatein  $\alpha$  verwendet und den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt.

#### 4.13 Screening nach Interaktionspartnern

Mit dieser Methode wurde nach Interaktionspartnern von Silicatein  $\alpha$  gesucht. Dazu wurde das modifizierte Silicatein  $\alpha$  an Hydroxyapatit-Plättchen gebunden (s. 4.12.1) und anschließend mit einem Schwamm-Proteinextrakt für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 3 x 10 min mit 4 ml TBS gewaschen. Um gebundene Interaktionspartner zu separieren wurden die Proben zuerst mit Eluationspuffern, die auch zur Proteinaufreinigung benutzt werden, behandelt. Zur Auswertung wurde zum einen ein Western-Blot (s. 4.11.2) und zum anderen eine Antikörperfärbung direkt an den Hydroxyapatit-Plättchen durchgeführt (s. 4.12.1).

Für den Western-Blot wurden alle Überstände gesammelt, sowohl nach den einzelnen Waschschrinen, als auch nach Inkubation mit den Eluationspuffern (s. Tab. 4.14) und auf diesen aufgetragen.

Puffer	Zusammensetzung
Eluationspuffer D pH 5,9	100 mM Natriumhydrogenphosphat 10 mM Tris Cl 8 M Urea
Eluationspuffer E pH 4,5	100 mM Natriumhydrogenphosphat 10 mM Tris Cl 8 M Urea

Tab. 4.14: Zusammensetzung der Eluationspuffer

## **4.14 Biosynthese von Titandioxid und Biosilikat durch das immobilisierte Glu-tag-Silicatein**

### **4.14.1 Titandioxidsynthese durch auf Hydroxyapatit-Plättchen immobilisiertes Silicatein $\alpha$**

Das auf Hydroxyapatit-Plättchen immobilisierte Glu-tag-Silicatein (s. 4.12.1) wurde mit 250  $\mu\text{M}$  TitaniumIV bis(ammonium lactato) dihydroxid (Ti[BALDH]) in TBS pH 7,5 für 12 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte mit TBS pH 7,5. Diesem Ansatz wurden 200  $\mu\text{l}$  entnommen und auf ein SEM-Stub gegeben und über Nacht getrocknet. SEM-Stubs bestehen aus einem Stiftprobenteller und einem leitfähigen Haftaufkleber mit einem Durchmesser von 12 mm (s. Abb. 5.6.3). Die Auswertung erfolgte am Phenom SEM (FEI) im Elektronenmikroskopie Zentrum der Johannes-Gutenberg Universität. Die XRD-Messungen wurden am Institut für Anorganische Chemie durchgeführt. Hierzu wurden der Probe 500  $\mu\text{l}$  entnommen, mehrmals mit MilliQ-Wasser gewaschen. Nach einer letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgezogen und die Plättchen über Nacht bei 32°C getrocknet.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde das modifizierte Glu-tag-Silicatein an Hydroxyapatit-Nanopartikel immobilisiert. Hierzu wurde 1 mg der Nanopartikel mit 100  $\mu\text{g}$  Protein für sechs Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation mit 250  $\mu\text{M}$  Ti[BALDH] für 12 Stunden. Im Anschluss wurden die Nanopartikel mehrmals mit MilliQ-Wasser gewaschen, bevor 2 x 10  $\mu\text{l}$  auf ein TEM-Grid gegeben wurden. TEM-Grids sind Kupfer-Netze mit einem Durchmesser von 3,05 mm und 300 Stegen (mesh). Die Grids wurden über Nacht getrocknet und die TEM-Aufnahmen bzw. die TEM/EDX-Messungen am Elektronenmikroskopie Zentrum der Johannes-Gutenberg Universität durchgeführt.

#### 4.14.2 Titandioxidsynthese durch auf Kalknadeln immobilisiertes Silicatein $\alpha$

30 mg der gereinigten Nadeln (s. 4.12.2) wurden mit 500  $\mu\text{g}$  modifiziertem Silicatein  $\alpha$  für 2 Stunden in TBS Puffer pH 7,5 inkubiert. Im Anschluß folgten mehrere Waschschriffe mit TBS um nicht gebundenes Silicatein zu entfernen. Um die Nadeln mit Titandioxid zu beschichten, wurde das an den Nadeln immobilisierte Silicatein mit einer 250  $\mu\text{M}$  Ti[BALDH]-Lösung für 12 Stunden inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit MilliQ Wasser, erfolgte die Auswertung am Phenom SEM (FEI, Niederlande) im Elektronenmikroskopie Zentrum der Johannes Gutenberg Universität. Als negative Kontrolle wurden die Nadeln mit nicht modifiziertem Silicatein behandelt.

In einem weiteren Ansatz wurden 50 mg der gereinigten Nadeln mit 400  $\mu\text{g}$  Silicatein  $\alpha$  und 100  $\mu\text{g}$  Silintaphin-1 für 2 Stunden in TBS pH 7,5 inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen, wurde auch hier das Substrat Ti[BALDH] für 12 Stunden zu den Proteinen gegeben.

In einem dritten Versuchsansatz wurden die Nadeln, wie oben beschrieben, zuerst mit beiden Proteinen und anschließend mit dem Substrat Ti[BALDH] inkubiert. Dieser Versuch wurde nicht nach 12 Stunden abgebrochen, sondern die Nadeln wurden kurz in TBS gewaschen und erneut mit Protein bzw. Substart inkubiert. Diese Prozedur wurde insgesamt 6 mal wiederholt, bevor die Auswertung am Phenom SEM und die SEM/EDX Messungen am MPI für Polymerforschung (MPI-P) durchgeführt wurden.

#### 4.14.3 Biosilikatsynthese durch auf $\text{TiO}_2$ -Nanodrähten immobilisiertem Glu-tag-Silicatein $\alpha$

Das auf  $\text{TiO}_2$ -Nanodrähten immobilisierte Silicatein (s. 4.12.3) wurde mit 250  $\mu\text{M}$  Tetraethylorthosilikat (TEOS) für 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit MilliQ-Wasser erfolgte die Auswertung mittels TEM/EDX am Elektronenmikroskopie Zentrum der Johannes- Gutenberg Universität.

Als Negativ-Kontrollen wurden in allen Versuchen die verschiedenen Oberflächen mit unmodifiziertem Silicatein und dem entsprechenden Substrat behandelt oder nur mit

dem Substrat. Zudem konnten damit Kreuzreaktionen zwischen den Substraten und den verschiedenen Oberflächen überprüft bzw. ausgeschlossen werden.

#### **4.14.4 Titandioxidsynthese durch auf Gold immobilisiertes Cys-tag-Silicatein $\alpha$**

Das durch einen Stempel (s. 4.12.3) auf Gold übertragene Cys-tag-Silicatein  $\alpha$  wurde mit Renaturierungspuffer (s. 4.9.7) für 6 Stunden inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS pH 7,5 wurde das immobilisierte Protein mit 250  $\mu$ M Ti[BALDH] für zwei Stunden inkubiert. Anschließend folgten mehrere Waschschriffe mit MilliQ-Wasser, bevor die Auswertung mittels SEM/EDX Messungen am MPI für Polymerforschung (MPI-P) durchgeführt wurde.

### **4.15 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die mikroskopische Beurteilung der mit Silicatein  $\alpha$  (Glu- und Cys-tag) beschichteten Oberflächen erfolgte am Stereomikroskop AHBT3 von Olympus. Das Mikroskop ermöglicht sowohl die Betrachtung der Objekte im Fluoreszenzlicht als auch im Hellfeld. Um die Fluoreszenzemission des an den Cy3 bzw. Cy2 gekoppelten Sekundärantikörpers zu detektieren (Emission: 570 nm bzw. 508 nm), wurden die Präparate mit Licht definierter Wellenlänge (Exzitation: 550 nm bzw. 490 nm) angeregt. Für die Dokumentation und Bearbeitung der über eine angeschlossene CCD-Kamera digitalisierten Bilder wurde die Software Olympus analySIS (V 3.0) verwendet.

### **4.16 Rasterelektronenmikroskopie (REM / SEM)**

Das Rasterelektronenmikroskop (REM), im englischen auch SEM (Scanning Electron Microscopy) genannt, ist ein Elektronenmikroskop, das zur Abbildung von Objektoberflächen genutzt wird. Dabei wird ein Elektronenstrahl, erzeugt von einer

beheizten Kathode (warme Feldemission) in einem bestimmten Muster über das Objekt geführt (gerastert) und die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt dazu genutzt, ein Bild von diesem mit hoher Schärfentiefe zu erhalten. Ein Vergrößerungseffekt entsteht dadurch, dass über dem Elektronenstrahl der Bildröhre ein stärkeres elektrisches Feld angelegt wird als über dem Strahl im Mikroskop. Um zu verhindern, dass sich das Präparat durch den Elektronenstrahl elektrisch auflädt, wird die gesamte Oberfläche mit einem dünnen Film einer leitenden Substanz (meistens Kohlenstoff oder Gold) bedampft. Bei modernen hoch auflösenden REM Geräten ist die Goldbedampfung nicht mehr nötig.

Eine weitere Verwendung des SEMs ist die „Energiedispersive Röntgenstrahlen Analyse“ im englischen auch EDX genannt. Diese Methode wird zur Charakterisierung der Elementzusammensetzung kleinster Probenbereiche genutzt. Sie beruht auf dem Prinzip, dass ein Elektron des Elektronenstrahls im Atom der Probe ein kernnahes Elektron aus seiner Position schlägt und die so entstandene Lücke sofort von einem energiereichen Elektron aus einem höheren Orbital aufgefüllt wird. Diese Energiedifferenz, die in Form eines Röntgenquants frei wird, kann mit geeigneten Detektoren aufgenommen werden. Da jedes Element eine charakteristische Intensität aufweist, kann so direkt auf die in der Probe enthaltenen Elemente geschlossen werden.

In dieser Arbeit wurden beide Methoden benutzt, um mit Titandioxid bzw. Biosilikat beschichtete Oberflächen zu charakterisieren. Für einfache Aufnahmen wurde das Phenom (FEI, Niederlande) im Institut für Physikalische Chemie benutzt. Es arbeitet mit einer Spannung von 0,5 kV.

Die Charakterisierung der Proben wurde mittels EDX am MPI für Polymerforschung in Mainz durchgeführt. Es arbeitet mit einer Spannung von 5 kV.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Glu-tag Modifizierung des Silicatein $\alpha$

Um bisher Silicatein auf verschiedenen Oberflächen immobilisieren zu können, mussten diese zuerst mit einem Ni<sup>2+</sup>-NTA-Copolymer überzogen werden. Durch den C-terminalen His-tag des Silicatein, der normalerweise zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins genutzt wird, konnte dieses an das Ni<sup>2+</sup> gebunden werden.

Um das Silicatein direkt auf verschiedene Oberflächen zu immobilisieren, wurde das reife Enzym (AS<sub>115-330</sub>) mit einem 8 x Glu-tag modifiziert. Die Modifizierung erfolgte mittels PCR und genspezifischen Primern, die am 5'-Ende eine für acht Glutamat-Reste codierende Sequenz in den open reading frame des Silicateins integrierten (s. 3.11.1). Zur Überprüfung der korrekten Modifizierung wurde das PCR-Produkt nach Aufreinigung in den pGEM-T-Vektor kloniert (s. 4.6) und sequenziert (s. 4.8). Anschließend konnte das modifizierte Silicatein über einen Restriktionsverdau (s. 4.5) in den Expressionsvektor pBAD/gIIIa kloniert (s. 4.9.2) werden.

Abbildung 5.1.1 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz des modifizierten Silicatein.

```

1  ATGAAAAAACTGCTGTTTCGCGATTCCGCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCACCATG      60
1  M  K  K  L  L  F  A  I  P  L  V  V  P  F  Y  S  H  S  T  M                    20
61  GTGGAAGAGGAAGAGGAAGAGGAAGAGCCTGAAGCTGTAGACTGGAGAACCAAAGGAGCT      120
21  V  E  E  E  E  E  E  E  E  P  E  A  V  D  W  R  T  K  G  A                    40
121 GTCACGGCTGTCAAGGACCAGGGAGACTGTGGTGCTAGCTATGCTTTTCAGTGCTATGGGT      180
41  V  T  A  V  K  D  Q  G  D  C  G  A  S  Y  A  F  S  A  M  G                    60
181 GCTTTGGAGGGTGTCTAATGCTTTAGCCAAGGGAAATGCAGTATCTCTCAGTGAACAGAAC      240
61  A  L  E  G  A  N  A  L  A  K  G  N  A  V  S  L  S  E  Q  N                    80
241 ATCATTGATTGCTCGATTCCCTTACGGTAACCACGGTTGTCATGGAGGCAATATGTATGAT      300
81  I  I  D  C  S  I  P  Y  G  N  H  G  C  H  G  G  N  M  Y  D                    100
301 GCTTTTTTTGTATGTCATCGCTAACGAGGGGGTTCGATCAGGACAGTGCATATCCATTTGTT      360
101 A  F  L  Y  V  I  A  N  E  G  V  D  Q  D  S  A  Y  P  F  V                    120
361 GGAAAGCAATCCAGCTGCAACTATAACAGTAAATACAAAGGTACATCAATGTCGGGGATG      420
121 G  K  Q  S  S  C  N  Y  N  S  K  Y  K  G  T  S  M  S  G  M                    140
421 GTGTCAATCAAAAAGTGGTAGTGAGTCTGACTTACAAGCAGCTGTTTTCAAACGTTGGCCCT      480
141 V  S  I  K  S  G  S  E  S  D  L  Q  A  A  V  S  N  V  G  P                    160

```



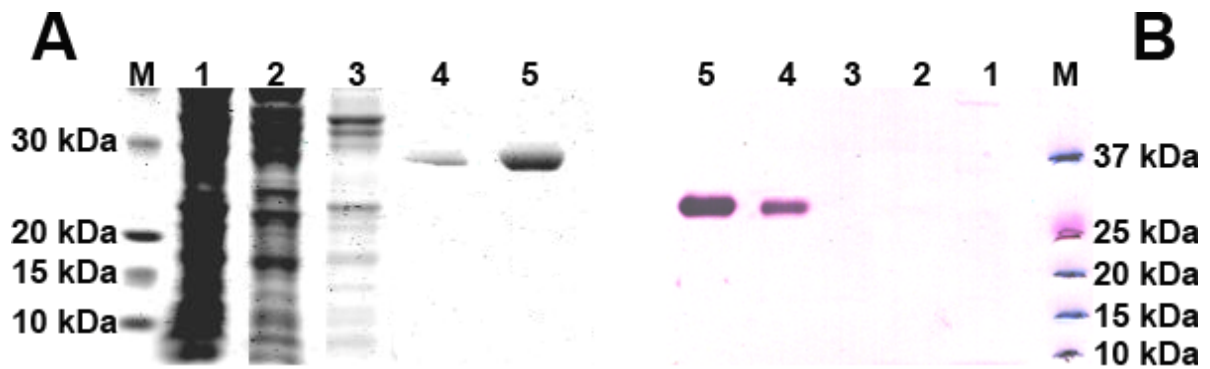
```

481  G T A T C T G T T G C T A T T G A T G G T G C T A A C A G T G C C T T C A G G T T T T A C T A C A G T G G T G T C T A T      540
161  V S V A I D G A N S A F R F Y Y S G V Y      180
541  G A C T C A T C A C G A T G C T C C A G T A G T A G T C T T A A C C A C G C A A T G G T A G T C A C T G G A T A C G G A      600
181  D S S R C S S S S L N H A M V V T G Y G      200
601  T C A T A C A A T G G G A A R R A T A C T G G C T G G C C A A G A A T A G C T G G G G A A C T A A C T G G G G T A A C      660
201  S Y N G K X Y W L A K N S W G T N W G N      220
661  A G T G G C T A T G T G A T G A T G G C C C G C A A C A A G T A C A A C C A G T G T G G A A T T G C T A C C G A T G C A      720
221  S G Y V M M A R N K Y N Q C G I A T D A      240
721  T C T T A T C C C A C C C T A A T A A G C T T T T C T A G A A C A A A A A C T C A T C T C A G A A G A G G A T C T G A A T      780
241  S Y P T L I S F L E Q K L I S E E D L N      260
781  A G C G C C G T C G A C C A T C A T C A T C A T C A T C A T T G A
261  S A V D H H H H H H H *

```

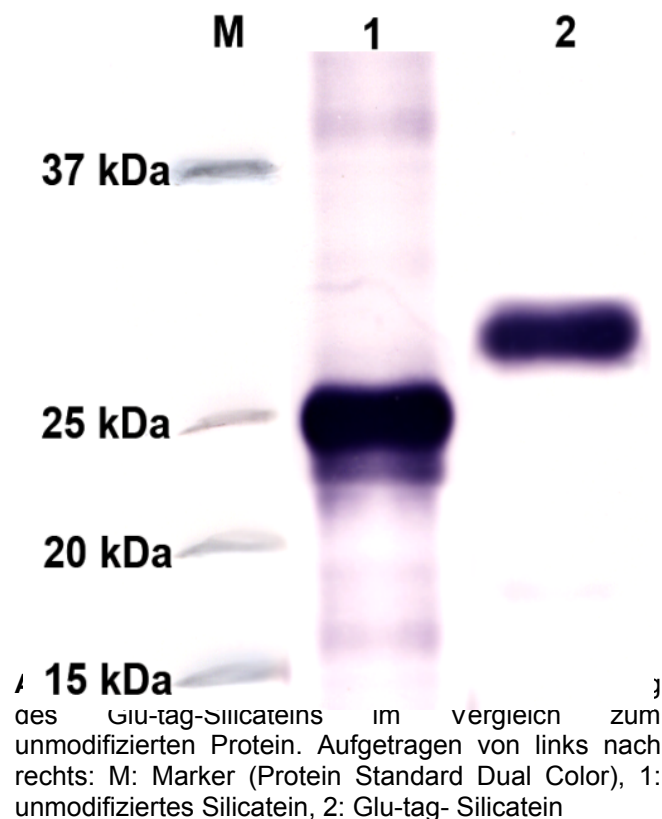
**Abbildung 5.1.1:** Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz des modifizierten Silicatein  $\alpha$  im Expressionsvektor pBAD/gIII A. Rot markiert sind Start- bzw. Stoppcodon, der Glu-tag (8 x E) ist schwarz unterstrichen. Anfang und Ende des reifen Silicatein sind lila gekennzeichnet. Das *myc*-Epitop ist orange dargestellt, der His-tag grün.

Die Gesamtlänge des Glu-tag modifizierten Silicateins beträgt 270 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 29 kDa. Die Sequenz beinhaltet neben dem modifizierten Silicatein  $\alpha$  auch einen C-terminalen His-tag (6 x H) bzw. ein *myc*-Epitop, die zur Aufreinigung und Antikörperdetektion genutzt werden. Des Weiteren befindet sich am N-terminalen Ende, vor dem Glu-tag (8 x E), eine 21 Aminosäuren lange Startsequenz. Da das Glu-tag-Silicatein ausschließlich in unlöslicher Form exprimiert wird, erfolgte die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (s. 4.9.5.2) über  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose und wurde durch eine SDS- Gelelektrophorese bzw. einen Western-Blot mittels anti-His-Antikörper überprüft (s. 4.11.2). Abbildung 5.1.2 zeigt das SDS-Gel und den Western-Blot nach der Aufreinigung des Proteins.



**Abbildung 5.1.2:** (A) SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung von Glu-tag-Silicatein. Aufgetragen von links nach rechts: M: Marker (Novex Sharp Unstained Protein Standard), 1: Durchfluss, 2: Waschfraktion 1, 3: Waschfraktion 2, 4: Eluat 1, 5: Eluat 2. (B) Western-Blot mit anti-His-Primärantikörper und anti-Maus-Sekundärantikörper gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase. Die Reihenfolge entspricht der des SDS-Gels, nur der Marker (Protein Standard Dual Color) ist unterschiedlich.

Sowohl das SDS-Gel als auch der Western-Blot zeigen eine saubere Glu-tag-Silicatein Bande, da weder in Eluat 1 noch in Eluat 2 Kontaminationen in Form von anderen Proteinbanden zu erkennen waren. Das Molekulargewicht lag bei 29 kDa. Die größte Proteinmenge konnte mit dem Eluat 2 erzielt werden, dieses wurde dann für die Renaturierung (s. 4.9.7) des Silicatein verwendet. Im Anschluss daran wurde erneut ein Western-Blot durchgeführt. Hier wurde neben dem Glu-tag-Silicatein auch das rekombinante Silicatein  $\alpha$  ohne Glu-tag aufgetragen (s. Abb. 5.1.3).



Der Unterschied in der Bandengröße ist erstens auf die Verwendung unterschiedlicher Vektoren, unmodifiziertes Silicatein befindet sich im pQ30 A-Vektor (Qiagen) und zweitens auf die N-terminale Modifikation, also den Glu-tag zurückzuführen.

Nach Aufreinigung und Renaturierung wurde das modifizierte Silicatein für Immobilisierungen auf verschiedenen Oberflächen verwendet.

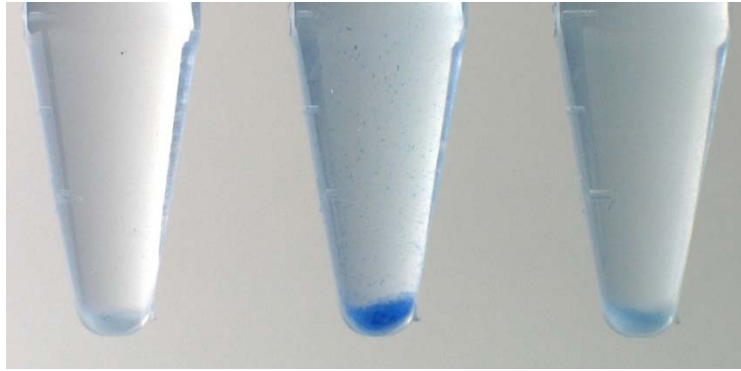
## **5.2 Immobilisierung des Glu-tag-Silicatein auf verschiedenen Oberflächen**

### **5.2.1 Immobilisierung auf Hydroxyapatit-Plättchen**

Da der Glu-tag, abgeleitet von den Proteinen Osteonectin und BSP, sich primär dazu eignet, an das Calcium von Hydroxyapatit [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ] zu binden, wurden für die ersten Versuche Hydroxyapatit-Plättchen der Firma Sigma Aldrich zur Immobilisierung eingesetzt.

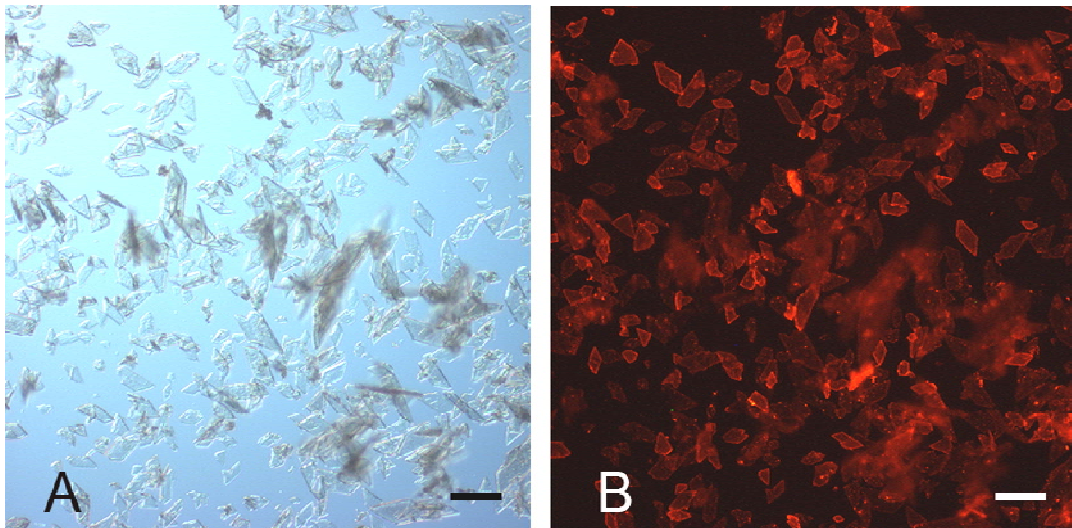
Dazu wurden diese mit modifiziertem Silicatein  $\alpha$ , wie unter 4.12.1 beschrieben, inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde das unmodifizierte Silicatein unter gleichen Versuchsbedingungen eingesetzt.

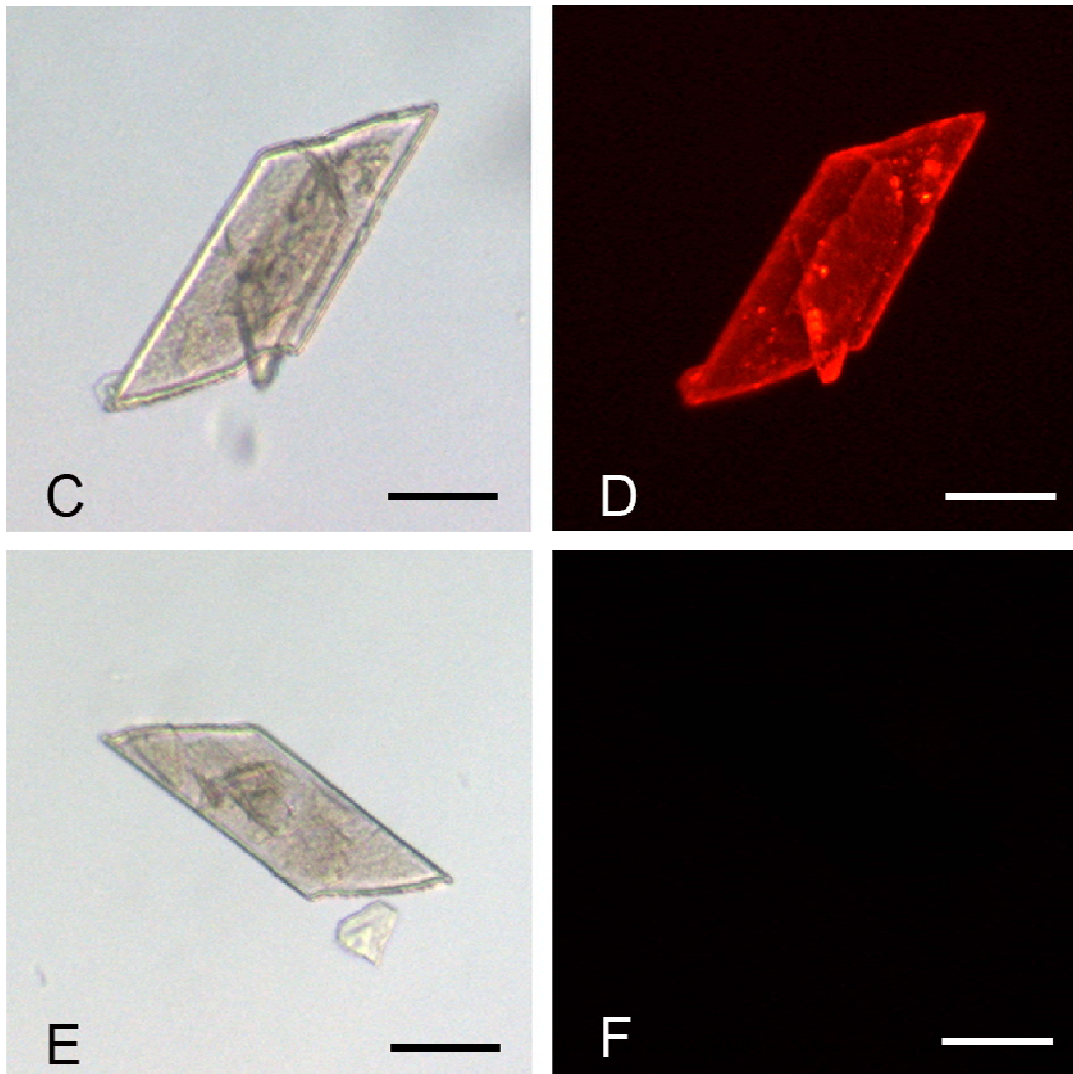
Zum Nachweis der Bindung von modifiziertem Silicatein  $\alpha$  wurde eine Färbung mit Coomassie durchgeführt. Hierzu wurden die Proben für zwei Stunden mit Coomassie inkubiert und anschließend mehrmals mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gewaschen. Die Auswertung erfolgte visuell (s. Abb. 5.2.1.1).



**Abbildung 5.2.1.1:** Detektion des an Hydroxyapatit-Plättchen immobilisierten, modifizierten Silicatein  $\alpha$  mittels Coomassie-Färbung (mittig). Als Negativ-Kontrolle dienen das unmodifizierte Silicatein (rechts) und die Plättchen ohne Protein (links).

Es konnte ein deutlicher Unterschied in der Färbung der Hydroxyapatit-Plättchen gezeigt werden, wenn das modifizierte Protein zuvor an deren Oberfläche immobilisiert wurde. Im Vergleich dazu zeigten die beiden Negativ-Kontrollen, links ohne Protein und rechts mit unmodifiziertem Silicatein  $\alpha$ , keine bzw. nur eine leichte Färbung. Zur genaueren Überprüfung wurde an den Hydroxyapatit-Plättchen eine Antikörperfärbung durchgeführt (s. 4.12.1). Dazu wurden die Plättchen über Nacht in 5% Milchpulver geblockt und das immobilisierte Protein mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert (s. Abb. 5.2.1.2).





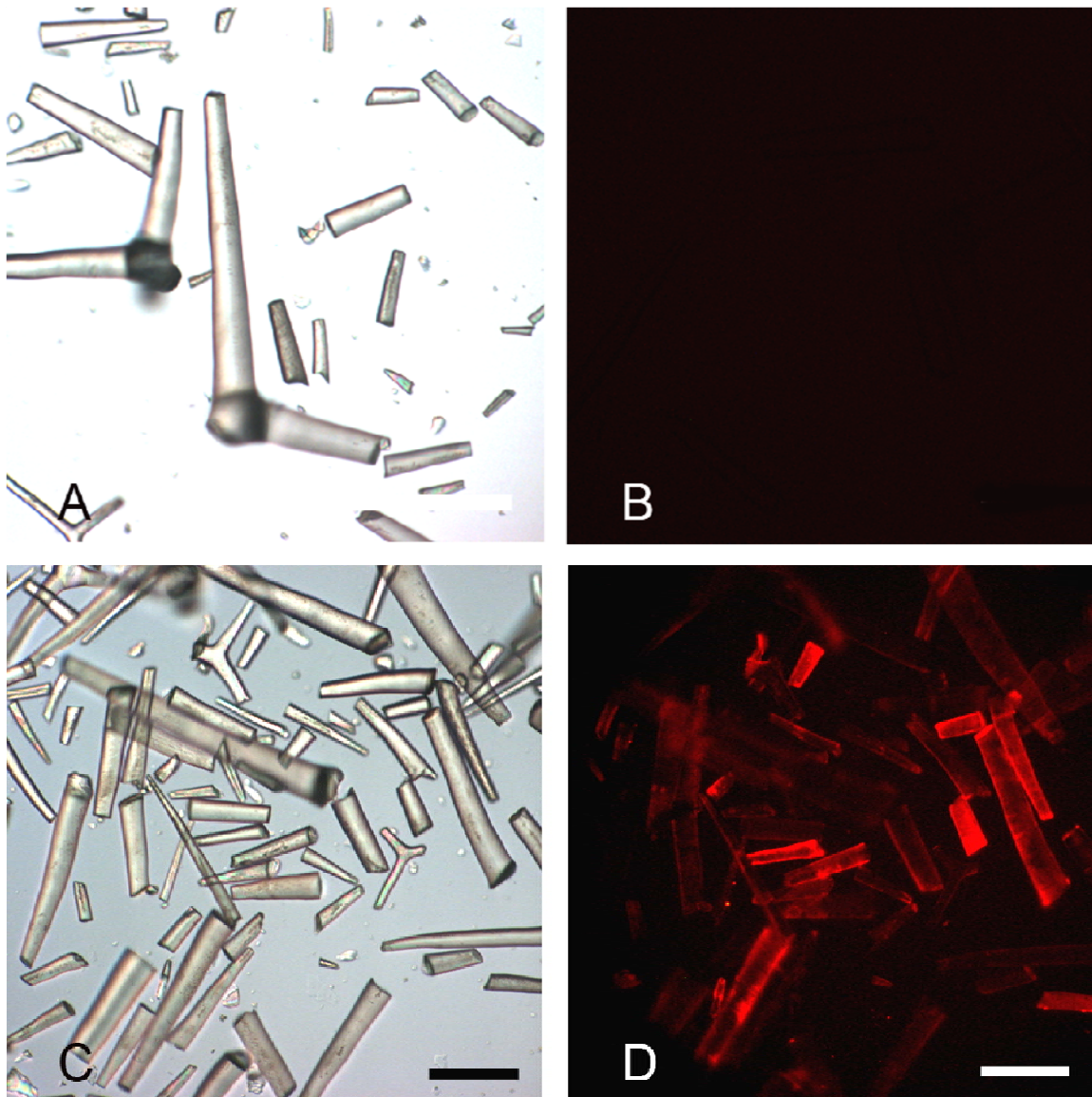
**Abbildung 5.2.1.2:** Immunofluoreszenzanalyse des auf Hydroxyapatit gebundenen Glutag-Silicatein mit einem anti-His Primärantikörper und einem Cy3 konjugierten Sekundärantikörper (B/D/F) und die entsprechenden Nomarski Bilder (A/C/E). (A/B) Übersicht über die Hydroxyapatit-Plättchen nach Inkubation mit modifiziertem Silicatein. (C/D) Vergrößerung auf ein einzelnes Plättchen und (E/F) Negativ-Kontrolle mit unmodifiziertem Protein. Messskalen 250  $\mu\text{m}$ .

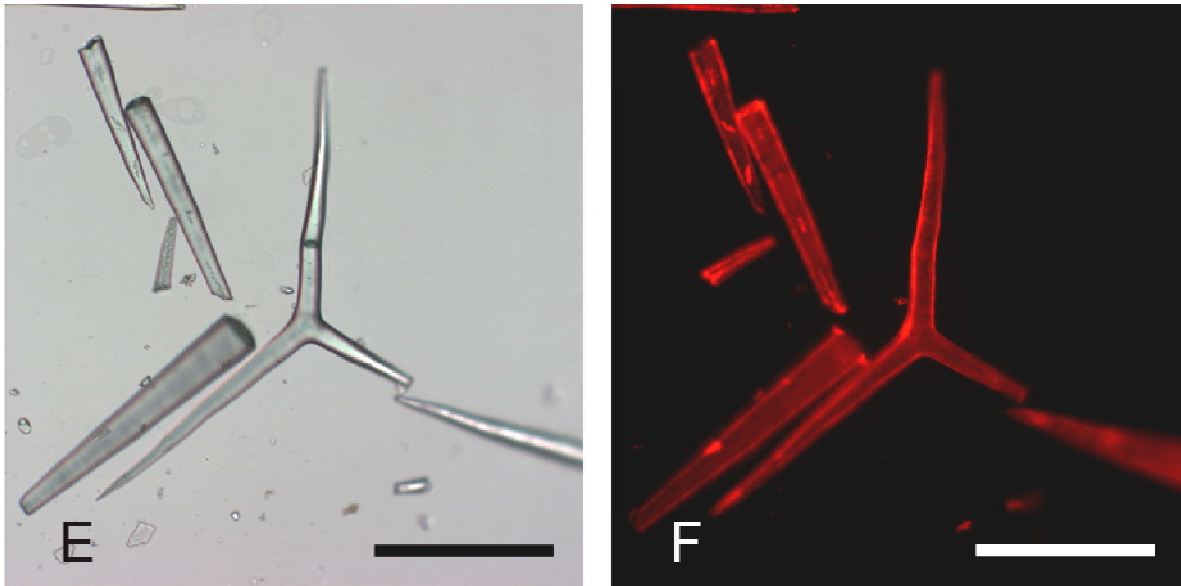
Hydroxyapatit-Plättchen an deren Oberfläche das modifizierte Silicatein  $\alpha$  immobilisiert wurde, zeigten eine starke Fluoreszenz (s. Abb. 5.2.1.2 A-D). Bei der Negativ-Kontrolle (s. Abb. 5.2.1.2 E-F) konnte bei gleicher Belichtungszeit (200 ms) kein Fluoreszenzsignal abgegriffen werden.

### 5.2.2 Immobilisierung auf Kalkspiculae des Schwammes *Paraleucilla magna*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, Silicatein  $\alpha$  mittels Glu-tag auf Hydroxyapatit zu immobilisieren, sollte überprüft werden, ob auch andere calciumhaltige Oberflächen dafür geeignet sind. Als Modellsystem wurden die Kalkspiculae des Schwammes *Paraleucilla magna* gewählt, da diese zum einen aus Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) bestehen und zum anderen eine homogene Oberfläche aufweisen, was für spätere Versuche von Vorteil ist.

Bevor die Kalkspiculae mit dem modifizierten Silicatein inkubiert werden konnten, mussten diese wie unter 4.12.2 beschrieben gereinigt werden. Die Detektion erfolgte mittels Antikörperfärbung. Als Negativ-Kontrolle diente wieder unmodifiziertes Protein.



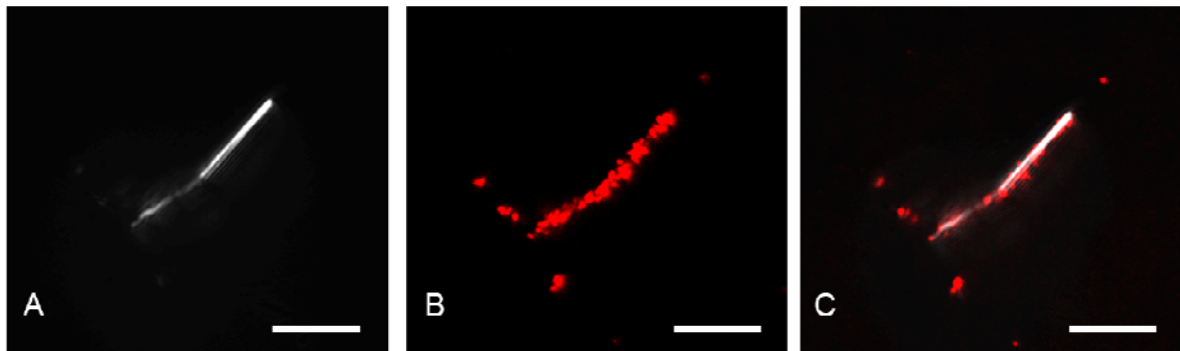


**Abbildung 5.2.2:** Immunfluoreszenzanalyse des auf Kalknadeln des Schwammes *Paraleucilla magna* gebundenen Glu-tag-Silicatein mit spezifischem Primärantikörper bzw. Cy3 konjugiertem Sekundärantikörper (B/D/F) und die entsprechenden Nomarski Aufnahmen (A/C/E). (A/B) Negativ-Kontrolle mit unmodifiziertem Protein. (C-E) Modifiziertes, gebundenes Silicatein in der Übersicht (C/D) und vergrößert dargestellt (E/F). Messskalen: 250  $\mu\text{m}$ .

Bei der anschließenden Auswertung der Fluoreszenz am Mikroskop zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Nadeln, welche mit dem modifizierten Protein inkubiert wurden und der Negativ-Kontrolle (Abb. 5.2.2). Auch hier konnte bei gleicher Belichtungszeit (200 ms) kein Fluoreszenzsignal abgegriffen werden.

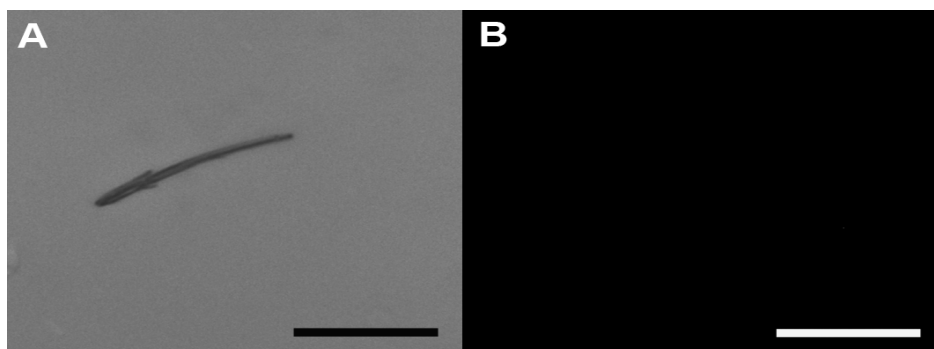
### 5.2.3 Immobilisierung auf TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte

In einem anderen Versuchsansatz wurden TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte mit modifiziertem Silicatein inkubiert, um zu analysieren, ob der Glu-tag auch an Titandioxid binden kann. Die TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte wurden am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Johannes-Gutenberg Universität hergestellt und für fünf Stunden mit dem Glu-tag-Silicatein inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte visuell an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM).



**Abbildung 5.2.3.1:** Immunofluoreszenzanalyse des auf TiO<sub>2</sub>-Nanodrähten immobilisierten Glu-tag-Silicatein. Dabei bindet der Tag des modifizierten Proteins mit seiner Carboxygruppe an das Metalloxid. Zur Detektion wurde ein anti-His-Antikörper und ein Cy3 konjugierter Sekundärantikörper verwendet. (A) Nomarski-Aufnahme eines TiO<sub>2</sub>-Nanodrahts, (B) Fluoreszenzaufnahme und (C) Überlagerung beider Signale. Die Aufnahmen wurden an einem CLSM durchgeführt. Messskalen: 10 µm.

Abbildung 5.2.3.1 (B und C) zeigt das an TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte immobilisierte Silicatein. Deutlich ist das gebundene Protein zu erkennen. Auch hier zeigte die Negativ-Kontrolle mit unmodifiziertem Silicatein keine Fluoreszenz (s. Abb. 5.2.3.2).



**Abbildung 5.2.3.2:** Immunofluoreszenzanalyse der Negativ-Kontrolle. (A) Nomarski-Aufnahme eines TiO<sub>2</sub>-Nanodrahts, (B) Fluoreszenzaufnahme nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern. Messskalen: 20 µm

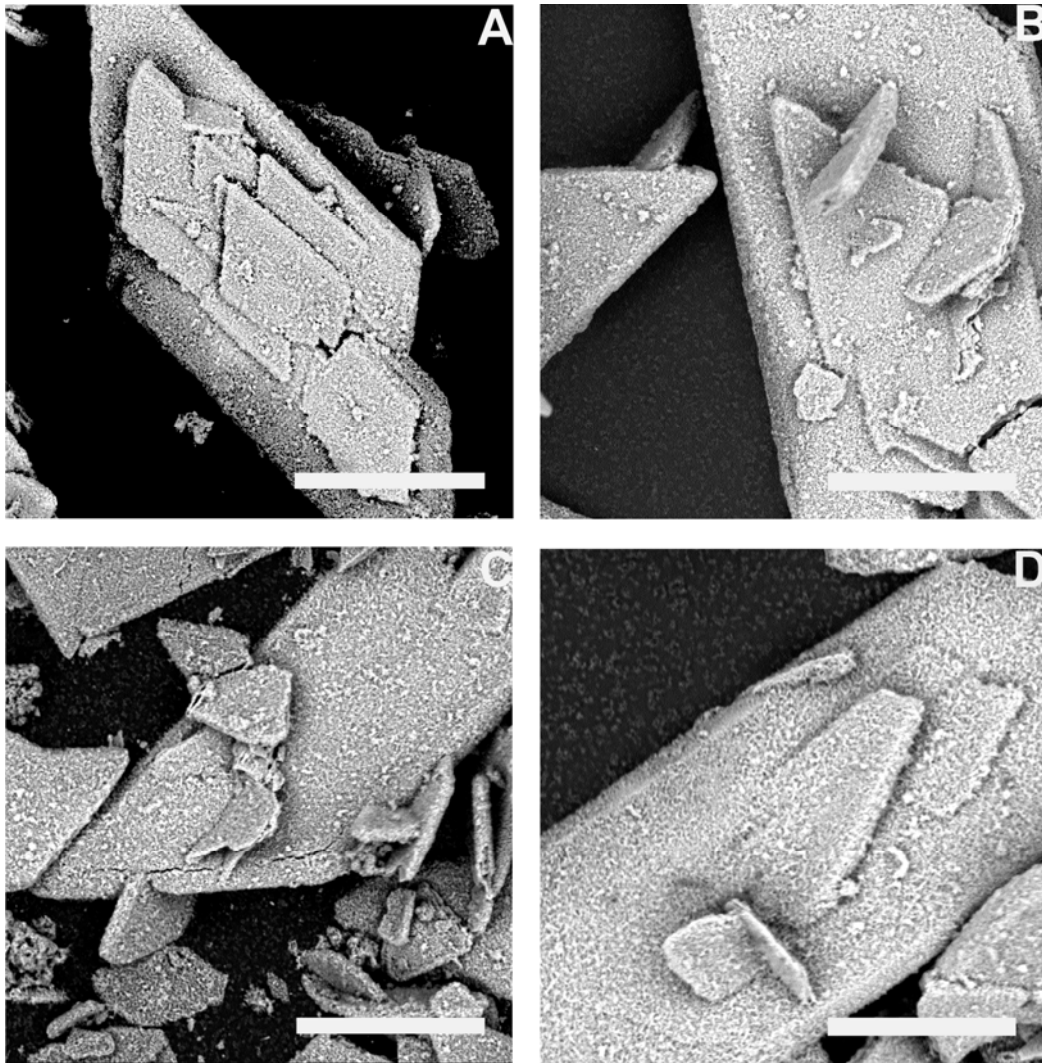


### **5.3 Biosynthese von Titandioxid und Biosilikat durch das immobilisierte Glu-tag-Silicatein**

Silicatein induziert nicht nur die Bildung von Biosilikat, sondern auch die Bildung von einigen Metalloxiden, wie z.B. Titandioxid. Da dies unter neutralem pH und bei Raumtemperatur geschieht, eröffnet die Verwendung von Silicatein neue Möglichkeiten in verschiedenen Anwendungsgebieten, wie der Biotechnologie oder Biomedizin. In den vorangegangenen Versuchen konnte das Glu-tag-Silicatein auf verschiedenen Oberflächen immobilisiert werden. In den folgenden Experimenten sollte zum einen die Aktivität des gebundenen Enzyms untersucht werden und zum anderen der Einfluss von verschiedenen Parametern auf die Oberflächenmorphologie der durch Silicatein synthetisierten Produkte.

#### **5.3.1 Synthese von Titandioxid durch das auf Hydroxyapatit-Plättchen immobilisierte Glu-tag-Silicatein**

Nach der Immobilisierung des Glu-tag-Silicatein auf der Oberfläche von HA-Plättchen wurde die Aktivität des Enzyms durch die Zugabe des Substrates Titanium(IV) bis(ammonium lactato) dihydroxid (Ti[BALDH]) untersucht. Hierzu wurde das immobilisierte Silicatein mit 250  $\mu\text{M}$  Ti[BALDH] für 12 Stunden inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit MilliQ-Wasser erfolgte die Auswertung am Phenom SEM (FEI) im Elektronenmikroskopie Zentrum der Johannes-Gutenberg Universität (s. Abb. 5.3.1.1). Als Negativ-Kontrollen dienten zum einen unbehandelte HA-Plättchen und zum anderen HA-Plättchen, die mit Substrat, aber ohne Protein inkubiert wurden.



**Abbildung 5.3.1.1:** SEM-Aufnahmen von Hydroxyapatit-Plättchen nach Inkubation mit Titanium(IV) bis(ammonium lactato) dihydroxid für 12 h. (A-B) Negativ-Kontrollen, einmal vor der Inkubation mit Ti[BALDH] (A) und nach einer Inkubationszeit von 12 h (B). (C-D) HA-Plättchen auf denen zuerst das Glu-tag-Silicatein immobilisiert wurde, bevor diese mit dem Substrat inkubiert wurden. Messskalen 40  $\mu\text{m}$ .

Wie in Abbildung 5.3.1.1 zu erkennen ist, konnte kein Unterschied der Oberflächenmorphologie zwischen den verschiedenen HA-Plättchen festgestellt werden. Ob auf diesen zuerst das Glu-tag-Silicatein immobilisiert wurde (C u. D), bevor die Inkubation mit dem Substrat Ti[BALDH] erfolgte oder ob die Inkubation ohne Enzym stattfand (B), war eine Veränderung auf der Oberfläche, im Vergleich zu unbehandelten HA-Plättchen (A), durch diese Aufnahmen nicht festzustellen.

Um dennoch aussagekräftige Daten zu erhalten, wurde eine Röntgenbeugungsanalyse (XRD, X-Ray Diffraction) am Institut für Anorganische Chemie durchgeführt. XRD ist eine zerstörungsfreie Methode zur Strukturanalyse von Kristallen. Dabei wird die Probe mit monochromatischem Röntgenlicht bestrahlt und die Streustrahlung wird registriert. Das Untersuchungsverfahren beruht auf der

Beugung der Röntgenstrahlung an den Netzebenenscharen der Kristalle. Das Wirkprinzip wird durch die BRAGG'sche Gleichung beschrieben:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta$$

$\lambda$  = Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung

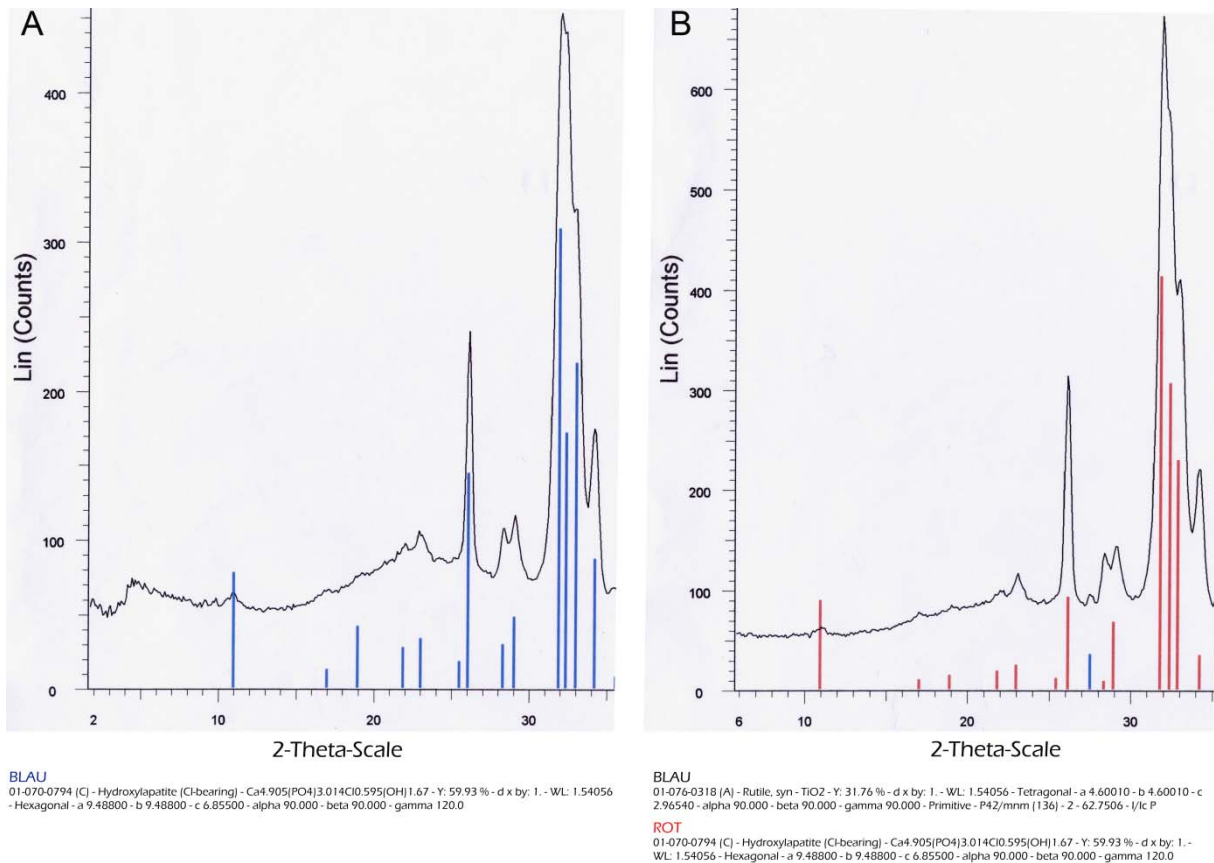
$d$  = Gitterebenenabstand

$\theta$  = Beugungswinkel

Mit dieser Methode sollte das durch immobilisiertes Glu-tag-Silicatein synthetisierte Titandioxid auf den HA-Plättchen detektiert werden.

In Abbildung 5.3.1.2 sind die Diagramme der Röntgenbeugungsaufnahmen der einzelnen Proben dargestellt, zum einen die Negativ-Kontrolle, HA-Plättchen inkubiert mit Ti[BALDH] (A) und zum anderen die HA-Plättchen, auf denen zuvor das Glu-tag-Silicatein immobilisiert wurde, bevor die Inkubation mit dem Substrat erfolgte (B).

In beiden Diagrammen lassen sich die stärksten Reflexe eindeutig dem Hydroxyapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \text{OH}$ ) zuordnen. Daneben konnte aber auch in Probe B ein Reflex, wenn auch sehr klein, Titandioxid in der Rutil-Struktur zugeordnet werden.



**Abbildung 5.3.1.2:** Röntgenbeugungsdiagramme der verschiedenen HA-Plättchen. (A) Negativ-Kontrolle, bei der die HA-Plättchen nur mit Ti[BALDH] inkubiert wurden. Die Reflexe für das Hydroxyapatit sind blau dargestellt. (B) HA-Plättchen die zuerst mit dem Glu-tag-Silicatein inkubiert wurden, bevor die Inkubation mit Ti[BALDH] erfolgte. Die Reflexe für das Hydroxyapatit sind rot dargestellt, der Reflex für rutiles Titandioxid blau.

Durch die Röntgenbeugungsanalyse konnte zwar Titandioxid detektiert werden, aber eine visuelle Bestätigung durch SEM-Aufnahmen war durch die Oberflächenbeschaffenheit der HA-Plättchen nicht möglich. Daher wurden in einem weiteren Versuchsansatz Hydroxyapatit-Nanopartikel verwendet, um bessere Ergebnisse zu erlangen.

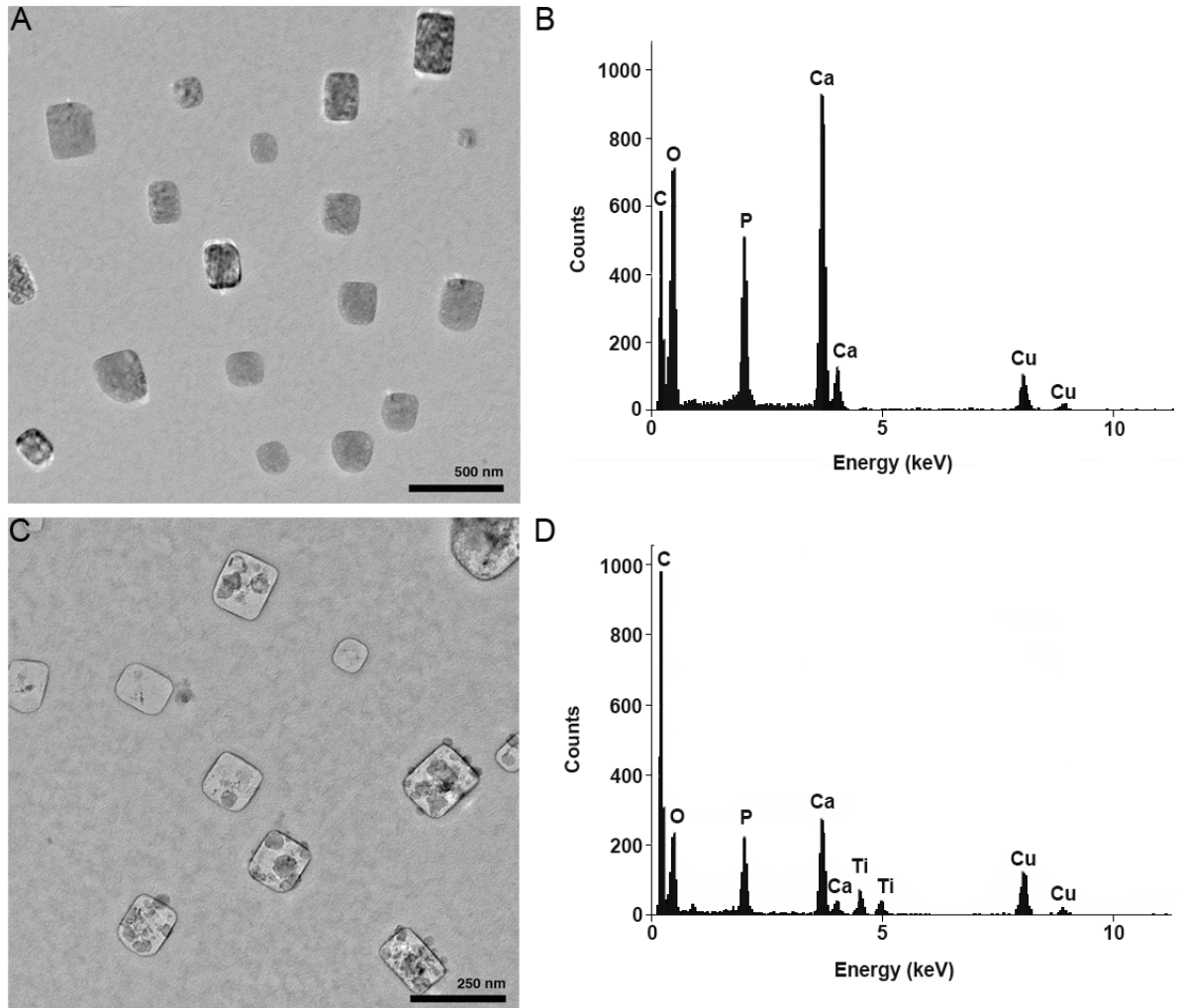
### 5.3.2 Synthese von Titandioxid durch das auf Hydroxyapatit-Nanopartikeln immobilisierte Glu-tag-Silicatein

Um mehr Informationen über die Aktivität des Glu-tag-Silicatein zu erhalten, wurde dieses an HA-Nanopartikel immobilisiert und mit 250  $\mu\text{M}$  Ti[BALDH] für 12 h inkubiert.

Anschließend erfolgte die Auswertung an einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) mit EDX im Elektronenmikroskopie Zentrum der Johannes-Gutenberg

Universität. Als Negativ-Kontrollen dienten HA-Nanopartikel, die ebenfalls mit Ti[BALDH] inkubiert wurden.

Abbildung 5.3.2. zeigt die TEM-Aufnahmen mit den dazugehörigen EDX Daten.



**Abbildung 5.3.2:** TEM-Aufnahmen und dazugehörige EDX-Daten von HA-Nanopartikeln. (A-B) Negativ-Kontrolle, HA-Nanopartikel nach Inkubation mit Ti[BALDH]. (C-D) HA-Nanopartikel, auf denen zuerst das Glu-tag-Silicatein immobilisiert wurde, bevor die Inkubation mit dem Substrat Ti[BALDH] für 12 h erfolgte.

In der Negativ-Kontrolle (A) weisen alle HA-Nanopartikel eine rechteckige, teilweise aber auch abgerundete Form mit einer homogenen Oberflächenstruktur auf. Das dazugehörige EDX (B) zeigt nur die typischen Signale für Calcium (Ca), Phosphor (P) Kohlenstoff (C) und Sauerstoff, die dem Hydroxyapatit zugeordnet werden können. Das Signal für Kupfer (Cu) stammt von den verwendeten Grids.

Wurden auf den HA-Nanopartikeln aber zuerst das Glu-tag-Silicatein immobilisiert, bevor eine Inkubation mit dem Substrat Ti[BALDH] erfolgte, waren auf deren Oberfläche kleinere Partikel zu erkennen (C). Auf dem dazugehörigen EDX (D) sind

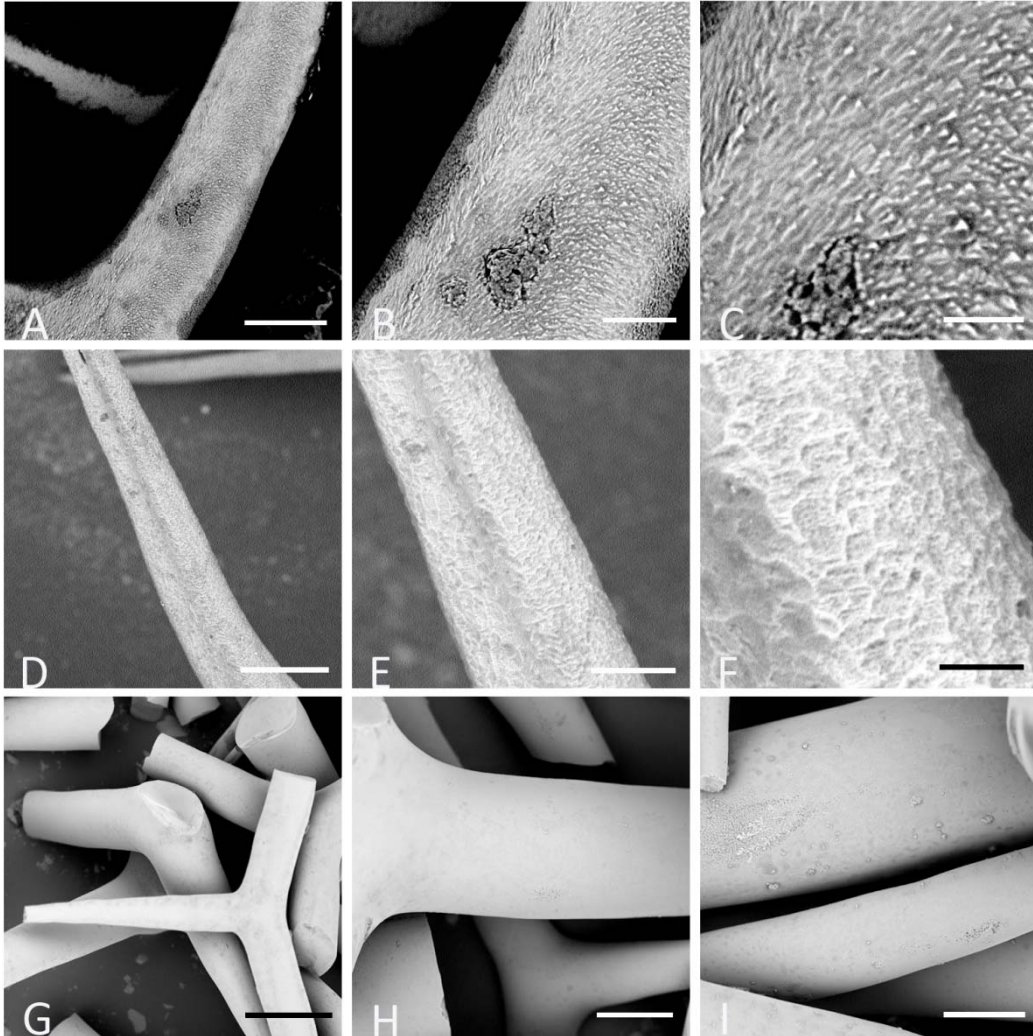
neben den bekannten Signalen für das Hydroxyapatit und das Kupfer auch zwei Signale zu erkennen, die als Titan (Ti) identifiziert werden konnten. Dies lässt darauf schließen, dass das Ti-Signal von der  $\text{TiO}_2$ -Beschichtung der Apatit-Kristalle herrührt, die durch das immobilisierte Glu-tag-Silicatein synthetisiert wurde.

### 5.3.3 Synthese von Titandioxid durch das auf Kalknadeln immobilisierte Glu-tag-Silicatein

Nach der Immobilisierung von Silicatein  $\alpha$  auf der Oberfläche von Kalknadeln des Schwammes *P. magna* wurde die Aktivität des Enzyms untersucht. Außerdem wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die Oberflächenmorphologie studiert, insbesondere Inkubationszeit und Anwesenheit des Interaktors Silintaphin-1.

Hierzu wurden die Nadeln wie unter 4.12.2 beschrieben gereinigt, mit einem oder beiden Proteinen und dem Substrat Ti[BALDH] inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit dem Phenom SEM am Elektronenmikroskopie Zentrum der Johannes-Gutenberg Universität gemacht und die Charakterisierung der Proben mittels EDX am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPI-P) durchgeführt.

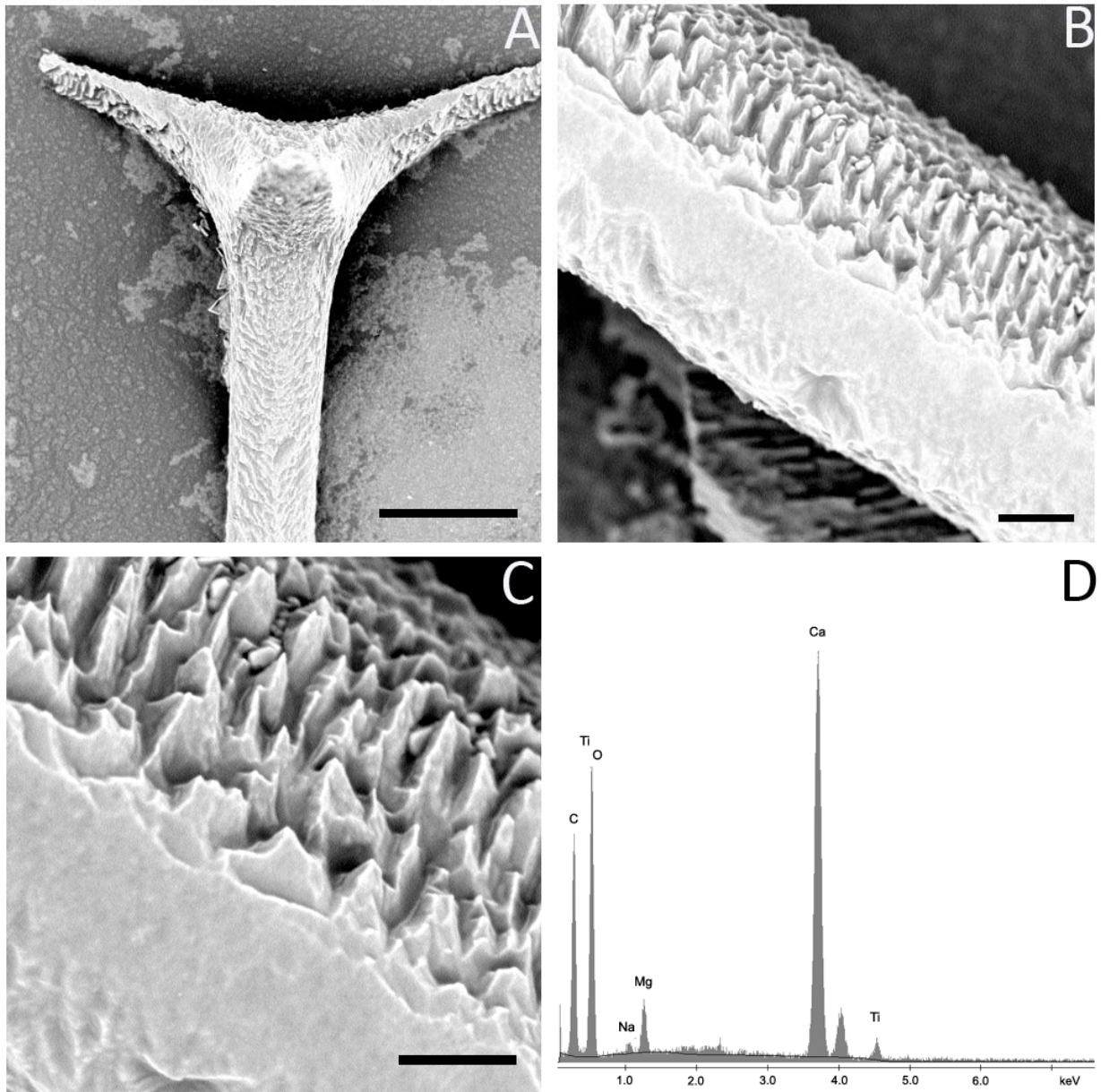
Abbildung 5.3.3.1 zeigt zum einen die Negativ-Kontrolle, welche kein immobilisiertes Protein enthielt, sonst aber gleich behandelt wurde und zum anderen die Nadeln, auf denen das Glu-tag-Silicatein immobilisiert und im Anschluss das Substrat dazu gegeben wurde. Hier konnte eine leichte Veränderung der Nadeloberfläche festgestellt werden. Die glatte Oberfläche, wie sie in der Negativ-Kontrolle (G-I) zu beobachten war, wurde von einer leicht gezackten, aufgerauten Schicht überzogen (A-C).



**Abbildung 5.3.3.1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Nadeln des Kalkschwammes *Paraleucilla magna*. Auf den Nadeln wurde entweder nur das modifizierte Silicatein immobilisiert und mit dem Substrat Ti[BALDH] inkubiert (A-C) oder zusätzlich noch mit dem Silintaphin-1 und dem Precursor (D-F). Als Negativkontrolle wurden die Nadeln ohne Proteine aber mit dem Substrat inkubiert (G-I). Die Skala der Messbalken von links nach rechts auf allen Bildern 60 µm, 30 µm und 8 µm.

Im Vergleich dazu zeigen Nadeln, auf denen das Glu-tag-Silicatein und sein Interaktionspartner Silintaphin-1 im Verhältnis 1:4 immobilisiert wurden, in Anwesenheit von Ti[BALDH] eine stärkere Veränderung. Die Nadeloberfläche wurde von einer netzartigen Struktur überzogen (D-F). Wurde die Inkubationszeit auf 72 Stunden erhöht und die Proteine, wie auch das Substrat alle 12 Stunden erneuert, konnte die größte Veränderung der Nadeloberfläche beobachtet werden. Die netzartige Struktur erschien ausgeprägter und es entstand ein raschel ähnlicher Überzug (s. Abb. 5.3.3.2).

Um genauere Aussagen über die Beschichtung zu erhalten, wurden EDX-Untersuchungen durchgeführt. Hier konnten die Signale für Calcium (Ca), Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O), Natrium (Na), Magnesium (Mg) und Titan (Ti) identifiziert werden.

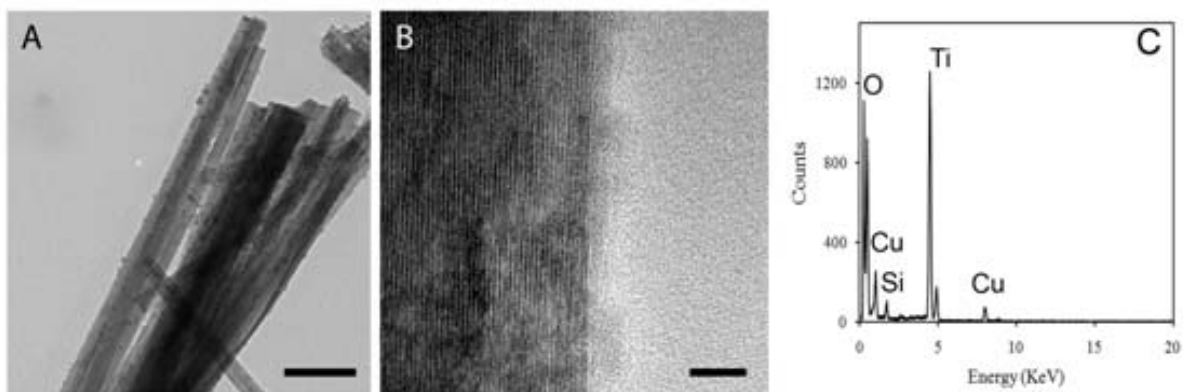


**Abbildung 5.3.3.2:** SEM Aufnahme einer Nadel von *Paraleucilla magna*, welche mit modifiziertem Silicatein und Silintaphin-1 bzw. Precursor inkubiert wurden. Über einen Zeitraum von 3 Tagen wurden sowohl die Proteine, als auch das Substrat alle 12 Stunden erneuert. (A) Komplette Nadel nach Versuchsende (Messbalken 30 µm). (B und C) Aufnahmen zeigen Vergrößerungen eines Nadelabschnitts (Messbalken 3 µm) und (D) das dazugehörige EDX.



### 5.3.4 Synthese von Biosilikat durch das auf TiO<sub>2</sub>-Nanodrähten immobilisierte Glu-tag-Silicatein

Um die Aktivität von gebundenem Glu-tag-Silicatein näher zu verdeutlichen, wurden auch die TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte mit 250 µM Tetraethylorthosilikat (TEOS) für 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit MilliQ-H<sub>2</sub>O erfolgte die Auswertung mittels TEM/EDX am Elektronenmikroskopie Zentrum der Johannes-Gutenberg Universität. Abbildung 5.3.4 zeigt die TEM-Aufnahmen und das dazugehörige EDX von TiO<sub>2</sub>-Nanodrähten, die mit Glu-tag-Silicatein und TEOS inkubiert wurden.

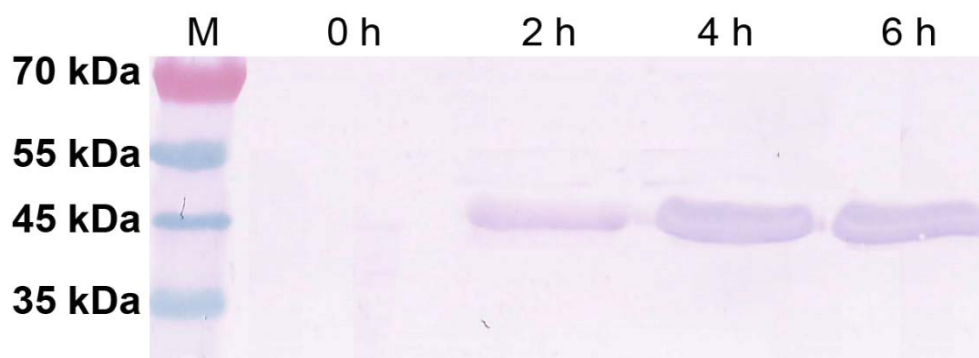


**Abbildung 5.3.4:** TEM-Aufnahmen von TiO<sub>2</sub>-Nanodrähten an denen Biosilikat durch immobilisiertes Glu-tag-Silicatein synthetisiert wurde (A/B) und das dazugehörige EDX (C).

Auf der Oberfläche der TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte lassen sich verschieden große Aggregatstrukturen in Form von dunkleren Flecken erkennen (A/B). Um diese Aggregate genauer zu charakterisieren, wurde eine EDX-Untersuchung durchgeführt. Neben den Signalen für Titan (Ti) und Sauerstoff (O), die den TiO<sub>2</sub>-Nanodrähten zugeordnet werden können, konnte auch ein Signal für Silikat (Si) detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den Aggregaten um Biosilikat handelt. Das Signal für Kupfer lässt sich auf die verwendeten TEM-Grids zurückführen.

## 5.4 Expression des Interaktionspartners Silintaphin-1

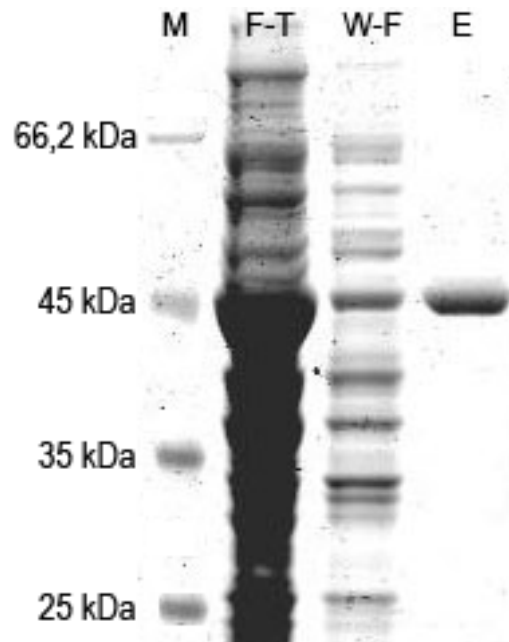
Um den Interaktionspartner des Silicatein  $\alpha$ , das Silintaphin-1 für spätere Versuche zur Verfügung zu haben, wurde dieses als rekombinantes Protein exprimiert und aufgereinigt. Hierfür wurde der kodierende Bereich des Silintaphin-1 mit genspezifischen Primern (s. 3.11) aus der *Suberites domuncula* cDNA-Bank amplifiziert (s. 4.2), in den Expressionsvektor pTrcHis2-TOPO kloniert (s. 4.9.1) und in verschiedene Bakterienstämme transformiert (s. 4.6.3). Die Expression des rekombinanten Silintaphin-1 wurde im Western-Blot mit anti-His-Antikörpern überprüft (s. 4.11.2). Abbildung 5.4.1 zeigt den Western-Blot der Pilotexpression des Silintaphin-1 mit den Proben 0-6 Stunden.



**Abbildung 5.4.1:** Western-Blot zur Darstellung der Expression des rekombinant hergestellten Silintaphin-1. Dargestellt sind die aus *E. coli* Expressionskulturen gewonnenen Proben; von links nach rechts: M = Marker (peqGold Prestained Protein Marker IV), 0 h = induziert mit IPTG bzw. 2 h, 4 h und 6 h nach der Induktion. Detektion mit Primärantikörper anti-His und Sekundärantikörper anti-Maus konjugiert mit Alkalischer Phosphatase.

Es zeigte sich eine zeitabhängig zunehmende Proteinexpression in Form einer stärker werdenden Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Dies entspricht dem errechneten Molekulargewicht von 42,509 kDa, wenn man den angefügten His-Tag und andere vektorspezifische Sequenzen von insgesamt 3 kDa mit einbezieht.

Um eine ausreichende Menge des Silintaphin-1 zu erhalten, wurde eine Bakterienkultur angesetzt. Diese wurde ab einer  $OD_{600}$  von 0,6 mit IPTG induziert und für 6 Stunden bei 37°C schüttelnd im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das exprimierte rekombinante Protein unter nativen Bedingungen über  $Ni^{2+}$ -NTA aufgereinigt (s. 4.9.5). Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-Gel auf ihre Reinheit überprüft (s. Abb.: 5.4.2) und die Proteinmenge durch einen *Bradford Assay* (s. 4.9.6) quantifiziert.



**Abbildung 5.4.2:** SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung des rekombinanten Silintaphin-1. Aufgetragen von links nach rechts: M = Marker (peqGold Protein Standard Marker I), F-T = Durchfluss, W-T = Waschfraktion und E = Eluat.

Das SDS-Gel zeigte eine saubere Aufreinigung des Silintaphin-1, da im Eluat (E) keine Kontaminationen in Form von anderen Proteinbanden zu erkennen waren. Anschließend wurde noch eine Dialyse gegen 1L Aufbewahrungspuffer (TBS pH 7,5) durchgeführt, bevor das rekombinante Silintaphin-1 für weiterführende Experimente verwendet werden konnte.

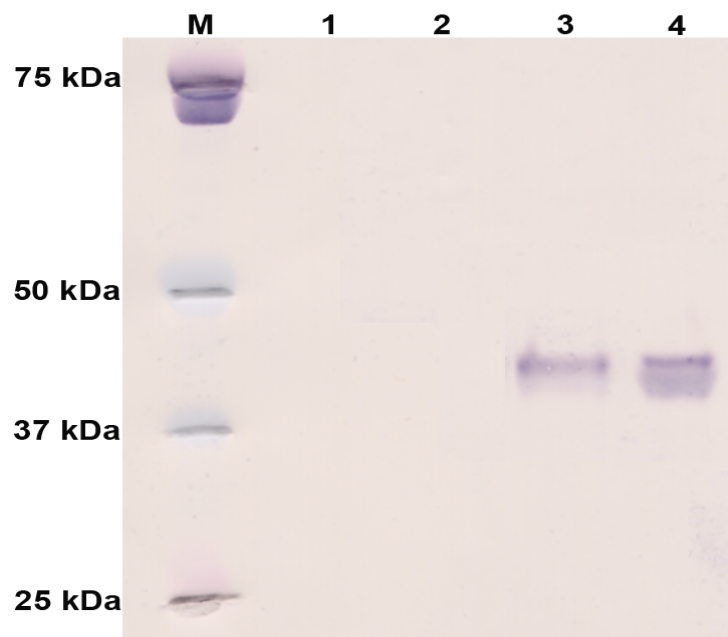
## **5.5 Screening nach Interaktionspartnern des Silicatein $\alpha$ durch einen modifizierten Pulldown-Assay**

### **5.5.1 Detektion von rekombinantem Silintaphin-1**

Ein Pulldown-Assay ist eine Methode um *in vitro* Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen. Hierzu wird ein Zielprotein (bait = Köder) in einen Fusionsvektor (z.B. GST) kloniert und exprimiert. Nach anschließender Aufreinigung kann das Fusionsprotein an eine Trägermatrix verankert werden, um durch die Zugabe von Zelllysate mögliche Interaktionspartner (prey= Beute) zu binden. Danach können diese

durch Verwendung von Eluationspuffern voneinander gelöst werden. Die Auswertung erfolgt über SDS-PAGE oder durch einen Western-Blot.

Um zu zeigen, dass ein solcher Pulldown-Assay auch mit auf Hydroxyapatit-Plättchen (HA) immobilisiertem Silicatein möglich ist, wurde zuerst die Interaktion von Silicatein  $\alpha$  mit Silintaphin-1 überprüft. Hierzu wurde das immobilisierte Glu-tag-Silicatein mit rekombinantem (rek.) Silintaphin-1 für 2 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS, wurden die Interaktionspartner durch die Zugabe von verschiedenen Eluationspuffern (s. 4.13) voneinander separiert und mittels Western-Blot detektiert. Abbildung 5.5.1 zeigt einen solchen Western-Blot.



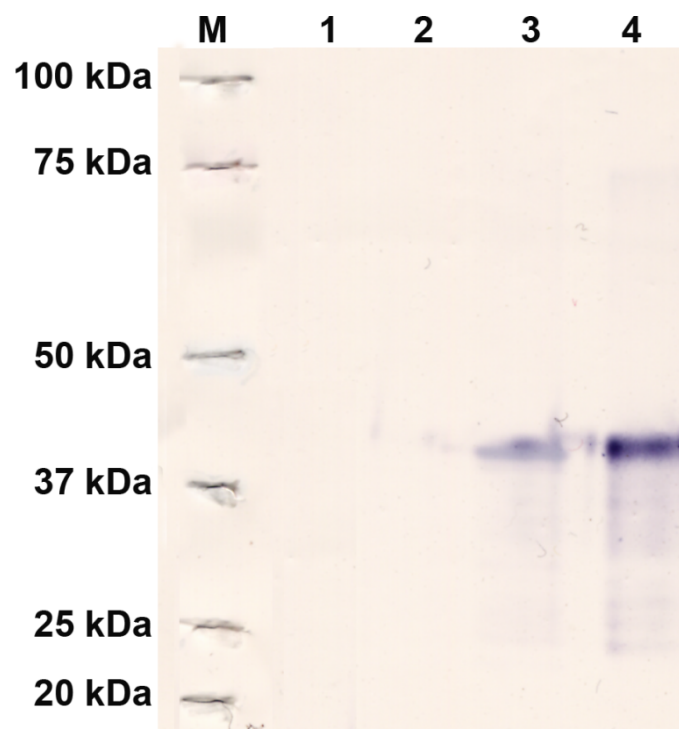
**Abbildung 5.5.1:** Western-Blot nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von rek. Silintaphin-1. Aufgetragen von links nach rechts: M: Marker (Protein Standard Dual Color), 1: Waschfraktion 1, 2: Waschfraktion 2, 3: Eluat mit Eluationspuffer 1, 4: Eluat mit Eluationspuffer 2

Auf dem Western-Blot sind neben dem Marker (M) noch die zwei Waschfraktionen und beide Eluate aufgetragen. Zur Detektion wurden ein primärer anti-His-Antikörper und ein sekundärer anti-Maus-Antikörper, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, eingesetzt. Das Silintaphin-1 konnte nur in den letzten Überständen, nach der Separierung der Interaktionspartner durch die Zugabe von zwei Eluationspuffern, nachgewiesen werden. Während den einzelnen Waschschritten konnten keine Banden auf dem Blot detektiert werden. Damit konnte bewiesen werden, dass eine Identifizierung von Interaktionspartnern des Silicatein  $\alpha$  durch diesen modifizierten Pulldown-Assay möglich ist. In Folgeversuchen sollte gezeigt werden, dass dieser

Assay auch mit einem Schwamm-Proteinextrakt anstelle von rekombinantem Protein funktioniert, um weitere Interaktionspartner zu detektieren.

### 5.5.2 Detektion von nativem Silintaphin-1

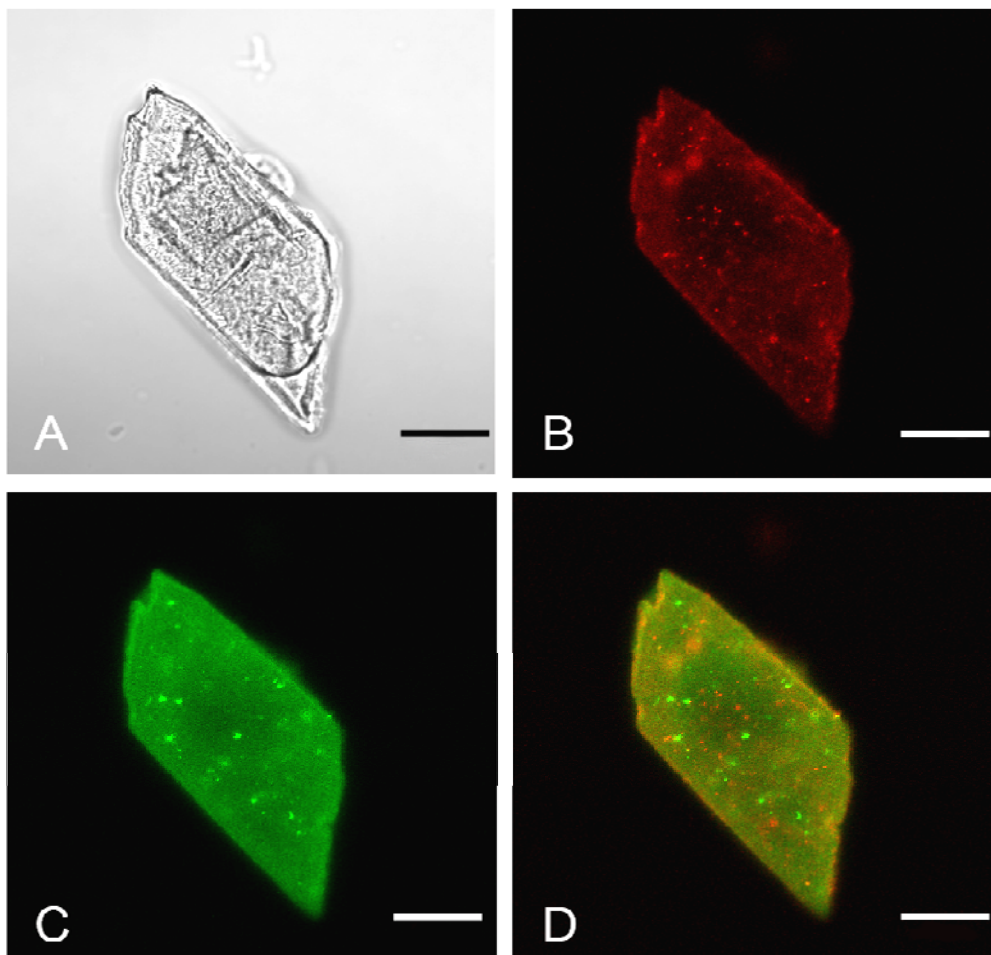
Um zu bestätigen, dass Interaktionspartner des Silicatein  $\alpha$  mit dieser Methode auch aus einem Schwamm-Proteinextrakt isoliert werden können, wurde das auf Hydroxyapatit-Plättchen immobilisierte Glu-tag-Silicatein mit einem Proteinextrakt aus dem Schwamm *Suberites domuncula* wie unter 4.13 beschrieben inkubiert. Die Separierung von gebundenen Interaktionspartnern erfolgte durch die schon erwähnten Elutionspuffer. Die Detektion erfolgte durch einen Western-Blot mit Antikörpern gegen das Silintaphin-1 (s. Abb. 5.5.2.1).



**Abbildung 5.5.2.1:** Western-Blot nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von nativem Silintaphin-1. Aufgetragen von links nach rechts: M: Marker (Protein Standard Dual Color), 1: Waschfraktion 1, 2: Waschfraktion 2, 3: Eluat mit Elutionspuffer 1, 4: Eluat mit Elutionspuffer 2

Auf dem Western-Blot sind neben dem Marker (M) noch die zwei Waschschrte und beide Eluate aufgetragen. Zur Detektion wurden ein primärer anti-Silintaphin-1-Antikörper und ein sekundärer anti-Maus-Antikörper, konjugiert mit Alkalischer

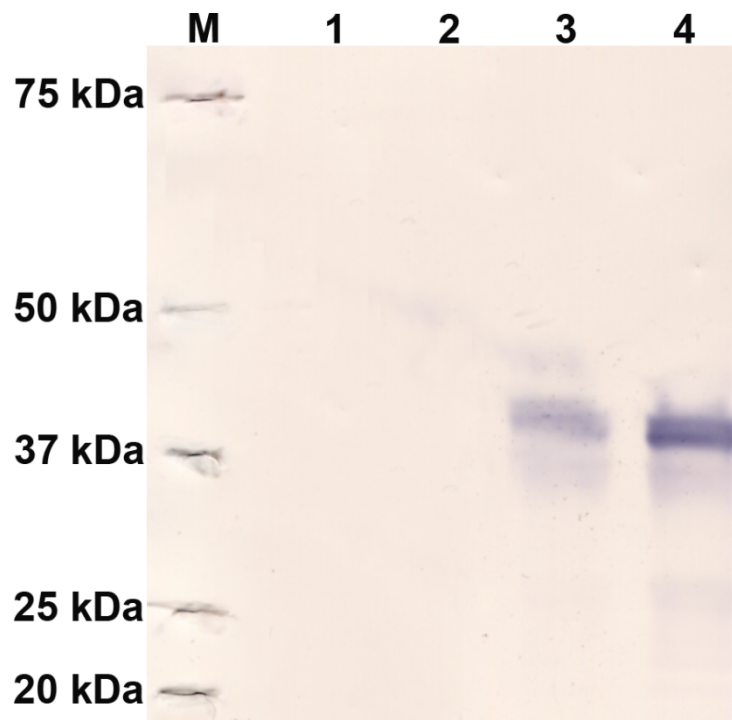
Phosphatase, eingesetzt. Auch hier konnte das native Silintaphin-1 nur in den letzten Überständen, nach der Separierung der Interaktionspartner durch die Zugabe von zwei Elutionspuffern nachgewiesen werden. Während den einzelnen Waschschrritten konnten keine Banden auf dem Blot detektiert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass dieser modifizierte Pulldown-Assay auch zur Detektion von Interaktionspartnern aus einem Schwamm-Proteinextrakt genutzt werden kann. Um die Bindung des Silintaphin-1 an das Glu-tag-Silicatein zu visualisieren, wurde eine Antikörperfärbung direkt an den HA-Plättchen durchgeführt (s. Abb. 5.5.2.2). Dies war möglich, da der primäre anti-Silicatein-Antikörper aus einem Kaninchen stammte und der anti-Silintaphin-1 aus einer Maus. Die Detektion erfolgte über einen sekundären Cy3 anti-Kaninchen- bzw. FITC-anti-Maus-Antikörper.



**Abbildung 5.5.2.2:** Immunofluoreszenzanalyse des immobilisierten Silicatein und seines Interaktionspartners Silintaphin-1 auf Hydroxyapatit-Plättchen. Zur Detektion des Silicatein wurde ein spezifischer anti-Silicatein  $\alpha$  Primärantikörper und ein Cy3 anti-Kaninchen-Sekundärantikörper verwendet (B). Das an Silicatein gebundene Silintaphin-1 wurde durch einen spezifischen anti-Silintaphin-1-Antikörper und einen FITC-anti-Maus- Sekundärantikörper detektiert (C). Differentialinterferenzkontrast (Nomarski) Aufnahme eines Hydroxyapatit-Plättchens (A) und *Merge* beider Antikörperfluoreszenzsignale (D). Co-lokalisierungen erscheinen gelb. Die Aufnahmen wurden mit einem CLSM 700 (Zeiss) gemacht.

### 5.5.3 Detektion von Silicatein $\beta$

Der zweite bekannte Interaktionspartner, der durch diese Methode aus einem Schwamm-Proteinextrakt identifiziert werden sollte, war das native Silicatein  $\beta$ . Auch hier wurde das auf HA-Plättchen immobilisierte Silicatein  $\alpha$  mit einem Schwamm-Proteinextrakt inkubiert und nach mehrmaligem Waschen wurden die Interaktionspartner durch Zugabe von Eluationspuffern separiert. Durch einen Western-Blot mit Antikörpern gegen das Silicatein  $\beta$ , konnte dieses detektiert werden (s. Abb. 5.5.3).



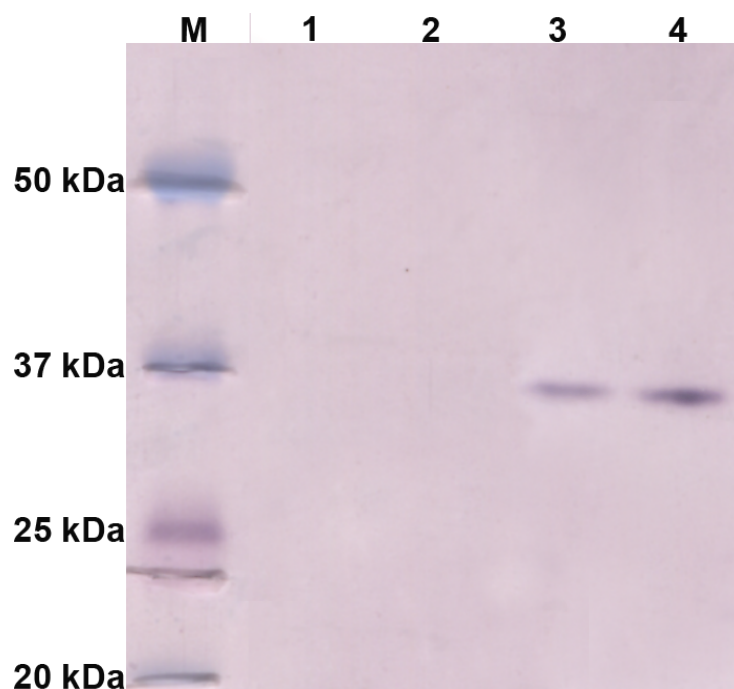
**Abbildung 5.5.3:** Western-Blot nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von nativem Silicatein  $\beta$ . Aufgetragen von links nach rechts: M: Marker (Protein Standard Dual Color), 1: Waschfraktion 1, 2: Waschfraktion 2, 3: Eluat mit Eluationspuffer 1, 4: Eluat mit Eluationspuffer 2

Auf dem Western-Blot sind neben dem Marker (M) noch die zwei Waschschrte und beide Eluate aufgetragen. Zur Detektion wurde ein primärer anti-Silicatein  $\beta$ -Antikörper und ein sekundärer anti-Kaninchen-Antikörper, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, eingesetzt. Erneut konnte das native Silicatein  $\beta$  nur in den letzten Überständen, nach der Separierung der Interaktionspartner durch die Zugabe von zwei Eluationspuffern, nachgewiesen werden. Während den einzelnen Waschschrten konnten keine Banden auf dem Blot detektiert werden. Das Molekulargewicht von 40 kDa entspricht dem des Proproteins von Silicatein  $\beta$ . Das reife, prozessierte Silicatein  $\beta$  hat ein Molekulargewicht von 24 kDa. Eine

Antikörperfärbung direkt an den Hydroxyapatit-Plättchen, wie beim Silintaphin-1, konnte hier nicht durchgeführt werden, da beide primären Antikörper mittels Kaninchen erzeugt wurden. Somit war eine eindeutige Detektion der beiden Interaktionspartner nicht möglich.

#### 5.5.4 Detektion des Silicatein $\alpha$

Der dritte Interaktionspartner, der mittels dieser Methode detektiert werden sollte, war das native Silicatein  $\alpha$ . Hierzu wurde das Glu-tag-Silicatein auf HA-Plättchen immobilisiert und mit einem Schwamm-Proteinextrakt inkubiert. Nach mehrmaligen Waschschritten, wurden die Interaktionspartner durch die Zugabe von Eluationspuffern voneinander separiert. Die Detektion erfolgte durch einen Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das native Silicatein  $\alpha$  (s. Abb. 5.5.4).



**Abbildung 5.5.4:** Western-Blot nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von nativem Silicatein  $\alpha$ . Aufgetragen von links nach rechts: M: Marker (Protein Standard Dual Color), 1: Waschfraktion 1, 2: Waschfraktion 2, 3: Eluat mit Eluationspuffer 1, 4: Eluat mit Eluationspuffer 2

Neben dem Marker (M) sind auf dem Western-Blot noch die zwei Waschschrritte und beide Eluate aufgetragen. Zur Detektion wurde ein primärer anti-Silicatein  $\alpha$ -Antikörper und ein sekundärer anti-Kaninchen-Antikörper, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, eingesetzt. Auch hier konnte das native Silicatein  $\alpha$  nur in den letzten

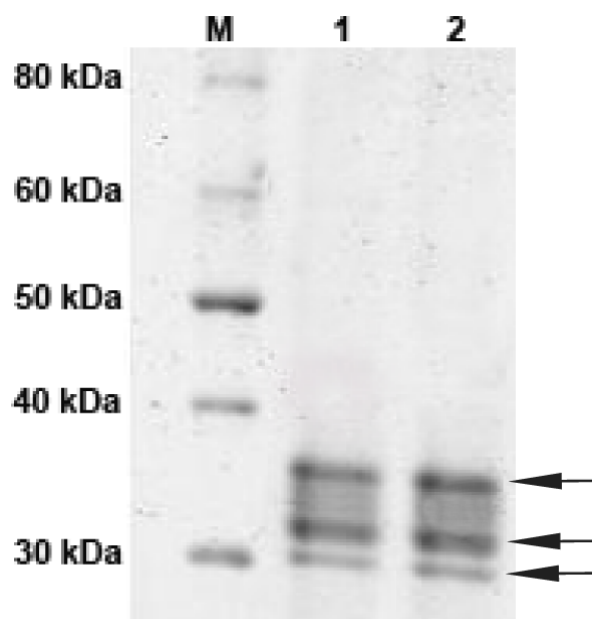


Überständen, nach der Separierung der Interaktionspartner durch die Zugabe von zwei Elutionspuffern, nachgewiesen werden. Während der einzelnen Waschschriffe konnten keine Banden auf dem Blot detektiert werden. Das Molekulargewicht von 35 kDa entspricht dem des Proproteins von Silicatein  $\alpha$ . Das reife, prozessierte Silicatein  $\alpha$  hat ein Molekulargewicht von 24 kDa.

### 5.5.5 Detektion von unbekanntem Proteinen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es mit dem modifizierten Pulldown-Assay möglich ist, bekannte Interaktionspartner des Silicatein  $\alpha$  zu identifizieren, sollten bislang noch unbekannte Proteine mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden.

Hierzu wurde das Glu-tag-Silicatein auf HA-Plättchen immobilisiert und mit einem Schwamm-Proteinextrakt inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Interaktionspartner durch die Zugabe von Elutionspuffern voneinander separiert. Die Detektion erfolgte auf einem SDS-Gel durch Coomassie-Färbung (s. Abb. 5.5.5).



**Abbildung 5.5.5:** SDS-Gel nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von noch unbekanntem Interaktionspartnern des Silicatein  $\alpha$ . Aufgetragen von links nach rechts: M: Marker (Novex Sharp Unstained Protein Standard) 1: Eluat mit Elutionspuffer 1, 2: Eluat mit Elutionspuffer 2. Die Pfeile markieren die Banden, die für die *deNovo* Sequenzierung vorgesehen waren bei 37, 33 und 30 kDa.

Neben dem Marker (M) wurden nur die Eluate 1 und 2 aufgetragen, die einzelnen Waschschr itte sind nicht gezeigt. Die Banden, die auf dem Gelbild mit Pfeilen markiert sind, stellen Proteine dar, die nicht durch Antikörperfärbung identifiziert werden konnten. Um mehr Informationen über diese Proteine zu erlangen, wurde das SDS-Gel zur Firma PANATecs nach Tübingen verschickt. Dort wurden die Banden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und isoliert. Nach einem tryptischen Verdau, konnten die abgespaltenen Peptide mittels *deNovo*-Sequenzierung analysiert werden. Tabelle 5.5.5 zeigt die erhaltenen Aminosäuresequenzen für die drei unbekannt Proteine.

Isoliertes Protein	Erhaltene Fragmente
37 kDa	KDGAGFWD <u>NVENNFEA</u> HPR
33 kDa	AGGEL <u>KSAGST</u> PRR
30 kDa	<u>AGAPYACRDF</u> LDDRER

**Tabelle 5.5.5:** Erhaltene Aminosäuresequenz der unbekannt Proteine nach *deNovo*-Sequenzierung. Unterstrichene Sequenzanteile bezeichnen eine sichere Identifizierung mit einem in BioTools2.2 RapidDeNovo angegebenen Score von 100%.

Um die erhaltenen Sequenzen zu charakterisieren wurden diese mit anderen Proteinen aus Gendatenbanken (NCBI mit BLASTP-Algorithmus) verglichen. Es konnte keine Homologie zu schon bekannten Proteinen festgestellt werden. In weiterführenden Versuchen könnten, durch die Synthese von degenerierten Primern, die Gene aus der cDNA-Bank des Institutes amplifiziert und näher charakterisiert werden.

## 5.6 Cys-tag Modifizierung des Silicatein $\alpha$

Wie unter 5.1 erwähnt, mussten Oberflächen auf denen das Silicatein immobilisiert werden sollte, zuvor mit einem Ni<sup>2+</sup>-NTA-Copolymer überzogen werden. Hauptsächlich wurde diese Methode bei Beschichtung von Goldoberflächen, der sogenannten Lithographie eingesetzt. Dabei ist das NTA-Copolymer über die Thiolgruppen der Cysteamine auf der Goldoberfläche gebunden.

Um das Silicatein direkt auf Goldoberflächen zu immobilisieren, wurde es in einem weiteren Versuch mit einem Cys-tag modifiziert. Die Modifizierung erfolgte mittels PCR und genspezifischer Primer, die am 5'-Ende eine für acht Cystein-Reste codierende Sequenz besitzen (s. 3.11.1). Zur Überprüfung der korrekten Modifizierung wurde das PCR-Produkt nach Aufreinigung in den pGEM-T-Vektor kloniert (s. 4.6) und sequenziert (s. 4.8). Anschließend konnte das modifizierte Silicatein über eine TA-Klonierung in den Expressionsvektor pTrc-His2 kloniert (s. 4.9.1) werden.

Abbildung 5.6.1 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Cys-tag modifizierten Silicatein.

```

1  M  A  L  C  C  C  C  C  C  C  C  P  E  A  V  D  W  R  T  K      20
1  ATGCCCTTTGTTGCTGTTGCTGTTGCTGTTGCCCTGAAGCTGTAGACTGGAGAACCAAA  60
21  G  A  V  A  A  V  K  D  Q  G  D  C  G  A  S  Y  A  F  S  A      40
61  GGAGCTGTGCGGGCTGTCAAGGACCAGGGAGACTGTGGTGCTAGCTATGCTTTCAGTGCT  120
41  M  G  A  L  E  G  A  N  A  L  A  K  G  N  A  V  S  L  S  E      60
121 ATGGGTGCTTTGGAGGGTGCTAATGCTTTAGCCAAGGGAAATGCAGTATCTCTCAGTGAA  180
61  Q  N  I  I  D  C  S  I  P  Y  G  N  H  G  C  H  G  G  N  M      80
181 CAGAACATCATTGATTGCTCGATTCCCTTACGGTAACACGGTTGTCATGGAGGCAATATG  240
81  Y  D  A  F  L  Y  V  I  A  N  E  G  V  D  Q  D  S  A  Y  P      100
241 TATGATGCTTTTTTGTATGTCATCGCTAACGAGGGGGTCGATCAGGACAGTGCATATCCA  300
101 F  V  G  K  Q  S  S  C  N  Y  N  S  K  Y  K  G  T  S  M  S      120
301 TTTGTTGGAAAGCAATCCAGCTGCAACTATAACAGTAAATACAAAGGTACATCAATGTGCG  360
121 G  M  V  S  I  K  S  G  S  E  S  D  L  Q  A  A  V  S  N  V      140
361 GGGATGGTGTCAATCAAAAGTGGTAGTGAGTCTGACTTACAAGCAGCTGTTTCAAACGTT  420
141 G  P  V  S  V  A  I  D  D  A  N  S  A  F  G  F  Y  Y  S  G      160
421 GGCCCTGTATCTGTTGCTATTGATGATGCTAACAGTGCCTTCGGGTTTTACTACAGTGGT  480

```

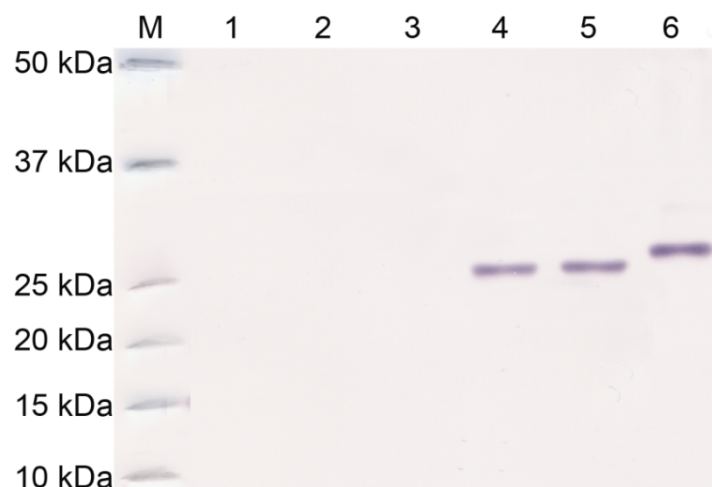
```

161  V Y D S S R C S S S S L N H A M V V T G 180
481  GTCTATGACTCATCACGATGCTCCAGTAGTAGTCTTAACCACGCAATGGTAGTCACTGGA 540
181  Y G S Y N G K K Y W L A K N S W G T N W 200
541  TACGGATCATAACAATGGGAAAAAATACTGGCTGGCCAAGAATAGCTGGGGAACTAACTGG 600
201  G N S G Y V M M A R N K Y N Q C G I A T 220
601  GGTAACAGTGGCTATGTGATGATGGCCCGCAACAAGTACAACCAGTGTGGAATTGCTACC 660
221  D A S Y P T L K G E F E A Y V E Q K L I 240
661  GATGCATCTTATCCCACCCTAAAGGGCGAATTTCGAAGCTTACGTAGAACAACAAAACATCATC 720
241  S E E D L N S A V D H H H H H H *
721  TCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATGTA

```

**Abbildung 5.6.1:** Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz des Cys-tag-Silicatein  $\alpha$  im Expressionsvektor pTrc-His2. Rot markiert sind Start- bzw. Stoppcodon, der Cys-tag (8 x C) ist schwarz unterstrichen. Anfang und Ende des reifen Silicatein sind lila gekennzeichnet. Das *myc*-Epitop ist orange dargestellt, der His-tag grün

Die Gesamtlänge des Cys-tag-Silicatein beträgt 256 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 27 kDa. Die Sequenz beinhaltet neben dem modifizierten Silicatein  $\alpha$ , auch einen C-terminalen His-tag (6 x H) bzw. ein *myc*-Epitop, die zur Aufreinigung und Antikörperdetektion genutzt werden. Da das Cys-tag-Silicatein ausschließlich in unlöslicher Form exprimiert wird, erfolgte die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (s. 4.9.5.2) über  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose und wurde durch einen Western-Blot mittels anti-His-Antikörper überprüft (s. 4.11.2). Abbildung 5.6.2 zeigt den Western-Blot nach der Aufreinigung des Cys-tag-Silicatein.



**Abbildung 5.6.2:** Western-Blot nach denaturierter Aufreinigung des Cys-tag-Silicatein. Aufgetragen sind von links nach rechts: M: Marker (Dual Color Precision Plus), 1: Durchfluss, 2: Waschfraktion 1, 3: Waschfraktion 2, 4: Eluat 1, 5: Eluat 2, 6: Glu-tag-Silicatein.

Auf dem Western-Blot wurde neben der Aufreinigung des Cys-tag-Silicatein, auch das Glu-tag-Silicatein aufgetragen. Deutlich ist der Unterschied im Molekulargewicht erkennbar. Dies ist auf die Verwendung des pTrc-His2 Vektors zurückzuführen, da dieser keine 21 Aminosäuren lange Startsequenz, wie der pBAD/gIIIa besitzt und somit ist das Cys-tag-Silicatein ca. 2,5 kDa leichter.

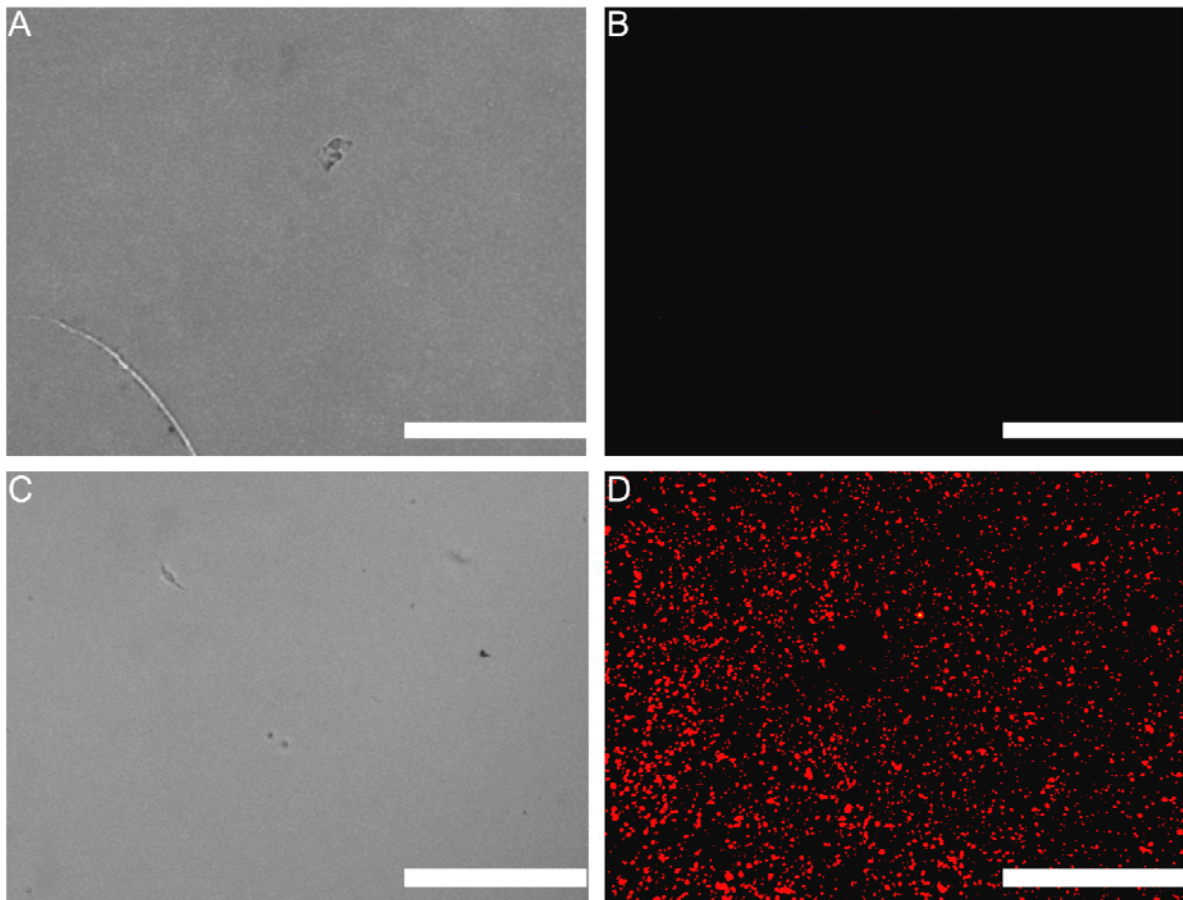
Die weiteren Versuche wurden alle mit dem denaturiert aufgereinigten Cys-tag-Silicatein durchgeführt. Die verwendeten Goldoberflächen, sogenannte (111) Goldoberflächen, wurden im Institut für Anorganische Chemie hergestellt. Abbildung 5.6.3 zeigt ein 2 x 2 cm großes Stück eines Objektträgers, auf dem eine solche Goldoberfläche aufgetragen wurde.



**Abbildung 5.6.3:** Verwendete Goldoberfläche (111), die auf einem Objektträger aufgetragen wurde.

Diese Plättchen wurden dann mit 300 µg Cys-tag-Silicatein für 12 Stunden inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit MilliQ-Wasser erfolgte die Auswertung durch Antikörperfärbung und AFM- Messungen. *Atomic Force Microscope* (AFM) ist eine Methode zur mechanischen Abtastung von Oberflächen und der Messung atomarer Kräfte im Nanometerbereich. Diese Messungen wurden am MPI-P durchgeführt. Bevor diese durchgeführt werden konnten, musste zuerst die Immobilisierung des Cys-tag-Silicatein nachgewiesen werden. Hierzu wurde eine Antikörperfärbung direkt auf den Plättchen durchgeführt, nachdem diese für 12 Stunden in 15% Milchlösung geblockt worden waren. Die Antikörperfärbung erfolgte mit einem primären anti-His-Antikörper und einem sekundären Cy3 konjugierten anti-Maus-Antikörper. Die Auswertung erfolgte an einem Stereomikroskop AHBT3 (s. 4.15). Abbildung 5.6.4 zeigt die Detektion des immobilisierten Cys-tag-Silicatein durch Antikörperfärbung.

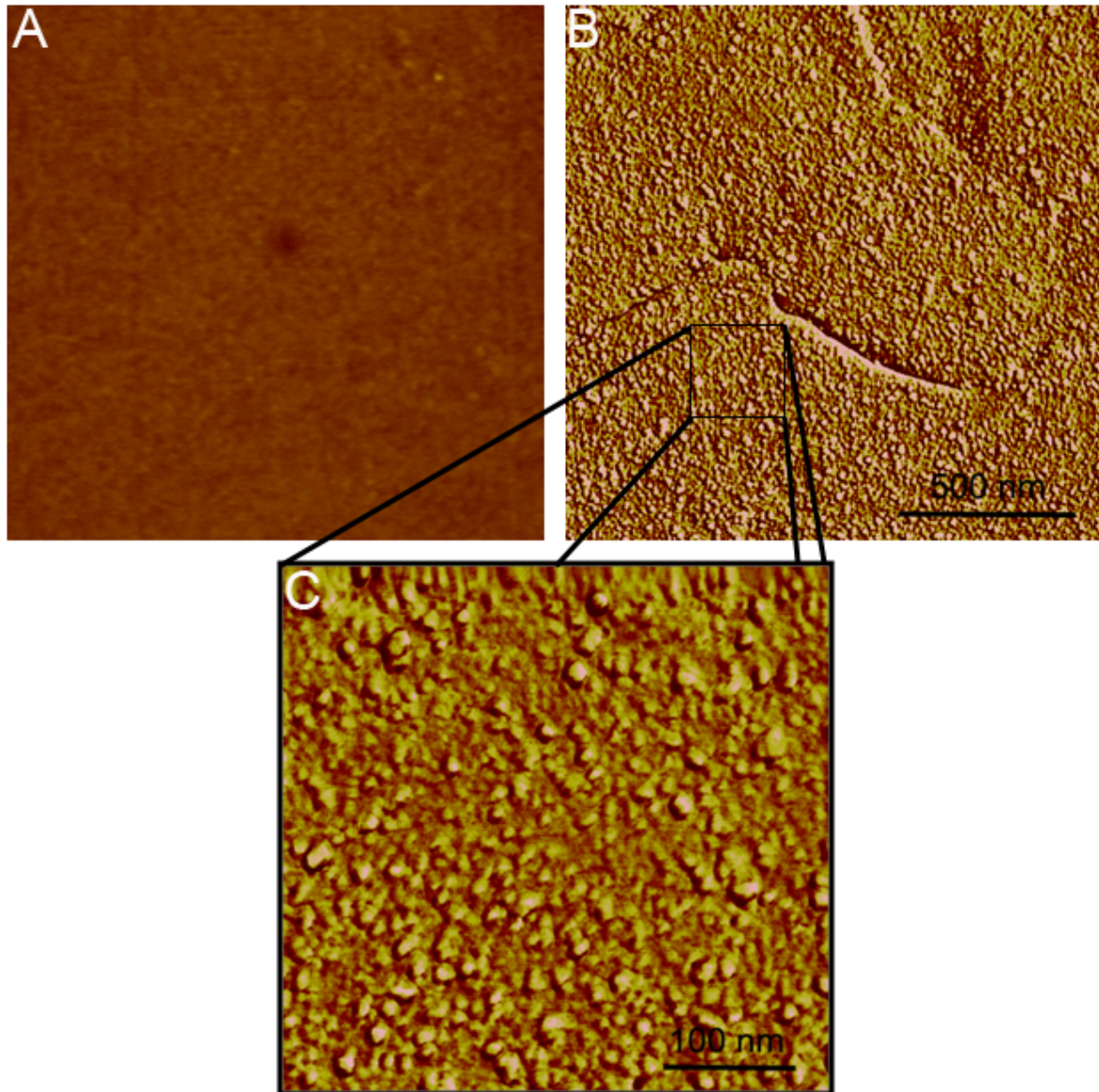
Als Negativ-Kontrolle dienten Goldoberflächen, die mit unmodifiziertem Silicatein inkubiert wurden.



**Abbildung 5.6.4:** Immunofluoreszenzanalyse des auf (111) Goldoberflächen immobilisierten Cys-tag-Silicatein mit einem anti-His Primärantikörper und einem Cy3 konjugierten Sekundärantikörper (B/D) und die entsprechenden Nomarski Bilder (A/C). (A/B) Negativ-Kontrolle mit unmodifiziertem Silicatein. (C/D) Cys-tag-Silicatein immobilisiert auf der Goldoberfläche. Messskalen 20  $\mu\text{m}$ .

Deutlich konnte das immobilisierte Cys-tag-Silicatein auf der Goldoberfläche mit Hilfe der Antikörperfärbung detektiert werden (C/D). Zwar ist kein komplett homogener Überzug zu erkennen, dennoch kann von einer spezifischen Bindung des Cys-tag-Silicatein auf der Goldoberfläche gesprochen werden, denn die Negativ-Kontrolle mit unmodifiziertem Silicatein zeigt keine Fluoreszenzsignale.

Um die Bindung noch besser zu verdeutlichen, wurde die eingangs beschriebene AFM-Messung durchgeführt. Abbildung 5.6.5 zeigt diese, neben der Goldoberfläche auf der das Cys-tag-Silicatein immobilisiert wurde. Als Negativ-Kontrolle diente eine unbehandelte Oberfläche.

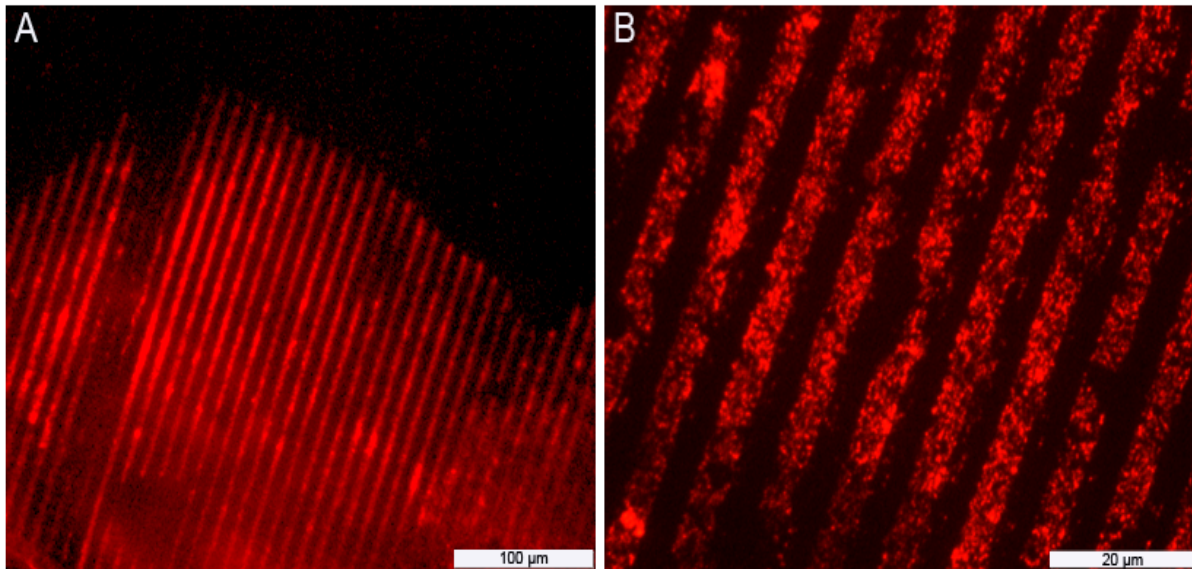


**Abbildung 5.6.5:** AFM-Aufnahmen von (111) Goldoberflächen. (A) Unbehandelte Goldoberfläche, die als Negativ-Kontrolle diente. (B/C) Goldoberfläche auf der Cys-tag-Silicatein immobilisiert wurde, zum einen eine Übersicht (B) und zum anderen eine Nahaufnahme (C) des in B markierten Bereiches.

Auch bei den AFM-Aufnahmen lässt sich ganz deutlich das immobilisierte Cys-tag-Silicatein auf der Goldoberfläche in Form von Aufrauungen erkennen (B/C). Die Negativ-Kontrolle zeigt keine Aufrauungen (A). Somit konnten die schon durch die Antikörperfärbung gemachten Ergebnisse, in Bezug auf die Immobilisierung von Cys-tag-Silicatein auf Goldoberflächen, bestätigt werden.

Durch die Verwendung des Microcontact-Printings konnte das Cys-tag-Silicatein in einer geordneten Struktur auf die Goldoberfläche übertragen werden. Bei dieser Methode wurde ein Polydimethylsiloxan (PDMS)-Stempel verwendet. Dieser Stempel besitzt ein linienförmiges Muster, wobei jede Linie 8  $\mu\text{m}$  breit ist. Der Abstand zwischen den Linien beträgt 5  $\mu\text{m}$ . Der Stempel wurde mit 50  $\mu\text{g}$  Cys-tag-Silicatein

bedeckt. Nach einer kurzen Trockenphase von einer Minute im Stickstoffstrom, konnte das Cys-tag-Silicatein auf die Goldoberfläche übertragen werden. Nach mehrmaligem Waschen wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt um das gebundene Cys-tag-Silicatein zu detektieren (s. Abb.: 5.6.6).



**Abbildung 5.6.6:** Immunofluoreszenzanalyse des auf (111) Goldoberflächen gestempelten Cys-tag-Silicatein mit einem anti-His Primärantikörper und einem Cy3 konjugierten Sekundärantikörper (A/B.). (A) Übersichtsaufnahme des Stempelmusters (Messbalken 100 µm) und (B) Ausschnitt aus A (Messbalken 20 µm).

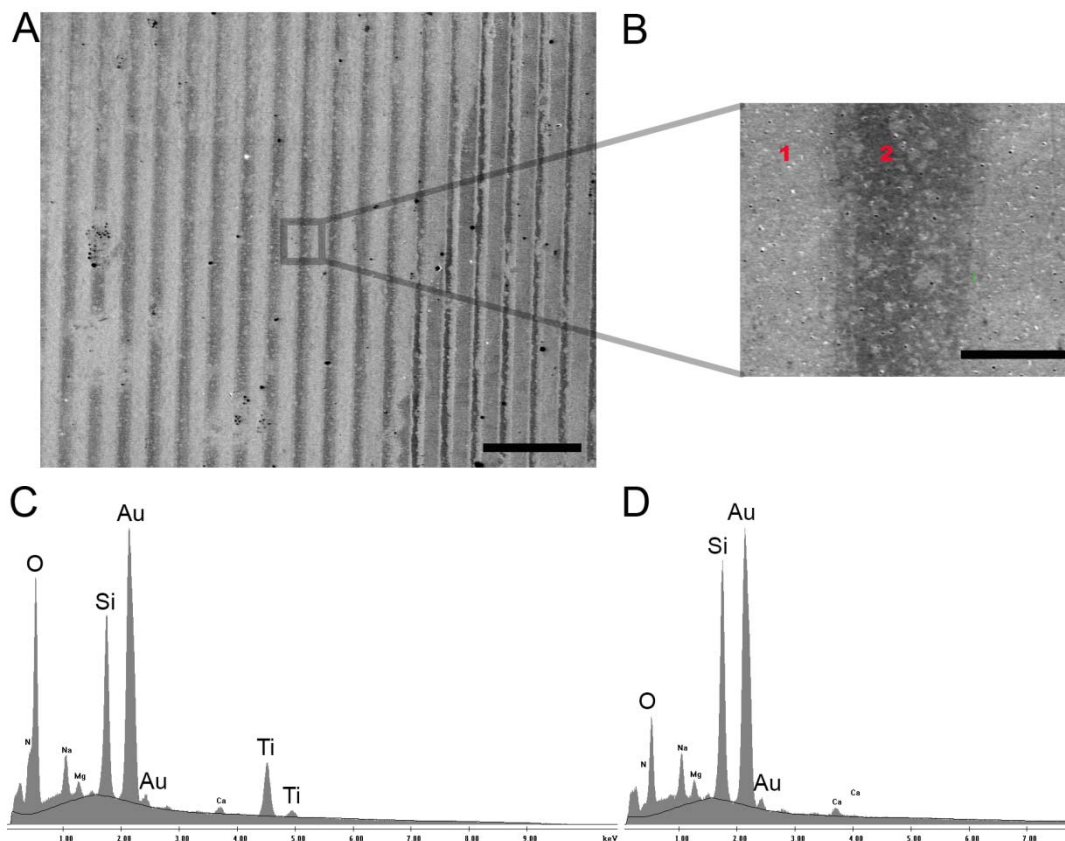
Deutlich konnte das linienförmige Muster des Stempels durch das Cys-tag-Silicatein auf die Goldoberfläche übertragen werden. Die Linien und die dazwischenliegenden Abstände sind klar zu erkennen. Auch durch mehrmaliges Waschen konnte dieses charakteristische Muster nicht zerstört werden.

Um die Aktivität des an Gold gebundenen Cys-tag-Silicatein näher zu untersuchen, wurden die durch einen Stempel übertragenen Proteine zuerst renaturiert und dann mit 250 µM Ti[BALDH] für zwei Stunden inkubiert (s. 4.14.4). Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Auswertung mittel SEM/EDX am MPI-P. Abbildung 5.6.7 zeigt die SEM Aufnahmen mit den dazugehörigen EDX Daten.

Deutlich war das durch den Stempel übertragene Linienmuster zu erkennen. In Verbindung mit den EDX Daten konnte die Anwesenheit von Titandioxid in den hellen Streifen des Stempelmusters bestätigt werden. In den dunklen Streifen (s. Abb. 5.6.7 D) ließen sich nur die Signale für Gold (Au), Sauerstoff (O), Silikat (Si), Natrium (Na), Magnesium (Mg) und Stickstoff (N) detektieren, aber keines für



Titan (Ti). Da in den dunklen Bereichen kein Protein vorhanden war, konnte es auch nicht zur Bildung von Titandioxid kommen. Diese Ergebnisse spiegeln zum einen die Resultate der Antikörperfärbung wieder und zum anderen zeigen sie, dass das immobilisierte Silicatein seine Aktivität beibehält bzw. die Renaturierung des gebundenen Proteins möglich ist.



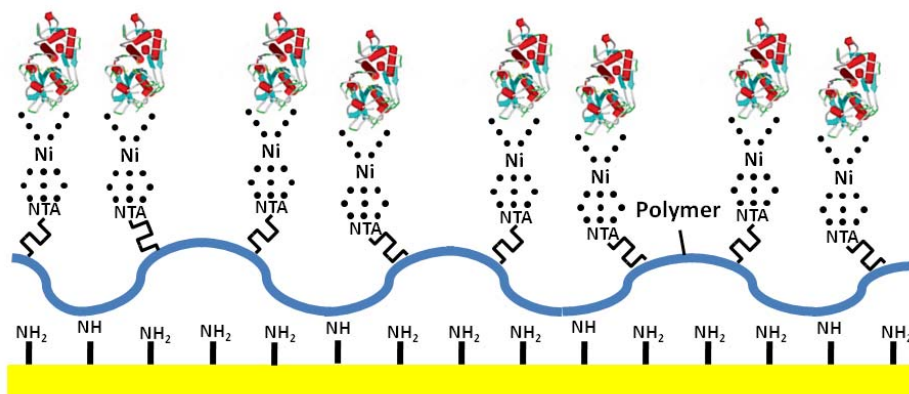
**Abbildung 5.6.7:** SEM/EDX Aufnahmen des gestempelten Cys-tag Silicatein nach Inkubation mit Ti[BALDH]. (A) Übersichtsaufnahme des Stempelmusters, (B) Ausschnitt mit der Markierung für die dazugehörigen EDX Analysen (C1/D2). (C) EDX eines hellen Streifen und (D) EDX eines dunklen Bereiches. Messbalken in A 50 µm und B 8 µm.

## 6. Diskussion

Silicateine sind Enzyme, welche nur in Schwämmen vorkommen und dort die Bildung von Biosilikat aus monomeren Siliziumverbindungen katalysieren. Silicatein  $\alpha$  wurde zum ersten Mal 1998 aus dem Schwamm *Tethya aurantia* isoliert und charakterisiert (Cha et al., 1999; Shimizu et al., 1998). Im Jahr 2000 konnte dann auch im Schwamm *Suberites domuncula* dieses Enzym beschrieben werden (Krasko et al., 2000). Das unprozessierte Polypeptid besteht aus 331 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 36 kDa. Nach Durchlaufen des Reifungsprozesses, einer Phosphorylierung und Abspaltung der Signalsequenz (AA<sub>1</sub>-AA<sub>17</sub>) bzw. des benachbarten Propeptids (AA<sub>18</sub>-AA<sub>112</sub>), besteht das reife Enzym aus 218 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 24 kDa und einem pI von 5,5.

Silicatein  $\alpha$  weist eine hohe Ähnlichkeit zum Cathepsin-L auf (Müller et al., 2006) und besitzt wie dieses im aktiven Zentrum ein Histidin (AA<sub>277</sub>) und ein Asparagin (AA<sub>297</sub>). Nur das Cystein des Cathepsin-L wurde durch ein Serin (AA<sub>138</sub>) ersetzt (Krasko et al., 2000). Auch das Serin-Cluster, welches im Silicatein  $\alpha$  nahe dem aktiven Zentrum zu finden ist, fehlt im Cathepsin-L (Müller et al., 2009). Silicatein  $\alpha$  bildet zum großen Teil das Axialfilament der Spiculae und ist auch an deren Außenseite zu finden, wo es für das lamellare Dickenwachstum verantwortlich ist (Müller et al., 2006). In der Arbeitsgruppe Morse wurde erstmals beschrieben, dass Silicatein  $\alpha$  nicht nur in der Lage ist die Bildung von Biosilikat zu katalysieren, sondern auch die Bildung von Titandioxid aus den entsprechenden Substraten wie zum Beispiel Titanium(IV) bis(ammonium lactato) dihydroxid (Ti[BALDH]) ermöglicht (Sumerel et al., 2003). Später konnte gezeigt werden, dass das Enzym auch Gallium-oxohydroxid (GaOOH) bzw. Galliumoxid (Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Kisailus et al., 2005a) und Zirkoniumdioxid (ZrO<sub>2</sub>) synthetisieren kann (Tahir et al., 2005). Die Syntheseigenschaften ermöglichen neue Applikationen in verschiedenen technischen Anwendungsbereichen. Anzuführen wären hier die Halbleitertechnik, piezoelektrische Sensoren, Solarzellen oder LED (Rai and Perry, 2009). Die Herstellung von Metalloxiden, die in diesen Gebieten zum Einsatz kommen, benötigt hohe Temperaturen, starken Druck und hohe pH-Werte. Das Enzym Silicatein  $\alpha$  ist in der Lage diese Reaktionen bei Raumtemperatur und neutralem pH aus in Wasser stabilen Substraten wie Ti[BALDH], Hexafluorzirconat (ZrF<sub>6</sub><sup>2-</sup>) und Gallium(III)nitrat

(GaNO<sub>3</sub>) zu katalysieren (Schröder et al., 2009). Dies ist im Besonderen für die Beschichtung von Materialien wichtig, die hitzeempfindlich sind oder durch extreme pH-Werte angegriffen werden. Tahir et al. gelang es 2005 rekombinantes Silicatein  $\alpha$  über einen Histidin-tag auf Goldoberflächen zu immobilisieren (Tahir et al., 2005). Der His-tag, der normalerweise zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins benötigt wird, kann dabei an eine Nickel-NTA-Matrix binden, welche an ein Polymer gekoppelt ist. Über ein Cysteamin wird es an die Goldoberfläche gebunden (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6.:** Schematische Darstellung der Immobilisierung von Silicatein auf einer Goldoberfläche durch ein Ni<sup>2+</sup>-NTA-Kopolymer. Dabei konnte das Polymer auf der einen Seite durch Cysteamine auf der Goldoberfläche verankert werden, auf der anderen Seite wurde das Silicatein über einen vorhandenen His-tag an das Ni<sup>2+</sup>-Ion dieses sogenannten „self assembled monolayer“ (SAM) gebunden.

Die Cysteamin-Polymer-Beschichtung bietet eine Reihe von Möglichkeiten in der Nanobiotechnologie, stößt aber in der Biomedizin an ihre Grenzen, da sich nicht alle Oberflächen für ein solches Coating eignen. Zudem können die zur Aktivierung des Polymers nötigen Lösungsmittel und die über die Zeit freigesetzten Monomere aus dem Polymergerüst toxische oder mutagene Wirkung auf das umliegende Gewebe haben (Natalio et al., 2010). Gegen den medizinischen Einsatz spricht auch das hohe allergene Potential des Nickels. Es kann zu einer Sensibilisierung führen, zumal die Prävalenz einer Kontaktallergie gegen das Metall in der Allgemeinbevölkerung sehr hoch ist (Kasper-Sonnenberg et al., 2011; Thyssen et al., 2007).

Um diesen Problemen zu begegnen wurden in dieser Arbeit zwei Tags entwickelt, mit denen Silicatein  $\alpha$  direkt auf verschiedene Oberflächen binden kann, ohne seine enzymatische Aktivität zu verlieren. Durch diese Art der Immobilisierung entfallen auch die toxischen und mutagenen Wirkungen, die über die Zeit durch das Polymergerüst freigesetzt werden.

### **6.1 Modifizierung des Silicatein $\alpha$ mit einem Glu-tag**

Basierend auf dem aktuellen Forschungsstand wurde in dieser Arbeit die Modifikation des Silicatein  $\alpha$  mit einem Glu-tag durchgeführt, da Proteine wie Osteonectin, das Bone Sialoprotein (BSP) und andere Säugetierproteine, die an der Mineralisierung von Knochen und Zähnen beteiligt sind, die Möglichkeit besitzen über glutamatreiche Sequenzen (Glu) an Hydroxyapatit zu binden (Fujisawa et al., 1996; Goldberg et al., 2001). Über ionische Wechselwirkung kann das Glutamat an das Calcium des Hydroxyapatits binden (Moradian-Oldak et al., 1992; Sawyer et al., 2005). Dabei werden mindestens drei Glutamate benötigt um eine Einheitszelle (*single unit cell*) des Hydroxyapatits zu umspannen (Natalio et al., 2010). Je größer die glutamatreiche Sequenz ist, umso stärker ist die Bindung an das Hydroxyapatit. Im Falle des Osteonectins ist eine Sequenz aus 5 x Glu für die Bindung an HA verantwortlich. Beim BSP ist eine N-terminale glutamatreiche Sequenz, bestehend aus zweimal acht hintereinander liegenden Glutamaten, für die Bindung verantwortlich (Hunter and Goldberg, 1994). Diese beruht darauf, dass die Carboxylgruppe des Glu-tag mit dem  $\text{Ca}^{2+}$  des Hydroxyapatit interagieren kann (Gorbunoff, 1984a). Eine Carboxylgruppe alleine würde nur durch elektrostatische Wechselwirkung an das Calcium binden. Da aufgrund der Modifikation des Silicateins aber ein Cluster aus acht Glutaminsäuren mit demnach acht Carboxylgruppen vorhanden ist, kann von einer koordinativen Bindung ausgegangen werden (Gorbunoff, 1984b).

Abgeleitet davon wurde das reife Silicatein  $\alpha$  am N-Terminus mit einem Glu-tag aus acht aufeinanderfolgenden Glutamaten modifiziert. Die Modifizierung des Silicatein  $\alpha$  wurde mittels PCR und spezifischen Primern, die den Glu-tag beinhalteten und dem rekombinanten Silicatein  $\alpha$ , durchgeführt (s. 5.1). Die anschließende Ligation erfolgte über Restriktionsenzyme in den Expressionsvektor pBADgIII/A (s. 4.9.2). Nach Sequenzierung, Expression, denaturierender Aufreinigung und Renaturierung konnte das modifizierte Silicatein  $\alpha$  (Glu-tag-Silicatein) für Versuche zur Immobilisierung auf verschiedenen Oberflächen verwendet werden.

Da der Glu-tag, sich primär dazu eignet an das Calcium des Hydroxyapatit zu binden, wurden Hydroxyapatit-Plättchen für die ersten Immobilisierungsversuche eingesetzt. Zur Überprüfung, ob das Glu-tag-Silicatein an das HA gebunden hat, wurde eine Coomassie-Färbung (s. Abb. 5.2.1.1) durchgeführt. Die starke Blaufärbung der HA-

Plättchens spricht für die gelungene Immobilisierung des Glu-tag-Silicateins. Die leichte Blaufärbung der Negativ-Kontrolle mit dem unmodifizierten Silicatein  $\alpha$  lässt sich durch den für die Aufreinigung benötigten His-tag am C-terminalen Ende des Proteins erklären. Dieser kann zum einen über seine Carboxylgruppe an das  $\text{Ca}^{2+}$  und zum anderen durch seine Aminogruppe an das Phosphat des Hydroxyapatit über schwache ionische Wechselwirkungen binden (Suen et al., 2004).

Eine genauere Überprüfung der Immobilisierung des Proteins wurde durch eine Antikörperfärbung erzielt. Hierzu wurden die oben beschriebenen Proben mit einem primären Anti-His-Antikörper und einem sekundären Cy3 gekoppelten Anti-Maus-Antikörper inkubiert. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten eine signifikante Fluoreszenz der HA-Plättchen, auf denen das modifizierte Silicatein  $\alpha$  immobilisiert wurde (s. Abb. 5.2.1.2). Im Gegensatz dazu wies die Negativ-Kontrolle keine Fluoreszenz auf. Diese Ergebnisse lassen auf eine spezifische und starke Bindung des Glu-tag-Silicatein an die HA-Plättchen schließen, da (i) keine Kreuzreaktion zwischen HA und Antikörpern beobachtet werden konnte, (ii) unmodifiziertes Silicatein  $\alpha$  nicht immobilisiert werden konnte und (iii) eine starke Fluoreszenz in den HA/Glu-tag-Silicatein Proben nach ausführlichen Waschschritten detektiert wurde (Natalio et al., 2010).

Auf Basis der Versuche mit den HA-Plättchen wurde das Glu-tag-Silicatein an HA-Nanofibrillen gebunden. Diese eigens synthetisierten HA-Nanofibrillen eignen sich für biomedizinische Zwecke, da das Calcium:Phosphat-Verhältnis von 5:3 dem Verhältnis im Knochen in etwa entspricht (Pellegrino and Biltz, 1968). Auch könnten diese HA-Nanostrukturen bei Knochen- und Zahnimplantaten zum Einsatz kommen, da sie biokompatibel und bioaktiv sind, d.h. eine osteoinduktive wie auch osteokonduktive Wirkung aufweisen (Ong and Chan, 1999; Vallet-Regí and González-Calbet, 2004; Wahl and Czernuszka, 2006). Im Vergleich zu HA-Mikrostrukturen erleichtern sie das Einwandern von Osteoblasten aufgrund ihrer vergrößerten Oberfläche (Itoh et al., 2004; Ngiam et al., 2009). Durch die vergrößerte Oberfläche ist es möglich, mehr Glu-tag-Silicatein zu binden. Betrag der Anteil an gebundenem Protein bei den HA-Plättchen  $82 \pm 4\%$ , erhöhte sich der Anteil bei den HA-Nanofibrillen auf  $93 \pm 5\%$  (Natalio et al., 2010). Die erhöhte Menge an gebundenem Protein bedingt eine verstärkte Synthese von Biosilikat, was in einem Knochenimplantat zu einer beschleunigten Reifung und Differenzierung von

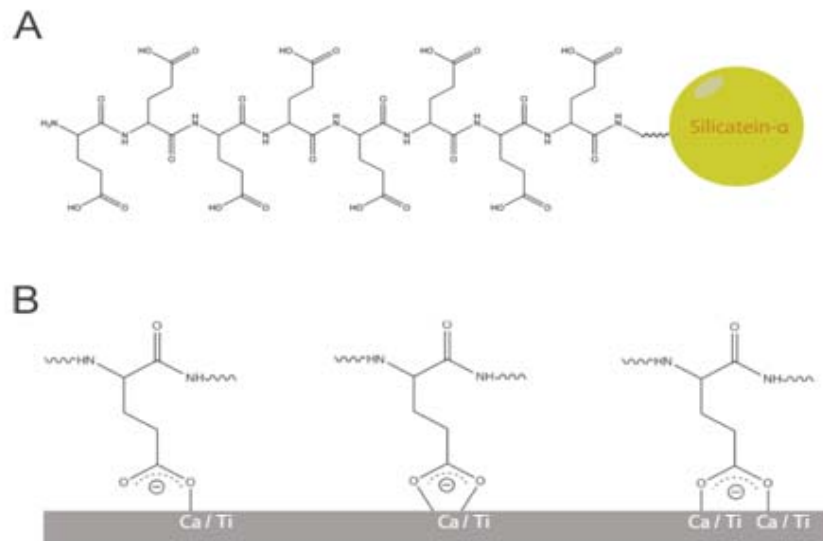
Osteoblasten führt (Bosetti and Cannas, 2005; Müller et al., 2007b). Die Eigenschaften eines solchen HA-Kompositmaterials führen zu einem verbesserten, schnelleren und stabileren Einwachsen der Implantate.

Nicht nur HA-Kompositmaterialien kommen immer häufiger in der Biomedizin zum Einsatz, sondern auch Calciumcarbonatverbindungen wie Perlmutter oder die Skelette der Kalkalgen (Haptophyta) bzw. der Südseekoralle *Macroporaria* (Westbroek, P 1998, Kehr 1993, Turahni 2005). Gerade das sogenannte *Biocoral*, eine mikro- und makroporöse Calciumcarbonatkeramik findet häufig Verwendung in der Kiefer- und Gesichtschirurgie (Kehr et al., 1993; Yukna and Yukna, 1998). In der Biotechnologie findet Calciumcarbonat als Trägermaterial für Metalloxide Verwendung (Lin et al., 2009).

Durch die Immobilisierung des Glu-tag-Silicatein an Calciumcarbonat-Oberflächen könnten neuartige  $\text{CaCO}_3$ -Kompositmaterialien entwickelt werden, die sowohl in der Biomedizin als auch in der Biotechnologie zum Einsatz kommen können.

Um dies zu beweisen, wurden die Nadeln von *Paraleucilla magna* als Modellsystem gewählt, da sie aus Calciumcarbonat bestehen und somit die Bindung von modifiziertem Silicatein  $\alpha$  entlang vorgegebener Strukturen erlauben. Die Nadeln dieses Kalkschwamms weisen eine triactine und tetractine Form auf. Bevor die Nadeln für Inkubationsversuche mit dem modifizierten Silicatein  $\alpha$  genutzt werden konnten, wurden diese gemäß Protokoll gereinigt (s. 4.12.2) und auf Proteinrückstände überprüft (Diezel et al., 1972). Anschließend wurden die Nadeln für zwei Stunden mit modifiziertem oder unmodifiziertem Silicatein  $\alpha$  inkubiert. Zur Detektion des an den Nadeln immobilisierten Proteins wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt. Wie bei den Hydroxyapatit-Plättchen wiesen die Kalknadeln, welche mit dem modifizierten Silicatein  $\alpha$  inkubiert wurden, im Gegensatz zur Negativkontrolle eine deutliche Fluoreszenz auf (s. Abb. 5.2.2). Es zeigten sich demnach die gleichen Ergebnisse wie in den Bindungsversuchen mit den HA-Plättchen (s.o.), d.h. die Immobilisierung war erfolgreich und es kann auf eine stabile Bindung von modifiziertem Silicatein  $\alpha$  an die Kalknadeln geschlossen werden. Es wurde somit gezeigt, dass ein mit einem Glu-tag versehenes Silicatein  $\alpha$  direkt an calciumhaltige Oberflächen immobilisiert werden kann. Hierbei ist es nicht nötig zuvor ein Kopolymer aufbringen zu müssen, weil die Carboxylgruppe des Glu-tag über drei verschiedene Möglichkeiten an calciumhaltige Oberflächen binden kann:

1. Monodentat, nur ein Sauerstoffatom der Carboxylgruppe bindet an ein Calcium,
2. Bidentat, beide Sauerstoffatome binden gemeinsam an ein Calcium und
3. jedes Sauerstoffatom bindet separat an ein Calcium (s. Abb. 6.1.1).



**Abbildung 6.1.1:** Bindung des Glu-tag an Calciumoberflächen bzw. Titandioxid. A) Schematische Darstellung des modifizierten Silicatein. B) Mögliche Bindungsarten des Glutamat an Calcium-/Ti-Oberflächen, von links nach rechts: Monodentat, nur ein Sauerstoffatom der Carboxylgruppe bindet an das Calcium/Titan; Bidentat beide Sauerstoffatome binden an ein Calcium/Titan; und jedes Sauerstoffatom bindet an ein Calcium/Titan.

Neben den erwähnten calciumhaltigen Materialien finden auch andere Stoffe wie  $\text{TiO}_2$ -Nanodröhte Verwendung in der Forschung.

Dabei spielt die gute Bioverträglichkeit und die hervorragenden elektrischen Eigenschaften des  $\text{TiO}_2$  eine wichtige Rolle (Roy et al., 2011). Neben der Photovoltaik (Grätzel, 2001) findet Titandioxid auch Anwendung in elektrochromen, beschlagverhindernden und selbstreinigenden Materialien, biomedizinischen Beschichtungen, Sensoren und intelligenten Oberflächenbeschichtungen (Armstrong et al., 2004; Ghicov and Schmuki, 2009). Durch Modifikationen der  $\text{TiO}_2$ -Oberflächen mit anderen Stoffen, wie zum Beispiel Biosilikat würden sich die hervorragenden Eigenschaften des Titandioxids weiter verbessern lassen. Gerade die Anwendung eines Biosilikat/Titandioxid-Kompositmaterials wird in den letzten Jahren intensiv erforscht (Schröder et al., 2005; Wiens et al., 2010; Yoshida et al., 1999). Die

Verwendung des Silicatein  $\alpha$  ermöglicht die Synthese von Biosilikat und den verschiedenen Metalloxiden, aus in Wasser stabilen Substraten (Müller et al., 2009; Schröder et al., 2009).

Im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen ist dies ein großer Vorteil, dennoch wird für die Immobilisierung des Silicatein  $\alpha$  ein  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Kopolymer benötigt (Schröder et al., 2009). Damit dieses Gerüst auf die  $\text{TiO}_2$ -Nanodrähte aufgebracht und aktiviert werden kann, kommen starke organische Lösungsmittel zum Einsatz (Tahir et al., 2006). Um diese nicht biokompatiblen Prozesse zu minimieren, wurde das Glu-tag-Silicatein direkt auf den  $\text{TiO}_2$ -Nanodrähten immobilisiert (Andre et al., 2011). Um die Bindung des Glu-tag-Silicatein an die  $\text{TiO}_2$ -Nanodrähte zu verdeutlichen, wurde eine Antikörperfärbung direkt an diesen durchgeführt. Wie bei den Hydroxyapatit-Plättchen und den Kalknadeln, wiesen die  $\text{TiO}_2$ -Nanodrähte welche mit dem modifizierten Silicatein  $\alpha$  inkubiert wurden, eine deutliche Fluoreszenz auf (s. Abb. 5.2.3.1), womit die Bindung analog zu den vorherigen Versuchen bewiesen wurde.

Für Carboxylgruppen konnte schon gezeigt werden, dass diese sehr effizient an Metalloxide, insbesondere an Titandioxid binden können (Andre et al., 2011; Ulman, 1996). Die Bindung zwischen den Carboxylgruppen und dem Titan kann, genauso wie beim Calcium, über drei verschiedene Möglichkeiten ablaufen (s. Abb. 6.1.1). Welcher der drei Bindungstypen allerdings vorliegt, konnte auch hier bis jetzt noch nicht geklärt werden. Durch verschiedene spektroskopische Methoden, wie die Schwingungsspektroskopie (IR, Raman) oder die Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) könnte der genaue Bindungstyp ermittelt werden.

Durch die Modifizierung des Silicatein  $\alpha$  mit einem Glu-tag gelang in dieser Arbeit zum ersten Mal eine direkte Immobilisierung des Enzyms an calciumhaltige Oberflächen, wie Hydroxyapatit und Calciumcarbonat. Dies legte die Basis, Silicatein  $\alpha$  direkt an Titandioxidoberflächen zu binden. Dadurch können die gewebsunverträglichen Prozesse deutlich minimiert werden, denn ein vorheriges Aufbringen eines Kopolymers ist für diese Art von Oberflächen nicht mehr nötig.

Gerade im Bereich von biomedizinischen bzw. biotechnologischen Anwendungen, in denen diese Prozesse nicht erwünscht sind, eröffnet diese Methode der direkten Proteinimmobilisierung neue Wege und Möglichkeiten.



## 6.2 Oberflächenmodifikation durch Glu-tag-Silicatein

### 6.2.1 Synthese einer TiO<sub>2</sub>-Beschichtung durch Glu-tag-Silicatein

Titandioxid (TiO<sub>2</sub>) findet zum einen wegen seiner Halbleitereigenschaften Verwendung in piezoelektrische Sensoren, in Solarzellen oder LED's (Rai and Perry, 2009; Schröder et al., 2009) und zum anderen kommt es wegen seiner guten mechanischen Eigenschaften, der hohen Korrosionsbeständigkeit und der sehr guten Biokompatibilität auch sehr häufig in der Biomedizin zum Einsatz (Brunette et al., 2002). Darüber hinaus wird das TiO<sub>2</sub> wegen seiner photokatalytischen Eigenschaften zur Selbstreinigung von Oberflächen eingesetzt (Teraoka et al., 2000). Schon eine geringe Menge an Licht ist ausreichend, damit organische Verunreinigungen durch das Titandioxid zerstört werden können (Sujaridworakun et al., 2005b).

Hydroxyapatit (HA) findet nicht nur Verwendung als Knochenersatzmaterial, sondern auch als Adsorbens für Bakterien, Stickstoffoxide (NO<sub>x</sub>), organische Moleküle und Viren (Sujaridworakun et al., 2005a). Eine Kombination aus Hydroxyapatit und Titandioxid würde die positiven Eigenschaften beider Stoffe synergistisch bündeln.

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen die stabile Bindung des Glu-tag-Silicatein an Hydroxyapatit-Plättchen nachgewiesen werden konnte, sollte nun die Aktivität des Silicatein  $\alpha$  überprüft werden, um auszuschließen, dass durch die Modifizierung, anschließende Renaturierung und durch die Immobilisierung an den HA-Plättchen der Zugang zum aktiven Zentrum des Proteins blockiert wurde.

Hierzu wurde das auf Hydroxyapatit-Plättchen immobilisierte Glu-tag-Silicatein mit dem Substrat Ti[BALDH] inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dienten HA-Plättchen die zwar mit dem Substrat inkubiert wurden, aber auf denen kein Protein immobilisiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Auswertung elektronenmikroskopisch. Durch die sehr unebene Struktur der HA-Plättchen, konnte visuell kein Unterschied zwischen den einzelnen Proben beobachtet werden (s. Abb. 5.3.1.1). Deshalb wurden die verschiedenen Proben einer XRD-Analyse unterzogen. Hierbei wird das zu untersuchende HA-Plättchen mit monochromatischen Röntgenstrahlen beschossen und die Streustrahlung registriert. Die so erhaltenen Reflexe können dann den entsprechenden Substanzen zugeordnet werden. In beiden Diagrammen lassen sich die stärksten Reflexe dem Hydroxyapatit (Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> OH) zuordnen (s. Abb. 5.3.1.2). Ein kleiner Reflex konnte, in der Probe

mit dem immobilisierten Silicatein  $\alpha$ , Titandioxid in der Rutil-Struktur zugeordnet werden. Damit konnte ein erster Beweis für die vorhandene Aktivität des Glu-tag-Silicatein geliefert werden.

Um eine visuelle Bestätigung des durch Silicatein  $\alpha$  synthetisierten Titandioxids zu bekommen, wurden in einem weiteren Versuchsansatz HA-Nanopartikel verwendet. HA-Nanopartikel besitzen im Gegensatz zu den HA-Plättchen eine glattere Oberfläche, was eine bessere Identifikation über TEM/EDX erlaubt.

Die Signale von Titan und Sauerstoff im EDX-Diagramm lassen auf eine Beschichtung mit Titandioxid schließen (s. Abb. 5.3.2). Desweiteren konnte auch eine Veränderung in Form von kleinen Ablagerungen auf der Oberfläche der HA-Nanopartikel festgestellt werden.

Ähnlich dem vorangegangenen Versuchsansatz wurde die Synthese von Titandioxid auf den Kalknadeln von *Paraleucilla magna*, als Beispiel einer  $\text{CaCO}_3$ -haltigen Struktur untersucht. Diese eignen sich ebenso wie die Nanopartikel, da sie eine glatte Oberfläche aufweisen und Ablagerungen dadurch deutlich zu Tage treten. Zusätzlich sollte hier der Einfluss von Konzentration und Inkubationszeit mit und ohne den Interaktor Silintaphin-1 auf die Oberflächenmorphologie untersucht werden. Die Interaktionspartner wurden im Verhältnis 1:4 (Silintaphin-1 zu Silicatein  $\alpha$ ) dazu gegeben (Schlossmacher 2011). Ohne Interaktor zeigte sich lediglich eine leicht gezackte, aufgerauhte Schicht (s. Abb. 5.3.3.1 A-C), mit Silintaphin-1 bildete sich eine netzartige Struktur aus (D-F). Durch die Erhöhung der Inkubationszeit mit beiden Proteinen konnte die Schichtdicke auf der Nadel verstärkt werden.

Durch die repetitive Erneuerung von Substrat und Proteinen alle 12 Stunden wird die Schichtverdickung im Sinne einer Layer-by-Layer-Deposition postuliert, wobei sich nach Bildung je einer Titandioxidschicht im Wechsel das synthetisierende Silicatein  $\alpha$  mit seinem Glu-tag anlagert. Auf den SEM-Aufnahmen zeigt sich dies in einer deutlichen Zunahme der Beschichtung und die netzartige Struktur ging in einen gleichförmigen raspel-ähnlichen Überzug über (s. Abb. 5.3.3.2). Die EDX-Messungen bestätigten erneut die Anwesenheit von Titan und Sauerstoff.

Durch die Modifizierung des Silicatein  $\alpha$  mit einem Glu-tag können Kompositmaterialien bestehend aus Calciumcarbonat und Titandioxid bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert hergestellt werden. Zudem kann die

Verwendung des Interaktionspartners Silintaphin-1 Einfluss auf Form und Stärke der Beschichtung nehmen (Andre et al., 2011).

### **6.2.2 Synthese einer Biosilikat-Beschichtung durch immobilisiertes Glu-tag-Silicatein**

Die Verwendung von Silikat-Beschichtungen hat sich vor allem in der Medizin als vielversprechend erwiesen. Silikat stimuliert die Expression von Genen, die an der Knochen- und Knorpelbildung beteiligt sind (Carlisle, 1970), gleichzeitig induziert es auch die Osteoblastendifferenzierung und Mineralisation von Zellen (Bosetti and Cannas, 2005; Ducheyne et al., 1994; Vallet-Regí et al., 2006; Varanasi et al., 2009; Wiens et al., 2010). Dies konnte auch an Oberflächen gezeigt werden, bei denen die Biosilikatbeschichtung durch das Enzym Silicatein  $\alpha$  synthetisiert wurde. Die verwendeten SaOS-2 Zellen (human osteogenic sarcoma cells) zeigten eine gesteigerte Proliferation und Mineralisation im Vergleich zu Zellen, die unter Standardbedingungen gewachsen waren (Schröder et al., 2005). Mit diesem Zelltyp konnte auch gezeigt werden, dass Biosilikat die Expression der Proteine Enamelin und Amelogenin steigert. Diese sind an der Bildung von Zahnschmelz (gr. *Enamelum*, lat. *Substantia adamantinea*), dem härtesten Material des menschlichen Körpers, beteiligt (Müller et al., 2007b).

Wie unter 6.1 beschrieben kommen auch TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte immer häufiger in der Biomedizin und Biotechnologie zum Einsatz. Durch die Modifikation des Silicatein mit einem Glu-tag konnten die nicht biokompatiblen Prozesse, die durch das vorher nötige Aufbringen eines Ni<sup>2+</sup>-NTA-Kopolymer entstanden sind, minimiert werden. Die direkte Immobilisierung des Glu-tag Silicatein auf den TiO<sub>2</sub>-Nanodrähten konnte mittels durchgeführten Antikörperfärbungen bereits demonstriert werden (s. 5.2.3). Um zu zeigen, dass das auf TiO<sub>2</sub>-Nanodrähten immobilisierte Silicatein seine Aktivität beibehält, wurden diese mit Tetraethylorthosilikat (TEOS) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden wurden die Nanodrähte gewaschen. Die Auswertung erfolgte mittels SEM-Aufnahmen und EDX-Messungen. Die Oberfläche der TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte wies verschieden große Aggregate, in Form von dunklen Flecken auf. Bei den durchgeführten EDX-Messungen ließen sich neben den Signalen für Titan (Ti) und Sauerstoff (O), die den Nanodrähten zuzuordnen sind,

auch ein Signal für Silikat detektieren (s. Abb. 5.3.4). Diese Ergebnisse zeigen, dass das immobilisierte Glu-tag-Silicatein Biosilikat synthetisieren kann.

Auf diesen Ergebnissen beruhend wurde der gleiche Versuchsaufbau mit Zirkoniumdioxid verfolgt, bei dem ebenfalls ein kompletter Überzug der TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte gelang (Andre et al., 2011).

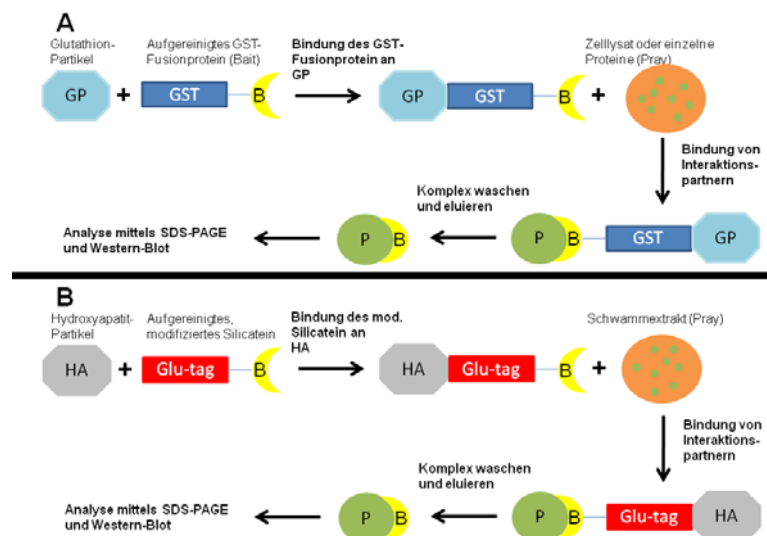
Durch den entwickelten Glu-tag konnte das Silicatein  $\alpha$  erfolgreich auf verschiedenen Oberflächen immobilisiert werden. Neben Hydroxyapatit und Calciumcarbonat gelang auch eine Immobilisierung an TiO<sub>2</sub>-Nanodrähten. Durch Inkubation mit verschiedenen Substraten konnte auch die Aktivität des gebundenen Glu-tag-Silicatein gezeigt werden.

Dies ermöglicht die Herstellung von Kompositmaterialien unter Normalbedingungen. Zur industriellen Herstellung von Glas benötigt man zum Beispiel hohe Temperaturen, starken Druck und einen hohen pH-Wert. Durch die Verwendung des Silicatein  $\alpha$  kann dieser Prozess bei Raumtemperatur, normalem Luftdruck und neutralem pH-Wert durchgeführt werden, wodurch Beschädigungen während des Herstellungsprozess vermieden werden können. Gerade bei der Verwendung von calciumhaltigen Oberflächen können saure pH-Werte zu Auflösungen des Materials führen. Genauso können sich Metalle bei zu großer Hitzeeinwirkung verformen und es kann zu Beschädigungen der Oberfläche kommen. Diese Beschädigungen können zu einem Verlust der Eigenschaft des Materials führen. Bei Titandioxid könnte zum Beispiel der photokatalytische Effekt an diesen Stellen verloren gehen. Ein weiterer Vorteil des Glu-tag-Silicatein besteht darin, dass kein Kopolymer zur Immobilisierung des Enzyms auf die zu beschichtende Oberfläche aufgetragen werden muss. Die zur Aktivierung des Kopolymers benötigten Lösungsmittel und die über die Zeit aus dem Polymergerüst freigesetzten Monomere können toxische oder mutagene Wirkung auf das umliegende Gewebe haben oder direkt das zu beschichtende Material angreifen. Durch die Modifizierung des Silicatein  $\alpha$  mit einem Glu-tag entfallen diese Nachteile, da es direkt auf verschiedenen Oberflächen immobilisiert werden kann. In diesem Kontext könnte auch auf das als Linker verwendete Nickel verzichtet werden.

### 6.3 Screening nach Interaktionspartnern

Eine weitere Möglichkeit das modifizierte, an HA-Plättchen immobilisierte Silicatein  $\alpha$  zu nutzen, ist ein Screening nach Interaktionspartnern. Es beruht auf dem GST-Pulldown Assay (Smith and Johnson, 1988). Hierbei wird ein bekanntes Protein in einen GST-Fusionsvektor kloniert, exprimiert und nach Aufreinigung an Glutathion-beschichtete Agarose gebunden. Zu diesem als Köder bezeichneten Fusionsprotein wird anschließend ein Zelllysat oder einzelne, zum Beispiel radioaktiv markierte Proteine gegeben. Kommt es zu einer Interaktion, also zu einer Bindung zwischen dem GST-Fusionsprotein und einem Interaktionspartner, kann dieser isoliert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie oder durch einen Western-Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Solch ein Pulldown-Assay wird *in vitro* dazu eingesetzt, um Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen bzw. um neue Interaktionspartner für ein bekanntes Protein, aus einem Proteinextrakt zu isolieren (s. Abb. 6.3.1).



**Abbildung 6.3.1:** Schematische Darstellung eines GST-Pulldown (A) und des modifizierten Screenings nach Interaktionspartnern (B).

Im Falle des Silicatein  $\alpha$  konnte das Silintaphin-1 durch einen *Yeast two Hybrid* Test als Interaktionspartner identifiziert werden (Wiens et al., 2009). Durch Antikörperfärbung konnte eine Kolokalisation beider Proteine sowohl im Axialfilament, als auch in einer Schicht, welche die wachsende Nadel umgibt, gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen verifizierten, dass das Silintaphin-1 die

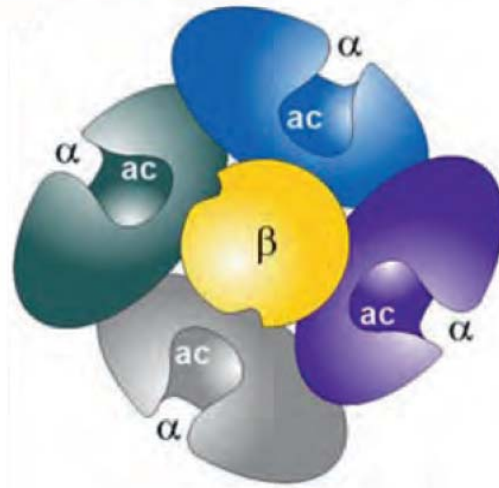
gleichen Eigenschaften in regenerierendem Schwammgewebe und bei Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Natriummetasilika aufweist wie das Silicatein  $\alpha$  (Krasko et al., 2000; Wiens et al., 2009). Auch die Funktionsweise des Silintaphin-1 konnte unter anderem durch die Verwendung eines Molybdat-Assays aufgeklärt werden (Schloßmacher et al., 2011). Silintaphin-1 ist nicht nur wichtig für die Anordnung der Silicateine zu Filamenten, sondern es steigert auch deren Enzymaktivität (Andre et al., 2011; Müller et al., 2009).

Der in dieser Arbeit entwickelte Glu-tag und die dadurch gelungene Immobilisierung des Silicatein  $\alpha$  an Hydroxyapatit-Partikel konnte nun dazu genutzt werden, einen modifizierten Pulldown-Assay zu entwickeln. Durch die Verwendung des rekombinanten Silintaphin-1 sollten die schon bekannten Ergebnisse weiter erhärtet werden, da ein ähnlicher Assay mit beiden Proteinen noch nicht durchgeführt wurde. Desweiteren ist die erfolgreiche Bindung des rekombinanten Silintaphin-1 an das immobilisierte Silicatein  $\alpha$  und die Detektion mittels Western-Blot (s. Abb. 5.5.1) eine einfache Überprüfung der Funktionsweise des modifizierten Pulldown-Assays.

In einem neuen Versuchsansatz konnte auch das native Silintaphin-1 aus einem Schwamm-Protein-Extrakt mit dieser Methode isoliert werden (s. Abb. 5.5.2.1). Hier gelang die Doppelfärbung des immobilisierten Silicatein  $\alpha$  und des daran gebundenen Silintaphin-1 direkt an den Hydroxyapatit-Plättchen (s. Abb. 5.5.2.2).

Neben dem nativen Silintaphin-1 ist es auch gelungen, die Proteine Silicatein  $\alpha$  und  $\beta$  mit spezifischen Antikörpern zu detektieren (s. Abb. 5.5.3 und 5.5.4). Die Detektion dieser Proteine lässt sich durch die angenommene natürliche Anordnung der Silicateine zueinander erklären (s. Abb. 6.3.2). Silicatein  $\alpha$  formt Tetramere, wobei die aktiven Zentren der einzelnen Proteine nach außen gerichtet sind und die Serin-Cluster in die Mitte des Oligomers zeigen (Müller et al., 2007a). Um die optimale Ausrichtung untereinander und zu dem in der Mitte befindlichen Silicatein  $\beta$  zu gewährleisten, sind die Silicateine verdreht angeordnet (Müller et al., 2007a):

Diese Anordnung der Proteine kann zwar eine Erklärung für das gerichtete Wachstum der Nadeln in *Suberites domuncula* sein, ist aber in anderen Schwämmen bzw. sogar in verschiedenen Nadeltypen eines Schwammes unterschiedlich (Müller et al., 2007c).



**Abbildung 6.3.2:** Schematische Darstellung des planaren Silicatein  $\alpha$  Tetramers (blau, lila, grau, grün), mit dem zentral liegenden Silicatein  $\beta$ . Die aktiven Zentren der Silicateine sind als Taschen dargestellt (ac). (Verändert nach Schröder 2009)

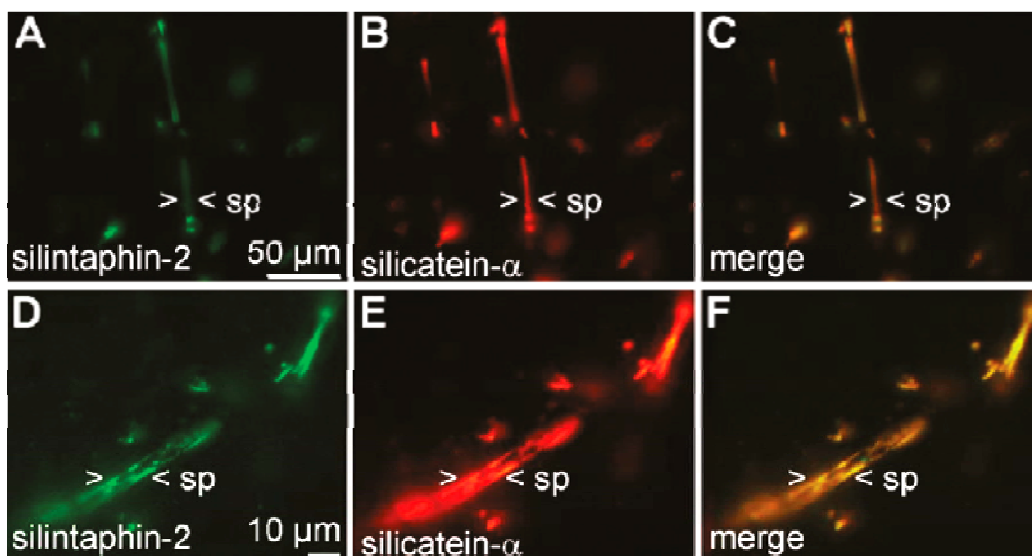
Das beide Proteine nur in ihrer unprozessierten Form detektiert werden konnten, lässt sich auf die Verwendung des Schwamm-Protein-Extraktes zurückführen. Sowohl das Silicatein  $\alpha$ , als auch das Silicatein  $\beta$  werden erst durch die Bindung an die Spiculae bzw. das wachsende Axialfilament zu ihrer reifen Form prozessiert (Müller et al., 2005; Wiens et al., 2011). Um beide Proteine in ihrer reifen Form zu detektieren, müsste dieser Assay mit einem Nadelextrakt wiederholt werden.

Neben den bekannten Interaktionspartnern konnten noch weitere Proteine mit dieser Methode isoliert und mittels SDS-Gel nachgewiesen werden (s. Abb 5.5.5). Diese Banden wurden einer *de novo*-Sequenzierung unterzogen. Auf die so erhaltenen Aminosäuresequenzen sollen in Zukunft degenerierte Primer synthetisiert werden, um die komplette Nukleotidsequenz der unbekannt Proteine zu entschlüsseln bzw. mit der Schwamm-Datenbank zu vergleichen.

Auch das 15 kDa große Protein Silintaphin-2, welches zuvor durch einen *Yeast two Hybrid* Versuch als Interaktionspartner des Silicatein  $\alpha$  gefunden wurde, konnte durch diese Methode und einem anschließenden Western Blot identifiziert werden (Wiens et al., 2011). Silintaphin-2 ähnelt in seiner Struktur calciumbindenden sekretorischen Proteinen, zu deren Aufgabe die Mineralisierung der organischen Matrix im Metazoengewebe gehört. Für die Funktionsweise im Schwamm sind 2 Szenarien vorstellbar. Zum einen könnte es durch Calciumbindung und

anschließender Konformationsänderung die Bindung des Silicatein  $\alpha$  an Kieselsäure erleichtern. Silintaphin-2 würde den Transport der Kieselsäure zum aktiven Zentrum des Silicateins unterstützen und dadurch eine lokal begrenzte Kieselsäureanreicherung in der Nähe des aktiven Zentrums hervorrufen. Dies würde die Spiculogenese deutlich verbessern, da die Silikatkonzentration ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ) im Meerwasser sehr gering ist (Fröhlich und Barthel, 1997).

Zum anderen könnte das Silintaphin-2 die Aktivität der minealisierenden Zellen, den Sklerocyten beeinflussen indem es eine Hormon- oder Zytokin-ähnliche Rolle übernehmen würde. Durchgeführte immunfluoreszenz Untersuchungen (s. Abb. 6.3.3) zeigten eine Kolokalisation mit dem Silicatein  $\alpha$  innerhalb des Axialfilamentes und auf der Nadeloberflächen (Wiens et al., 2011).



**Abbildung 6.3.3:** Die Kolokalisation von Silintaphin-2 und Silicatein  $\alpha$  in Primmorphen des Schwammes *Suberites domuncula* wurde mit proteinspezifischen Antikörpern durchgeführt. (A-C) Übersicht eines Gewebeschnittes bei dem quer- und längsgeschnitten Spicula (sp) angefärbt werden konnten. (D-F) Vergrößerung einer längsgeschnittenen Spicula. Beide Proteine konnten sowohl im Axialfilament als auch auf der Nadeloberfläche kolokalisiert werden. Abgeändert nach (Wiens et al., 2011).

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Glu-tag nicht nur dazu genutzt werden kann Silicatein  $\alpha$  auf verschiedenen Oberflächen zu immobilisieren, sondern es kann auch zur Detektion von schon bekannten und neuen Interaktionspartnern, mittels des modifizierten Pulldown-Assay, genutzt werden.



#### **6.4 Modifizierung des Silicatein $\alpha$ mit einem Cys-tag**

Nicht nur Oberflächen aus Calcium oder Titandioxid kommen in der Biotechnologie zum Einsatz, sondern auch Oberflächen aus Gold (Au). Speziell bei der Analyse von Biomolekülen oder bei Biosensoren wird Gold als Substrat eingesetzt (Kisailus et al., 2005b; Kisailus et al., 2006; Roco, 2003). Zu nennen sind Methoden wie die Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscope*, AFM), die zur Abtastung von Oberflächen und zur Messung von atomaren Kräften im Nanometerbereich dient (Dorvel et al., 2007) oder die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR), welche zur Charakterisierung und Bewertung von Proteininteraktionen genutzt wird (Homola et al., 1999). Dabei wird einer der Interaktionspartner auf der Goldoberfläche immobilisiert und der andere kann aus einer Lösung heraus an diesen binden. Vor allem bei der Erforschung von Arzneimitteln kommt diese Methode zum Einsatz (Cooper, 2002).

Bei den oben genannten Methoden muss das interessierende Biomolekül oder zumindest einer der Interaktionspartner über einen Liganden an die Goldoberfläche gebunden werden (Homola et al., 1999). Der Ligand bindet dabei über seine Thiolgruppe, meistens über Cysteine oder Methionine, an die Goldoberfläche (Tahir et al., 2005). Damit das Biomolekül an den Liganden binden kann, muss dieser in mehreren Schritten aktiviert werden (Cooper, 2002). Zur Aktivierung werden organische Lösungsmittel verwendet, die das Biomolekül zerstören bzw. dessen Funktion beeinträchtigen können. Daher ist es notwendig leichtere und einfachere Möglichkeiten zu entwickeln, um Biomoleküle direkt an Gold zu binden.

Da Silicatein  $\alpha$  so ein vielfältiges Protein ist, gerade in Bezug auf die Synthese von verschiedenen Materialien, unter anderem auch Metalloxide, ist es von großem Interesse, dieses Protein direkt auf Goldoberflächen zu immobilisieren.

Um die direkte Immobilisierung des Silicateins zu ermöglichen wurde das reife Protein am N-terminalen Ende mit einem Cys-tag, bestehend aus acht aufeinanderfolgenden Cysteinen modifiziert.

Die Immobilisierung des Cys-tag-Silicateins auf Gold(111)-Oberflächen wurde durch Antikörperfärbungen überprüft. Als Negativ-Kontrolle diente nicht modifiziertes Silicatein  $\alpha$ , das den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt war. Die Antikörperfärbung erfolgte mit einem primären Anti-His-Antikörper und einem sekundären Cy3 gekoppelten Anti-Maus-Antikörper. Anschließende mikroskopische

Aufnahmen zeigten eine signifikante Färbung der Goldplättchen, auf denen das Cys-tag-Silicatein immobilisiert wurde (s. Abb. 5.6.4). Im Vergleich dazu wies die Negativ-Kontrolle keine Fluoreszenz auf. Diese Ergebnisse zeigen wie die vorangegangenen Experimente eine spezifische Bindung des Cys-tag-Silicatein an Goldoberflächen.

Um die Ergebnisse noch weiter zu verifizieren wurden anschließend noch AFM-Aufnahmen der mit Silicatein  $\alpha$  beschichteten Goldoberflächen gemacht. Auch hier konnte das Cys-tag-Silicatein auf der Oberfläche detektiert werden. Im Vergleich zu unbehandelten Goldoberflächen ist eine deutliche Aufrauhung der Oberfläche zu erkennen.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass das Silicatein  $\alpha$  durch eine Modifizierung mit einem Cys-tag direkt auf Goldoberflächen immobilisiert werden kann. Eine vorherige Behandlung der Oberfläche ist nicht mehr nötig. Hierdurch eröffnen sich neue Wege in der Biotechnologie, nicht nur in Anwendungen mit Silicatein  $\alpha$ , sondern auch mit anderen Proteinen. Eine einfache Modifizierung des Proteins ist ausreichend um eine starke Bindung an die Goldoberfläche zu gewährleisten.

In weiteren Versuchen wurde die Aktivität des gebundenen Cys-tag-Silicatein überprüft. Hierzu musste das Protein zuerst renaturiert werden. Die Renaturierung erfolgt im Gegensatz zum Glu-tag-Silicatein erst nach der Immobilisierung. Durch die Modifikation mit einem Cys-tag besitzt das Silicatein neben seinen schon vorhandenen sechs acht zusätzlich Cysteine. Bei einer Renaturierung des Silicatein könnte es mit diesen Cysteinen zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommen, die eine korrekte Faltung des Proteins unwahrscheinlich machen.

Um die Aktivität des gebundenen Silicatein  $\alpha$  zu überprüfen, wurde dieses mit dem Substrat Ti[BALDH] inkubiert. Analog zu den Versuchen der Antikörperfärbung wurde im *Micro-Contact-Printing* die Synthese von Titandioxid in gleicher Position wie das Protein nachgewiesen. In den hellen Bereichen beider Proben konnte entweder das Cys-tag-Silicatein detektiert werden (Antikörperfärbung) oder das durch das Enzym synthetisierte Titandioxid. In den dunklen Bereichen, ohne Protein, konnte dementsprechend kein Titandioxid detektiert werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass Silicatein durch die Modifizierung mit einem Cys-tag auf Goldoberflächen unter Beibehaltung seiner Aktivität immobilisiert werden kann.

Durch die Synthese von Kompositmaterialien mit Silicatein könnte so ein Einsatz in verschiedenen Bereichen der Halbleiter- oder Sensortechnik denkbar sein.

## 6.5 Schlussfolgerung

Diese Ergebnisse und die oben durchgeführten Antikörperfärbungen bzw. Versuche zeigen, dass

1. die Modifizierung des Silicatein  $\alpha$  mit dem Glu-tag eine direkte Bindung an Hydroxyapatit-Plättchen/-Nanopartikel ermöglicht.
2. dieser Glu-tag auch genutzt werden kann, um Silicatein  $\alpha$  direkt auf  $\text{TiO}_2$ -Nanodrahnte zu immobilisieren.
3. der entwickelte Cys-tag zur Immobilisierung des Silicatein  $\alpha$  auf Goldoberflächen genutzt werden kann.
4. es nicht mehr nötig ist, potentiell unverträgliche Polymerbeschichtungen aufzubringen.
5. das immobilisierte Silicatein seine Aktivität beibehält und Titandioxid bzw. Biosilikat synthetisieren kann.
6. mit dem immobilisierten Silicatein  $\alpha$  ein Screening nach bekannten Interaktionspartnern durchgeführt werden kann.
7. die Identifikation von noch unbekanntem Interaktionspartnern möglich ist.

## **6.6 Ausblick**

Die Entwicklung von modifiziertem Silicatein  $\alpha$  mit verschiedenen Tags, die eine direkte Immobilisierung an spezifischen Oberflächen ermöglicht und durch die Vielseitigkeit des Enzyms selbst, neben Biosilikat auch Metalloxide ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$ , etc.) zu synthetisieren, öffnet neue Wege in der Materialwissenschaft. Mit dem modifizierten Silicatein  $\alpha$  besteht die Möglichkeit neue Kompositmaterialien zu entwickeln, deren Synthese, Funktionalität und Morphologie kontrolliert werden kann.

Diese Modifikation, ob mit Cys- oder Glu-tag, kann auch auf andere biologisch wichtige Proteine übertragen werden. Ein Beispiel wäre die Modifikation von Proteinen die am Prozess der Knochenbildung beteiligt sind, damit diese anschließend auf Titanimplantaten immobilisiert werden können. Dadurch könnten solche Oberflächen funktionalisiert werden, um eine bessere Biokompatibilität zu erreichen. Ebenso kann der in dieser Arbeit etablierte Pulldown-Assay auf andere zu untersuchende Proteine übertragen werden oder es könnten weiterführende Untersuchungen wie AFM und SPR durchgeführt werden, um zusätzliche Informationen über die Interaktionspartner zu erhalten.

## 7. Zusammenfassung

Das Silicatein  $\alpha$  ist ein 24 kDa großes Enzym, welches im Schwamm *Suberites domuncula* für die Synthese von Biosilikat verantwortlich ist. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass Silicatein auch die Synthese anderer Metalloxide wie Titandioxid, Galliumoxid und Zirkoniumdioxid katalysieren kann. Diese Fähigkeiten machen das Silicatein  $\alpha$  für biomedizinische und biotechnologische Anwendungen interessant, da die Synthese unter nahezu physiologischen Bedingungen ablaufen kann, was die Herstellung neuartiger Kompositmaterialien mit einzigartigen Eigenschaften erleichtern würde. Zur Immobilisierung des Silicatein  $\alpha$  auf verschiedenen Oberflächen wurde bislang ein Nickel-NTA-Kopolymer eingesetzt. Diese Art der Immobilisierung bietet eine Reihe von Möglichkeiten in der Nanobiotechnologie, stößt aber in der Biomedizin an ihre Grenzen, da sich nicht alle Oberflächen für ein solches Coating eignen. Zudem können die zur Aktivierung des Polymers nötigen Lösungsmittel und die über die Zeit freigesetzten Monomere aus dem Polymergerüst toxische oder mutagene Wirkung auf das umliegende Gewebe haben. Deshalb wurde das Silicatein  $\alpha$  in dieser Arbeit mit zwei Affinitäts-Tags so modifiziert, dass es an verschiedene Oberflächen immobilisiert werden kann und dabei seine Aktivität beibehält. Zuerst wurde das Silicatein mit einem Glu-tag am N-terminalen Ende modifiziert. Dadurch gelang die direkte Immobilisierung an Hydroxyapatit und die folgende, enzymkatalysierte Synthese von Biosilikat-Beschichtungen auf diesem Träger. Die Eigenschaften eines solchen HA-Kompositmaterials können zum Beispiel zu einem verbesserten, schnelleren und stabileren Einwachsen von Knochenimplantaten führen, da Biosilikat die Reifung und Differenzierung von Osteoblasten beschleunigt.

Mit dem an Hydroxyapatit-Plättchen immobilisierten Glu-tag-Silicatein wurde ein modifizierter Pull-down Assay etabliert, wodurch bekannte, aber auch bis dahin noch unbekannte Protein-Interaktionspartner identifiziert werden konnten.

Um zu zeigen, dass der entwickelte Glu-tag an präformierte, calciumhaltige Oberflächen binden kann, wurden die Nadeln des Kalkschwammes *Paraleucilla magna* als Modellorganismus verwendet. Die Nadeln konnten durch das immobilisierte Silicatein mit einer Titandioxid-Schicht überzogen werden und unter Verwendung des Interaktionspartners Silintaphin-1 konnte diese Beschichtung noch verstärkt werden. Solche  $\text{CaCO}_3$ -Kompositmaterialien könnten sowohl in der

Biomedizin als auch in der Biotechnologie zum Einsatz kommen. Neben den erwähnten calciumhaltigen Materialien finden auch andere Stoffe wie TiO<sub>2</sub>-Nanodrähte Verwendung in der Forschung. In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Glu-tag auch Affinität zu Titandioxid-Oberflächen vermittelt. Auch hier konnte durch das oberflchenimmobilisierte Enzym eine Biosilikatbeschichtung synthetisiert werden.

Mit der zweiten Modifikation - einem Cys-tag - konnte Silicatein direkt auf Goldoberflächen immobilisiert werden. Durch die Verwendung eines Polydimethylsiloxan (PDMS)-Stempels wurde das Cys-getaggte Silicatein in einem linienförmigen Muster auf das Gold übertragen und die Synthese von Titandioxid dort nachgewiesen.

Die Experimente und Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass Silicatein  $\alpha$  durch einfache Modifikationen an verschiedene Oberflächen immobilisiert werden kann und dabei immer noch seine Aktivität behält.

Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, unter Normalbedingungen verschiedenste Kompositmaterialien herzustellen.

## 8. Literaturverzeichnis

**Andre, R., Tahir, M. N., Link, T., Jochum, F. D., Kolb, U., Theato, P., Berger, R., Wiens, M., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. et al.** (2011). Chemical Mimicry: Hierarchical 1D TiO<sub>2</sub>@ZrO<sub>2</sub> Core-Shell Structures Reminiscent of Sponge Spicules by the Synergistic Effect of Silicatein- $\alpha$  and Silintaphin-1. *Langmuir*, null-null.

**Armstrong, A. R., Armstrong, G., Canales, J. and Bruce, P. G.** (2004). TiO<sub>2</sub>-B Nanowires. *Angewandte Chemie* **116**, 2336-2338.

**Anbar, A. D. and Knoll, A. H.** (2002). Proterozoic Ocean Chemistry and Evolution: A Bioinorganic Bridge? *Science* **297**, 1137-1142.

**Bosetti, M. and Cannas, M.** (2005). The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials* **26**, 3873-3879.

**Brunette, D. M., Tengvall, P., Textor, M. and Thomson, P.** (2002). Titanium in medicine: materials science, surface science, engineering, biological responses and medical applications: Springer Berlin / Heidelberg.

**Campbell, N. A.** (1997). Biologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

**Carlisle, E. M.** (1970). Silicon: A Possible Factor in Bone Calcification. *Science* **167**, 279-280.

**Carlisle, E. M.** (1972). Silicon: An Essential Element for the Chick. *Science* **178**, 619-621.

**Carlisle, E. M.** (2007). Silicon as an Essential Trace Element in Animal Nutrition. In *Ciba Foundation Symposium 121 - Silicon Biochemistry*, pp. 123-139: John Wiley & Sons, Ltd.



**Cavalier-Smith, T., Allsopp, M. T. E. P., Chao, E. E., Boury-Esnault, N. and Vacelet, J.** (1996). Spongephylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Canadian Journal of Zoology* **74**, 2031-2045.

**Cha, J. N., Shimizu, K., Zhou, Y., Christiansen, S. C., Chmelka, B. F., Stucky, G. D. and Morse, D. E.** (1999). Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 361-365.

**Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

**Cooper, M. A.** (2002). Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 515-528.

**Coradin, T. and Lopez, P. J.** (2003). Biogenic Silica Patterning: Simple Chemistry or Subtle Biology? *Chembiochem* **4**, 251-259.

**Diezel, W., Kopperschläger, G. and Hofmann, E.** (1972). An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Analytical Biochemistry* **48**, 617-620.

**Dorvel, B. R., Keizer, H. M., Fine, D., Vuorinen, J., Dodabalapur, A. and Duran, R. S.** (2007). Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes on Gold Surfaces: QCM-Z and AFM Study. *Langmuir* **23**, 7344-7355.

**Ducheyne, P., Ei-Ghannam, A. and Shapiro, I.** (1994). Effect of bioactive glass templates on osteoblast proliferation and in vitro synthesis of bone-like tissue. *Journal of Cellular Biochemistry* **56**, 162-167.

**Eckert, C., Schröder, H. C., Brandt, D., Perovic-Ottstadt, S. and Müller, W. E. G.** (2006). Histochemical and Electron Microscopic Analysis of Spiculogenesis in the Demosponge *Suberites domuncula*. *J. Histochem. Cytochem.* **54**, 1031-1040.

**Fröhlich, H. and Barthel, D.** (1997). Silica uptake of the marine sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight. *Marine Biology* **128**, 115-125.

**Fujisawa, R., Wada, Y., Nodasaka, Y. and Kuboki, Y.** (1996). Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1292**, 53-60.

**Ghicov, A. and Schmuki, P.** (2009). Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO<sub>2</sub> nanotubes and other self-aligned MO<sub>x</sub> structures. *Chemical Communications*, 2791-2808.

**Gibson, T. J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M. and Birney, E.** (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 349-353.

**Goldberg, H. A., Warner, K. J., Li, M. C. and Hunter, G. K.** (2001). Binding of Bone Sialoprotein, Osteopontin and Synthetic Polypeptides to Hydroxyapatite. *Connective Tissue Research* **42**, 25-37.

**Gorbunoff, M. J.** (1984a). The interaction of proteins with hydroxyapatite : I. Role of protein charge and structure. *Analytical Biochemistry* **136**, 425-432.

**Gorbunoff, M. J.** (1984b). The interaction of proteins with hydroxyapatite : II. Role of acidic and basic groups. *Analytical Biochemistry* **136**, 433-439.

**Grätzel, M.** (2001). Photoelectrochemical cells. *Nature* **414**, 338-344.

**Gundacker, D., Leys, S. P., Schröder, H. C., Müller, I. M. and Müller, W. E. G.** (2001). Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. *Glycobiology* **11**, 21-9.

**Holland, H. D.** (1992). Chemistry and evolution of the Proterozoic ocean. In *The proterozoic biosphere*, eds. J. W. Schopf and C. Klein), pp. 169 - 172. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

**Homola, J., Yee, S. S. and Gauglitz, G.** (1999). Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **54**, 3-15.

**Hott, M., de Pollak, C., Modrowski, D. and Marie, P. J.** (1993). Short-term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats. *Calcified Tissue International* **53**, 174-179.

**Hunter, G. K. and Goldberg, H. A.** (1994). Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem. J.* **302**, 175-179.

**Iler, R. K.** (1979). *The Chemistry of Silica*.

**Itoh, S., Kikuchi, M., Koyama, Y., Takakuda, K., Shinomiya, K. and Tanaka, J.** (2004). Development of a Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite as a Medical Device. *Cell Transplantation* **13**, 451-461.

**Jugdaohsingh, R.** (2007). Silicon and bone health. *J. Nutr. Health Aging* **11**, 99-110.

**Jugdaohsingh, R., Tucker, K. L., Qiao, N., Cupples, L. A., Kiel, D. P. and Powell, J. J.** (2004). Dietary Silicon Intake Is Positively Associated With Bone Mineral Density in Men and Premenopausal Women of the Framingham Offspring Cohort. *Journal of Bone and Mineral Research* **19**, 297-307.

**Junqua, S., Robert, L., Garrone, R., De Ceccatty, M. P. and Vacelet, J.** (1974). Biochemical and Morphological Studies on Collagens of Horny Sponges. Ircinia Filaments Compared to Spongines. *Connective Tissue Research* **2**, 193-203.

**Kasper-Sonnenberg, M., Sugiri, D., Wurzler, S., Ranft, U., Dickel, H., Wittsiepe, J., Hölzer, J., Lemm, F., Eberwein, G., Altmeyer, P. et al.** (2011). Prevalence of nickel sensitization and urinary nickel content of children are increased by nickel in ambient air. *Environmental Research* **111**, 266-273.

**Kehr, P. H., Graftiaux, A. G., Gosset, F., Bogorin, I. and Bencheikh, K.** (1993). Coral as graft in cervical spine surgery. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* **3**, 287-293.

**Kim, S. and Lee, S. B.** (2008). Soluble expression of archaeal proteins in *Escherichia coli* by using fusion-partners. *Protein Expression and Purification* **62**, 116-119.

**Kisailus, D., Choi, J., Weaver, J., Yang, W. and Morse, D.** (2005a). Enzymatic Synthesis and Nanostructural Control of Gallium Oxide at Low Temperature. *Advanced Materials* **17**, 314-318.

**Kisailus, D., Najarian, M., Weaver, J. C. and Morse, D. E.** (2005b). Functionalized Gold Nanoparticles Mimic Catalytic Activity of a Polysiloxane-Synthesizing Enzyme. *Advanced Materials* **17**, 1234-1239.

**Kisailus, D., Truong, Q., Amemiya, Y., Weaver, J. C. and Morse, D. E.** (2006). Self-assembled bifunctional surface mimics an enzymatic and templating protein for the synthesis of a metal oxide semiconductor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 5652-5657.

**Krasko, A., Lorenz, B., Batel, R., Schröder, H. C., Müller, I. M. and Müller, W. E. G.** (2000). Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *Eur J Biochem* **267**, 4878-87.

**Labeit, S. and Kolmerer, B.** (1995). Titins: Giant Proteins in Charge of Muscle Ultrastructure and Elasticity. *Science* **270**, 293-296.

**Lemmon, M. A.** (2004). Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 707-711.

**Lemmon, M. A. and Ferguson, K. M.** (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* **350**, 1–18.

**Lin, H., Dong, Y.-b. and Jiang, L.-y.** (2009). Preparation of calcium carbonate particles coated with titanium dioxide. *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials* **16**, 592-597.

**Liu, L. and Makowske, M.** (1999). Phosphotyrosine protein of molecular mass 30 kDa binds specifically to the positively charged region of the pleckstrin N-terminal pleckstrin homology domain. *Biochem. J.* **342**, 423-430.

**Mann, S.** (2001). *Biom mineralization Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry.*

**Mayer, G.** (2005). Rigid Biological Systems as Models for Synthetic Composites. *Science* **310**, 1144-1147.

**Mehl, D. and Müller, W. E. G.** (1998). Molecular biological and palaeontological evidence that Eumetazoa, including Porifera (sponges), are of monophyletic origin. *Sponge Science- Multidisciplinary Perspectives*, 133-156.

**Moradian-Oldak, J., Frolow, F., Addadi, L. and Weiner, S.** (1992). Interactions between Acidic Matrix Macromolecules and Calcium Phosphate Ester Crystals: Relevance to Carbonate Apatite Formation in Biom mineralization. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **247**, 47-55.

**Müller, W. E. G.** (1995). Molecular phylogeny of metazoa (animals): Monophyletic origin. *Naturwissenschaften* **82**, 321-329.

**Müller, W. E. G.** (2001). Review: How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **129**, 433-460.

**Müller, W. E. G., Belikov, S. I., Tremel, W., Perry, C. C., Gieskes, W. W. C., Boreiko, A. and Schröder, H. C.** (2006). Siliceous spicules in marine demosponges (example *Suberites domuncula*). *Micron* **37**, 107-120.

**Müller, W. E. G., Boreiko, A., Schloßmacher, U., Wang, X., Tahir, M. N., Tremel, W., Brandt, D., Kaandorp, J. A. and Schröder, H. C.** (2007a). Fractal-related assembly of the axial filament in the demosponge *Suberites domuncula*: Relevance to biomineralization and the formation of biogenic silica. *Biomaterials* **28**, 4501-4511.

**Müller, W. E. G., Boreiko, A., Wang, X., Krasko, A., Geurtsen, W., Custódio, M., Winkler, T., Lukić-Bilela, L., Link, T. and Schröder, H. C.** (2007b). Morphogenetic Activity of Silica and Bio-silica on the Expression of Genes Controlling Biomineralization Using SaOS-2 Cells. *Calcified Tissue International* **81**, 382-393.

**Müller, W. E. G., Krasko, A., Le Pennec, G. and Schröder, H. C.** (2003). Biochemistry and cell biology of silica formation in sponges. *Microscopy Research and Technique* **62**, 368-377.

**Müller, W. E. G., Kruse, M., Blumbach, B., Skorokhod, A. and Müller, I. M.** (1999). Gene structure and function of tyrosine kinases in the marine sponge *Geodia cydonium*: autapomorphic characters in Metazoa. *Gene* **238**, 179-93.

**Müller, W. E. G., Li, J., Schröder, H. C., Qiao, L. and Wang, X.** (2007b). The unique skeleton of siliceous sponges (Porifera; Hexactinellida and Demospongiae) that evolved first from the Urmetazoa during the Proterozoic: a review.

**Müller, W. E. G., Rothenberger, M., Boreiko, A., Tremel, W., Reiber, A. and Schröder, H. C.** (2005). Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *Cell and Tissue Research* **321**, 285-297.

**Müller, W. E. G., Schloßmacher, U., Eckert, C., Krasko, A., Boreiko, A., Ushijima, H., Wolf, S. E., Tremel, W., Müller, I. M. and Schröder, H. C.** (2007c). Analysis of the axial filament in spicules of the demosponge *Geodia cydonium*: Different silicatein composition in microscleres (asters) and megascleres (oxeas and triaenes). *European Journal of Cell Biology* **86**, 473-487.

**Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Skorokhod, A., Bünz, C., Müller, I. M. and Grebenjuk, V. A.** (2001). Contribution of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmetazoa). *Gene* **276**, 161-73.

**Müller, W. E. G., Wang, X., Belikov, S. I., Tremel, W., Schloßmacher, U., Natoli, A., Brandt, D., Boreiko, A., Tahir, M. N., Müller, I. M. et al.** (2008). Formation of Siliceous Spicules in Demosponges: Example *Suberites domuncula*: Wiley-VCH Verlag GmbH.

**Müller, W. E. G., Wang, X., Cui, F. Z., Jochum, K. P., Tremel, W., Bill, J., Schröder, H. C., Natalio, F., Schlossmacher, U. and Wiens, M.** (2009). Sponge spicules as blueprints for the biofabrication of inorganic-organic composites and biomaterials. *Appl Microbiol Biotechnol* **83**, 397-413.

**Müller, W. E. G., Wang, X. and Schröder, H. C.** (2009b). Paleoclimate and Evolution: Emergence of Sponges During the Neoproterozoic. In *Biosilica in Evolution, Morphogenesis, and Nanobiotechnology*, vol. 47 eds. W. E. G. Müller P. Jeanteur Y. Kuchino A. Macieira-Coelho and R. E. Rhoads), pp. 55-77: Springer Berlin Heidelberg.

**Müller, W. E. G., Wiens, M., Adell, T., Gamulin, V., Schröder, H. C., Müller, I. M. and Kwang, W. J.** (2004). Bauplan of Urmetazoa: Basis for Genetic Complexity of Metazoa. In *International Review of Cytology*, vol. Volume 235, pp. 53-92: Academic Press.

**Natalio, F., Link, T., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Cui, F.-Z., Wang, X. and Wiens, M.** (2010). Bioengineering of the silica-polymerizing enzyme silicatein-[alpha] for a targeted application to hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia* **6**, 3720-3728.

**Natalio, F., Mugnaioli, E., Wiens, M., Wang, X., Schröder, H. C., Tahir, M., Tremel, W., Kolb, U. and Müller, W. E. G.** (2010b). Silicatein-mediated incorporation of titanium into spicules from the demosponge *Suberites domuncula*. *Cell and Tissue Research* **339**, 429-436.

**Ngiam, M., Liao, S., Patil, J. A., Cheng, Z., Chan, C. K. and Ramakrishna, S.** (2009). The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone* **45**, 4-16.

**Ong, J. and Chan, D. C. N.** (1999). Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **28**, 667–707.

**Pahler, S., Krasko, A., Schütze, J., Müller, I. M. and Müller, W. E. G.** (1998). Isolation and characterization of a cDNA encoding a potential morphogen from the marine sponge *Geodia cydonium* that is conserved in higher metazoans. *Proc Biol Sci* **265**, 421-5.

**Pancer, Z., Kruse, M., Müller, I. and Müller, W. E. G.** (1997). On the origin of Metazoan adhesion receptors: cloning of integrin alpha subunit from the sponge *Geodia cydonium*. *Mol Biol Evol* **14**, 391-8.

**Pellegrino, E. D. and Biltz, R. M.** (1968). Bone Carbonate and the Ca to P Molar Ratio. *Nature* **219**, 1261-1262.

**Perry, C. C. and Keeling-Tucker, T.** (2000). Biosilicification: the role of the organic matrix in structure control. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **5**, 537-550.

**Polini, A., Pagliara, S., Camposeo, A., Biasco, A., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. and Pisignano, D.** (2011). Biosilica Electrically-Insulating Layers by Soft Lithography-Assisted Biomineralisation with Recombinant Silicatein. *Advanced Materials*, n/a-n/a.



**Rai, A. and Perry, C. C.** (2009). Facile Fabrication of Uniform Silica Films with Tunable Physical Properties Using Silicatein Protein from Sponges. *Langmuir* **26**, 4152-4159.

**Reitner, J. and Mehl, D.** (1995). Early Paleozoic diversification of sponges: new data and evidences. *Geol. Paläontol. Mitt. Innsbruck* **20**, 335 - 237.

**Roco, M. C.** (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 337-346.

**Roder, K., Wolf, S. S., Larkin, K. J. and Schweizer, M.** (1999). Interaction between the two ubiquitously expressed transcription factors NF-Y and Sp1. *Gene* **234**, 61-69.

**Roy, P., Berger, S. and Schmuki, P.** (2011). TiO<sub>2</sub>-Nanoröhren: Synthese und Anwendungen. *Angewandte Chemie* **123**, 2956-2995.

**Sawyer, A. A., Weeks, D. M., Kelpke, S. S., McCracken, M. S. and Bellis, S. L.** (2005). The effect of the addition of a polyglutamate motif to RGD on peptide tethering to hydroxyapatite and the promotion of mesenchymal stem cell adhesion. *Biomaterials* **26**, 7046-7056.

**Schäcke, H., Schröder, H. C., Gamulin, V., Rinkevich, B., Müller, I. M. and Müller, W. E. G.** (1994). Molecular cloning of a tyrosine kinase gene from the marine sponge *Geodia cydonium*: a new member belonging to the receptor tyrosine kinase class II family. *Mol Membr Biol* **11**, 101-7.

**Schloßmacher, U., Wiens, M., Schröder, H. C., Wang, X., Jochum, K. P. and Müller, W. E. G.** (2011). Silintaphin-1: Interaction with silicatein during structure-guiding biosilica formation. *FEBS Journal*, no-no.

**Schröder, H. C., Boreiko, O., Krasko, A., Reiber, A., Schwertner, H. and Müller, W. E. G.** (2005). Mineralization of SaOS-2 cells on enzymatically (silicatein) modified bioactive osteoblast-stimulating surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **75B**, 387-392.

**Schröder, H. C., Brandt, D., Schloßmacher, U., Wang, X., Tahir, M., Tremel, W., Belikov, S. and Müller, W. E. G.** (2007). Enzymatic production of biosilica glass using enzymes from sponges: basic aspects and application in nanobiotechnology (material sciences and medicine). *Naturwissenschaften* **94**, 339-359.

**Schröder, H. C., Krasko, A., Le Penneç, G., Adell, T., Wiens, M., Hassanein, H., Müller, I. M. and Müller, W. E. G.** (2003). Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge *Suberites domuncula*. In *Progress in molecular and subcellular biology*, vol. 33, pp. 250-268.

**Schröder, H. C., Perović-Ottstadt, S., Rothenberger, M., Wiens, M., Schwertner, H., Batel, R., Korzhev, M., Müller, I. M. and Müller, W. E. G.** (2004). Silica transport in the demosponge *Suberites domuncula*: fluorescence emission analysis using the PDMPO probe and cloning of a potential transporter. *Biochem J* **381**, 665–673.

**Schröder, H. C., Schlossmacher, U., Boreiko, A., Natalio, F., Baranowska, M., Brandt, D., Wang, X., Tremel, W., Wiens, M. and Müller, W. E. G.** (2009). Silicatein: nanobiotechnological and biomedical applications. *Prog Mol Subcell Biol* **47**, 251-73.

**Schröder, H. C., Wang, X., Tremel, W., Ushijima, H. and Müller, W. E. G.** (2008). Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Natural Product Reports* **25**, 455-474.

**Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G. D. and Morse, D. E.** (1998). Silicatein alpha: Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6234-6238.

**Simpson, T. L.** (1984). *The Cell Biology of Sponges*.

**Simpson, T. L. and Volcani, B. E.** (1981). Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems.

**Smith, D. B. and Johnson, K. S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.

**Spencer, H.** (1864). *The principles of biology, Vol. 1. Williams and Norgate, London.*

**Storch, V. and Welsch, U.** (1996). *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag

**Suen, R.-B., Lin, S.-C. and Hsu, W.-H.** (2004). Hydroxyapatite-based immobilized metal affinity adsorbents for protein purification. *Journal of Chromatography A* **1048**, 31-39.

**Sujaridworakun, P., Koh, F., Fujiwara, T., Pongkao, D., Ahniyaz, A. and Yoshimura, M.** (2005a). Preparation of anatase nanocrystals deposited on hydroxyapatite by hydrothermal treatment. *Materials Science and Engineering: C* **25**, 87-91.

**Sujaridworakun, P., Pongkao, D., Ahniyaz, A., Yamakawa, Y., Watanabe, T. and Yoshimura, M.** (2005b). Direct Fabrication of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Deposited on Hydroxyapatite Crystals Under Mild Hydrothermal Conditions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **5**, 875-879.

**Sumerel, J. L., Yang, W. J., Kisailus, D., Weaver, J. C., Choi, J. H. and Morse, D. E.** (2003). Biocatalytically templated synthesis of titanium dioxide. *Chemistry of Materials* **15**, 4804-4809.

**Tahir, M. N., Eberhardt, M., Therese, H. A., Kolb, U., Theato, P., Müller, W. E. G., Schröder, H. C. and Tremel, W.** (2006). From Single Molecules to Nanoscopically Structured Functional Materials: Au Nanocrystal Growth on TiO<sub>2</sub> Nanowires Controlled by Surface-Bound Silicatein. *Angewandte Chemie* **118**, 4921-4927.

**Tahir, M. N., Natalio, F., Therese, H. A., Yella, A., Metz, N., Shah, M. R., Mugnaioli, E., Berger, R., Theato, P., Schröder, H. C. et al.** (2009). Enzyme-Mediated Deposition of a TiO<sub>2</sub> Coating onto Biofunctionalized WS<sub>2</sub> Chalcogenide Nanotubes. *Advanced Functional Materials* **19**, 285-291.

**Tahir, M. N., Theato, P., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Borejko, A., Fai, Janshoff, A., Huth, J. and Tremel, W.** (2005). Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein. *Chemical Communications*, 5533-5535.

**Tahir, M. N., Theato, P., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Janshoff, A., Zhang, J., Huth, J. and Tremel, W.** (2004). Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein. *Chemical Communications*, 2848-2849.

**Teraoka, K., Nonami, T., Yokogawa, Y., Taoda, H. and Kameyama, T.** (2000). Preparation of TiO<sub>2</sub>-coated Hydroxyapatite Single Crystals. *Journal of Materials Research* **15**, 1243-1244.

**Terpe, K.** (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 523-533.

**Thyssen, J. P., Uter, W., Schnuch, A., Linneberg, A. and Johansen, J. D.** (2007). 10-year prevalence of contact allergy in the general population in Denmark estimated through the CE-DUR method. *Contact Dermatitis* **57**, 265-272.

**Treguer, P., Nelson, D. M., Van Bennekom, A. J., DeMaster, D. J., Leynaert, A. and Queguiner, B.** (1995). The Silica Balance in the World Ocean: A Reestimate. *Science* **268**, 375-379.

**Trombitas, K., Greaser, M., Labeit, S., Jin, J.-P., Kellermayer, M., Helmes, M. and Granzier, H.** (1998). Titin Extensibility In Situ: Entropic Elasticity of Permanently Folded and Permanently Unfolded Molecular Segments. *The Journal of Cell Biology* **140**, 853-859.

**Ulman, A.** (1996). Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533-1554.

**Vallet-Regí, M. and González-Calbet, J. M.** (2004). Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry* **32**, 1-31.

**Vallet-Regí, M., Salinas, A. and Arcos, D.** (2006). From the bioactive glasses to the star gels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **17**, 1011-1017.

**Van Dyck, K., Robberecht, H., Van Cauwenbergh, R., Van Vlaslaer, V. and Deelstra, H.** (2000). Indication of silicon essentiality in humans. *Biological Trace Element Research* **77**, 25-32.

**Varanasi, V. G., Saiz, E., Loomer, P. M., Ancheta, B., Uritani, N., Ho, S. P., Tomsia, A. P., Marshall, S. J. and Marshall, G. W.** (2009). Enhanced osteocalcin expression by osteoblast-like cells (MC3T3-E1) exposed to bioactive coating glass (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-K<sub>2</sub>O-Na<sub>2</sub>O system) ions. *Acta Biomaterialia* **5**, 3536-3547.

**Wagner-Hülsmann, C., Bachinski, N., Diehl-Seifert, B., Blumbach, B., Steffen, R., Pancer, Z. and Müller, W. E. G.** (1996). A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*) system. *Glycobiology* **6**, 785-93.

**Wahl, D. A. and Czernuszka, J. T.** (2006). Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair'. *European Cells and Materials* **11**, 43-56

**Wang, X., Wiens, M., Schröder, H. C., Jochum, K. P., Schloßmacher, U., Götz, H., Duschner, H. and Müller, W. E. G.** (2011). Circumferential spicule growth by pericellular silica deposition in the hexactinellid sponge *Monorhaphis chuni*. *The Journal of Experimental Biology* **214**, 2047-2056.

**Wang, X., Zhang, X.-h., Schröder, H. C. and Müller, W. E. G.** (2009a). Giant basal spicule from the deep-sea glass sponge *Monorhaphis chuni*: synthesis of the largest bio-silica structure on Earth by silicatein. *Frontiers of Materials Science in China* **3**, 226-240.

**Wang, X. H., Schlossmacher, U., Natalio, F., Schröder, H. C., Wolf, S. E., Tremel, W. and Müller, W. E. G.** (2009b). Evidence for biogenic processes during formation of ferromanganese crusts from the Pacific Ocean: implications of biologically induced mineralization. *Micron* **40**, 526-35.

**Weiner, S. and Dove, P. M.** (2003). An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **54**, 1-29.

**Westheide, W. and Rieger, R.** (1996). Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und wirbellose Tiere. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

**Whaley, S. R., English, D. S., Hu, E. L., Barbara, P. F. and Belcher, A. M.** (2000). Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature* **405**, 665-668.

**Wiedenmann, J., Oswald, F. and Nienhaus, G. U.** (2009). Fluorescent proteins for live cell imaging: Opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life* **61**, 1029-1042.

**Wiens, M.** (2004). Grundlegende Mechanismen der Apoptose in den einfachsten Invertebraten, den Porifera. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* **37**, 190-199.

**Wiens, M., Bausen, M., Natalio, F., Link, T., Schlossmacher, U. and Müller, W. E. G.** (2009). The role of the silicatein- $\alpha$  interactor silintaphin-1 in biomimetic biomineralization. *Biomaterials* **30**, 1648-56.

**Wiens, M., Schröder, H. C., Wang, X., Link, T., Steindorf, D. and Müller, W. E. G.** (2011). Isolation of the silicatein- $\alpha$  interactor silintaphin-2 by a novel solid-phase pull-down assay. *Biochemistry*.

**Wiens, M., Wang, X., Natalio, F., Schröder, H. C., Schloßmacher, U., Wang, S., Korzhev, M., Geurtsen, W. and Müller, W. E. G.** (2010a). Bioinspired Fabrication of Bio-Silica-Based Bone-Substitution Materials. *Advanced Engineering Materials* **12**, B438-B450.

**Wiens, M., Wang, X., Schloßmacher, U., Lieberwirth, I., Glasser, G., Ushijima, H., Schröder, H. C. and Müller, W. E. G.** (2010b). Osteogenic Potential of Biosilica on Human Osteoblast-Like (SaOS-2) Cells. *Calcified Tissue International*, 1-12.

**Wiens, M., Wang, X., Schröder, H. C., Kolb, U., Schloßmacher, U., Ushijima, H. and Müller, W. E. G.** (2010c). The role of biosilica in the osteoprotegerin/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Biomaterials* **31**, 7716-7725.

**Wiens, M., Wang, X., Unger, A., Schröder, H. C., Grebenjuk, V. A., Pisignano, D., Jochum, K. P. and Müller, W. E. G.** (2010d). Flashing light signaling circuit in sponges: Endogenous light generation after tissue ablation in *Suberites domuncula*. *Journal of Cellular Biochemistry* **111**, 1377-1389.

**Wolf, S. E., Schlossmacher, U., Pietuch, A., Mathiasch, B., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. and Tremel, W.** (2010). Formation of silicones mediated by the sponge enzyme silicatein-alpha. *Dalton Transactions* **39**, 9245-9249.

**Yoshida, K., Kamada, K., Sato, K., Hatada, R., Baba, K. and Atsuta, M.** (1999). Thin sol-gel-derived silica coatings on dental pure titanium casting. *Journal of Biomedical Materials Research* **48**, 778-785.

**Yukna, R. A. and Yukna, C. N.** (1998). A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (Biocoral) bone replacement grafts in infrabony defects. *J. Clin. Periodontol.* **25**, 1036-1040.



## 9. Verzeichnisse

### 9.1 *Abbildungsverzeichnis*

<b>Abbildung 1.1:</b> Mineralisation vs. Biomineralisation.....	S. 2
<b>Abbildung 1.4:</b> Evolutionsdiagramm mit Einordnung der Schwämme .....	S. 8
<b>Abbildung 1.5.1:</b> Schematischer Ablauf der Nadelbildung.....	S. 10
<b>Abbildung 1.5.2:</b> Strukturmodell des Silicatein $\alpha$ ... ..	S. 11
<b>Abbildung 1.5.3:</b> Biomedizinische Anwendungen von Biosilikat.....	S. 15
<b>Abbildung 4.2:</b> Schematischer Ablauf einer PCR.....	S. 31
<b>Abbildung 4.6.4:</b> Blau-Weiß-Selektion.....	S. 41
<b>Abbildung 4.8:</b> Schematischer Ablauf einer Sequenzierung .....	S. 43
<b>Abbildung 5.1.1:</b> Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz des modifizierten Silicatein $\alpha$ .....	S. 66
<b>Abbildung 5.1.2:</b> SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung von Glu-tag-Silicatein .....	S. 67
<b>Abbildung 5.1.3:</b> Western-Blot nach Renaturierung .....	S. 67
<b>Abbildung 5.2.1.1:</b> Detektion des an Hydroxyapatit-Plättchen immobilisierten, modifizierten Silicatein.....	S. 69

<b>Abbildung 5.2.1.2:</b> Immunofluoreszenzanalyse des auf Hydroxyapatit gebundenen Glu-tag-Silicatein.....	S. 70
<b>Abbildung 5.2.2:</b> Immunofluoreszenzanalyse des auf Kalknadeln des Schwammes <i>Paraleucilla magna</i> gebundenen Glu-tag-Silicatein.....	S. 72
<b>Abbildung 5.2.3.1:</b> Immunofluoreszenzanalyse des auf TiO <sub>2</sub> -Nanodrähten immobilisierten Glu-tag- Silicatein.....	S. 73
<b>Abbildung 5.2.3.2:</b> Immunofluoreszenzanalyse der Negativ-Kontrolle.....	S. 73
<b>Abbildung 5.3.1.1:</b> SEM-Aufnahmen von Hydroxyapatit-Plättchen.....	S. 75
<b>Abbildung 5.3.1.2:</b> Röntgenbeugungsdiagramme der verschiedenen HA-Plättchen .....	S. 77
<b>Abbildung 5.3.2:</b> TEM-Aufnahmen und dazugehörige EDX-Daten von HA-Nanopartikeln.....	S. 78
<b>Abbildung 5.3.3.1:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Nadeln des Kalkschwammes <i>Paraleucilla magna</i> .....	S. 80
<b>Abbildung 5.3.3.2:</b> SEM Aufnahme einer Nadel von <i>Paraleucilla magna</i> , welche mit modifiziertem Silicatein und Silintaphin-1 bzw. Precursor inkubiert wurden.....	S. 81
<b>Abbildung 5.3.4:</b> TEM-Aufnahmen von TiO <sub>2</sub> -Nanodrähten.....	S. 82
<b>Abbildung 5.4.1:</b> Western-Blot zur Darstellung der Expression des rekombinant hergestellten Silintaphin-1.....	S. 83
<b>Abbildung 5.4.2:</b> SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung des rekombinanten Silintaphin-1.....	S. 84

---

<b>Abbildung 5.5.1:</b> Western-Blot nach Separierung der Interaktionspartner.....	S. 85
<b>Abbildung 5.5.2.1:</b> Western-Blot nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von nativem Silintaphin-1 .....	S. 86
<b>Abbildung 5.5.2.2:</b> Immunfluoreszenzanalyse des immobilisierten Silicatein und seines Interaktionspartners Silintaphin-1 auf Hydroxyapatit-Plättchen.....	S. 87
<b>Abbildung 25.5.3:</b> Western-Blot nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von nativem Silicatein $\beta$ .....	S. 88
<b>Abbildung 5.5.4:</b> Western-Blot nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von nativem Silicatein $\alpha$ .....	S. 89
<b>Abbildung 5.5.5:</b> SDS-Gel nach Separierung der Interaktionspartner zur Detektion von noch unbekanntem Interaktionspartnern.....	S. 90
<b>Abbildung 5.6.1:</b> Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz des Cys-tag-Silicatein $\alpha$ .....	S. 93
<b>Abbildung 5.6.2:</b> Western-Blot nach denaturierter Aufreinigung des Cys-tag-Silicatein.....	S. 93
<b>Abbildung 5.6.3:</b> Verwendete Goldoberfläche (111).....	S. 94
<b>Abbildung 5.6.4:</b> Immunfluoreszenzanalyse des auf (111) Goldoberflächen immobilisierten Cys-tag- Silicatein.....	S. 95
<b>Abbildung 5.6.5:</b> AFM-Aufnahmen von (111) Goldoberflächen.....	S. 96
<b>Abbildung 5.6.6:</b> Immunfluoreszenzanalyse des auf (111) Goldoberflächen gestempelten Cys-tag- Silicatein.....	S. 97

<b>Abbildung 5.6.7:</b> SEM/EDX Aufnahmen des gestempelten Cys-tag-Silicatein nach Inkubation mit Ti[BALDH].....	S. 98
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der Immobilisierung von Silicatein auf einer Goldoberfläche durch ein Ni <sup>2+</sup> -NTA-Kopolymer.....	S. 100
<b>Abbildung 6.1.1:</b> Bindung des Glu-tag an Calciumoberflächen bzw. Titandioxid .....	S. 104
<b>Abbildung 6.3.1:</b> Schematische Darstellung eines GST-Pulldown.....	S. 110
<b>Abbildung 6.3.2:</b> Schematische Darstellung des planaren Silicatein $\alpha$ Tetramer.....	S. 112
<b>Abbildung 6.3.3:</b> Die Kolokalisation von Silintaphin-2 und Silicatein $\alpha$ in Primmorphen des Schwammes <i>Suberites domuncula</i> .....	S. 113

## 9.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1:</b> Übersicht über einige Biomineralien und deren Funktion.....	S. 1
<b>Tabelle 1.3:</b> Auswahl von Organismen, die für die Silikatbiomineralisation von Bedeutung sind .....	S. 5
<b>Tabelle 4.9.5.1:</b> Zusammensetzung der Puffer zur nativen Aufreinigung.....	S. 49
<b>Tabelle 4.9.5.2:</b> Zusammensetzung der Puffer zur denaturierten Aufreinigung...S.	50
<b>Tabelle 4.10.2:</b> Verwendete Medien für Bestimmung des Antikörpertiter .....	S. 53
<b>Tabelle 4.11:</b> Pipettierschema für die eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele.....	S. 54

<b>Tabelle 4.11.2:</b> Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Western Blot .....	S. 56
<b>Tabelle 4.14:</b> Zusammensetzung der Eluationspuffer.....	S. 60
<b>Tabelle 5.5.5:</b> Erhaltene Aminosäuresequenz der unbekanntenen Proteine nach <i>deNovo</i> Sequenzierung der Firma PANATecs.....	S. 91

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

#### A

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AIX	Antibiotikum-IPTG-X-Gal
Amp	Ampicillin
ANT	Adeninnukleotid-Translokator
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)

#### B

BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Bp, bp	Basenpaare

#### C

°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
ca.	circa
cm	Zentimeter
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure

Cys	Cystein
<b>D</b>	
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DIG-11-UTP	Digoxigenin-markiertes 2'-Desoxyuridintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> (doppelsträngige DNA)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat

**E**

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid

**F**

F	<i>Forward</i>
---	----------------






**G**

g	relative Zentrifugalbeschleunigung
Glu	Glutamat

**H**

HA	Hydroxyapatite
----	----------------

---

h	Stunde(n)
His	Histidin
	
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
Ig	Immunglobulin
	
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
	
l	Liter
LB	Luria Broth Medium
	
m	Meter
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
mg	Milligram
μg	Mikrogramm
min	Minute(n)
Mio	Millionen
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
	
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

NT, nt	Nukleotide
<b>O</b>	
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
<b>P</b>	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PH	Pleckstrin homologie Domäne
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (Wasserstoffionen-Konzentration)
pl	Isoelektrischer Punkt
pmol	Picomol
<b>R</b>	
R	Reverse
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
<b>S</b>	
s.	siehe
Sili α mod	Silicatein alpha modifiziert
SDS	( <i>sodium</i> ) Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Ser	Serin
SM	<i>suspension medium</i> (Suspensionsmedium)
SOC	Spiroorthocarbonat Medium
Sog.	so genannte
SSC	<i>sodium salt citrate</i> , Natriumcitrat
<b>T</b>	
Tab.	Tabelle



t	Tonne
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEOS	Tetraethylorthosilikat
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i> (Schmelztemperatur)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) Aminomethan
<b>Z</b>	
U	<i>unit(s)</i> (Einheiten)
UV	Ultraviolett
ü.N.	Über Nacht
U/μl	Units pro Mikroliter
<b>V</b>	
V	Volt
(v/v)	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
<b>W</b>	
W	Watt
(w/v)	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
Wt	Wildtyp
<b>X</b>	
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
<b>Z</b>	
z.B.	zum Beispiel

## Danksagung

## **CURRICULUM VITAE**

## Publikationen

- Depagne C, Nassif N, Link T, Masse S, Roux R, Coradin T  
Bacteria survival and growth in multi-layered silica thin films. *J Mater Chem*. 2012 Apr; submitted
- André R, Tahir MN, Link T, Jochum FD, Kolb U, Theato P, Berger R, Wiens M, Schröder HC, Müller WE, Tremel W. Chemical mimicry: hierarchical 1D TiO<sub>2</sub>@ZrO<sub>2</sub>core-shell structures reminiscent of sponge spicules by the synergistic effect of silicatein- $\alpha$  and silintaphin-1. *Langmuir*. 2011 May 3; 27(9):5464-71.
- Wiens M, Schröder HC, Wang X, Link T, Steindorf D, Müller WE. Isolation of the silicatein- $\alpha$  interactor silintaphin-2 by a novel solid-phase pull-down assay. *Biochemistry*. 2011 Mar 29; 50(12):1981-90.
- Natalio F, Link T, Müller WE, Schröder HC, Cui FZ, Wang X, Wiens M. Bioengineering of the silica-polymerizing enzyme silicatein-alpha for a targeted application to hydroxyapatite. *Acta Biomater*. 2010 Sep; 6(9):3720-8.
- Wiens M, Bausen M, Natalio F, Link T, Schlossmacher U, Müller WE. The role of the silicatein-alpha interactor silintaphin-1 in biomimetic biomineralization. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(8):1648-56.
- Müller WE, Boreiko A, Wang X, Krasko A, Geurtsen W, Custódio MR, Winkler T, Lukić-Bilela L, Link T, Schröder HC. Morphogenetic activity of silica and bio-silica on the expression of genes controlling biomineralization using SaOS-2 cells. *Calcif Tissue Int*. 2007 Nov; 81(5):382-93.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel verwendet zu haben. Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht wurde.

Mainz, Juli 2012

---

Thorben Link