

Abschlussbericht

# Bionische High-Tech-Materialien für optische Anwendungen

# (BionOptik I)

# **Projektverbund BayBionik**

Von der Natur zur Technik

**Finanziert durch** Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz Rosenkavalierplatz 2 81925 München

# Projektnehmer

Universität Bayreuth Lehrstuhl Biomaterialien Prof. Dr. Thomas Scheibel Prof.-Rüdiger-Bormann-Str. 1 95447 Bayreuth Tel.: 0921556706 E-Mail: kai.mayer@bm.uni-bayreuth.de Web: fiberlab.de

# Berichtszeitraum:

1. Januar 2019 bis 28. Februar 2022





### Inhaltsverzeichnis

| 1 | Kurzzusammenfassung der Projektplanung3 |  |   |    |  |  |  |  |  |
|---|---|--|---|----|--|--|--|--|--|
| 2 | Einfül                                  | Einführung4  |   |    |  |  |  |  |  |
| 3 | Zielsetzung                             |  |   |    |  |  |  |  |  |
|   | 3.1                                     | Arbeitspaket 1: Rekombinante Herstellung neuer Spinnenseidenhybride  |   |    |  |  |  |  |  |
|   | 3.2                                     | Arbeitspaket 2: Prozessierung der neuen Hybride in Hydrogele und Fasern                                      |   |    |  |  |  |  |  |
|   | 3.3                                     | Arbeitspaket 3: Prozessieren von Spinnenseidenproteinen und Chitosan formverändernde Folien (4D-Druck)       |   |    |  |  |  |  |  |
|   | 3.4                                     | Arbeitspaket 4: 3D-Druck der optischen Cellulose/Spinnenseidengele auf formverändernden Folien (4D-Druck)9   |   |    |  |  |  |  |  |
|   | 3.5                                     | Ursprünglicher Zeitplan und Meilensteinplanung1  |   |    |  |  |  |  |  |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion               |  |   |    |  |  |  |  |  |
|   | 4.1                                     | Arbeitspaket 1: Rekombinante Herstellung neuer Spinnenseidenhybride  |   |    |  |  |  |  |  |
|   |   | 4.1.1  | Findung einer geeigneten Cellulose-bindenden-Domäne | 13 |  |  |  |  |  |
|   |   | 4.1.2  | Klonierung des Expressionsvektors                   | 17 |  |  |  |  |  |
|   |   | 4.1.3  | Expressionstests für eADF4(C16-CeBD)                | 18 |  |  |  |  |  |
|   |   | 4.1.4  | Fermentation und Proteinreinigung                   | 20 |  |  |  |  |  |
|   |   | 4.1.5  | Proteinanalyse                                      | 21 |  |  |  |  |  |
|   | 4.2                                     | Arbeitspaket 2: Prozessierung der neuen Hybride in Hydrogele und Filme 23                                    |   |    |  |  |  |  |  |
|   |   | 4.2.1  | Prozessierung in Filme                              | 23 |  |  |  |  |  |
|   |   | 4.2.2  | Prozessierung in Hydrogele                          | 24 |  |  |  |  |  |
|   | 4.3                                     | 4.3 Arbeitspaket 3+4: Prozessieren von Spinnenseidenproteinen und Chito<br>formverändernde Folien (4D-Druck) |   |    |  |  |  |  |  |
|   |   | 4.3.1  | Prozessierung in selbst-rollende Filme              | 25 |  |  |  |  |  |
|   | 4.4                                     | Lichtwe  | Ilenleiter aus Cellulose und eADF4(C16)-PL-CeBD     | 27 |  |  |  |  |  |
| 5 | Zusar                                   | nmenfas  | ssung   | 29 |  |  |  |  |  |

## 1 Kurzzusammenfassung der Projektplanung

Lichtwellenleiter spielen in der technischen Optik eine besondere Rolle. Sie werden als Faserlaser, zur flexiblen Weiterleitung von Laserstrahlung und für Beleuchtungszwecke benutzt. Daneben können Lichtwellenleiter in festen Substratmaterialien erzeugt und zur Datenübertragung verwendet werden. Das Grundprinzip ist eine Faser aus einem Material (Kern), das mit einem weiteren Material mit einem kleineren Brechungsindex beschichtet ist (Mantel). In den Kern eingekoppeltes Licht verbleibt durch Totalreflexion am Mantel in der Kernfaser. Dieses Prinzip der Lichtleitung ist auch bei einem Tiefseebewohner zu finden – dem Gießkannenschwamm (Euplectella aspergillum). Der Körper wird durch eine röhrenartige Gitterstruktur gebildet, die aus biomineralisierten Glasnadeln besteht. An der Basalfläche befinden sich ebenfalls elongierte Glasnadeln, die durch ihren hierarchischen Aufbau ausgeprägte Eigenschaften als Lichtwellenleiter zeigen. Die Fasern bestehen aus konzentrischen Ringen, die um eine zentrale Faser angeordnet sind. Auf der Nanostrukturebene wird deutlich, dass diese Faserstrukturen aus ca. 20 nm großen Glaskugeln aufgebaut sind. Eine derartige Materialarchitektur existiert für technische Lichtwellenleiter nicht. Dies ist der biologische Hintergrund für den hier verfolgten bionischen Ansatz. In dem Kooperationsprojekt BionOptik I und II sollen Lichtwellenleiter aus einem Verbundmaterial aus Cellulose und Spinnenseidenproteinen hergestellt werden. Aus diesen Biopolymeren sollen konsolidierte Kompositmaterialien mit einstellbaren optischen Eigenschaften generiert werden. Dazu sollen zunächst Cellulosenanokugeln aus entsprechenden Lösungen über nanoskalige Gelierung in der Größenordnung von wenigen 10 Nanometern hergestellt werden. Zusätzlich sollen Gele der ausgewählten Biopolymere hergestellt und zu Filmen und Filamenten verarbeitet werden. Anschließend werden Materialkomposite aus Cellulose und Spinnenseidenproteinen hergestellt. Biopolymerfilamente werden mit dem jeweiligen anderen Biopolymer beschichtet, um so Lichtwellenleiter herzustellen. Darüber sollen schließlich komplexe Lichtwellenleiterarchitekturen realisiert werden, wobei von der biologischen Struktur als Ideengeber ausgegangen wird und die grundlegenden Prinzipien in abstrahierter Form für technische optische Materialien übertragen werden. Dazu werden die formverändernden Eigenschaften von mehrlagigen Spinnenseidenfilmen eingesetzt (4D-Prozessierung), die es erlauben selbst-rollende Röhrchen als äußere Hüllen zu produzieren.

# 2 Einführung

Der klassische Lichtwellenleiter ist nach wie vor die Glasfaser. Über viele Jahre hat sich das Material aufgrund seiner geringen Kosten und weitgehend fehlerfreien Verarbeitungsmethoden zum Standard entwickelt. Neuere Entwicklungen der Lichtwellenleitung zielen jedoch auf den Ersatz von Glas für die Faserherstellung, welches üblicherweise bei hohen Temperaturen um 1200 °C verarbeitet wird, ab. Als Alternative werden Kunststoffe wie Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polycarbonat (PC) zur Erzeugung von *polymer optischen Fasern* (POF) verwendet. Die POFs sind Lichtwellenleiter, die primär für die Datenübertragung eingesetzt werden, in Form von Seitenlichtfasern aber auch in der (indirekten) Beleuchtung zum Einsatz kommen. Speziell in der Datenübertragung über kurze Distanzen gelten POFs aufgrund ihrer einfachen Herstellung und Handhabung als Alternative zu den meistverwendeten Glasfasern. Sowohl PMMA und PC basieren jedoch ausschließlich auf fossilen Rohstoffquellen.

Biopolymere als optische Lichtwellenleiter waren bislang nur Gegenstand der Grundlagenforschung. Sowohl Cellulose als auch Spinnenseidenproteine sind als potenzielle optische Materialien bereits Gegenstand aktueller Forschung [1, 2]. Bei der Verwendung des Polysaccharids Cellulose wird in erster Linie die Ausbildung sogenannter photonischer Materialien untersucht. Diese können mit Cellulose-Nanokristallen und einigen Cellulosederivaten aufgrund ihrer flüssig-kristallinen Eigenschaften erzeugt werden. Darüber hinaus wurden Cellulosederivate bereits für die Herstellung eines Lichtwellenleiters verwendet [1]. Weitere optische Materialien aus reiner, unmodifizierter Cellulose aus *de-novo* Herstellungsprozessen sind nicht bekannt. Kürzlich wurden Seidenproteine des Seidenspinners von F.G. Omenetto, Tufts University, USA, als Materialplattform für photonische und optoelektronische Anwendungen unter dem Namen *silk optics* beschrieben [2]. Dabei konnten periodische Nanostrukturen, Lichtwellenleiter, farbstoff-dotierte fluoreszierende Filme und photonische Kristalle aus Seidenproteinen hergestellt werden. Es wurden auch Fasern aus Seide beschrieben, die über Lichtwellenleiter- und nicht-lineare Eigenschaften verfügen [3].

Bzgl. der Kombination von Cellulose und Spinnenseide wurden vor allem zwei Arbeiten veröffentlicht, welche die Verarbeitung von rekombinanten Spinnenseidenproteinen mit Cellulose in Verbundmaterialien behandeln. Zum einen wurde eine unspezifische Verbindung rekombinanter Spinnenseidenproteine mit Cellulose-Nanofasern beschrieben, um sehr starke und bioaktive nanostrukturierte Fusionsmaterialien herzustellen. Hierfür wurden kleine Spinnenseidenproteine mit Immunglobulin G (IgG) Funktionsdomänen verwendet, um eine Kopplung zu Cellulose-Nanofasern herzustellen [4]. In einem anderen, spezifischen, Ansatz wurde ein Fusionsprotein zwischen einem rekombinanten Spinnenseidenprotein und einer Cellulosebindedomäne hergestellt, um Cellulose-Nanokristall Komposite zu bilden [5]. In keinem der beiden Ansätze wurden optische Leiterfunktionen erforscht.

Unsere wissenschaftlichen Vorarbeiten fokussierten sich auf die Charakterisierung, Modifikation, Herstellung und Verarbeitung von proteinbasierten Materialien als bio-inspirierte grüne Biopolymere für innovative high-performance Anwendungen. Zur rekombinanten Herstellung von Spinnenseidenproteinen wurde eine Plattformtechnologie entwickelt, mit der die von den natürlichen Vorbildern abgeleiteten Spinnenseidenproteine im labortechnischen Maßstab biotechnologisch hergestellt werden [6]. Die am Lehrstuhl Biomaterialien eingesetzten Proteine sind die des Abseilfadens der Europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus*; Fibroin 3 und 4 (ADF3, ADF4). Zusätzlich stehen Varianten bzgl. Ladung und anderen chemischen Funktionen zur Verfügung [7]. Die in diesem Projekt verwendete rekombinante Spinnenseide ist die *engineered Araneus diadematus Fibroin 4 C16 (eADF4(C16))* Variante. C16 steht hierbei für 16 Wiederholungen des charakteristischen C-Moduls, welches entscheidend für die Eigenschaften der rekombinanten Spinnenseide ist.

Die rekombinanten Seidenproteine können biotechnologisch auch mit anderen Funktionsproteinen oder Peptiden kombiniert werden, z. B. durch den molekularbiologischen Einbau einer Gensequenz in bereits bestehende Spinnenseidengene, die zuvor ausgewählte Proteine oder Peptide kodieren. Es sind verschiedene Varianten am Lehrstuhl etabliert, um das Funktionsspektrum der Biotech-Seide zu erweitern, wie beispielsweise mit dem Enzym Esterase 2 [8]. In Vorarbeiten wurden am Lehrstuhl auch verschiedenste Verarbeitungstechniken etabliert. Darunter Spinn-, Guss-, 3D-Druck-, Sprüh-, Schaum- und Beschichtungsmethoden, mit denen die biotechnologisch erzeugten Spinnenseidenproteine in Fasern, Hydrogele, Schäume, Partikel, Vliesstoffe, Beschichtungen, und weitere prozessiert werden können (siehe Abbildung 1). Die Verarbeitung kann dabei so gesteuert werden, dass sie quantitativ erfolgt. Den biologischen Spinnprozess in einen technischen Prozess zu überführen (Bionik) war die größte Herausforderung. Das entwickelte neuartige biomimetische Spinnverfahren empfindet die Natur gezielt nach und ermöglicht weltweit erstmalig die Herstellung biomimetischer Seidenfasern mit gleicher Zähigkeit wie die der natürlichen Spinnenseide [9].



Abbildung 1: Verarbeitung von Spinnenseidenproteinen in unterschiedliche Zustandsformen (alle am Lehrstuhl Biomaterialien entwickelt und etabliert).

Hydrogele aus Spinnenseidenproteinen zeigen scherverdünnendes Verhalten und lassen sich über 3D-Druckverfahren definiert ablegen [11].

Die entwickelte Plattformtechnologie zur rekombinanten Herstellung von Spinnenseidenproteinen wird seit 2008 von der ausgegründeten Firma AMSilk GmbH mit Sitz in Martinsried im industriellen Maßstab umgesetzt. Das Faser-Produkt BioSteel<sup>®</sup> stellt die weltweit erste und einzige biotechnologische Spinnenseidenfaser mit naturidentischer Zähigkeit dar. Des Weiteren werden Spinnenseiden bereits in Form von Hydrogelen in Hautpflegeprodukten vermarktet.

# 3 Zielsetzung

Die im Kooperationsprojekt BionOptik II eingesetzte Cellulose gehört zu den wichtigsten Polysacchariden und besitzt eine zentrale Bedeutung als nachwachsender Rohstoff für die Herstellung biogener Materialien, die nachhaltig aus Pflanzen hergestellt werden. Die in diesem Projekt verwendeten Spinnenseidenmaterialien sind ebenso nachhaltig über biotechnologische Routen zugänglich. Die Nachhaltigkeit dieser Materialien ist auf die nachwachsenden Rohstoffe zur Produktion zurückzuführen. Für die Cellulose sind dies die Pflanzen und für die Spinnenseide Bakterien sowie das Nährmedium, welches ebenfalls aus natürlichen Bestandteilen wie Hefeextrakt und Glucose besteht.

Das Prinzip der Lichtleitung ist bei einem Tiefseebewohner zu finden: dem Gießkannenschwamm (*Euplectella aspergillum*) [12]. Der Körper wird durch eine hohle, röhrenartige Gitterstruktur gebildet, die aus biomineralisierten Glasnadeln besteht. An der Basalfläche befinden sich ebenfalls elongierte, nicht vernetzte Glasnadeln, die durch ihren hierarchischen Aufbau ausgeprägte Eigenschaften als Lichtwellenleiter zeigen (siehe Abbildung 2) [12]. Die Fasern bestehen aus konzentrischen Ringen, welche um eine zentrale Faser angeordnet sind. Auf der Nanostrukturebene wird deutlich, dass diese Fasern aus ca. 20 nm großen Glaskugeln (hydratisiertes Siliciumdioxid SiO<sub>2</sub>xH<sub>2</sub>O) aufgebaut sind. Eine derartige hierarchische Architektur für Glasfasern oder andere optische Materialien existiert derzeit für technische Lichtwellenleiter nicht.

Dies ist der biologische Hintergrund für den hier verfolgten bionischen Ansatz. Aus Cellulose sollen 20 nm große Kugeln erzeugt werden, die dann analog der hierarchischen Struktur des Gießkannenschwammes zu bionischen Lichtleitfasern assembliert werden. Die Spinnenseidenproteine sind in dem Projekt essenziell für die Einstellung der optischen Eigenschaften sowie für die Stabilität der Lichtleitfasern.



Abbildung 2: Biologische Lichtleitfasern: a) Gießkannenschwamm, b) Querschnitt durch eine Basalglasfaser, c) Ringarchitektur der Glasfaser und Nanostruktur des Glasfaserkerns aus Nanoglaskugeln, d) Unterschiede im Brechungsindex über den Querschnitt e) Lichtwellenleitereigenschaften der Basalglasfasern [23].

Für das Projekt BionOptik I und BionOptik II wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

- 1) Aufgrund ihrer Brechungsindexunterschiede sind Cellulose ( $n_{587}$  = 1,47) und Spinnenseidenproteine ( $n_{600}$  = 1,34-1,54) für die Erzeugung von optischen Materialien und Lichtwellenleitern geeignet, die ausschließlich aus diesen beiden Biopolymeren bestehen.
- Mit Cellulose- (BionOptik II) und Spinnenseidenproteingelen sowie Spinnenseidenfaser-Verstärkern (BionOptik I) können konsolidierte Kompositmaterialien mit einstellbaren optischen Eigenschaften generiert werden.
- 3) Mit der Herstellung von Cellulosenanokugeln und ihrer definierten Anordnung in Mikrokanälen können nach dem biologischen Vorbild der *Euplectella* Lichtwellenleiter erzeugt werden.
- 4) In Kombination mit Spinnenseidenproteinröhrchen können dadurch komplexere Lichtwellenleiterarchitekturen realisiert werden.

Diese Arbeitshypothesen sollten durch nachfolgendes Arbeitsprogramm überprüft werden.

### 3.1 Arbeitspaket 1: Rekombinante Herstellung neuer Spinnenseidenhybride

In diesem Arbeitspaket (AP) sollten Spinnenseidenproteine molekularbiologisch mit Cellulosebindedomänen (CeBD) gekoppelt und rekombinant hergestellt werden. Cellulosebindedomänen (CeBD) sind kleine, 30 – 180 Aminosäuren umfassende Bestandteile von Cellulase-Enzymen in Mikroorganismen. Sie werden in 14 Familien basierend auf Aminosäure-Sequenz, Bindungsspezifität und Struktur klassifiziert [13]. Sie haben i.d.R. eine C- oder N-terminale Position im Enzym. Die Verwendung von CeBDs als Affinitäts-Tag in der rekombinanten Produktion von Fusionsproteinen ist bekannt [14]. Die Herstellung des genetischen Fusionskonstruktes eADF4(C16)-CeBD sollte mittels einer Klonierungsstrategie analog zu der von eADF4(C16)-Esterase 2 bzw. eADF4(C16)-GFP erfolgen. Wichtig dabei ist, wie in Vorarbeiten gezeigt, dass die genetische Fusion der Proteine weder die Selbstassemblierungseigenschaften des Spinnenseidenproteins noch die native Struktur und katalytische Funktion der CBD beeinträchtigt. Dies war auch hier zu erwarten, so dass eine funktionsfähige und spezifische Bindung zu den Cellulose-basierten Materialien möglich wird. Die begleitende Proteinanalytik zur Reinheit und Identifizierung beinhaltet Gelelektrophorese, spektroskopische (CD, UV) und chromatographische Methoden gekoppelt mit MALDI-TOF zur Bestimmung der Molekulargewichte und Schwingquartzmikrowaagen (QCM)-Messungen zur Bindung des Fusionsproteins an Cellulose.

### 3.2 Arbeitspaket 2: Prozessierung der neuen Hybride in Hydrogele und Fasern

Nach molekularbiologischer Funktionalisierung sollten die Hybridkonstrukte in Hydrogele, Fasern und Folien prozessiert werden. Für die Verarbeitung der Fusionskonstrukte kann die Arbeitsgruppe verschiedene etablierte Prozessierungsverfahren, darunter Spinn-, Guss-, Beschichtungs- und 3D-Druckmethoden anwenden. Zudem können auch Mehrschichtsysteme nach dem Layer-by-Layer-Prinzip zur Generierung von kontrollierten 2-D refraktiven Elementen hergestellt werden. Fasern werden mit einem etablierten Nass-Spinnverfahren hergestellt [9]. Die Fusionsproteine werden dabei aus Lösung in einem Fällbad ausgefällt und anschließend in einer Nachverarbeitungsstrecke gewaschen und verstreckt (Industrie-Nassspinnanlage der Firma Dienes AG ist vorhanden). Ebenso ist die Herstellung von Hydrogelen mit rekombinanten Spinnenseidenproteinen als Methode etabliert. Es lassen sich durch Wahl und Konzentration des Lösungsmittels/Puffers kontrollierte Bedingungen der Hydrogele für den anschließenden 3D-Druck einstellen [15]. Es erfolgt eine mikroskopische (Licht- und Rasterelektronenmikroskopie), rheologische und spektroskopische Charakterisierung der hergestellten Morphologien.

# 3.3 Arbeitspaket 3: Prozessieren von Spinnenseidenproteinen und Chitosan in formverändernde Folien (4D-Druck).

Es sollten auf Basis der Spinnenseidenproteine formverändernde Strukturen (Röhrchen) hergestellt werden. Eine Formänderung erfordert Stimuli-Sensitivität und eine inhomogene Quellung des Materials. Die inhomogene Quellung kann erreicht werden, wenn zwei Polymere mit unterschiedlichen Quelleigenschaften verwendet werden (siehe Abbildung 3). So entstehende, selbst-assemblierende Strukturen basieren auf einem wichtigen Strukturierungsprinzip der Natur, das als Konzept zur Bildung sogenannter "intelligenter Materialien" (*smart materials*) im Projekt genutzt werden soll (4D-Prozessierung). In Vorarbeiten wurden für die Generierung von selbstrollenden Röhrchen zweilagige Folien aus Chitosan als Stimulus-responsivem Biopolymer (aktive Schicht) und rekombinantem Spinnenseidenprotein (passive Schicht) verwendet. Durch die stärkere Quellung der außen liegenden Chitosan-Schicht in einem wässrigen Puffer wird unter Verwendung von Kanülen ein Rollen entlang der Folien-Längsachse induziert. Die Röhrchen haben einen Durchmesser von ca. 1 mm. Durch Variation der Prozessparameter wie Schichtdicken, Kanülendurchmesser etc., aber auch anderer Stimuli wie beispielsweise Änderung des pH-Wertes des Puffers können die entstehenden Röhrchen kontrolliert eingestellt werden.



Abbildung 3: Faltverhalten von Doppelschichten aus Chitosan und Spinnenseide. Zunächst wurde eine Chitosanfolie gegossen, die danach mit einer eADF4(C16)-Folie beschichtet wurde. Durch Inkubation in Puffer rollt sich die Chitosanfolie um eine Achse auf, sodass die Seidenfolie die Innenseite der entstehenden Röhrchen bedeckt.

# 3.4 Arbeitspaket 4: 3D-Druck der optischen Cellulose/Spinnenseidengele auf formverändernden Folien (4D-Druck).

In diesem AP sollten die formverändernden Folien (4D-Prozessierung) mit Cellulose, bzw. den angestrebten Spinnenseiden/Cellulose-Hydrogelen mittels 3D-Druckverfahren gefüllt und ihre Eigenschaften analysiert werden. Dazu werden zunächst die in AP1-2 hergestellten Spinnenseidenprotein-Hydrogele auf die formveränderbaren Bilayer-Filme aus AP1-3 aufgedruckt und das Rollverhalten analysiert. Für den 3D-Druck steht ein 3D-Drucker (RegenHU) mit 4 unterschiedlichen Druckköpfen zur Verfügung. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass auch mit mesoporösen Silika-Nanopartikeln beladene Seidenhydrogele 3D-gedruckt werden können [16]. Analog dazu sollen die Spinnenseidenhydrogele mit den Cellulose-Nanokugeln der Arbeitsgruppe von Prof. Zollfrank (AP2-3) beladen und auf die Bilayer-Folien 3D-gedruckt werden. Es erfolgt eine eingehende mikroskopische und mechanische Analyse der gefüllten Lichtleiterstrukturen. Zudem soll der Effekt einer Verstärkung der entstehenden Strukturen durch implementierte Spinnenseidenfasern untersucht werden.

# 3.5 Ursprünglicher Zeitplan und Meilensteinplanung

| Arbeitspakete AP   | 19/<br>1 | 19/<br>2 | 19/<br>3 | 19/<br>4 | 20/<br>1 | 20/<br>2 | 20/<br>3 | 20/<br>4 | 21/<br>1 | 21/<br>2 | 21/<br>3 | 21/<br>4 |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| AP1-1: Rekombinante Her-<br>stellung neuer Spinnensei-<br>denhybride   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Das Ziel ist die molekularbio-<br>logische Kopplung und rekom-<br>binante Herstellung von neu-<br>artigen Spinnenseidenprotei-<br>nen mit Cellulosebindedomä-<br>nen (CeBD)  |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AP1-2: Prozessierung der<br>neuen Hybride in Hydro-<br>gele und Fasern   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Das Ziel ist die Verarbeitung<br>der neuen Spinnenseiden-<br>CeBD-Hybride in funktionale<br>Hydrogele, die als Matrix, und<br>mechanisch stabile Fasern, die<br>als Verstärker in den neuen<br>Lichtwellenleiterstrukturen<br>eingesetzt werden. |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AP1-3: Prozessieren von<br>Spinnen-seidenproteinen<br>und Chitosan in formverän-<br>dernde Folien (4D-Druck)   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Ziel ist es, sich selbst-rollende<br>Röhr-chenstrukturen als Man-<br>tel für die Lichtwellenleiter<br>herzustellen.  |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| AP1-4: 3D-Druck der opti-<br>schen Cellulose/Spinnen-<br>seidengele auf Formverän-<br>dernden Folien (4D-Druck)  |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Ziel ist es, die neuen Cellu-<br>lose-Spinnenseiden-Lichtwel-<br>lenleiter in die formverändern-<br>den Folien zu drucken (3D),<br>damit diese sich nach externer<br>Initiation um die Lichtwellen-<br>leiterstrukturen formen (4D).             |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |

Abbildung 4: Im Projektantrag vorgeschlagener Zeitplan zur Verteilung der Arbeiten.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Das Projekt hatte eine Verzögerung von ca. 6 Monaten, da die Findung und Einstellung eines passenden wissenschaftlichen Mitarbeiters nach Bewilligung des Projektes Mitte Dezember 2018 bis in den Frühsommer 2019 in Anspruch nahm. Entsprechend wurde der Zeitplan angepasst. Somit standen erste Proteine ab Mitte 2020 zur Verfügung. Ab diesem Zeitpunkt konnte ein direkter Materialaustausch mit BionOptik II realisiert werden. Wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, wurde das Fusionsprotein jedoch nochmals modifiziert, da die ursprünglich geplante Variante keine Bindung zu Cellulose ermöglichte. Die später entwickelte, bindende Variante, ist allerdings sehr scherempfindlich und muss in wässriger Lösung gelagert werden. Deshalb konnte, u.a. auch Pandemie-bedingt kein Materialaustausch stattfinden. Da der Transport der Proteinlösung mit Paketdienstleistern nicht realisierbar war und persönliche Treffen/Dienstreisen stark eingeschränkt waren, wurden alle Prozessierungsschritte von Cellulosematerialien in Kombination mit dem Spinnenseiden-Fusionsprotein in Bayreuth durchgeführt.

# 4.1 Arbeitspaket 1: Rekombinante Herstellung neuer Spinnenseidenhybride

Zur erfolgreichen Herstellung des neuartigen Fusionsproteins, musste vorerst eine geeignete Cellulose-bindende-Domäne (CeBD) identifiziert und, gekoppelt an die DNA-Sequenz von eADF4(C16), in den Trägervektor pET28 (folgend pET-Vektor genannt) überführt werden.

Nach erfolgreicher Klonierung erfolgte eine Expressionsanalyse des Proteins in verschiedenen *Escherichia coli (E. coli)* Stämmen und anschließend Fermentationen in 1.3, 3.5, 5 und 20 L Fermentern.

Die erhaltene Bakterienfeuchtmasse wurde anschließend aufgereinigt, um das Zielprotein zu extrahieren.

Analysen zur Proteinreinheit umfassten SDS-PAGEs (mit anschließender Silberfärbung), UV-Vis und CD-Spektroskopie und MALDI-TOF.

### 4.1.1 Findung einer geeigneten Cellulose-bindenden-Domäne

Der erste Teil des Arbeitspakets 1 befasste sich mit der Findung einer geeigneten Cellulosebindenden-Domäne (CeBD). Diese sollte mehreren Anforderungen gerecht werden, wie zum Beispiel die Möglichkeit der Proteinproduktion in *Escherichia coli*, dem am Lehrstuhl etablierten Expressionsorganismus. Des Weiteren sollte gewährleistet sein, dass die Domäne auch nach der Modifikation mit einem anderen Protein (in diesem Falle eADF4(C16)) Bindungsaktivität aufweisen kann.

CeBDs sind Domänen von Exo- und Endoglucanasen mehrerer grampositiver Bakterien und Pilze [14]. Da das Spinnenseidenfusionsprotein von E. coli exprimiert wird, wurde die CeBD der Exoglucanase [17, 18] von Cellulomonas fimi verwendet, da beide Bakterien grampositiv sind und eine sehr ähnliche Codonverwendung aufweisen [19]. Diese gehört zur Familie 2 der CeBDs, bei der es sich um die Familie der irreversiblen CeBDs handelt [20, 21]. Die CeBDs haben ein gemeinsames Merkmal: Sie alle enthalten einen Kamm, wie in Abbildung 5 in Gelb hervorgehoben, aus linear angeordneten, fast regelmäßig beabstandeten und lösungsmittelexponierten Aromaten (Tryptophanresten), die an der Bindung der CeBD an Cellulose beteiligt sind [21]. Sowohl CeBD<sub>CEX</sub> (C-terminal) als auch CeBD<sub>CenA</sub> (N-terminal) von C. fimi zeigen drei TRP-Reste, TRP17, TRP38 und TRP54, welche streng konserviert sind. Insgesamt weist CeBD<sub>CEX</sub> sogar fünf TRP-Reste auf, welche, wie Din et al. heraus fanden, die Bindung zwischen CeBD und Cellulose durch einen hydrophoben Effekt verursachen, der zwischen den insgesamt fünf Tryptophanresten und der flachen Oberfläche der Zuckerringe der Cellulose auftritt [22]. Dies würde auch die höhere Affinität für die strukturierte kristalline Cellulose erklären, wenn die Tryptophanreste auf einer mehr oder weniger flachen Oberfläche exponiert werden.



Abbildung 5: Struktur der CeBD<sub>CEX</sub>. In Gelb hervorgehoben sind die Trypthophanreste 17, 54 und 72, welche besagten "Kamm" zur Cellulose-Bindung bilden.

Aufgrund der Möglichkeit der Modifizierung des Proteins am N-terminus zur späteren Aufreinigung wurde die CeBD<sub>CEX</sub> am C-Terminus des eADF4(C16) angebracht und fortlaufend als CeBD bezeichnet. Die entsprechende Aminosäure-Sequenz für die Domäne lautet:

ASSGPAGCQVLWGVNQWNTGFTANVTVKNTS-SAPVDGWTLFSFPSGQQVTQAWSTVTQSS-VTVRNAPWNGSIPAGGTAQFGFNGSHTGTNAAPTAFSLNGTPCTVG

Wie bereits anfangs beschrieben, wurde das Protein nochmals weiter modifiziert, da das ursprünglich geplante Fusionsprotein, bei dem die CeBD-Sequenz direkt auf die eADF4(C16)-Sequenz folgte, keine Bindung an Cellulose erkennen ließ. Grund hierfür ist vermutlich die Nähe der CeBD zum eADF4(C16) Protein. eADF4(C16) ist zwar intrinsisch ungefaltet, kann aber aufgrund von Ladungen oder  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen Interaktionen mit dem Fusionspartner eingehen. Durch die Inkorporation eines sogenannten Prolinlinkers (PL), konnte die Funktionalität des Fusionsproteins hergestellt werden. Der Prolinlinker kommt ebenfalls im natürlichen Protein, der Cellulase, vor, um die katalytische Domäne von der CeBD zu trennen. Er besteht aus 21 alternierenden Prolin und Trypthophanresten und weist somit keine Struktur, Ladung oder sonstige etwaige Funktionen außerhalb der eines Abstandshalters auf. Das so entstandene neue Fusionsprotein wurde eADF4(C16)-PL-CeBD benannt. Abbildung 6 zeigt eine schematische Zusammenfassung des neuartigen Fusionsproteins. Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16), welches aus 16 Wiederholungen des sogenannten C-Moduls besteht (Aminosäure-Sequenz: GSSAAAAAAAASGPGGQGPEN-QGPSGPSGPGQPGGP) ist molekularbiologisch mit der Aminosäure-Sequenz der CeBD und dem Prolinlinker (PL) am C-Terminus erweitert, um so eine Bindung an Cellulosemoleküle zu ermöglichen.

Für Analyse- und Aufreinigungszwecke besitzen die Fusionsproteine am N-Terminus einen T7- und einen 6-HIS-Tag.



Abbildung 6: Schematische Darstellung des gekoppelten Fusionsproteins eADF4(C16-CeBD).

### 4.1.2 Klonierung des Expressionsvektors

Die Klonierung von eADF4(C16)-CeBD und eADF4(C16)-PL-CeBD wurde mit einen sogenannten nahtlosen Klonierungsansatz durchgeführt [24] und von einem externen Sequenzierungs-Dienstleister bestätigt. Bei der Klonierung werden zwei pCS-Vektoren mit jeweils den beiden zu kombinierenden Zielsequenzen nach bzw. vor jener Sequenz und in der Ampicillin-Resistenz verdaut, so dass beide Teile der Sequenz nahtlos ligiert werden können und erfolgreiche Ligationen eine wieder zusammengefügte Ampicillin-Resistenz aufweisen. Die kombinierte Zielsequenz wird daraufhin in den Expressionsvektor pET überführt, welcher für die Produktion von rekombinanten Proteinen von *E. coli* optimiert ist.

Nach den Restriktions- und Ligationsschritten erfolgt eine Transformation des pET-Vektors in den verwendeten *E.coli* Stamm (hier DH10b) mit anschließendem Ausplattieren auf einem Selektionsnährboden. Die DNA jeder über Nacht gebildeten Kolonie wurde mithilfe des Promega DNA miniprep kits zur weiteren Modifizierung extrahiert.

Potenziell erfolgreiche Klonierungsansätze wurden durch Agarosegelelektrophorese identifiziert und durch einen Sequenzierungsdienstleister bestätigt.

Abbildung 7 zeigt ein repräsentatives Agarosegel Bild nach einem BamHI/HindIII Testverdau des pET28\_C16\_PL\_CeBD-Vektors vor der Sequenzierung.



# Abbildung 7: Agarosegelelektrophorese nach einem BamHI/HindIII Testverdau von pET28\_C16\_PL\_CeBD. Die Banden an den Rändern zeigen einen 10 kb-Standard. Die jeweiligen Restriktionsprodukte im rot markierten Bereich sind von oben nach unten: Der doppelt verdaute, "leere" pET\_C16\_pl\_CeBD-Vektor mit ~5kb und die BamHI/HindIII verdaute Zielsequenz mit 2 kb.

Wie in Abbildung 7 zu erahnen ist, war die Klonierung in diesem Falle bei 5 Kolonien erfolgreich. Jede Bande steht für den Verdau einer Bakterienkolonie. Im rot markierten Bereich ist die zu erwartende Aufteilung zu sehen. Die anders verteilten Banden zeigen entweder nur teilweise verdaute Vektoren bei ~7 kb oder andere, nicht eindeutig zu identifizierende, Fragmente. Banden, die der zu erwartenden Verteilung entsprachen, wurden sequenziert und die resultierenden Dateien wurden mit *in silica* Experimenten abgeglichen. Hierfür wurde die Software SnapGene verwendet. Die übereinstimmenden Vektoren wurden re-transformiert und die DNA amplifiziert, um sie für die anschließende Proteinproduktion weiterzuverwenden.

### 4.1.3 Expressionstests für eADF4(C16-CeBD)

Um geeignete Bedingungen für die Fermentation von eADF4(C16)-PL-CeBD zu finden, wurden mehrere Expressionstests durchgeführt. Hierfür wurden drei *E. coli* Stämme (BL21gold(DE3), HMS174 und SHuffle) bei 25, 30 und 37°C und mit Induktionskonzentrationen von 0.1 und 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zwischen 0 und 72 Stunden Induktionszeit verglichen. Da eine Rückfaltung des Fusionsproteins sich als zu unzuverlässig erwies, war es wichtig geeignete Parameter für eine Akkumulation des Proteins im Überstand zu finden, um Chromatographische Verfahren zur Aufreinigung anwenden zu können, um die Proteinfaltung zu erhalten.

Für die Expressionsanalyse wurde eine Übernachtkultur einer Transformationskolonie gezüchtet, um damit eine erneute Kultur am Folgetag anzusetzen. Diese wurde bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0.7 gezüchtet und dann bei der entsprechenden Temperatur induziert. Die Proben wurden mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen und anschließend über SDS-PAGE (Abkürzung für Englisch sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend entweder per Silberfärbung gefärbt oder einem Western-Blot unterzogen. Beim Western-Blot wurden sekundäre anti-T7 Antikörper verwendet, welche an den N-Terminus des Fusionsproteins binden.

Überraschenderweise waren die Expressionstests aller getesteten Stämme, Temperaturen und Induktionskonzentrationen sehr ähnlich. Bei jeder getesteten Parameterkombination befand sich das Protein stets im Pellet, was auf eine Agglomeration in Inklusionskörpern schließen lässt. Dies würde bedeuten, dass das Protein unlöslich ist. Gründe hierfür könnten die falsche Proteinfaltung, die Proteineigenschaften oder die Produktionsparameter sein. Jedenfalls bedeutet es, dass das Protein nach der Reinigung und vor der letztendlichen Verwendung wieder gelöst werden müsste, wozu jedoch Lösungsmittel oder chaotrophe Salze nötig wären, welche wiederum die Faltung der CeBD beeinträchtigen würden.

Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalyse von eADF4 (C16)-PL-CeBD in Bl21gold (DE3) zwischen 0 und 48 Stunden bei 30°C. Diese Parameter sind stellvertretend für alle anderen getesteten Kombinationen, da sie keine bedeutenden Unterschiede aufwiesen. Der Western-Blot zeigt für jede Probe ein T7-getaggtes eADF4(C16)-PL-CeBD. Darüber hinaus sind keine zusätzlichen, kleineren Banden sichtbar, die einen Abbau des Proteins anzeigen würden.

Da die Expressionsanalyse keinen Aufschluss über die bestmöglichen Fermentationsparameter geben konnte, wurden diese anhand von Erfahrungswerten festgelegt und erst im Fermentationsmaßstab weiter angepasst. Die schlechte Übertragbarkeit von Expressionstest auf Fermentation lässt sich am besten an den geänderten Prozessparametern erklären. Bei einem Expressionstest gibt es keinerlei Luft- oder Sauerstoffzufuhr, sowie keinen geregelten pH-Wert oder Substratfluss. Die OD bei Induktion entspricht somit beim Expressionstest ungefähr 1 und bei einem 5 L Fermenter 50, oder sogar 80 bei einem 20 L Fermenter. Dadurch ist auch die Proteinmenge bei einer Fermentation um ein Vielfaches größer.



Abbildung 8: Silberfärbung (oben) und Western Blot (unten) von SDS-Gelen der Expressionsanalyse. Der Western Blot wurde mit T7-Antikörpern inkubiert.

#### 4.1.4 Fermentation und Proteinreinigung

Die Fermentation des Zielproteins eADF4 (C16)-PL-CeBD wurde in 1.3, 3.5, 5 und 30 L Bioreaktoren durchgeführt, die jeweils über die EVE-Bioprozessplattform gesteuert wurden. Abbildung 9 zeigt einen 1.3 L Fermenter. Man ließ die Bakterienkultur bei 37°C wachsen, bis ein Wert für die optische Dichte (OD) von 40–50 erreicht war. Dann wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM und Regulierung der Temperatur auf 30°C induziert. Nach der gewünschten Expressionszeit von 2 Stunden wurden die Bakterien geerntet. Die Induktionszeit von 2 Stunden wurde experimentell bestimmt. Die geerntete Bakteriensuspension wurde bei –80°C gelagert.



Abbildung 9: 1.3 L Minifors Fermenter zur rekombinanten Herstellung der Fusionsproteine<u>.</u>

Die Proteinreinigung wurde mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) mit Ni-NTA-Säule durchgeführt. Ni-NTA-Agarose ist ein nickelbeladenes Affinitätsharz, das zur Reinigung rekombinanter Proteine verwendet werden kann, die eine Polyhistidin (6xHis)-Sequenz enthalten, indem Chelatkomplexe gebildet werden. An das Harz gebundene Proteine können entweder mit einem Puffer mit niedrigem pH-Wert oder durch Kompetition mit Imidazol oder Histidin eluiert werden. Auch hier wurden die optimalen Elutionsbedingungen experimentell bestimmt und ein sauberes Protein konnte gewonnen werden. Die Proteinerträge waren ca. 0.25-0.35 mg pro Gramm *E.coli* Pellet.

Eine Publikation, die auch Daten der Proteinproduktion und Reinigung, sowie einen Fermentationsverlauf und Chromatogramme zeigen wird, ist in Bearbeitung.

### 4.1.5 Proteinanalyse

Das aufgereinigte eADF4(C16)-PL-CeBD wurde anhand von SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung und Western-Blot auf seine Reinheit überprüft.

Berechnungen per protParam, einem kostenlosen online Tool zur Bestimmung von Molekulargewichten, zufolge sollte das Fusionsprotein ein Molekulargewicht von 60.7 kDa haben. Eine MALDI-TOF Messung bestätigte das exakte Molekulargewicht von 60.7 kDa.

Um zu verifizieren, dass die CeBD korrekt gefaltet vorliegt und somit eine Bindung an Cellulose möglich ist, wurde die Denaturierung des Proteins mittels nah-UV Circulardichroismus (CD) und Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Da der eADF4(C16)-Teil des Fusionsproteins intrinsisch ungefaltet ist, muss jede festgestellte Denaturierung des Proteins auf eine Entfaltung der CeBD zurückzuführen sein. Die Denaturierung wurde thermisch, sowie chemisch untersucht, wobei zur chemischen Denaturierung Guanidinhydrochlorid (GdmCL), ein chaotrophes Salz, genutzt wurde.

Durch diese Methoden konnte festgestellt werden, dass sich das Protein ab 60°C zu denaturieren beginnt und bei ca. 80°C vollständig denaturiert ist. Die chemische Denaturierung begann bereits ab 1M GdnCL.

Das gefaltete Fusionsprotein wurde anschließend bzgl. Adhäsion an Cellulose untersucht. Hierfür wurden QCM-D (Quartz Crystal Micro-balance and Dissipation) Messungen durchgeführt. Mit QCM-D können kleinste Masseänderungen im Nanogramm Bereich detektiert werden. Die Sensor-chips wurden mit 0.5% Cellulose Lösung (bereitgestellt von Prof. Zollfrank's Gruppe, TUM) per spin-coating beschichtet. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse einer QCM-Messung nach Sauerbrey Auswertung.



### Abbildung 10: Vergleich der akkumulierten Proteinmasse auf einem Cellulose-beschichteten QCM-D-Chip. n=2

Abbildung 10 verdeutlicht, dass eine Bindung des Proteins an die Cellulose beschichteten QCM-D Chips stattfindet. Somit sind alle Anforderungen von AP-1 erfüllt.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über das neue Protein, insbesondere der Scheranfälligkeit und der Lagerung in wässriger Lösung, um die Faltung zu erhalten, konnten nicht alle Arbeitspakete wie im Projektantrag und der Zielsetzung beschrieben bearbeitet werden. Die direkte Prozessierung zu Fasern scheint zwar durchaus möglich, ist aber in diesem Projektzusammenhang nicht zielführend, da ein paralleles Spinnen aufgrund der verschiedenen Lösungsmittelsysteme der beiden Komponenten (eADF4(C16)-PL-CeBD und Cellulose) nicht durchführbar ist. Des Weiteren ist die Produktionsausbeute sehr gering. Somit wurde die Vorgehensweise angepasst und Beschichtungen von Cellulosefasern mit Seide durchgeführt (siehe 4.4).

# 4.2 Arbeitspaket 2: Prozessierung der neuen Hybride in Hydrogele und Filme

Wie bereits erläutert, wurde Arbeitspaket 2 angepasst, sodass hier die Verarbeitung in Filme und Hydrogele fokussiert wurde.

### 4.2.1 Prozessierung in Filme

Um die Cellulose-bindende Funktion von eADF4(C16)-PL-CeBD zu erhalten, musste die Prozessierung in Filme aus wässrigen Lösungen mit Zugabe von 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) durchgeführt werden. Das zugesetzte Salz erhöht die Stabilität des Proteins und zersetzt sich bei Verdunstung rückstandslos in NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. Somit sollten keine Defekte im Film entstehen. Es konnten völlig transparente Filme gegossen werden. Nachteil dieser Methode ist, dass aufgrund der hohen Verdunstungszeit keine dicken Filme produzierbar sind. Durch die lange Zeit, beginnt das Protein Agglomerate zu bilden und es entsteht ein trüber Film. eADF4(C16)-PL-CeBD ist maximal bis ~6 mg/mL löslich, bevor es dimerisiert und ausfällt.

Die aus NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gegossenen Filme wurden in den nächsten APs für die selbst-rollenden Filme verwendet. Vorab wurden Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese Filme, wenn erneut befeuchtet, an Cellulose binden können. Hierfür wurden eADF4(C16) und eADF4(C16)-PL-CeBD Filme aus NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gegossen und anschließend 20 Minuten mit Wasserdampf nachbehandelt. Anschließend wurden jeweils 20 µL einer 3 mg/mL Suspension der Cellulosenanopartikel (CNP) der TUM auf den Filmen getrocknet. Genauere Informationen über die CNP sind dem Bericht der Gruppe von Prof. Zollfrank zu entnehmen. Nach 30 Minuten wurden die Filme 3-mal mit Wasser gewaschen und wiederum getrocknet. Die Analyse der einzelnen Materialien wurde mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.



### Abbildung 11: REM-Aufnahmen von getrockneten CNP auf eADF(C16) und eADF4(C16)-PL-CBD Filmen vor (links) und nach (rechts) 3 Waschschritten mit Wasser.

Abbildung 11 zeigt deutlich, dass die Partikel besser auf eADF4(C16)-PL-CeBD haften, jedoch ist auch zu erkennen, dass die CNP in wässriger Suspension miteinander verschmelzen. Dadurch konnten keine optischen Messungen durchgeführt werden.

### 4.2.2 Prozessierung in Hydrogele

Die Prozessierbarkeit in Hydrogele wurde untersucht, um Komposit-Gele für die Lichtleitung herzustellen, welche anschließend auf selbst-rollende Röhrchen aufgedruckt werden sollten.

Die Produktion von Hydrogelen war erfolgreich. Durch Einmischen von Cellulosemikrofasern (Merck) konnte die Stabilität der Gele stark erhöht werden. Daten werden in einer geplanten Publikation gezeigt.

Aufgrund der schlechten Verarbeitbarkeit der CNP in Wasser, kommen Anwendungen im Hydrogel für optische Anwendungen nicht in Frage und wurden nicht weiterverfolgt. Für Anwendungen jenseits der Optik könnten sich jedoch interessante Gebiete für ein solches Komposit-Gel finden. So könnten die Komposit Hydrogele zum Beispiel Anwendungen im Bereichen der Gewebe(re)konstruktion finden, für welche Hydrogele aus unmodifizierter, unverstärkter rekombinanter Spinnenseide zu instabil sind. Eine weitere mögliche Anwendung, ebenfalls im Bereich der Biomedizin, wären Wirkstoffdepots, welche ihre Wirkstoffe langsamer freigeben, je stärker sie vernetzt sind. Diese Vernetzung ließe sich durch den Anteil an verlinkenden Cellulose Nanopartikeln steuern.

# 4.3 Arbeitspaket 3+4: Prozessieren von Spinnenseidenproteinen und Chitosan in formverändernde Folien (4D-Druck)

Aufgrund der vorangehenden Erkenntnisse, dass eADF4(C16)-PI-CeBD mit CNP nicht für optische Anwendungen in Frage kommt, wird AP3 und 4 hier zusammenfassend beschrieben.

### 4.3.1 Prozessierung in selbst-rollende Filme

Basierend auf Vorarbeiten des Lehrstuhls Biomaterialien [25] wurden zweilagige Filme aus Chitosan und eADF4(C16)-PL-CeBD gegossen, um ein Rollen durch die Schwellung des Chitosanfilms zu induzieren. Jedoch sollte hier statt einer Spritzennadel, eine Linie aus CNP als Rollachse für den Film dienen.

Um dies zu erreichen, wurde eine 2 %ige Chitosan Lösung in 1 % Ameisensäure über Nacht gelöst, gefiltert und anschließend auf Polystyrol gegossen. Der Film wurde über Nacht getrocknet und anschließend mit 0.1 M NaOH nachbehandelt. Auf den trockenen Film wurde nun ein weiterer Film aus eADF4(C16)-PL-CeBD in 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gegossen. Nach dem Trocknen über Nacht, wurde der komplette Film mit Wasserdampf nachbehandelt und in ca. 0.5\*1.5 cm große Rechtecke zurechtgeschnitten. Entlang der 1.5 cm Achse wurde auf die aus eADF4(C16) bestehende Seite mit Rasierklingen eine Linie aus CNP geformt und der zweilagige Film wurde mit den platzierten CNP vorsichtig auf eine Wasseroberfläche gelegt. Durch die starke Schwellung von Chitosan rollte sich der Film entlang der langen Achse. Jedoch war die Linie aus CNP nicht schwer und stabil genug, um eine wirkliche Drehachse zu bilden. Aufgrund dessen hat sich der Film von beiden Seiten gleichzeitig gerollt. Des Weiteren konnte der Querschnitt nur sehr schwer observiert werden, da aus dem getrockneten Röllchen die CNP wieder herausfielen. Abbildung 12 zeigt einen solchen Querschnitt mit wenigen verbleibenden CNP. Die trockenen CNP banden nur sehr schlecht an den eADF4(C16)-PL-CeBD Film. Des Weiteren blieben die CNP durch diese Prozessierung undurchsichtig und waren damit nicht geeignet für Lichtwellenleitung.



Abbildung 12: REM-Aufnahme eines selbst-gerollten eADF4(C16)-PL-CeBD/Chitosan Röhrchens mit inkorporierten CNP

## 4.4 Lichtwellenleiter aus Cellulose und eADF4(C16)-PL-CeBD

Durch die Ergebnisse aus AP 3 wurde ersichtlich, dass der im Antrag vorgeschlagene Ansatz des selbstrollenden-Röhrchens mit implementierten CNP nicht zielführend ist. Durch die unterschiedlichen Beschaffenheiten und Verarbeitungsmethoden der CNP und des Fusionsproteins, kann weder eine optisch aktive Hydrogel Matrix, noch ein selbst-rollender Lichtwellenleiter prozessiert werden. Des Weiteren sind dicke, frei-stehende Filme aus eADF4(C16)-PL-CeBD nicht produzierbar, was die Nutzung auf Beschichtungen beschränkt.

Der Brechungsindex von eAF4(C16) Filmen war 1.49-1.53 und 1.55-1.57 für Cellulose, womit eine Lichtwellenleitung möglich ist, wenn Cellulose als Kern und rekombinante Spinnenseide als Mantel eingesetzt wird.

Ein möglicher Ansatz, um Lichtwellenleiter aus den beiden Materialien herzustellen war deshalb das Beschichten von Cellulosefasern, die von Prof. Zollfranks Gruppe hergestellt wurden. Diese besitzen bereits lichtleitende Eigenschaften. In Bayreuth wurden sie mit dem Fusionsprotein beschichtet.

Hierzu wurden spezielle Vorrichtungen mittels 3D-Druck erstellt, um die Fasern möglichst gleichmäßig zu beschichten. Die Cellulosefasern konnten erfolgreich ummantelt werden, ohne dass eine Delaminierung stattfand. Die Fasern wurden dann in Prof. Zollfrank's Gruppe analysiert. Die Lichtwellenleiter wiesen eine niedrigere Dämpfung auf als vor der Beschichtung und sind somit als Biopolymer Lichtleiter geeignet. Durch den Mantel aus rekombinanter Spinnenseide können u.a. im medizinischen Bereich Anwendung finden, indem man sich die biokompatiblen Eigenschaften der Spinnenseide zunutze macht. Eine weitere Eigenschaft ist die gezielte Bioabbaubarkeit des Mantels. So könnten zukünftig Lichtwellenleiter mit einer definierten Lebensdauer erzeugt werden. Des Weiteren können diese Lichtwellenleiter nachhaltig produziert werden und sind zu 100% aus erneuerbaren Rohstoffen. Abbildung 13 zeigt die lichtleitenden Fasern.



Abbildung 13: 3 Lichtleitende Cellulose/eADF4(C16)-PL-CeBD Fasern mit grünem, orangenen und rotem Licht.

Daten zur Lichtwellenleitung sollen demnächst publiziert werden.

# 5 Zusammenfassung

Ein Hybridprotein aus Spinnenseide und einer Cellulose-Bindedomäne (eADF4(C16)-PL-CeBD) konnte erfolgreich hergestellt, charakterisiert und prozessiert werden, welches in Kombination mit Cellulose und dem Partnerprojekt BionOptik II zu einem Lichtwellenleiter weiter prozessiert wurde. Die Arbeitspakete 1 und 2 wurden damit vollständig abgeschlossen. Das Protein kann von *E. coli* hergestellt und per Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. QCM-D (Quartz Crystal Microbalance and Dissipation) Messungen haben die Bindung an Cellulosefilmen bestätigt. Filme und Hydrogele konnten erfolgreich hergestellt werden.

Die Arbeitspakete 3 und 4 wurden aufgrund der unvereinbaren Materialeigenschaften der Cellulosenanopartikel (CNP) und dem Fusionsprotein zusammengeführt. Die Produktion von selbst-rollenden Spinnenseidenröhrchen mit einem Kern aus CNP konnte nicht realisiert werden, da die CNP in Wasser verarbeitet nicht in der Lage sind Licht zu leiten und nicht als Rollachse dienen können. Des Weiteren muss eADF4(C16)-PL-CeBD zwingend in wässriger Lösung bleiben und kann auf kein anderes Lösungsmittelsystem angepasst werden, welches für die Cellulose besser geeignet wäre.

Somit wurde eine neue Herangehensweise mit dem Ummanteln der Cellulosefasern verfolgt. Dieser war sehr erfolgreich. Eine Publikation ist geplant.

Zusammenfassend sind 2 Publikationen in Anlehnung an das Projekt geplant:

- 1. Publikation in Kooperation mit Prof. Zollfranks Gruppe: Biopolymerbasierter Lichtwellenleiter aus Cellulose und rekombinanter Spinnenseide
- Alleinstehende Publikation: Herstellung und Charakterisierung von eADF4(C16)-PL-CeBD

Vorträge in Verbindung mit dem BayBionik Projektverbund:

- Ideenforum am 13.02.2020 im Bionicum Nürnberg
- Vortragsreihe BayBionik am 24.11.2021 im Planetarium Nürnberg

# Literaturverzeichnis

- [1] Zollfrank C, Scheibel T, Seitz H, Travitzky N. 2014. Bioinspired Materials Engineering. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*
- [2] Omenetto FG, Kaplan DL. 2008. A new route for silk. *Nature Photonics*, 2: 641-643
- [3] Kujala S, Mannila A, Karvonen L, Kieu K, Sun Z. 2016. Natural silk as a photonics component: A study on its light guiding and nonlinear optical properties. *Scientific Reports*, 6: 22358
- [4] Mittal N, Jansson R, Widhe M, Benselfelt T, Håkansson, KMO, Lundell F, Hedhammar M, Söderberg LD. 2017. Ultrastrong and bioactive nanostructured bio-based composites. ACS Nano, 11: 5148-5159
- [5] Meirovitch S, Shtein Z, Ben-Shalom T, Lapidot S, Tamburu C, Hu X, Kluge JA, Raviv
  U, Kaplan DL, Shoseyov O. 2016. Spider silk-CBD-cellulose nanocrystal composites: Mechanism of assembly. *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 1573
- [6] Scheibel T. 2004. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbial Cell Factories*, 3: 14-21
- [7] Doblhofer E, Scheibel T. 2015. Engineering of recombinant spider silk proteins allows defined uptake and release of substances. *Journal of Pharmaceutical Science*, 104: 988-994
- [8] Humenik M, Mohrand M, Scheibel T. 2018. Self-assembly of spider silk-fusion proteins comprising enzymatic and fluorescence activity. *Bioconjugate Chemistry*, 29: 898-904
- Heidebrecht A, Eisoldt L, Diehl J, Schmidt A, Geffers M, Lang G, Scheibel T. 2015.
  Biomimetic fibers made of recombinant spidroins with the same toughness as natural spider silk. *Advanced Materials*, 27: 2189–2194
- [10] Bauer, J. & Scheibel, T. 2017. Conformational stability and interplay of N- and C-terminal domains. *Biomacromolecules*, 18: 835 – 845
- [11] Schacht K, Jüngst T, Schweinlin M, Ewald A, Groll J, Scheibel T. 2015. Biofabrication of cell-loaded 3D spider silk constructs. *Angewandte Chemie*, 54, 2816–2820
- [12] Sundar VC, Yablon AD, Grazul JL, Ilan M, Aizenberg J. 2003. Fibre-optical features of a glass sponge. *Nature*, 424: 899-900
- [13] Linder M, Teeri TT.1997. The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*, 57: 15-28
- [14] Levy I, Shoseyov O. 2002. Cellulose-binding domains Biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 20: 191-213

- [15] DeSimone, E., Schacht, K. & Scheibel, T. 2016. Cations influence the crosslinking of hydrogels made of recombinant, polyanionic spider silk proteins. *Materials Letters*, 183: 101-104
- [16] Kumari S, Bargel H, Anby M, Lafargue D, Scheibel T. 2018. Recombinant spider silk hydrogels for sustained release of biologicals. *ACS Biomaterials*, 4: 1750-1759
- [17] Warren, R. A. J.; Beck, C. F.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Langsford, M. L.; Miller Jr., R. C.; O'Neill, G. P.; Scheufens, M.; Wong, W. K. R., Sequence conservation and region shuffling in an endoglucanase and an exoglucanase from Cellulomonas fimi. 1986, 1 (4), 335-341.
- [18] 40.O'Neill, G.; Goh, S. H.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C., Structure of the gene encoding the exoglucanase of Cellulomonas fimi. Gene 1986, 44 (2), 325-330.
- [19] Hasenwinkle, D.; Jervis, E.; Kops, O.; Liu, C.; Lesnicki, G.; Haynes, C. A.; Kilburn, D. G., Very high-level production and export in Escherichia coli of a cellulose binding domain for use in a generic secretion-affinity fusion system. **1997**, *55* (6), 854-863.
- [20] Tomme, P.; Boraston, A.; McLean, B.; Kormos, J.; Creagh, A. L.; Sturch, K.; Gilkes, N. R.; Haynes, C. A.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G., Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains1Presented at the 2nd Conference on Affinity Technology, Arlington, VA, USA, September 29–30, 1997.1. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 1998, 715 (1), 283-296.
- Berland, B. S.; Haynes, D. R.; Foster, K. L.; Tolbert, M. A.; George, S. M.; Toon, O. B., Refractive Indices of Amorphous and Crystalline HNO3/H2O Films Representative of Polar Stratospheric Clouds. The Journal of Physical Chemistry 1994, 98 (16), 4358-4364.
- [22] Din, N.; Forsythe, I. J.; Burtnick, L. D.; Gilkes, N. R.; Miller Jr, R. C.; Warren, R. A. J.; Kilburn, D. G., The cellulose-binding domain of endoglucanase A (CenA) from Cellulomonas fimi: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. 1994, 11 (4), 747-755.
- [23] Aizenberg, J.; Sundar, V. C.; Yablon, A. D.; Weaver, J. C.; Chen, G., Biological glass fibers: Correlation between optical and structural properties. 2004, 101 (10), 3358-3363.
- [24] Padgett, K. A.; Sorge, J. A., Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. Gene 1996, 168 (1), 31-5.
- [25] Aigner, T.; Scheibel, T., Self-Rolling Refillable Tubular Enzyme Containers Made of Recombinant Spider Silk and Chitosan. ACS Appl Mater Interfaces 2019, 11 (17), 15290-15297.

# Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung          | Bedeutung   |
|--------------------|---|
| AFM                | Rasterkraftmikroskop  |
| C.fimi             | Cellulomonas fimi   |
| CD                 | Circulardichroismus   |
| CeBD               | Cellulose-bindende Domäne   |
| CNP                | Cellulosenanopartikel   |
| COVID 19           | Corona Virus disease 2019   |
| E.coli             | Escherichia coli  |
| eADF4(C16)         | Engineered <i>Araneus diadematus</i> fibrion 4<br>(mit 16 repetitiven C-Modulen)  |
| eADF4(C16-CeBD)    | Engineered <i>Araneus diadematus</i> fibrion 4<br>(mit 16 repetitiven C-Modulen) und einer<br>Cellulose-bindenden-domäne                          |
| eADF4(C16)-PL-CeBD | Engineered <i>Araneus diadematus</i> fibrion 4<br>(mit 16 repetitiven C-Modulen), einem<br>Prolinlinker und einer Cellulose-binden-<br>den-domäne |
| GdnCl              | Guanidinhydrochlorid  |
| HFIP               | Hexafluoroisopropanol   |
| IMAC               | Immobilisierte Metallionen-Affinitätschro-<br>matographie   |
| mg                 | Milligram   |
| mL                 | Milliliter  |
| mM                 | millimol  |
| QCM-D              | Engl. Quartz Crystal Microbalance and Dissipation   |
| SDS-PAGE           | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel-<br>elektrophorese  |
| TRP                | Tryptophan  |