

„Schon mal am seidenen Faden gehangen?“ Ein Einblick in die molekulare Anatomie des Spinnenfadens“

Niklas Bayer und Katja Zorn

Im Anbruch eines neuen Tages fließen die ersten Sonnenstrahlen zaghaft über die gläsernen Fassaden der obersten Stockwerke stählerner Himmelsriesen, während sich in den tiefen Häuserschluchten New Yorks Tag und Nacht wieder einmal um das kurzlebige, geradezu zerbrechliche Zwielficht zanken. Nichtsahnend schwingt sich, von zahlreichen Fenstern widergespiegelt und lediglich von einem dünnen Faden getragen, der Schatten eines Mannes herab, durchbricht diese kriegerische Ruhe und scheint am Höhepunkt seiner Bewegung für den Herzschlag eines Augenblicks zu verharren, nur um dem Betrachter die Möglichkeit zu geben, das kleine schwarze Symbol einer Spinne auf der Brust seines blau-roten Anzuges zu erhaschen.

Diese oder vergleichbare Szenen sind sicherlich Vielen aus den Spiderman-Filmen bekannt und sollen auch keinesfalls das Thema dieses Artikels darstellen. Aber ist es überhaupt möglich, dass sich ein knapp 80 kg schwerer Mann an einem Millimeter-dicken Faden hin und her schwingt, oder liegt auch hier wieder nur ein der Hollywoodtraumfabrik entsprungener „special effect“ vor? Wie dick müsste der Spinnenfaden eigentlich sein, und worauf basieren dessen außergewöhnliche Eigenschaften?

Der Spinnenfaden – molekulare Hightech der Natur

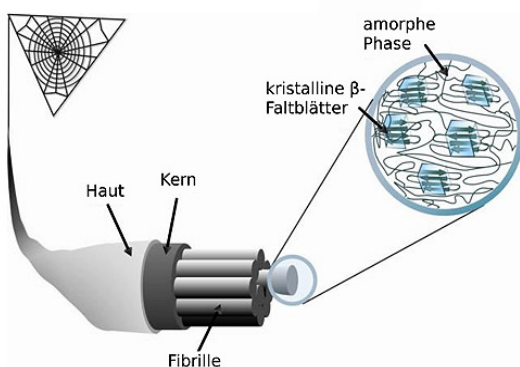


Abbildung 1: Schema des hierarchischen Aufbaus des Spinnenfadens. Die aus MaSp1 und MaSp2 aufgebaute Kernstruktur wird von einer Haut aus Spidroinen der Nebenspinnendrüse (MiSp1 und MiSp2), Glycoproteinen und Lipiden umgeben [6, 18].

Seit über drei Jahrzehnten versuchen Wissenschaftler die Geheimnisse des Spinnenfadens hinsichtlich seiner außergewöhnlichen Eigenschaften zu lüften. Die Belastbarkeit, die Elastizität oder die Klebrigkeit sind Merkmale, die für eine biotechnologische Anwendung von Interesse sind.

Grundsätzlich besteht ein Spinnennetz aus unterschiedlichen Fadentypen, die mithilfe diverser Spinnrüsenarten produziert werden. Die physikalischen Eigenschaften der Fäden variieren hierbei in Abhängigkeit von ihrem Entstehungsort sowie von makroskopischen und molekularen Strukturelementen [1, 2]. Durch die spezifische Kombination dieser Fäden und ihrer Eigenschaften entsteht letztendlich das Spinnennetz [3]. Die Grundbausteine der Biopolymere sind spezielle

Proteine, die als Spidroine bezeichnet werden. Diese Bauelemente sind durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft [4]. Jede Fadenart besitzt ihre charakteristischen Kernproteine [5].

Der derzeit am besten untersuchte Spinnenfaden ist die sogenannte „Lebensleine“ aus der Hauptspinnendrüse der „Gartenkreuzspinne“ (*Araneus diadematus*). Trotz seiner geringen Dichte besitzt diese bemerkenswerte Fadenart die Bruchzähigkeit von Stahl und übersteigt die Zähigkeit von Kevlar, was es zu einem der stärksten, menschenbekanntesten Biopolymere macht [6]. Die Eigenschaften sind unter anderem das Resultat

strukturabhängiger, spezifischer Wechselwirkungen der Spidroine 1 und 2 der Hauptampullendrüse (MaSp1 und MaSp2). Diese Proteine bilden die semikristalline Kernstruktur, die zu Fibrillen zusammengefasst und von einer Haut aus Spidroiden der Nebenampullendrüse, Glycoproteinen und Lipiden umgeben ist (Abb.1). Prinzipiell sind die beiden Proteine im Faden ungleichmäßig verteilt, wobei die MaSp2-Monomere bevorzugt in dicht gepackten Kernbereichen lokalisiert sind und in der Peripherie meist vollständig fehlen [7, 8].

Proteinstrukturen - Ein wenig Ordnung im Chaos

Proteine sind im Allgemeinen aus den 20 natürlichen Aminosäuren aufgebaut und in mehreren Substrukturebenen hierarchisch organisiert. Während die Primärstruktur die Abfolge der durch Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren beschreibt, stellt die Sekundärstruktur die niedrigste Ebene der räumlichen Anordnung dar. Aufgrund der sterisch eingeschränkten Drehbarkeit um die Torsionswinkel ϕ und ψ können hierbei regelmäßige Struktur motive, wie die α -Helix, das β -Faltblatt oder der β -Turn, angenommen werden (Abb. 2). Die Motive werden durch sequenzspezifische Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats und Entropieeffekte stabilisiert. Im Gegensatz zum α -Helix-Motiv bilden sich beim β -Faltblatt die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei benachbarten Polypeptidstrangabschnitten aus, woraus eine parallele oder anti-parallele Ausrichtung resultieren kann. Häufig sind Faltblätter über einen β -Turn miteinander verknüpft.

Die Tertiärstruktur berücksichtigt die räumliche Lage der Aminosäureseitenketten und deren Verknüpfungen über Salz- und Disulfidbrückenbindungen bzw. hydrophobe Wechselwirkungen. Zusätzlich können mehrere Polypeptidketten als Quartärstruktur in einer spezifischen räumlichen Geometrie zu größeren Komplexen assoziieren [9]. Insbesondere ist diese Strukturebene in der Lebensleine von Spinnen für die außergewöhnliche Zugfestigkeit und Flexibilität verantwortlich. Generell gilt, dass die

Funktion eines Proteins mit seiner dreidimensionalen Struktur assoziiert ist.

Die Faltungsvorgänge von Proteinen sind komplex und nicht vollständig verstanden. So ist die dreidimensionale Faltung der Primärstruktur von weiteren Faktoren, wie z.B. Entropie, Temperatur oder pH-Wert, abhängig. Sequenzhomologie bedeutet jedoch nicht unbedingt auch Strukturhomologie.

Alles hängt an MaSp1

MaSp1 ist bis heute der strukturell am besten untersuchte Bestandteil der Lebensleine. Die Primärsequenz des ca. 200 bis 720 kDa schweren Proteins (das entspricht ca. 2000 bis 6000 Aminosäuren) ist in allen Spinnenarten stark konserviert und besitzt zwei sich mehrfach

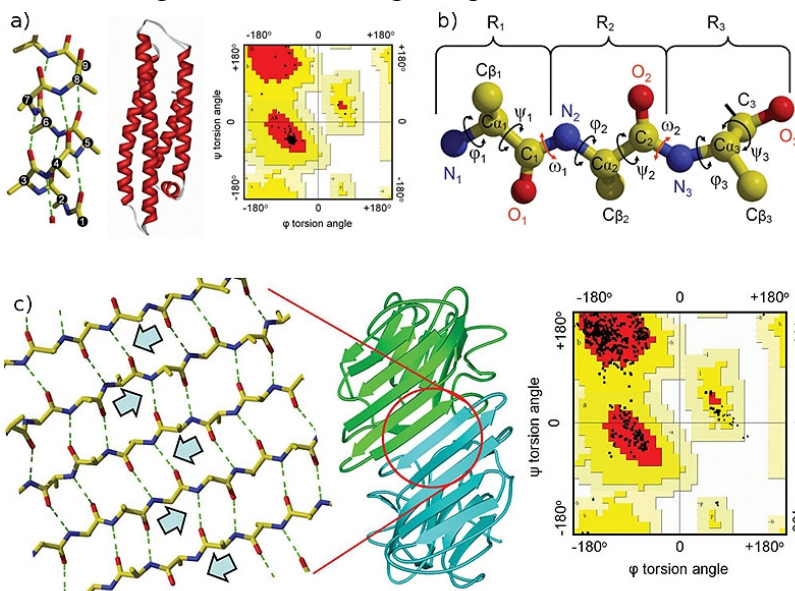


Abbildung 2: Schematische Darstellung der sekundären Struktur motive. Die schwarzen Punkte im Ramachandran-Plot zeigen die bevorzugten ϕ - ψ -Winkelpaare.

- a) Die rechtsgängige α -Helix wird über Wasserstoffbrücken stabilisiert
- b) Darstellung des Polypeptidrückgrats und seiner Torsionswinkel.
- c) Die β -Faltblatt motive können parallel oder anti-parallel ausgerichtet sein und werden über Wasserstoffbrückenbindungen zum benachbarten Strang stabilisiert. Bilder entstammen [9].

wiederholende Sequenzmotive, die in Richtung des Amino- und des Carboxylendes jeweils von einem nicht-repetitiven Abschnitt flankiert werden [10, 11]. Hierbei handelt es sich zum einen um hydrophile, Glycin-reiche Wiederholungen des Musters Glycin-Glycin-X (GGX), wobei X häufig die Aminosäuren Arginin (R), Leucin (L), Tyrosin (Y) oder Glutamin (Q) repräsentiert. Alternierend dazu treten hydrophobe Poly-Alanin-Sequenzabschnitte auf [11]. Bei diesen beiden Motiven wird vermutet, dass sie auf makroskopischer Ebene für die außergewöhnliche Stabilität der Lebensleine verantwortlich sind. Während des Spinnprozesses erfahren diese Sequenzmotive Konformationsänderungen. Einfache Strukturanalysen deuten darauf hin, dass die Poly-Alanin-Motive im endgültigen Faden dicht gepackte, anti-parallele β -Faltblätter ausbilden, während die GGX-Motive sich bevorzugt in helikalen Strukturen (z.B. 3_{10} -Helix) anordnen [7, 10, 12].

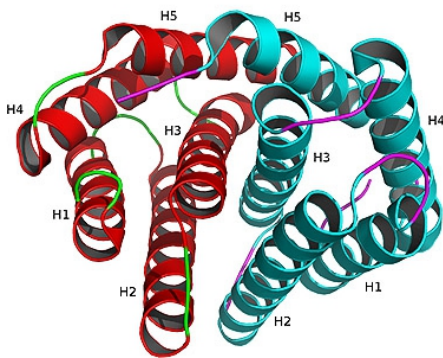


Abbildung 3: Dimer des MaSp1- N-Terminus aus *Euprostenops australis* (PDB-Code: 3LR6). Jedes Monomer besteht aus einem 5-Helix-Bündel (H1 – H5) (Rot bzw. Blau). Die Dimerisierung erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen mehreren Alanin-Resten der Helix 3.

Die ersten 130 AS des nicht-repetitiven Amino-Endes (N-Terminus) von MaSp1 konnten im Gegensatz zum mittleren Sequenzabschnitt strukturell vollständig aufgeklärt werden. Sie bilden eine Struktur aus fünf α -Helices, die in Abhängigkeit vom pH-Wert und Salzgehalt der Lösung reversibel ihre Konformation ändern und mit dem N-terminalen Helix-Bündel eines anderen MaSp1 dimerisieren können (Abb. 3). Der Kontakt erfolgt dabei über die Helix 3 (H3) des jeweiligen Monomers. Die an den hydrophoben Wechselwirkungen beteiligten Aminosäurereste sind dabei in allen Spinnenarten hochkonserviert. Es wird angenommen, dass der N-Terminus die für die Polymerisierung zu einem Faden notwendigen Konformationsänderungen des Spidroins während des Spinnens reguliert und proteinstabilisierende Eigenschaften besitzt [13,14]. Das nicht-repetitive Carboxylende (C-Terminus) von MaSp1 stellt das

entgegengesetzte, ca. 100 Aminosäuren lange Ende des Polypeptidstranges dar und bildet ebenfalls eine Struktur aus fünf α -Helices (Abb. 4). Dieses Helixbündel unterscheidet sich jedoch von dem des N-Terminus in der Länge der Helices und ihrer räumlichen Anordnung zueinander (Tertiärstruktur). Die Dimerisierung erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Helices 4 (H4) zweier Monomere und wird

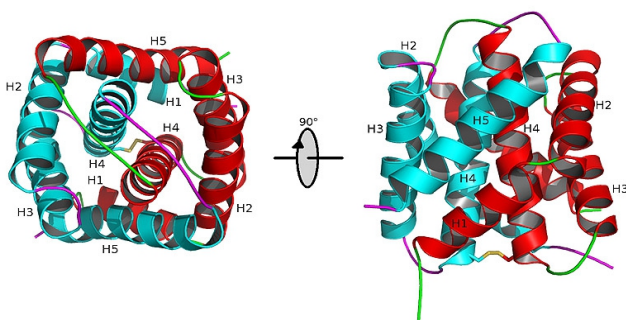


Abbildung 4: Dimer des MaSp1- C-Terminus aus *Araneus diadematus* (PDB-Code: 2KHM). Jedes Monomer besteht aus einem 5-Helix-Bündel (H1 – H5) (Rot bzw. Blau). Die Dimerisierung erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und eine Disulfidbrücke (Gelb) zwischen der Helix 4 beider Monomere.

zusätzlich über Salzbrücken und eine Disulfidbrücke stabilisiert. Bezüglich des Polymerisationsprozesses wurde beobachtet, dass der C-Terminus für die korrekte Anordnung der β -Faltblätter (die aus Poly-Alanin-Sequenzmotiven bestehen) verantwortlich ist und keine Reaktion auf pH-Veränderungen zeigt [15].

Selbstarrangement des Spinnenfadens



Die Schwierigkeit bei der Herstellung eines synthetischen Spinnenfadens, der die gleichen Eigenschaften wie sein natürliches Äquivalent besitzt, ist vor allem im unaufgeklärten Spinnprozess begründet.

Aufgrund des amphiphilen Charakters des MaSp1 wird vermutet, dass sich die Alanin-reichen Motive während der Micellenbildung zu sieben über Schleifen verbundene β -Faltblätter umformen. Im Verlauf der Wanderung des Proteins zum Spinnrüsenausgang werden Konformationsänderungen über Scherkräfte, Wasserentzug, den Austausch von Natriumchlorid durch Kaliumphosphat und einen schlagartigen pH-Abfall im Protein induziert. Das kosmotrope Kaliumphosphat bewirkt dabei wahrscheinlich, dass die hydrophoben Interaktionen an der Proteinoberfläche verstärkt werden und es nachweislich zur Ausbildung kristalliner β -Faltblattstrukturen (sehr eng gepackt) der Alanin-reichen Sequenzmotive kommt [6, 10]. Die Veränderung des pH-Wertes und der Ionenzusammensetzung induzieren Konformationsänderungen des N- bzw. C-Terminus. Die dadurch ermöglichte Dimerisierung fördert die Polymerisation der hochkonzentrierten Proteinlösung in der Spinnrüse [13, 15, 16]. Im Gegensatz dazu sind die ungeordneten bzw. helikalen Substrukturen der GGX-Motive in der Lage über Wasserstoffbrückenbindungen eine elastische Matrix zu bilden. Letztendlich stellt der Spinnenfaden daher eine semikristalline Makrostruktur dar [17].

Die enorme Zugfestigkeit und Stärke der Lebensleine von *Araneus diadematus* basiert auf der Kombination von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der amorphen Matrix aus GGX-Motiven, sowie den darin eingebetteten kristallinen β -Faltblattstrukturen. Damit erreicht die Lebensleine eine Zugfestigkeit von $1,1 \cdot 10^9 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$ (Tab. 1). Könnte nun ein 80 kg schwerer Mann an diesem Faden hängen? Theoretisch sollte ein Faden mit einem Durchmesser von 1,0 mm ausreichen, um einen solchen Mann zu halten. Hätten Sie je geglaubt, dass die Spiderman-Geschichte einen Funken Realität enthält?

Material	Zähigkeit/Tenazität [MJ m ⁻³]	Zugfestigkeit [GPa]	Dehnbarkeit [%]
Lebensleine von <i>Araneus diadematus</i>	160	1,1	27
Kevlar 49TM	50	3,6	2,7
Nylon 6,6	80	0,95	18
Carbonfaser	25	4	1,3
Stahl	6	1,5	0,8

Tabelle 1: Vergleich der Daten über die mechanischen Eigenschaften der Lebensleine mit einer Auswahl synthetisch hergestellter Polymere [6]

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Biochemie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald verfasst (s. Woche 23).</p> <p>Die Autoren, Niklas Bayer und Katja Zorn, sind Studentinnen im Masterstudiengang Biochemie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald</p> <p>(E-Mail: niklasbayer@gmx.de und zorn_katja@gmx.de).</p>  <p>Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Sabine Müller (E-Mail: smueller@uni-greifswald.de).</p>	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Welcher Spinnenfaden ist derzeit am besten untersucht?</p>

Literatur:

[1] U. Slotta, N. Mougín, L. Römer, and A. Leimer, "Synthetic Spider Silk Proteins and Threads", *Chem. Eng. Progress.*, 43–49, 2012.

[2] M. Heim, D. Keerl, and T. Scheibel, "Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber.", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 3584–3596, 2009.

[3] T. Scheibel and L. Römer, "The elaborate structure of spider silk", *Landes Bioscience*, 2, 154–161, 2008.

[4] Z. Lin, W. Huang, J. Zhang, J.-S. Fan, and D. Yang, "Solution structure of eggcase silk protein and its implications for silk fiber formation.", *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 8906–8911, 2009.

[5] X. Hu, K. Vasanthavada, K. Kohler, S. McNary, A. M. F. Moore, and C. A. Vierra, "Molecular mechanisms of spider silk.", *Cell Mol Life Sci: CMLS*, 63, 1986–1999, 2006.

[6] M. Heim, L. Römer, and T. Scheibel, "Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins.", *Chem Soc Rev*, 39, 156–164, 2010.

[7] A. Simmons, C. Michal, and L. Jelinski, "Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk", *Science*, 271, 84-87, 1996.

[8] M.B. Hinman and R.V.Lewis "Isolation of a Clone Encoding a Second Dragline Silk Fibroin", *J Biol Chem*, 267, 19320–19324, 1992.

[9] B. Rupp, "Protein structure", in *Biomolecular Crystallography*, Garland Science, New York, 2010, 23–71.

[10] M. Stark, S. Grip, A. Rising, M. Hedhammar, W. Engström, G. Hjälml, and J. Johansson, "Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins.", *Biomacromolecules*, 8, 1695–1701, 2007.

[11] S. T. Krishnaji, G. Bratzel, M. E. Kinahan, J. A. Kluge, C. Staii, J. Y. Wong, M. J. Buehler, and D. L. Kaplan, "Sequence-Structure-Property Relationships of Recombinant Spider Silk Proteins: Integration of Biopolymer Design, Processing, and Modeling", *Adv Funct Mater*, 23, 241-253, 2013.

[12] U. Slotta, S. Hess, K. Spiess, T. Stromer, L. Serpell, and T. Scheibel, "Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison.", *Macromol Biosci*, 7, 183–188, 2007.

- [13]** G. Askarieh, M. Hedhammar, K. Nordling, A. Saenz, C. Casals, A. Rising, J. Johansson, and S. D. Knight, "Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay.", *Nature*, 465, 236–8, 2010.
- [14]** M. Landreh, G. Askarieh, K. Nordling, M. Hedhammar, A. Rising, C. Casals, J. Astorga-Wells, G. Alvelius, S. D. Knight, J. Johansson, H. Jörnvall, and T. Bergman, "A pH-dependent dimer lock in spider silk protein.", *J Mol Biol*, 404, 328–336, 2010.
- [15]** F. Hagn, L. Eisoldt, J. Hardy, and C. Vendrely, "A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly", *Nature*, 465, 239–242, 2010.
- [16]** K. Jaudzems, G. Askarieh, M. Landreh, K. Nordling, M. Hedhammar, H. Jörnvall, A. Rising, S. D. Knight, and J. Johansson, "pH-dependent dimerization of spider silk N-terminal domain requires relocation of a wedged tryptophan side chain.", *J Mol Biol*, 422, 477–487, 2012.
- [17]** M. Elices, G. R. Plaza, J. Pérez-Rigueiro, and G. V Guinea, "The hidden link between supercontraction and mechanical behavior of spider silks.", *J Mech Behav Biomed Mater*, 4, 658–669, 2011.
- [18]** M. Humenik, A. M. Smith, and T. Scheibel, "Recombinant Spider Silks—Biopolymers with Potential for Future Applications", *Polymers*, 3, 640–661, 2011.