

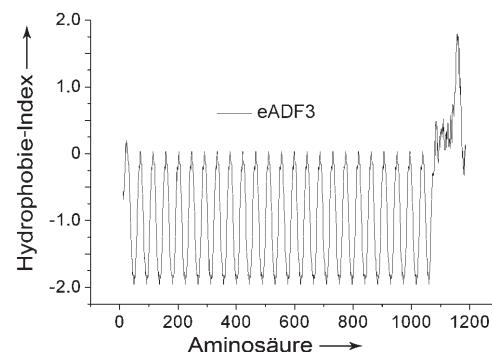
# Die amphiphilen Eigenschaften von Spinnenseidenproteinen sind entscheidend für ihr Verspinnen\*\*

Josef H. Exler, Daniel Hümmerich und Thomas Scheibel\*

Während der letzten 300 Millionen Jahre haben sich Spinnen zu exzellenten Seidenproduzenten entwickelt. Im Unterschied zu Insekten wie dem Seidenspinner *Bombyx mori* können Radnetzspinnen bis zu sieben unterschiedliche Seiden in ebenso vielen Drüsen für unterschiedliche Einsatzzwecke produzieren. Bisher wurden die Seiden aus der großen Ampullendrüse (major ampullate silks, MAS) am besten charakterisiert. Diese Seiden werden von den Radnetzspinnen als Rahmen und Speichen des Radnetzes sowie als Abseilfaden zur Flucht vor Fressfeinden eingesetzt.<sup>[1,2]</sup> MAS-Fäden bestehen aus zwei unterschiedlichen Proteinen; sie haben hervorragende mechanische Eigenschaften, und ihre Zähigkeit übertrifft die von vielen synthetischen Fasern, z.B. Kevlar. Da Spinnen ein ausgeprägtes Territorialverhalten zeigen und zu Kannibalismus neigen, ist eine groß angelegte Seidenfaserproduktion auf Spinnenfarmen nicht möglich. Allerdings gelang durch die Fortschritte der letzten beiden Jahrzehnte auf dem Gebiet der Molekularbiologie die biotechnologische Herstellung von Spinnenseidenproteinen.<sup>[1]</sup> Da man Spinnenseidenfasern für unterschiedliche medizinische und technische Anwendungen einsetzen könnte, werden künstliche Spinnenseiden-Spinnprozesse von verschiedenen Forschergruppen untersucht.<sup>[1,3]</sup> Im Prinzip entspricht das Verspinnen von Spinnenseiden einem Phasenübergang von einer Lösung in einen festen Faden. Dieser Phasenübergang wird im Spinnkanal der Spinne durch eine Vielzahl von Parametern, darunter pH-Wert, Ionenstärke und die Konzentration lyotroper Ionen, chemisch initiiert.<sup>[4a,5]</sup>

Wir haben eine biotechnologische Herstellungsmethode entwickelt, die das genetisch konstruierte Spinnenseidenprotein eADF3 hochrein (>99 %) zugänglich macht. Die Aminosäuresequenz von eADF3 entspricht dem bekannten Fragment von ADF3, einem der beiden MAS-Proteine der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus*.<sup>[1,6]</sup> In dieser Studie nutzten wir eADF3, um Details des Phasenübergangs von der Lösung in den Faden zu untersuchen.

Seiner Aminosäuresequenz zufolge ist eADF3 ein amphiphiles Protein (Abbildung 1) mit einem Molekulargewicht MW von 106 kDa.<sup>[4c,6]</sup> Das Protein zeichnet sich durch einen aminoterminalen Bereich mit sich wiederholenden Peptidmotiven (1073 Aminosäurereste) sowie eine carboxytermi-



**Abbildung 1.** Hydrophobie-Diagramm von eADF3. Durch die sich wiederholende Sequenz in der aminoterminalen Region ergibt sich ein amphiphiles Muster mit alternierenden hydrophilen und hydrophoben Bereichen. Auf der waagrechten Achse ist der Fortlauf der Aminosäurekette vom Amino- zum Carboxyterminus gezeigt. Je positiver der Hydrophobizitätsindex ist, desto hydrophober ist die Aminosäureseitenkette. In einem gefalteten Protein nehmen hydrophobe Aminosäuren häufig Positionen im Inneren ein, hydrophile Aminosäuren befinden sich an der Oberfläche der Proteinstruktur.

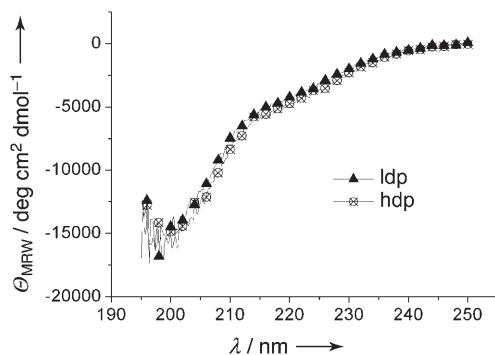
nale Domäne (123 Aminosäurereste) ohne Sequenzwiederholungen (NR-Domäne) aus. Letztere ist für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich und enthält das einzige Cystein des Proteins, das intermolekulare Disulfidbrücken bilden kann. Die einzige Möglichkeit, lyophilisiertes eADF3 zu lösen, besteht in der Zugabe starker Proteindenaturierungsmitteln, z.B. Guanidiniumthiocyanat. In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass denaturiertes eADF3 nach Dialyse gegen wässrige Puffer eine intrinsisch entfaltete Sekundärstruktur in der aminoterminalen Region und eine  $\alpha$ -helicale Struktur in der NR-Domäne einnimmt (Abbildung 2).<sup>[1,6]</sup>

Interessanterweise führt eine Dialyse zu einer Flüssig-flüssig-Phasentrennung von eADF3 (Abbildung 3 und Abbildung 4). Eine der beiden Phasen weist eine Proteinkonzentration über 1.4 mm bei einer Viskosität von  $\eta = 61.8 \text{ mPas}$  auf (zum Vergleich: die Viskosität von Olivenöl beträgt  $\eta = 100 \text{ mPas}$ ). Diese hochdichte Phase besteht aus nichtkovalent assoziierten eADF3-Oligomeren (MW > 30 000 kDa, bestimmt mit dynamischer Lichtstreuung). Nach Zugabe von Kaliumphosphat, einem natürlichen Initiator der Seidenaggregation, ist es möglich,  $\beta$ -Faltblatt-reiche Fäden aus dieser Phase zu ziehen (Abbildung 3).

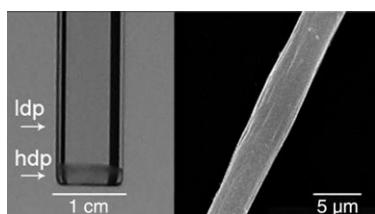
Die zweite Phase weist ausschließlich dimeres Protein (MW = 212 kDa) mit Konzentrationen zwischen 150 und 200  $\mu\text{M}$  bei einer mit Wasser ( $\eta = 1.0 \text{ mPas}$ ) vergleichbaren Viskosität von  $\eta = 1.6 \text{ mPas}$  auf. Es war unmöglich, aus dieser Phase Fäden zu erzeugen. Die Sekundärstruktur von eADF3 ist in beiden Phasen identisch (Abbildung 2), weswegen ver-

[\*] J. H. Exler, Dr. D. Hümmerich, Dr. T. Scheibel  
Department Chemie, Lehrstuhl Biotechnologie  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-289-13345  
E-Mail: thomas.scheibel@ch.tum.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHE 603/4-1, 4-2).



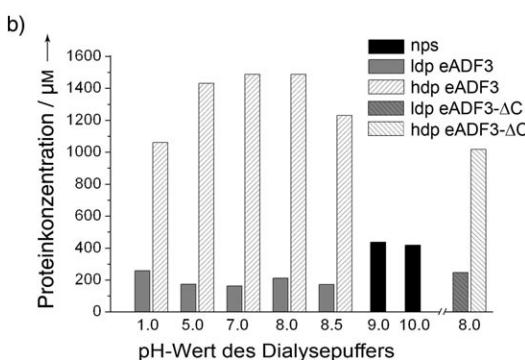
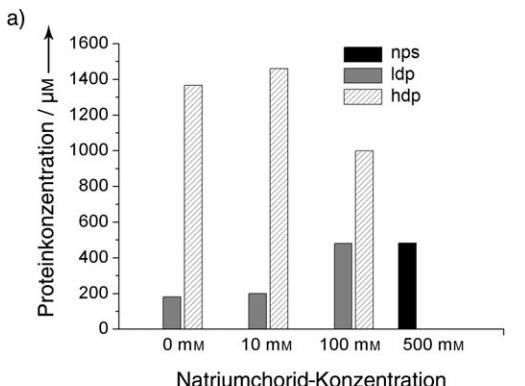
**Abbildung 2.** Sekundärstrukturanalyse von eADF3. Fern-UV-CD-Spektren beider Phasen von eADF3 wurden in 10 mM Tris/HCl, pH 8, bei 20°C aufgenommen. Die Spektren sind unabhängig von Verdünnung und oxidierenden oder reduzierenden Bedingungen. ldp: niedrigdichte Phase; hdp: hochdichte Phase.



**Abbildung 3.** Phasentrennung von eADF3 nach Dialyse. Links sind beide Phasen in einer 1-mL-Quarzküvette zu sehen: oben die niedrigdichte (ldp) und unten die hochdichte Phase (hdp). Die REM-Aufnahme im rechten Bildteil zeigt einen aus der hochdichten Phase gezogenen Seidenfaden.

mutlich nicht eine Sekundärstrukturänderung, sondern eine Änderung im Oligomerisierungsgrad ausschlaggebend für die Fadenbildung ist.

Die hohen Natriumchlorid-Konzentrationen<sup>[5]</sup> in den Spinndrüsen von Spinnen verhinderten in unseren Experimenten vollständig die Bildung von Oligomeren, da vermutlich hydrophile Wechselwirkungen zwischen den Spinnenseidenproteinen und dem Lösungsmittel bevorzugt waren. Außerdem können dadurch hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Seidenproteine geschwächt werden, was die Flüssig-flüssig-Phasentrennung verhindert (Abbildung 4a). In der Spinndrüse von Spinnen existiert ausschließlich eine einphasige Lösung mit extrem hoher Proteinkonzentration (bis 40 % w/v). Unsere Befunde erklären, warum in Spinndrüsen von Spinnen kein Flüssig-fest-Phasenübergang stattfindet, der für die Tiere fatale Folgen hätte. Trotz höchster Proteinkonzentrationen in der Drüse kann angenommen werden, dass hohe Natriumchlorid-Konzentrationen die Bildung von Seidenoligomeren, die entscheidend für die Fadenbildung sind, unterdrücken.<sup>[4]</sup> In unseren Experimenten aggregierten die Seidenproteine sobald das Natriumchlorid entfernt wurde. Ähnliches wurde in Spinnen beobachtet, in denen die Natriumchlorid-Konzentrationen während der Passage der Seidenproteine durch den Spinnkanal stark gesenkt werden und somit wahrscheinlich die Seidenoligomerisierung ausgelöst wird.



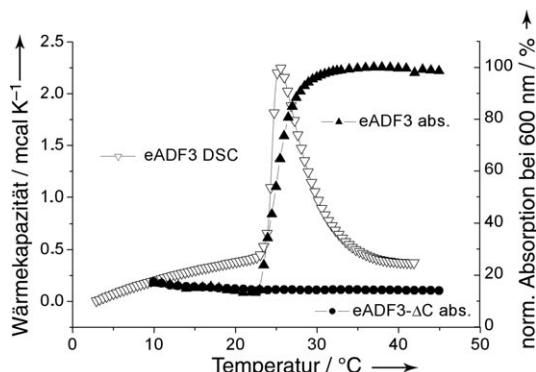
**Abbildung 4.** a) Konzentration der eADF3-Phasen nach Zugabe von Natriumchlorid zum Dialysepuffer. Die Proteinkonzentration der hochdichten Phase (> 15 % w/v) ist der in Spinndrüsen gefundenen Konzentration ähnlich. b) Einfluss von pH-Änderungen auf die Phasentrennung von eADF3 und eADF3-ΔC. nps: keine Phasentrennung; ldp: niedrigdichte Phase; hdp: hochdichte Phase.

Neben Änderungen der Ionenzusammensetzung spielen Änderungen des pH-Werts eine entscheidende Rolle für den natürlichen Spinnprozess. Bevor am Ende des Spinnkanals Fäden gezogen werden, sinkt der pH-Wert auf 6.3.<sup>[5]</sup> Wir testeten die pH-Abhängigkeit der Phasentrennung und beobachteten eine Inhibition der Phasentrennung oberhalb pH 8.5 (Abbildung 4b). Die Ursache dafür ist vermutlich die Deprotonierung der 51 normalerweise ungeladenen Tyrosinreste in eADF3 bei pH > 9.<sup>[7]</sup> Die anionischen Tyrosylate in den hydrophoben Regionen erhöhen die Hydrophilie und schwächen hydrophobe Wechselwirkungen, was vermutlich die Proteinoligomerisierung unterdrückt. Über die Natriumchlorid-Konzentration und den pH-Wert lässt sich also die Seidenoligomerisierung und somit die Fadenbildung steuern.

Um den Einfluss der NR-Dimerisierungsdomäne zu untersuchen, verglichen wir eADF3 mit der monomeren Deletionsmutante eADF3-ΔC (MW = 95 kDa). Dabei zeigte sich, dass die Flüssig-flüssig-Phasentrennung auch ohne NR-Domäne stattfindet. Die beiden Phasen von eADF3-ΔC hatten bei allen getesteten pH-Werten unterhalb 8.5 Proteinkonzentrationen und MWs wie die Phasen von eADF3 bei pH 1 (Abbildung 4b und Hintergrundinformationen). Dies zeigt, dass die NR-Domäne nicht essenziell für die Phasentrennung ist, diese aber verstärken kann. Vermutlich beruht der Einfluss der NR-Domäne auf den Glutaminsäure- und Asparaginsäureresten, die im Sauren ionisiert vorliegen und somit die Nettoladung des Proteins verändern. Offensichtlich

führt diese Nettoladung zu einem verringerten Oligomerisierungspotenzial und zu niedrigeren Proteinkonzentrationen in der hochdichten Phase. Dieser Befund erklärt die frühere Beobachtung, dass NR-Domänen maßgeblich die Löslichkeit der Spinnenseidenproteine beeinflussen.<sup>[6a]</sup>

Die NR-Domäne ist entscheidend für die untere kritische Entmischungstemperatur (LCST) von eADF3. Im Unterschied zu der entsprechenden Phase von eADF3-ΔC zeigt die niedrigdichte Phase von eADF3 ein vollständig reversibles LCST-Verhalten mit einem Übergangspunkt von 25.4°C (Abbildung 5), der von Proteinkonzentration und Ionenstärke abhängig ist.



**Abbildung 5.** LCST-Verhalten der niedrigdichten Phasen von eADF3 und eADF3-ΔC bei einer Konzentration von 50 μM. Das LCST-Verhalten wurde durch Trübungsmessung bei 600 nm sowie mit DSC (nur für eADF3 gezeigt) bestimmt. Die LCST von eADF3 liegt bei 25.4°C.

Es kann gefolgert werden, dass die beobachtete Flüssig-flüssig-Phasentrennung der rekombinanten Spinnenseidenproteine einen physiologisch relevanten Oligomerisierungsprozess widerspiegelt, wobei die beobachtete hochdichte Phase Eigenschaften aufweist, wie sie auch in der Spinnlösung der Spinne gefunden wurden. Die Phasentrennung beruht auf dem amphiphilen Charakter der großen aminoterminalen Region (mit sich wiederholenden Peptidmotiven), während die NR-Domäne diese Eigenschaften verstärkt und zusätzlich das LCST-Verhalten der Proteine steuert. Die hier vorgestellten Ergebnisse bilden eine Grundlage, um einen effektiven Spinnprozess für rekombinante Spinnenseidenproteine zu etablieren.

## Experimentelles

Konstruktion von eADF3 und eADF3-ΔC: Die Aminosäuresequenz von eADF3 beruht auf der natürlichen Sequenz von ADF3 aus *Araneus diadematus*. Sequenzwiederholungselemente von ADF3 zeigen ein Polyalanin-reiches Motiv, das A genannt wurde (Sequenz: GPYGPGASAAAAAGGYGPGSGQQ), und ein Glutamin- und Glycin-reiches Motiv, das Q genannt wurde (Sequenz: GPGQQGP-GQQGPGQQGPGQQ), sowie einen Carboxyterminus, der nicht aus sich wiederholenden Sequenzen aufgebaut ist und als NR bezeichnet wurde (Sequenz: ASAAAVGGYGPQSSSAPVASAAAASRLSSPAAS-SRVSSAVSSLVSSGPTNQAALSNTISSVVSQVSASNPGLSGCDVLVQAL-LEVVSALVSILGSSSIGQINYGASAQYTQMVGQSVAQALAG). Durch einen von uns entwickelten molekularbiologischen Proteinkonstruktionsansatz gelingt die beliebige Kombination und Multimerisierung

der beschriebenen kurzen Einzelmotive. Auf diese Weise konnten Gene für zwei Proteine konstruiert werden: Ein Protein, eADF3-ΔC, besteht aus 24 Wiederholungen der beiden Motive A und Q ((AQ)<sub>24</sub>), und das zweite, eADF3, enthält zusätzlich die NR-Domäne.<sup>[6a]</sup>

Dialyse: Die gereinigten Proteine wurden zur Lagerung lyophilisiert. Die lyophilisierten Proteine wurden in einer Konzentration von 500 μM mithilfe von 6 M Guanidiniumthiocyanat gelöst und anschließend gegen 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl, pH 8, bei 4°C mit Membranen einer Ausschlussgröße von 6000–8000 Dalton (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) dialysiert. Die Proteinphasen wurden getrennt bei 4°C gelagert. Als Kontrolle wurden andere Puffer mit identischem pH eingesetzt:

pH	Puffer
1.0	HCl
5.0	10 mM Citrat/HCl
7.0	10 mM 2-Morpholino-Ethansulfonsäure/NaOH
8.0	10 mM Tris/HCl
8.5	10 mM Tris/HCl (Kontrolle: 10 mM Ethanolamin/HCl)
9.0	10 mM Ethanolamin/HCl (Kontrolle: 10 mM Glycin/NaOH)
10.0	10 mM NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> (Kontrolle: 10 mM Glycin/NaOH)

Die Proteinkonzentrationen wurden mit UV-Absorption in einem Cary-100-Spektrophotometer (Varian Medical Systems, Palo Alto, USA) unter Zuhilfenahme der molaren Extinktionskoeffizienten von eADF3 (75990 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) und eADF3-ΔC (71520 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) bei 280 nm und 20°C bestimmt.

Fern-UV-Circulardichroismus(CD)-Spektren wurden mit einem Jasco-715-Spektropolarmeter (Groß-Umstadt, Deutschland) aufgezeichnet. Alle Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 1.5 μM in 10 mM Tris/HCl, pH 8, in einer 0.1-cm-Quarzküvette bei 20°C aufgenommen. Kontrollexperimente, bei denen die unverdünnten Proben in einer 0.01-cm-Quarzküvette eingesetzt wurden, führten zu identischen Spektren.

Untersuchung der unteren kritischen Entmischungstemperatur (LCST) durch Trübungsmessung: Die Trübung der niedrigdichten eADF3- und eADF3-ΔC-Phase (Konzentration jeweils 50 μM) wurde gemessen, während die Temperatur in 1-K-Schritten erhöht wurde. Die optischen Dichten bei 600 nm wurden kontinuierlich mit einem Cary-100-Spektralphotometer aufgenommen. Die maximale Absorption von eADF3 wurde auf 100% normiert.

LCST-Untersuchung durch dynamische Differenzkalorimetrie (DSC): Alle DSC-Messungen wurden mit einem VP-DSC-MicroCalorimeter (MicroCal, Northampton, USA) bei einer Proteinkonzentration von 50 μM in 10 mM Tris/HCl, pH 8, und einer Heizgeschwindigkeit von 20 K h<sup>-1</sup> durchgeführt.

Herstellung von Seidenfäden: 10 μL jeder eADF3-Phase wurden 5 min in 0.5 M Kaliumphosphat, pH 8, inkubiert. Mit einer Pinzette konnten danach nur aus der hochdichten Phase Fäden gezogen werden.

Rasterelektronenmikroskopie (REM): Seidenfäden wurden auf Thermanox-Plastikobjekträgern (Nalge Nunc, USA) immobilisiert, durch Sputtern im Vakuum mit Gold beschichtet und mit einem JSM-5900-LV-REM (JEOL Ltd., Japan) bei 20 kV analysiert.

Eingegangen am 20. November 2006,  
veränderte Fassung am 26. Januar 2007  
Online veröffentlicht am 2. April 2007

**Stichwörter:** Kalorimetrie · Phasenübergänge · Proteindesign · Seidenspinnen · Selbstorganisation

- [1] T. Scheibel, *Microb. Cell Fact.* **2004**, 3, 14.  
[2] J. M. Gosline, P. A. Guerette, C. S. Ortlepp, K. N. Savage, *J. Exp. Biol.* **1999**, 202, 3295–3303.

- [3] a) A. Lazaris, S. Arcidiacono, Y. Huang, J.-F. Zhou, F. Duguay, N. Chretien, E. A. Welsh, J. W. Soares, C. N. Karatzas, *Science* **2002**, 295, 472–476; b) R. V. Lewis, *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 392–398; c) Y. Wang, H.-J. Kim, G. Vunkak-Novakovic, D. L. Kaplan, *Biomaterials* **2006**, 27, 6064–6082; d) D. P. Knight, F. Vollrath, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2002**, 357, 219–227; e) Z. Shao, F. Vollrath, *Nature* **2002**, 418, 741.
- [4] a) H.-J. Jin, D. L. Kaplan, *Nature* **2003**, 424, 1057–1061; b) C. Zhou, B. Leng, J. Yao, J. Qian, X. Chen, P. Zhou, D. P. Knight, Z. Shao, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2145–2149; c) J. P. Zbilut, T. Scheibel, D. Huemmerich, C. L. Webber, M. Colafranceschi, A. Giuliani, *Phys. Lett. A* **2005**, 346, 33–41; d) A. A. Dinerman, J. Cappello, H. Ghandehari, S. W. Hoag, *Biomaterials* **2002**, 23, 4203–4210.
- [5] a) A. Rising, H. Nimmervoll, S. Grip, A. Fernandez-Arias, E. Storckenfeldt, A. P. Knight, F. Vollrath, W. Engström, *Zool. Sci.* **2005**, 22, 273–281; b) X. Chen, D. P. Knight, F. Vollrath, *Biomacromolecules* **2002**, 3, 644–648.
- [6] a) D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, 43, 13604–13612; b) D. Huemmerich, U. Slotta, T. Scheibel, *Appl. Phys. A* **2005**, 82, 219–222; c) U. Slotta, M. Tammer, F. Kremer, P. Koelsch, T. Scheibel, *Supramol. Chem.* **2006**, 18, 465–471.
- [7] C. Dicko, J. M. Kennedy, D. Knight, F. Vollrath, *Biochemistry* **2004**, 43, 14080–14087.