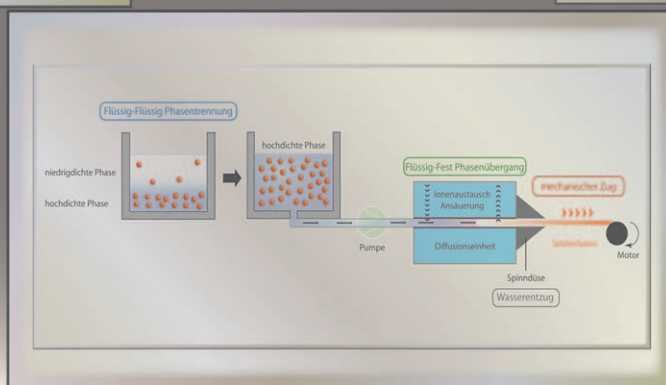
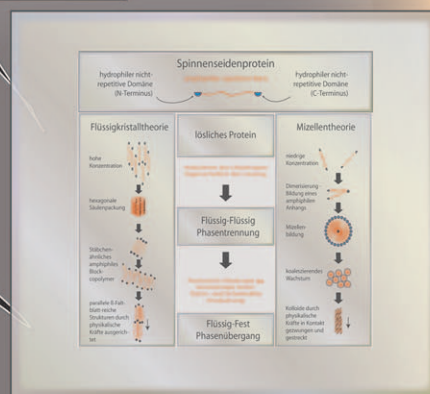
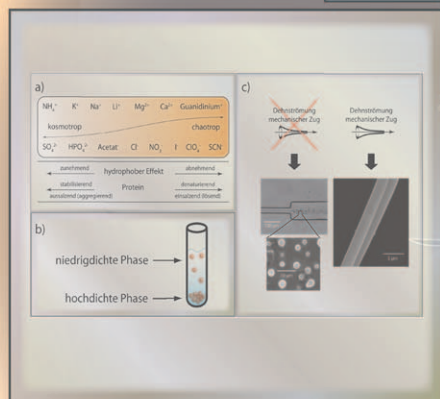
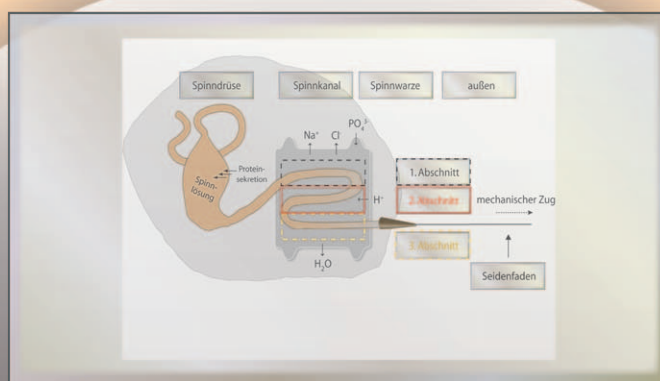


# Spinnenseide: vom löslichen Protein zur außergewöhnlichen Faser

Markus Heim, David Keerl und Thomas Scheibel\*

## Stichwörter:

Bionik · Faserproteine · Genexpression · Proteinfaltung · Spinnprozesse



**D**ie Proteinfaser Spinnenseide ist hinsichtlich ihrer Materialeigenschaften anderen natürlichen und vielen synthetischen Fasern überlegen. In der Natur beruht die Bildung einer festen Faser aus einem löslichen Spinnenseidenprotein auf komplexen biochemischen und physikalischen Prozessen, die in spezialisierten Spinnorganen ablaufen. In diesem Aufsatz wird der natürliche Prozess der Seidenherstellung ausgehend von der Gentranskription über die Proteinverarbeitung bis hin zur abschließenden Faserbildung vorgestellt; ebenso kommen technische Verfahren zur Seidenverspinnung zur Sprache. In-vivo- und In-vitro-Befunde auf dem Gebiet der Spinnenseidenforschung bilden die Grundlage für die Gestaltung neuer Proteine und Verarbeitungsstrategien, die die Anwendung dieser faszinierenden proteinösen Materialien in der Technik und der Medizin ermöglichen können.

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	3639
<b>2. Seidenproduktion: vom Gen zum Protein</b>	3641
<b>3. Der Assemblierungsprozess von Seidenproteinen: Konformationsänderung und Phasentrennung</b>	3644
<b>4. Faserbildung: Flüssig-fest-Phasenübergang</b>	3646
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	3648

## 1. Einleitung

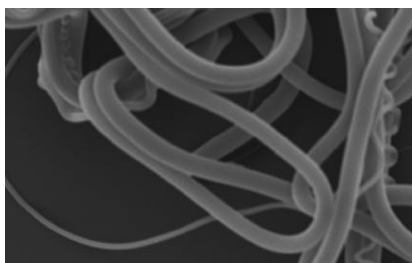
Spinnenseide wurde vom Menschen als Material genutzt, lange bevor sie in den Fokus der Forschung rückte. Im antiken Griechenland wurden blutende Wunden mit natürlichen Spinnennetzen abgedichtet, und in Australasien wurden Spinnenseidenfäden oder vollständige Spinnennetze zum Fischen verwendet. In neuerer Zeit wurde Spinnenseide auch für militärische Zwecke, besonders für den Bau von Fadenkreuzen, verwendet.<sup>[1]</sup> Diese Vielseitigkeit der Anwendungen von Spinnenseide beruht auf ihrer, im Vergleich zu anderen verfügbaren Materialien, äußerst hohen mechanischen Stabilität sowie auf der Biokompatibilität, Glattheit und Dünnheit der Seidenfäden.

Im Unterschied zu anderen Gliedertieren können Spinnen eine Vielfalt verschiedener Seiden mit unterschiedlichen Eigenschaften produzieren. Weibliche Radnetzspinnen (ecribellate Spinnen) nutzen bis zu sechs verschiedene Seiden sowie einen seidenähnlichen Klebstoff, die alle in spezialisierten Drüsen produziert werden und so maßgeschneidert sind, dass sie eine ganz bestimmte Aufgabe erfüllen können (Abbildung 1 und Tabelle 1).<sup>[2,3]</sup>

Der Rahmen und die Speichen eines Radnetzes werden vom Abseilfaden der Spinne gebildet, dessen Hauptbestandteile die Spidroine der großen Ampullendrüse (Major Ampullate Spidroins, MAS) sind, von denen es normaler-

weise zwei Varianten gibt. Der Abseilfaden hat die größte Zähigkeit aller Seidenarten und gewährleistet dementsprechend die Aufrechterhaltung der Form und die Stabilität des Netzes und dient der Spinne als Rettungsleine. Die Fangspiralseide, die so gestaltet ist, dass sie die kinetische Energie auftreffender Beute besonders gut dissipieren kann, besteht nur aus einer einzelnen Flagelliformseidenproteinvariante.<sup>[3]</sup> Da die Flagelliformseide an sich nicht klebrig ist, erhält die Fangspirale ecribellater Spinnen eine zusätzliche klebrige Beschichtung, die von der Aggregatseidendrüse sekretiert wird, um die gefangene Beute im Netz zu halten.<sup>[3-5]</sup> Bei der Fangspiralkonstruktion verwendet die Radnetzspinne zuerst Seidenproteine, die in der kleinen Ampullendrüse produziert werden (Minor Ampullate Spidroins, MIS), um eine Hilfspirale zu formen, die als Gerüst und als Vorlage für die Gestaltung der Fangspirale dient.<sup>[6]</sup> Um die verschiedenen Seidenarten miteinander zu verbinden und um das Netz am Untergrund zu befestigen, verwenden Spinnen einen „Befestigungszement“, ein Seidenprotein, das aus der Piriformdrüse stammt.<sup>[7]</sup> Andere Seiden werden genutzt, um den eigenen Nachwuchs zu schützen, wobei die seidene Eihülle aus zwei verschiedenen Seiden besteht. Die Seiden der tubuliformen (zylindrischen) Drüse bilden eine harte Schale, die der Eihülle Struktur und Stabilität verleiht und so den Nachwuchs der Spinne vor Verletzungen schützt. Die Acini-formseide wird oft als weiche innere Schicht der Eihülle (so für zusätzlichen Schutz sorgend) oder zum Einwickeln der gefangenen Beute verwendet.<sup>[3,8]</sup>

In den 1950er Jahren begannen sich Materialwissenschaftler für die Spinnenseide (insbesondere für den Abseil-



**Abbildung 1.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Spinnenseide, entnommen aus einem Netz einer Gartenkreuzspinne (*A. diadematus*).

[\*] M.Sc. M. Heim,<sup>[+]</sup> Dipl.-Ing. D. Keerl,<sup>[+]</sup> Prof. Dr. T. Scheibel  
Lehrstuhl für Biomaterialien,  
Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften  
Universität Bayreuth, 95440 Bayreuth (Deutschland)  
Fax: (+49) 921-55-7346  
E-Mail: thomas.scheibel@uni-bayreuth.de  
Homepage: <http://www.fiberlab.de>

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu diesem Aufsatz beigetragen.

**Tabelle 1:** Übersicht über die sieben von der weiblichen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* produzierten Seiden.

Seide	Herkunft	mechanische Daten	Sequenzdaten
Struktur- und Abseilfaden	große Ampullendrüse	Festigkeit: 1.1 GPa <sup>[3]</sup> Dehnbarkeit: 27% <sup>[3]</sup> Zähigkeit: 180 MJ m <sup>-3</sup> <sup>[3]</sup>	partielle Sequenz von <i>Araneus diadematus</i> und <i>Nephila clavipes</i> , Vollängensequenz von <i>Latrodectus Hesperus</i> <sup>[22]</sup>
Hilfsspiralfaden	kleine Ampullendrüse	nicht bekannt	partielle Sequenz von <i>Nephila clavipes</i>
Fangspirale (Flagelliformseide)	Flagelliformdrüse	Dehnbarkeit: 300% <sup>[3]</sup> Zähigkeit: 150 MJ m <sup>-3</sup> <sup>[3]</sup>	partielle Sequenz von <i>Nephila clavipes</i>
harte äußere Eihülle	Tubuliform (zylindrische) Drüse	nicht bekannt	partielle Sequenz von <i>Latrodectus hesperus</i>
weiche innere Eihüllenbeschichtung und Verpackungsseide	Aciniformdrüse	Festigkeit: ca. 0.7 GPa <sup>[a]</sup> Dehnbarkeit: 86% <sup>[a]</sup> Zähigkeit: 250 MJ m <sup>-3</sup> <sup>[a]</sup>	partielle Sequenz von <i>Araneus diadematus</i> und <i>Argiope trifasciata</i>
Befestigungszement	Piriformdrüse	nicht bekannt	nicht bekannt
wässrige, klebrige Beschichtung	Aggregatdrüse	nicht bekannt	Zusammensetzung der Niedermolekulargewichtskomponenten für araneoide Spinnen, <sup>[5]</sup> Isolierung zweier cDNAs von <i>Latrodectus hesperus</i> <sup>[100]</sup>

[a] Daten von *Argiope trifasciata*.

faden) zu interessieren, da ihre spezifischen mechanischen Eigenschaften jene der meisten anderen natürlichen und künstlichen Fasern übertreffen.<sup>[9]</sup> Alle bekannten Daten für den Abseilfaden von *Araneus diadematus* sind in Tabelle 2 denjenigen von anderen Fasermaterialien sowie von Stahl und Kupfer gegenübergestellt.

Der Abseilfaden ist etwa fünfmal zäher als Stahl (gewichtsbezogen) und sogar dreimal zäher als künstliche Fasern wie Kevlar 49.<sup>[10–12]</sup> Über seine „klassischen“ mechanischen Eigenschaften hinaus zeichnet sich der Abseilfaden auch durch die Fähigkeit zur Superkontraktion aus. Sobald ein natürlicher Abseilfaden in Kontakt mit Wasser kommt oder einer relativen Luftfeuchtigkeit von über 60% ausgesetzt wird, beginnt er radial anzuschwellen, wobei sein Durchmesser um bis zu 50% zu- und seine Länge entsprechend abnimmt.<sup>[13–15]</sup> In der Natur wird diese charakteristische Ei-

genschaft durch eine Umorientierung der Wasserstoffbrücken zwischen den Spinnenseidenproteinen während der Wasseraufnahme ermöglicht,<sup>[3,15–17]</sup> dabei wird der Faden plastiziert, wodurch sich seine mechanischen Eigenschaften verändern.<sup>[18]</sup> Auf diese Weise können „erschlafte“ Seidenfäden eines Netzes durch den Morgentau „erneuert“ werden, und das Netz erlangt so seine Stabilität zurück.<sup>[1,17,19]</sup> Interessanterweise findet die Superkontraktion von Spinnenseide unter physiologischen Temperaturen statt, während bei künstlichen Fasern im Allgemeinen hohe Prozesstemperaturen oder harsche Lösungsmittelbedingungen (z. B. Hexafluor-2-propanol oder andere Alkohole) erforderlich sind.<sup>[18]</sup> Darüber hinaus hat Spinnenseide auch ein Torsionsformgedächtnis, das es dem Abseilfaden nach erfolgter Verdrillung ermöglicht, nur geringfügig zu oszillieren und somit seine ursprüngliche Form vollständig wiederzuerlangen.<sup>[20,21]</sup> Dank dieser einzigartigen



Markus Heim studierte Biochemie an der Technischen Universität München, wo er 2006 seinen M.Sc. erhielt. Er ist Stipendiat der Graduiertenförderung Universität Bayern e.V. und promoviert gerade unter Anleitung von Thomas Scheibel am Lehrstuhl für Biomaterialien (Universität Bayreuth). Seine Forschung beschäftigt sich mit den Struktur-Funktions-Beziehungen der Spinnenseide und seidenähnlichen Proteinen.



David Keerl studierte Chemieingenieurwesen an der Technischen Universität München, wo er im Jahr 2006 sein Diplom erhielt. Er wechselte im August 2006 als Doktorand zur Arbeitsgruppe von Thomas Scheibel. Im Moment befasst er sich mit dem bionischen Spinnverfahren und der Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von bionisch hergestellten Seidenmaterialien.

**Tabelle 2:** Vergleich der mechanischen Eigenschaften des Abseilfadens von *Araneus diadematus* mit denen anderer natürlicher und künstlicher Materialien.<sup>[a]</sup>

Material	Dichte [g cm <sup>-3</sup> ]	Zugfestigkeit [GPa]	Steifigkeit [GPa]	Dehnbarkeit [%]	Zähigkeit [MJ m <sup>-3</sup> ]	spezielle Eigenschaften
<i>Araneus-diadematus</i> -Seide (Abseilfaden)	1.3	1.1	10	27	180	Torsions-Formgedächtnis – ohne externe Anregung; <sup>[20]</sup> reversible Superkontraktion (bis zu 50% der Originallänge)
<i>Bombyx-mori</i> -Seide (Kokon)	1.3	0.6	7	18	70	Verfügbarkeit (Seidenspinnerzucht)
Elastin	1.3	0.002	0.001	15	2	Formgedächtnis
Nylon 6.6	1.1	0.95	5	18	80	hoher Hitze- und Reibungswiderstand <sup>[102]</sup>
Kevlar 49	1.4	3.6	130	2.7	50	hohe Festigkeit bezogen auf das Gewicht <sup>[103]</sup>
Stahl	7.8	1.5	200	0.8	6	Vielfältigkeit (legieren, härten)
Kupfer (weich)	8.9	0.2	120	40	–	außergewöhnliche elektrische Leitfähigkeit
Wolle (bei 100% LF) <sup>[b]</sup>	1.3	0.2	0.5	5	60	ca. 40% Wasseraufnahme bis sich Wolle nass anfühlt, hohe Entflammungstemperatur
Carbonfaser	1.8	4	300	1.3	25	hohe Festigkeit bezogen auf das Gewicht

[a] Falls nicht anders aufgeführt, stammen sämtliche Werte aus Lit. [101]. [b] LF: Luftfeuchtigkeit.

Eigenschaft können sich Spinnen in Gefahrensituationen mithilfe des Abseilfadens als Rettungsleine schnell fallen lassen.

Die faszinierenden Eigenschaften von Spinnenseiden haben das Interesse von Wissenschaftlern an den molekularen Bausteinen der Spinnenseide (hauptsächlich der Proteine), an den Vorgängen bei der Assemblierung der Spinnenseidenproteine sowie am Faserspinnverfahren geweckt, alles mit dem Ziel, Spinnenseide für technische Zwecke nutzbar zu machen.

In diesem Aufsatz werden wir über die sehr komplexen Prozesse von der Verarbeitung der genetischen Information bis hin zur Prozessierung zum festen Seidenfaden berichten. In jedem Abschnitt werden In-vivo-Prozesse mit In-vitro-Beobachtungen verglichen, um so eine Grundlage für die Herstellung künstlicher Spinnenseidenfasern für zukünftige technische Anwendungen zu schaffen.

## 2. Seidenproduktion: vom Gen zum Protein

### 2.1. Proteinsekretion in den Spinnndrüsen

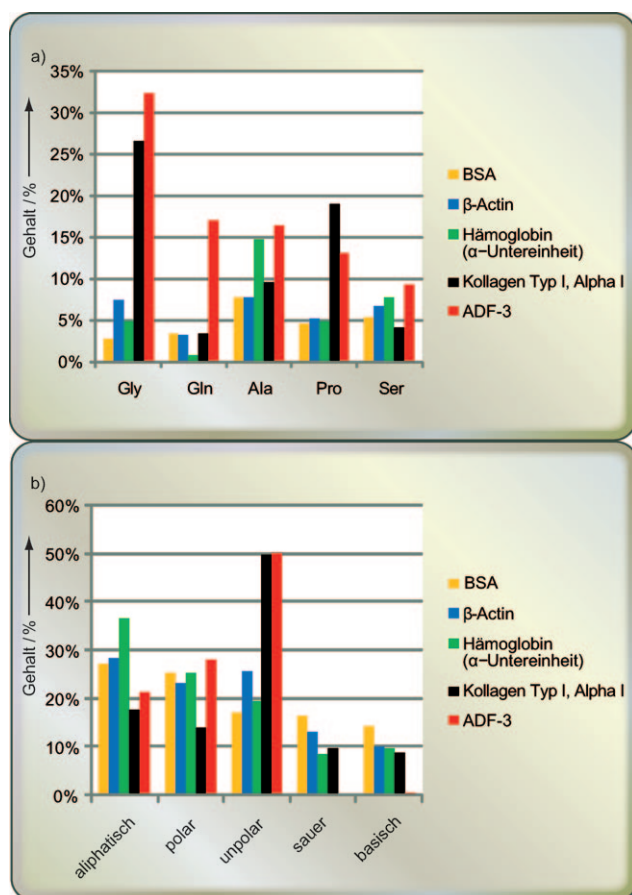
Spinnenseidenproteine werden durch verschiedene Gene kodiert, die fast ausschließlich einer einzigen Genfamilie angehören.<sup>[22–24]</sup> Angehörige dieser Gensuperfamilie zeigen

ähnliche molekulare Charakteristika, z. B. eine hochrepetitive Kernsequenz, die aus hintereinander angeordneten Konsensusmotiven besteht, flankiert von zwei nichtrepetitiven terminalen Regionen. Die Organisation der Genloci kann sich jedoch stark unterscheiden, wie aus den verschiedenen Spinnenseidengensequenzen ersichtlich wird. Während die vollständig entschlüsselten Spidroine 1 und 2 der großen Ampullendrüse (MaSp1 und MaSp2) des Abseilfadens der Schwarzen Witwe (*Latrodectus hesperus*) jeweils durch einzelne Exons kodiert sind, die 9390 bzw. 11 340 Basenpaare umfassen,<sup>[22]</sup> wird die genetische Information des (nicht vollständig, aber in weiten Teilen entschlüsselten) Flagelliform-Spinnenseidenproteins der Goldenen Radnetzspinne *Nephila clavipes* wahrscheinlich auf 13 Exons aufgeteilt, die durch hochkonservierte Introns voneinander getrennt sind.<sup>[25]</sup>

Die Transkription bestimmter Spinnenseidengene kann zu unterschiedlichen Versionen der gleichen Spidroine (zu so genannten Isoformen) führen, da alternative Startkodons in der 5'-Region vorliegen.<sup>[26]</sup> In Spinnenseidengenen mit Intron-Exon-Struktur müssen darüber hinaus unprozessierte mRNAs (die noch transkribierte Introns enthalten) vor der Translation prozessiert werden. Die Translation der genetischen Information in die Aminosäuresequenz eines Spinnenseidenproteins findet in großen, säulenartigen Endothelzellen statt, die im obersten Teil der Spinnendrüse in einer länglichen, breiter werdenden, gewundenen Region liegen.<sup>[27]</sup> Diese Zellen enthalten ein ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum (ER) und eine große Zahl an sekretorischen Vesikeln.<sup>[28,29]</sup> Im Fall des Abseilfadens folgt auf die Expression der entsprechenden Gene in den Epithelzellen die Sekretion von MaSp1 und MaSp2. Diese Spinnenseidenproteine zeigen im Allgemeinen eine hochrepetitive Kernsequenz aus bestimmten Konsensusmotiven. Alaninreiche Regionen ( $A_n$  oder  $(GA)_n$ ; mit G für Glycin), GPGXX (P für Prolin, X oft Glutamin) und GGX sind die Konsensusmotive der Kernregion der Spidroine der großen Ampullendrüse,<sup>[10]</sup> die unter den Radnetzspinnen seit 125 Millionen Jahren hochkonserviert sind.<sup>[30]</sup> Wegen der ausgeprägten Wiederholung der kurzen Konsensusmotive weisen Spinnenseidenproteine im Vergleich zu den meisten anderen Proteinen einen ungewöhnlich hohen Anteil der fünf Aminosäuren Glycin, Glut-



Thomas Scheibel ist Inhaber des Lehrstuhls für Biomaterialien an der Universität Bayreuth. Er studierte und promovierte an der Universität Regensburg und habilitierte an der Technischen Universität München. Er war ein Forschungstipendiat der Kemper Foundation und der DFG an der University of Chicago (USA). 2004 erhielt er den Junior Scientist Award des Kompetenzzentrums für Neue Materialien. Zusammen mit einem Journalisten gewann er 2005 den Promega-Preis „Hauptsache Biologie“. Er erhielt 2006 den Bionik-Preis des BMBF und gewann 2007 dessen „Innovation aus der Natur-Wettbewerb“. 2007 wurde ihm die Heinz-Maier-Leibnitz Medaille zuerkannt und 2008 der Karl-Heinz Beckurts Preis.



**Abbildung 2.** a) Gehalt der fünf häufigsten Aminosäuren Glycin (Gly), Glutamin (Gln), Alanin (Ala), Prolin (Pro) und Serin (Ser) in dem bekannten Fragment von Spidroin 3 der großen Ampullendrüse (ADF-3) von *Araneus diadematus* im Vergleich zum intrazellulären  $\beta$ -Actin, dem extrazellulären globulären Rinderserumalbumin (BSA) und der Hämoglobin- $\alpha$ -Untereinheit sowie dem fibrillären extrazellulären Kollagen Typ I ( $\alpha$ 1-Untereinheit). b) Vergleich dieser fünf Proteine hinsichtlich der gesamten Aminosäurezusammensetzung, gegliedert nach ihren chemischen Charakteristika, basierend auf den publizierten Sequenzen: U47855 (ADF-3), NP 001092 ( $\beta$ -Aktin), NP 851335 (BSA), P69905 (Hämoglobin- $\alpha$ -Untereinheit) und NM 000088 (Kollagen Typ I,  $\alpha$ 1).

amin, Alanin, Prolin und Serin auf (Abbildung 2a). Die Kernregion ist von nichtrepetitiven carboxy-<sup>[31,32]</sup> und aminoterminalen<sup>[26]</sup> Sequenzen flankiert, die ebenfalls konserviert sind. Das Molekulargewicht der Proteine des Abseilfadens liegt Schätzungen zufolge im Bereich von 250 bis 350 kDa.<sup>[10,33]</sup> Die starke Konservierung der Konsensusmotive und (wenn auch zu einem geringeren Maße) der Termini sowie der ungewöhnlich hohe Anteil unpolarer wie auch polarer Aminosäuren in Verbindung mit einem sehr niedrigen Anteil an geladenen (sauren oder basischen) Aminosäuren (Abbildung 2b) führt zu dem Schluss, dass die Primärstruktur der Seide eine bedeutende Rolle sowohl beim Prozess der Faseraufbildung als auch in Bezug auf die charakteristischen Eigenschaften des Fadens spielt. Der außergewöhnlich niedrige Gehalt an geladenen Aminosäuren und der sehr hohe Anteil an Glutamin unterscheiden Spinnen-

seide zusätzlich von den meisten anderen extrazellulären und Strukturproteinen wie Kollagen.

Die Sekundärstruktur der sekretierten MAS entspricht der eines nativ-entfalteten Proteins, da sie vornehmlich aus Random-Coil-Strukturen und Polyprolin-II-Helix-ähnlichen Strukturen besteht.<sup>[34]</sup> Man geht davon aus, dass die Polyprolin-II-Helix-ähnlichen Regionen die Löslichkeit der MAS in der Spinnlösung selbst bei Konzentrationen bis zu 50 Gew.-% aufrechterhalten, indem sie die Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken verhindern, da sie Wasserstoffbrücken zwischen Seitenketten und Lösungsmittelmolekülen begünstigen.<sup>[35]</sup> Interessanterweise sind die Polyprolin-II-Helices der MAS wegen ihrer charakteristischen Diederwinkel in der Lage, sich thermodynamisch leicht in eine  $\beta$ -Faltblattstruktur umzuwandeln, was ein wichtiger Aspekt für den Spinnprozess ist.<sup>[34]</sup>

Nach der Sekretion bilden die MAS offensichtlich tropfenähnliche Strukturen aus eng hexagonal-säulenartig gepackten Spinnseidenproteinen in der Drüse.<sup>[11,27]</sup> Die hochkonzentrierten und löslich gespeicherten Spinnseidenproteine werden durch komplexe Prozesse so verändert, dass am Ende ein fester Seidenfaden resultiert.

## 2.2. Die biotechnologische Herstellung von Spinnseide

Für mögliche Anwendungen der Spinnseide als Hochleistungsmaterial ist die kostengünstige Herstellung von Spinnseidenproteinen in ausreichender Menge entscheidend. Da die Haltung von Spinnen in einer Farm wegen deren Territorialverhalten und Kannibalismus nicht möglich ist,<sup>[36]</sup> bietet die biotechnologische Herstellung der Spinnseide eine vielversprechende Alternative. Wissenschaftler haben daher intensiv an der Entwicklung von Klonierungs- und Herstellungsstrategien gearbeitet. Das größte Hindernis war hierbei die Tatsache, dass mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) keine verlässliche Amplifizierung repetitiver Sequenzen möglich ist. Die repetitive Struktur der Seidengene ist zudem eine Hürde bei der Suche nach geeigneten Expressionswirten. Der Einsatz „moderner“ biotechnologischer Verfahren war notwendig, um Spinnseiden-ähnliche Gene und passende Wirtsorganismen für die Proteinherstellung zu entwickeln.<sup>[37]</sup> Ein Wirt muss die genetische Stabilität der transgenen Sequenz sicherstellen und die repetitiven mRNAs, die oft zur Bildung ausgeprägter Sekundärstrukturen neigen, verarbeiten können. Des Weiteren werden während der Induktion die tRNA- und Aminosäurevorräte der Zelle wegen des überproportional hohen Anteils von Glycin, Glutamin, Alanin, Prolin und Serin schnell aufgebraucht (Abbildung 2a). Um die genannten Schwierigkeiten zu umgehen, wurden Spinnseidenproteine in genetisch veränderten Bakterien,<sup>[38–42]</sup> Hefen,<sup>[40,43]</sup> Pflanzen,<sup>[44–46]</sup> Insekten<sup>[47]</sup> und Säugerzellen<sup>[48]</sup> sowie in transgenen Tieren<sup>[49]</sup> hergestellt. Jeder dieser Wirtsorganismen bietet gewisse Vor-, aber auch Nachteile (Tabelle 3).

Hinsichtlich des Gendesigns wurden verschiedene Ansätze verfolgt.<sup>[10,38,40,46,48,50–52]</sup> Unter anderem entwickelte unsere Gruppe ein Klonierungssystem, das die Bildung künstlicher Spinnseidengene durch eine nahtlose Ver-

**Tabelle 3:** Wirtsorganismen für die rekombinante Produktion von Spinnenseidenproteinen.

Wirtsorganismus	Seide	Spinne <sup>[a]</sup>	Vorteile	Nachteile
<b>Bakterien:</b> <i>Escherichia coli</i> (B- und K12-Derivate) <sup>[38–42, 53]</sup>	verschiedene künstlich erzeugte Spinnenseidenproteine	N.c. A.d.	leicht handzuhabendes Expressionssystem – leicht manipulierbar – schnelles Wachstum – leicht hochskalierbar – kostengünstige Fermentation	Nucleotidsequenzen müssen der prokaryotischen Kodonverwendung angepasst werden – schlechte Produktion größerer Spidroine – genetische Instabilität repetitiver Nucleotidsequenzen (Deletionen, Insertionen) – vorzeitiges Translationsende → Produktinhomogenität
<b>Hefe:</b> <i>Pichia pastoris</i> <sup>[40, 43]</sup>	künstlich erzeugte MAS	n.e.	leicht hochskalierbar – kostengünstige Fermentation – Produktion größerer Seidenproteine in Eukaryoten möglich – kein vorzeitiges Translationsende – posttranslationale Modifizierungen möglich – Möglichkeit sekretierter Proteinproduktion, Erzielung höherer Proteinausbeuten	multiple Geninsertionen können auftreten → Produktinhomogenität – Expressionseffizienz sinkt mit steigender Gengröße
<b>Pflanzen:</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> <sup>[44]</sup> <i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel) <sup>[45, 46]</sup> <i>Nicotiana</i> (Tabak) <sup>[45, 46]</sup>	MAS und abgeleitete Proteine	N.c.	nur 10–50% der Kosten einer Bakterienfermentation – leicht hochskalierbar – stabile Produktion großer Spidroine – posttranslationale Modifizierungen möglich	genetische Manipulation schwieriger als in Bakterien – längere Generationszeiten – großflächiger Freilandanbau kann rechtliche Bedenken auslösen
<b>Insektenzellen:</b> <i>Bombyx mori</i> -Zellen <sup>[51]</sup> <i>Spodoptera frugiperda</i> -Zellen (sf9, sf21) <sup>[47]</sup>	Flagelliformseide, MAS (aus cDNA) und mutierte Fragmente davon	N.c. A.d.	unter allen verwendeten Expressionssystemen sind Insekten phylogenetisch am engsten mit Spinnen verwandt – Produktion größerer Seidenproteine in Eukaryoten möglich – Verfügbarkeit geeigneter kommerzieller Zellkultursysteme – kein translationales Pausieren → höhere Produkthomogenität – Möglichkeit sekretierter Proteinproduktion, Erzielung höherer Proteinausbeuten – posttranslationale Modifizierungen möglich – fermentierbare Zellkulturen → Biomassenproduktion im Großmaßstab	zeitaufwändig wegen längerer Generationszeiten verglichen mit Bakterien und wegen komplizierterer Klonierungsprozeduren – zytosolische Produktion bestimmter Spinnenseidenproteine führte zu Proteinaggregation → anschließende Renaturierung verringert die Proteinausbeuten
<b>tierische Zellen:</b> Babyhamsternieren (BHK)-Zellen <sup>[48]</sup> Rinder-Mammaepithel-alveolar (MAC)-Zellen <sup>[48]</sup>	MAS-cDNA-Sequenzen und deren Variationen	N.c. A.d.	Produktion größerer Seidenproteine in Eukaryoten möglich – Möglichkeit sekretierter Proteinproduktion, Erzielung höherer Proteinausbeuten	schnelle Erschöpfung des tRNA-Vorrats wegen der einseitigen Aminosäurezusammensetzung der Spinnenseidenproteine – translationales Pausieren resultiert in heterogener Proteinproduktion – zeitaufwändig wegen längerer Generationszeiten verglichen mit Bakterien und wegen komplizierteren Klonierungsprozeduren
<b>transgene Tiere:</b> BELE-Ziegen <sup>[b]</sup> <i>Mus musculus</i> <sup>[52]</sup>	Untereinheiten von Seidenmolekülen, künstliche erzeugte MAS	n.e.	Produktion größerer Seidenproteine in Eukaryoten möglich – posttranslationale Modifizierungen möglich – Protein wird in Milch oder Urin sekretiert, was hohe Proteinausbeuten ermöglicht – konstitutive Produktion von Seidenproteinen – Produktion und Sekretion dauern während Laktation (Milch) bzw. Lebenszeit (Urin) der transgenen Tiere an	Erzeugung transgener Säuger ist zeitaufwändig – Trennung von Spinnenseidenproteinen und Milchkaseinen während der Reinigung ist schwierig – Erzeugung transgener Tiere könnte ethische/rechtliche Bedenken auslösen – Mäuse produzieren nur geringe Mengen an Milch, der Melkvorgang kann schwierig sein

[a] N.c.: *Nephila clavipes* (Goldene Radnetzspinne); A.d.: *Araneus diadematus* (Gartenkreuzspinne); n.e.: wird in der zitierten Publikation nicht erwähnt.

[b] Die Methode ist patentiert für Säuger im Allgemeinen.<sup>[49]</sup>

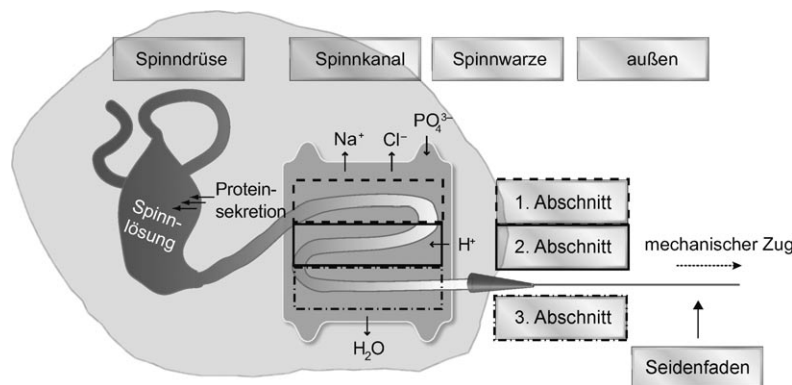
knüpfung Festphasen-synthetisierter Oligonucleotide ermöglicht.<sup>[53]</sup> Diese Methode erlaubt nicht nur die Nachahmung der modularen Anordnung der Konsensusmotive der Spinnenseide, sondern auch die Anpassung der Gen-Triplett-Kodons an die Bedürfnisse des gewünschten Expressionsorganismus. Mithilfe dieses Systems konnten wir eine Vielzahl an rekombinanten Spinnenseidenproteinen, die auf den Sequenzen der Proteine des Abseilfadens von *Araneus diadematus* und des Flagelliformseidenproteins von *Nephila clavipes* beruhen, sowohl in Bakterien als auch in Insektenzellen herstellen.<sup>[47,53]</sup>

### 3. Der Assemblierungsprozess von Seidenproteinen: Konformationsänderung und Phasentrennung

Die Proteine des Abseilfadens werden in der großen Ampullendrüse gespeichert, bis sie in eine Faser verarbeitet werden. Während des natürlichen Spinnprozesses werden die Proteine durch die Drüse befördert (Abbildung 3), wobei sie biochemischen Veränderungen sowie Elongations- und Scherkräften ausgesetzt sind.

Die biochemischen und physikalischen Veränderungen werden von einer Flüssig-flüssig-Phasentrennung begleitet, gefolgt von einem Flüssig-fest-Phasenübergang, der in einem noch unfertigen Seidenfaden resultiert. Die endgültige Faserstruktur wird nach einem Streckprozess im letzten Abschnitt des Spinnkanals und nach Verdunstung eines Großteils des enthaltenen Wassers an der Luft erzielt.

Der Aufbauprozess der Spinnenseidenproteine wird durch zwei etablierte Theorien beschrieben, die hinsichtlich der molekularen Ausrichtung, der Lagerung, des Phasentrennungsvorgangs und der Konformationsänderung der Proteine von In-vivo- (Abschnitt 3.1) und In-vitro-Befunden (Abschnitt 3.2) abgeleitet wurden (Abbildung 4).



**Abbildung 3.** Spinnenseidenverarbeitung: Spidroine der großen Ampullendrüse (Abseilfaden-Seidenproteine) werden durch die Epithelzellen, die die Drüse auskleiden, sekretiert. Das sekretierte Protein wird als hochkonzentrierte Spinnlösung gelagert. In Richtung der Spinnwarze passieren die Seidenproteine drei Abschnitte des sich verjüngenden Spinnkanals, begleitet von biochemischen Veränderungen, von Dehnströmung sowie Scherkräften. Der noch nicht fertige Abseilfaden verlässt die Drüse durch die Spinnwarze und wird durch Nachstrecken und Verdunstung der restlichen Lösung an Luft ausgehärtet.

#### 3.1. Der Assemblierungsprozess der Seide im Spinnkanal

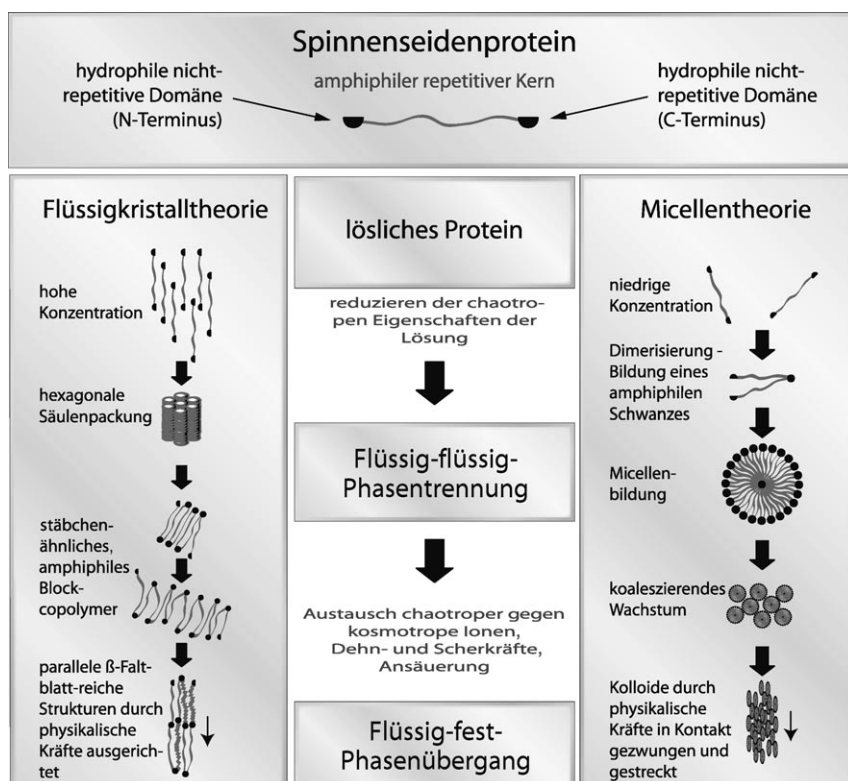
Gemäß den Befunden von Vollrath und Knight bilden die neu synthetisierten, langgestreckten Spinnenseidenproteine zuerst eine nematische, flüssigkristalline Phase in der Spinnlösung, wobei die Längsachsen der Moleküle parallel zueinander und senkrecht zum sekretierenden Epithelium angeordnet sind.<sup>[11]</sup> Beim Fluss durch die Drüse dreht sich die Orientierung der Längsachsen so weit, bis diese parallel zur Epithelwand liegen. Die Spinnenseidenproteine behalten diese nematische Ausrichtung bei, bis sie den zweiten Abschnitt (Abbildung 3) des Spinnkanals erreichen, in dem sie in Form doppelschichtiger Scheiben angeordnet sind, wobei die Längsachse senkrecht zur Scheibengrundfläche ausgerichtet ist. Diese Anordnung wird allgemein als zellulär optische Textur bezeichnet<sup>[54]</sup> und wird unter relativ niedrigen Spannungs Kräften erreicht. Eine sich beschleunigende Dehnströmung und Scherkräfte im dritten Kanalabschnitt wirken auf die Orientierung des Spinnenseidenproteins ein, was zur Verlängerung und Ausrichtung der scheibenartigen Strukturen führt (Abbildung 4).<sup>[27]</sup> In diesem Schritt wird der Konformationsübergang der Spinnenseidenproteine von Random-Coil- und Polyprolin-II-Helix-ähnlicher Konformation zu vornehmlich  $\beta$ -Faltblatt-reichen Strukturen initiiert.<sup>[11]</sup>

Die Konformationsänderung wird zusätzlich durch eine leichte Ansäuerung der Spinnlösung unterstützt.<sup>[27,55–58]</sup> Die Ansäuerung bewirkt eine Neutralisation der unter physiologischen Bedingungen üblicherweise negativ geladenen Glutamate der Spinnenseidenproteine, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt werden. Dadurch geliert die Spinnlösung im hinteren Teil des Kanals, was zu einer erhöhten Viskosität führt, die in Kombination mit schneller Dehnströmung den internen Streckprozess unterstützt.<sup>[56,57,59]</sup>

Schlussendlich bieten die Epithelzellen im dritten Kanalabschnitt mit ihren apikalen Mikrovilli eine große Oberfläche zur Wasserresorption, die zusätzlich durch die dünne Kutikula-Auskleidung dieses Bereichs des Spinnkanals erleichtert wird.<sup>[11,58,60]</sup> Unter der Annahme, dass der konvektive Wasserentzug durch die Epithelverkleidung schnell abläuft, lässt sich der gesamte Prozess gut anhand eines numerischen Modells beschreiben, demzufolge der weitere Wasserentzug lediglich durch eine interne Diffusion gesteuert wird. Dabei ist die Diffusion des restlichen Wassers, in Abhängigkeit von seinem Diffusionskoeffizienten, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Seidenbildung.<sup>[61]</sup> Die langsame Diffusion des Wassers führt zu einer erhöhten Faserplastizität, da intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken mehr Zeit für eine Umorientierung haben. Kurz vor dem Austritt der Faser aus dem Abdomen der Spinne wird das noch übrige Wasser durch die Spinnwarzenlippen entfernt, die die sich bildende Faser eng umschließen.<sup>[11]</sup>

#### 3.2. In-vitro-Analyse der Seidenassemblierung

Die Untersuchung der Seidenassemblierung in vitro kann auf zwei Arten erfolgen: 1) Natürliche Seidenfa-



**Abbildung 4.** Zwei etablierte Modelle zur Beschreibung der Spinnenseidenfaserbildung. Details siehe Text.<sup>[11, 62]</sup>

sern werden unter harschen Lösungsmittelbedingungen (z. B. in hochmolaren LiBr- und LiSCN-Lösungen, Hexafluor-2-propanol, Hexafluoraceton-Hydrat) aufgelöst, um eine regenerierte Seidenlösung zu erhalten; 2) rekombinante Seidenproteine, die auf Sequenzen beruhen, die von der natürlichen Sequenz abgeleitet wurden (siehe Abschnitt 2.2), werden in wässrigen Lösungen unter „natürlichen“ Bedingungen gelöst.

Unter Verwendung regenerierter *B.-mori*-Fibroine versuchten Kaplan und Jin, die Vorgänge bei der Seidenprotein-assembly während des natürlichen Spinnens aufzuklären.<sup>[62]</sup> Entgegen der Erwartung aus der Theorie von Vollrath (siehe Abschnitt 3.1) zeigten Bruchkanten nativer Spinnenseide häufig kugelförmige Strukturen in ihrer Kernregion, während die Mantelregion verlängerte Fibrillenstrukturen aufwies.<sup>[63]</sup> *B.-mori*-Fibroine wie auch die Spinnenseidenproteine enthalten in der Regel eine amphiphile Sequenz mit kurzen, abwechselnd hydrophilen und hydrophoben Aminosäurebereichen, die von größeren hydrophilen terminalen Regionen flankiert werden, wodurch die Moleküle tensid-ähnlich werden und Micellen bilden können.<sup>[3, 10, 53, 64]</sup> Durch die Proteinkonzentration getrieben, koaleszieren Micellen zu größeren kugelförmigen Strukturen. Das durch Dehnströmung und Wandgrenzen des Spinnkanals erzeugte Kraftfeld dehnt die kugelförmigen Strukturen und formt sie auf diese Weise zu Faserstrukturen, die als Vorstufen der anschließenden Spinnenseidenfaser angesehen werden.<sup>[62, 63]</sup>

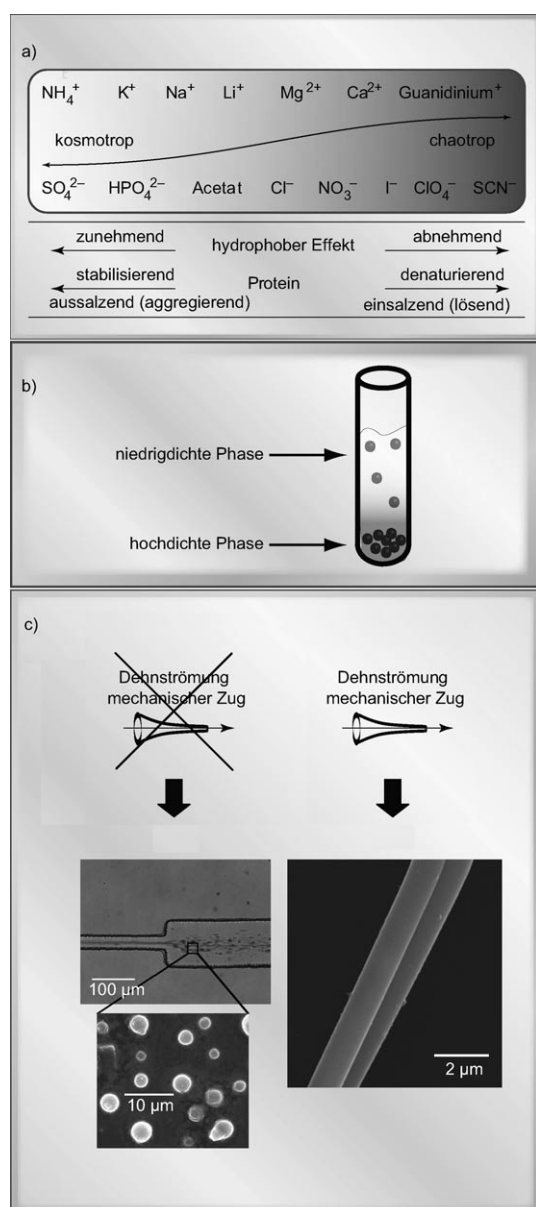
In beiden Studien werden die gleichen Aspekte der Vororientierung der Seidenproteine berücksichtigt, doch werden dabei einige wichtige Effekte, die die Sekundär-, Tertiär- und

Quartärstruktur beeinflussen, nicht in Betracht gezogen. Auf dem Weg durch den Spinnkanal sind die Proteine beachtlichen Veränderungen in ihrer Lösungsumgebung, mit Aussalzeffekten und anschließender Strukturbildung, ausgesetzt. Zu den Veränderungen gehören ein Anstieg der Kalium- und der Phosphatkonzentration, eine Abnahme der Natrium- und der Chloridkonzentration, Wasserentzug und eine leichte Ansäuerung.<sup>[27, 55, 58, 65]</sup> Gewöhnlich wird die Stabilität eines Proteins in wässriger Lösung durch die umgebenden Ionen beeinflusst: Nach Studien von Hofmeister zu Beginn des 20. Jahrhunderts stabilisieren chaotrope („einsalzende“) Ionen das Protein, während kosmotrope („aussalzende“) Ionen eine Strukturbildung und Proteinaggregation begünstigen (Abbildung 5a).<sup>[66, 67]</sup> Um die Auswirkungen der Salze der Hofmeister-Reihe auf die Seidenproteine zu entschlüsseln, wurde die Löslichkeit von rekombinanten Seidenproteinen bestimmt, die auf den MAS-Sequenzen von *Araneus diadematus* beruhen. Die Löslichkeit wird dabei durch die hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften der repetitiven Sequenzen eines einzelnen

Proteins bestimmt: Das hydrophilere eADF3-Protein ist bis zu 30 Gew.-% wasserlöslich, während das hydrophobere eADF4-Protein bereits bei Konzentrationen um 10 Gew.-% geliert.<sup>[53, 68]</sup> Diese Beobachtungen sind konform mit denen anderer Arbeitsgruppen, die eine Löslichkeit rekombinanter Seidenproteine der Spinne *Nephila clavipes* (Analoge der MA-Spidroine 1 und 2) in der Größenordnung von ca. 20 Gew.-% (in wässriger Lösung) erzielten.<sup>[69]</sup> Wir beobachteten, dass in Abwesenheit chaotroper Ionen (z. B. in entsalztem Wasser) und im Fall ungesättigter Proteinlösungen eine Flüssig-flüssig-Phasentrennung stattfindet, die in einer erhöhten Proteinkonzentration in einer hochdichten Phase resultierte (angezeigt durch große Kolloide ohne detektierbare Sekundärstruktur (Abbildung 5b)).<sup>[64]</sup>

Im Unterschied dazu unterdrücken chaotrope Salze wie Natriumchlorid, das in der Speicherlösung der Spinne vorkommt, die Aggregation und den Zusammenbau der Seidenproteine und unterbinden eine Flüssig-flüssig-Phasentrennung. Sobald Natriumchlorid gegen „aussalzende“ Ionen ausgetauscht wird, beginnt die Strukturbildung.<sup>[64]</sup> Der Aussalzeffekt hängt nicht nur von den verwendeten Ionen, sondern auch von der Primärstruktur der repetitiven Kernsequenz und der flankierenden nichtrepetitiven (NR-)Domänen ab, die die Reaktion der repetitiven Einheiten gegen aussalzfördernde Faktoren verstärken.<sup>[53, 68]</sup>

Ähnlich wie beim In-vivo-Prozess werden auch In-vitro-Verarbeitung und -Assembly der Seidenproteine durch den pH-Wert und physikalischen Stress beeinflusst.<sup>[27, 65, 70–72]</sup> Bei pH > 8.5 wird die Phasentrennung durch die Deproto-



**Abbildung 5.** Voraussetzungen für die In-vitro-Seidenfaserbildung. a) Salzeinfluss auf das Protein (Hofmeister-Serie).<sup>[66]</sup> b) Flüssig-flüssig-Phasentrennung. c) Einfluss der Dehnströmung und des mechanischen Zugs auf die Faserbildung. Ohne Dehnströmung oder mechanisches Ziehen werden lediglich kugelförmige Aggregate gebildet (links).

nierung der Tyrosinreste verhindert. Anionische Tyrosylreste in den hydrophoben Sequenzen des Proteins erhöhen die Hydrophilie und vermindern damit die hydrophoben Wechselwirkungen.<sup>[64]</sup> Um den Einfluss der Ansäuerung während der Seidenbildung eingehender zu untersuchen, wurde ein Mikrofluidikansatz verwendet, in dem sich Ionenkonzentrationen und pH-Wert kontrollieren ließen und gleichzeitig durch das Kanaldesign ein physikalischer Stress bewirkt werden konnte.<sup>[65]</sup> Beim natürlichen Prozess nimmt die Geschwindigkeit der Spinnlösung während der Beförderung durch den Kanal vor dem Streckkegel exponentiell zu, was darauf schließen lässt, dass Scherung an den Kanalwänden eine Rolle bei der Umwandlung von flüssiger Lösung zu

festem Faden spielt; mehr noch sorgen kontrollierte Strömungsdehnung und Wasserentzug für eine Zunahme der  $\beta$ -Faltblattstruktur.<sup>[57,73,74]</sup> Lagen keine aussalzenden Bedingungen und keine Ansäuerung vor, beeinflusste die Dehnströmung die Struktur der verwendeten Seidenproteine nicht, und Aussalzen alleine führte mangels Dehnströmung zur Bildung kugelförmiger Aggregate. Im Mikrofluidikapparat konnten Fasern nur nach Zugabe von Phosphat und Einstellung einer Dehnströmung mit gleichzeitiger Reduzierung des pH-Wertes von 8 auf 6 gebildet werden.<sup>[65]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass Fasern aus kugelförmigen Aggregaten resultierten, die durch die Dehnströmung im Mikrofluidikkanal miteinander in Kontakt gebracht worden waren.<sup>[65]</sup> Die resultierenden Fasern waren flexibel und zeigten hochgeordnete (vor allem  $\beta$ -Faltblatt-reiche) Regionen entlang ihrer Längsachse. Die Oberfläche der Fasern enthielt körnige Strukturen, was zu der Annahme führt, dass die Fasern noch nicht vollständig gebildet waren, sondern einem Anfangs- oder Zwischenstadium entsprachen.<sup>[65]</sup>

### 3.3. Ein kombiniertes Modell der Spinnenseidenassemblierung

Die beiden Modelle aus Abbildung 4 schließen einander nicht aus. Die Charakteristika der Spinnlösung, wie sie in beiden Modellen beschrieben wird, spiegeln die typischen physikalischen Eigenschaften von Flüssigkristallen wider (davon ausgehend, dass die von Jin und Kaplan beobachtete Micellenbildung Flüssigkristallinität nicht ausschließt). Lyotrophe Flüssigkristalle (Flüssigkristalle, die abhängig von der Konzentration ihrer Grundkomponenten eine Phasenumwandlung durchmachen können) mit amphiphilem Charakter zeigen eine konzentrationsabhängige Selbstorganisation in Lösung: Bei niedriger Konzentration bilden sie Micellen, bei höherer ordnen sie sich in Form hexagonaler Säulen an.<sup>[75]</sup> Dieses Verhalten bietet eine mögliche Erklärung dafür, warum In-vivo-Untersuchungen üblicherweise zu dem Schluss führen, dass die Spinnlösung flüssigkristallines Verhalten aufweist, während In-vitro-Studien (mit rekombinanter oder regenerierter Seide) auf das Vorliegen einer micellenähnlich vororientierten Spinnlösung schließen lassen. Native und regenerierte Seidenlösungen unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer rheologischen Eigenschaften: Die native Lösung verhält sich im Unterschied zur regenerierten wie ein geschmolzenes Polymer.<sup>[76]</sup> Eine höhere Proteinkonzentration führt demnach zu höherer Viskosität und ermöglicht somit eine Faserbildung bei deutlich niedrigeren Dehnströmungsgeschwindigkeiten.<sup>[65]</sup> Diese Beobachtungen zeigen, dass flüssigkristallines Verhalten der Spinnlösung unterstützend, aber keineswegs entscheidend für die Faserbildung ist.

## 4. Faserbildung: Flüssig-fest-Phasenübergang

### 4.1. Phasenumwandlung im distalen Bereich des Spinnkanals

Der letzte Schritt beim Spinnprozess ist die Umwandlung von einer hochdichten flüssigen in eine feste Phase, die im

distalen Bereich des Spinnkanals ihren Ursprung hat.<sup>[11,58,59,74]</sup> Während die Spinnlösung durch den Spinnkanal fließt, wird wie bereits erwähnt durch einen schnellen konvektiven Wasserentzug eine Flüssig-fest-Phasenumwandlung initiiert,<sup>[11,61]</sup> im Unterschied zu bisherigen Postulaten, dass die Verfestigung lediglich durch Kontakt an Luft entsteht.<sup>[11,27,77–79]</sup> Ein quasifestes Zwischenstadium oder eine vorläufige Faser wird durch eine Art Pumpmechanismus, bei dem zwei Muskeln zusammenarbeiten, durch den Kanal befördert und tritt durch die Spinnwarze aus.<sup>[27]</sup>

Mithilfe rheologischer Untersuchungen konnten die mechanistischen Details der Beförderung einer quasifesten Spinnlösung durch eine konvergente, düsenähnliche Spinnwarze aufgeklärt werden.<sup>[80]</sup> Dabei wurde gezeigt, dass die erforderliche Kraft, um die Spinnlösung durch diese Spinnwarze zu drücken, wegen der nichtnewtonschen Fließeigenschaften der Spinnlösung ca. 500 mal geringer ist als die bei einer entsprechenden newtonschen Flüssigkeit.<sup>[56,81]</sup> Viskose nichtnewtonsche Flüssigkeiten haben in der Regel ein strukturviskoses Verhalten, d.h., mit zunehmender Scherkraft sinkt die Viskosität der Flüssigkeit (und damit ihr Widerstand gegen die Scherkräfte).

Darüber hinaus zeigt die Spinnlösung ansteigenden Widerstand mit zunehmender Zeit und Dehnung (was nicht im Widerspruch zur Strukturviskosität steht) während der Dehnströmung, was zu einem viskoelastischen Fluidfilament führt.<sup>[80,82]</sup> Das Zusammenziehen des viskoelastischen Fluidfilaments (oft als „Einschnüren“ bezeichnet), das durch den Kapillardruck angetrieben wird und sich dem viskoelastischen Stress im sich dehrenden Filament widersetzt, kann am Besten durch das „time-evolutionary necking“-Modell beschrieben werden.<sup>[80,83]</sup> In diesem Modell beruht der Einschnürungs-/Trocknungsprozess eines viskoelastischen Filaments auf dem zeitabhängigen Verhältnis der Kapillarverdünnung des Filaments zur internen Wasserdiffusion. Die resultierende Einschnürungsgeschwindigkeit kann weiter durch zusätzlichen Abzug des Wassers aus dem Faden verändert werden, da die Wasserverdunstung wegen des wachsenden Oberfläche/Volumen-Quotienten mit zunehmender Zeit ansteigt. Mit weiterem Wasserverlust steigt daher die Fluidviskosität, und die Einschnürungsgeschwindigkeit verlangsamt sich zusätzlich.<sup>[83]</sup> Der Widerstand eines Fluidfilaments gegen weitere Dehnung wird durch die Dehnviskositätseigenschaften charakterisiert, die während der Kapillarverdünnung um den Faktor 100 zunehmen. Bei großen Dehnungen macht das Filament eine Kaltverformung durch, die das Auseinanderbrechen des Kapillars inhibiert und schließlich das Filament wegen einer Kombination aus molekularer Dehnung und Lösungsmittelverdunstung stabilisiert, was umgehend eine feste, einheitliche Faser mit konstantem Durchmesser ergibt.<sup>[80]</sup>

#### 4.2. Abschließende Faserbildung und Kontrolle der mechanischen Eigenschaften

Die Flüssig-fest-Umwandlung wird durch Umgebungsbedingungen wie partiellen Wasserentzug, Dehnströmung und Scherkräfte ausgelöst (siehe Abschnitt 3.1). Nach dem

Austritt aus der Spinnwarze wird die Flüssig-fest-Umwandlung durch die Kombination aus Zug und Wasserverlust durch Verdunstung an der Luft komplettiert. Zu den Faktoren, die den Verdunstungsprozess beeinflussen, gehören der Faserradius, die Verweilzeit an der Luft, die atmosphärische Luftfeuchtigkeit und Temperatur sowie die Geschwindigkeit der Luftströmung.<sup>[84]</sup> Da allerdings einige natürliche Seiden auch in wässriger Umgebung gesponnen werden, ist die Verdunstung des Lösungsmittels offensichtlich nicht entscheidend für die Faserbildung.<sup>[11,27,77,78]</sup> Der Zug und/oder das Strecken der Faser aus der Spinnwarze durch die Spinne führt zu einer Verminderung des Durchmessers (unterstützt durch die Tatsache, dass Seide eine moderate, positive Poisson-Zahl mit einem linearen Durchmesser/Dehnungs-Verhältnis zeigt) und resultiert somit in verbesserten mechanischen Eigenschaften der Faser.<sup>[85]</sup>

Der frisch gezogene Abseilfaden, üblicherweise ein Doppelfilamentfaden, wird meist an einem Trägermaterial (unter Verwendung einer Seide der Piriformdrüse) befestigt, bevor durch Bewegung oder Fallen der Zug erfolgt, wobei das Körpergewicht der Spinne und/oder die Erdanziehungskraft genutzt werden. Alternativ werden Abseilfäden von der Spinne mit ihren Hinterbeinen herausgezogen.<sup>[3,10,11,62,86,87]</sup>

Diese drei unterschiedlichen, aktiv von der Spinne eingesetzten Methoden haben eine große Variabilität mechanischer Eigenschaften des Abseilfadens zur Folge: 1) Bei der Methode des vertikalen Abstiegs nutzt die Spinne Reibungskräfte von mehr als dem Doppelten ihres Körpergewichtes und erzeugt somit starke Fäden;<sup>[87]</sup> 2) eine Spinne im freien Fall spinnst Seide dagegen bei niedrigen Kräften von ungefähr 10 % des eigenen Körpergewichtes ohne zusätzliche Reibungskräfte;<sup>[86,87]</sup> 3) Fasern, die während des ungestörten Kletterns einer Spinne gesponnen werden, haben Eigenschaften, die der Untergrenze einer üblichen Spannungs-Dehnungs-Kurve entsprechen.<sup>[15,87]</sup>

Die Zuggeschwindigkeit hat einen stark linearen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften. Dies bedeutet, dass besonders Proteinfaltung und molekulare Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinen durch diesen Prozess beeinflusst werden. Die Zuggeschwindigkeit beeinflusst die Zeit, die für die Proteinanordnung nötig ist, wobei höhere Zuggeschwindigkeiten diese Zeit wegen zunehmender Scher- und Dehnströmungskräfte reduzieren.<sup>[85]</sup>

Außer durch die aktive Kontrolle durch die Spinne werden die Fasereigenschaften auch durch Umwelteinflüsse wie Ernährung, Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit sowie durch das Körpergewicht beeinflusst.<sup>[3,74,79,85,88–91]</sup> Die daraus entstehende Variabilität ermöglicht die Herstellung eines maßgeschneiderten Materials, das ideal an die direkten Umgebungsbedingungen und die momentanen Bedürfnisse der Spinne angepasst ist.<sup>[92]</sup>

#### 4.3. In-vitro-Seidenspinnverfahren

In mehreren Studien wurden Spinnverfahren zur künstlichen Herstellung von Spinnenseide untersucht, allerdings führte keines der verwendeten Verfahren zu Seidenfasern mit Eigenschaften, die denen der natürlichen Seide entsprechen.

Die meisten der bisher getesteten Techniken zur Herstellung von Fasern aus einer Seidenlösung beruhen auf der Extrusion aus einer Lösung, dem Nassspinnen durch ein Koagulationsbad, dem Elektrosponnen und Mikrofluidikansätzen (manchmal unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln).<sup>[10,93]</sup>

Der natürliche Spinnprozess besteht aus einer komplexen Kombination eines Extrusions- und eines Streckprozesses,<sup>[27,58]</sup> was ihn von allen bekannten Verfahren zur Herstellung synthetischer Fasern unterscheidet und die Nachahmung des natürlichen Prozesses äußerst schwierig macht. Im Unterschied zu einem technischen Spinnverfahren, bei dem die physikalische Transformation, das Spinnen und der Zug sequenziell ablaufen, ist der Prozess im Körper einer Spinne schnell und konzertiert.<sup>[11,48,73,94]</sup> Mikrofluidikuntersuchungen versprechen eine Vertiefung des Verständnisses der Ereignisabfolge und der Kinetiken der Seidenbildung. Ziel ist, diese Beobachtungen bei der Entwicklung eines bionischen Spinnverfahrens zu nutzen, woran gegenwärtig mehrere Forschungsgruppen arbeiten (ein Beispiel findet sich in Abbildung 6).<sup>[65,95,96]</sup>

Da mehrere Faktoren, z.B. der interne Wasserentzugsprozess, das Verhalten der Spinnlösung oder Umgebungseinflüsse, das Ziehen eines Seidenfadens und damit seine Eigenschaften beeinflussen, müssen sie bei der technischen Umsetzung des natürlichen Spinnverfahrens berücksichtigt werden. Darüber hinaus kann es notwendig sein, zusätzliche Nachspinnverfahren anzuwenden, die von den bekannten technischen Spinnverfahren übernommen werden, um eine höhere Leistungsfähigkeit der Seidenfäden zu erzielen.

Das Nachstrecken kann die mechanischen Eigenschaften der Seidenfäden auf gleiche Art und Weise beeinflussen, wie es die Zuggeschwindigkeit in der Natur tut (siehe Abschnitt 4.2). Das Nachstrecken führt zu längeren und damit (wegen des konstanten Volumens) dünneren Fäden und resultiert so in verbesserten mechanischen Eigenschaften. <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopische Studien zeigten einen linearen Anstieg der  $\beta$ -Faltblattkonformation in Alaninsequenzen (die

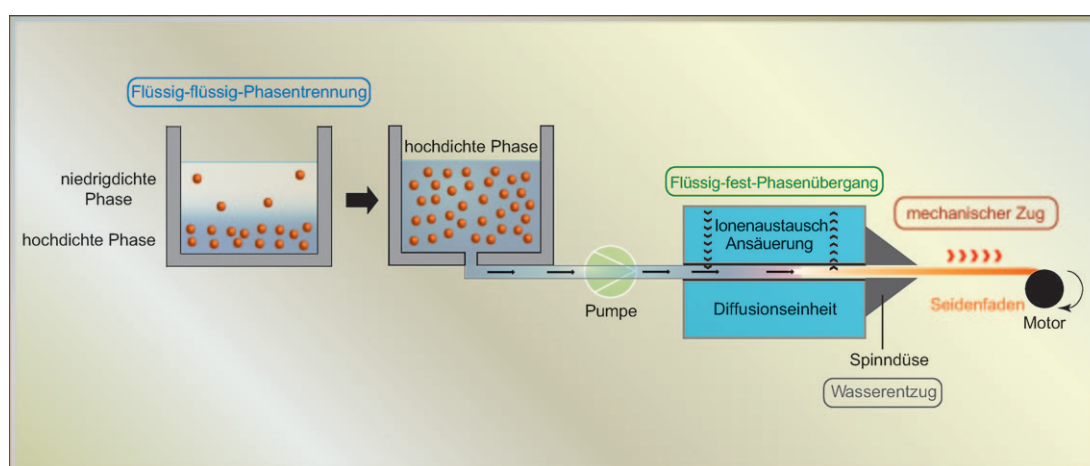
sonst als Random-Coil- oder helicale Struktur vorliegen) mit dem Streckquotienten (d.h. dem Verhältnis von Faserlänge nach Streckung zu Originalfaserlänge).<sup>[97]</sup>

Da das Spinnennetz in der Natur seine Flexibilität durch Superkontraktion bewahrt, scheint es möglich, Umgebungsbedingungen (Luftfeuchtigkeit) zur Kontrolle der Eigenschaften technisch gesponnener Seidenfasern zu nutzen. Das Nachstrecken künstlich hergestellter Fasern in einem wässrigen Bad resultiert in stärkeren (was sich in einem Anstieg der Streckspannung, der Bruchspannung und des Initialmoduls äußert), allerdings auch weniger dehnbaren Fasern (verdeutlicht durch die niedrigere Bruchdehnung, obwohl die Dehnenergie selbst ansteigt).<sup>[79]</sup> Diese Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der Faser beruht auf der Tatsache, dass das Eintauchen der Seidenfaser in Wasser in Kombination mit simultanem Zug zu einer verbesserten Ausrichtung und damit zu verbesserten mechanischen Eigenschaften führt.

Wichtige Aspekte bei der Nachahmung des natürlichen Spinnprozesses sind das Design des künstlichen Spinnkanals und des Nachstreckverfahrens. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Gestalt des künstlichen Kanals die Charakteristika der Dehnströmung beeinflusst: 1) Die langsame Verjüngung des Kanals verhindert wegen der daraus resultierenden langsamen Dehnströmungsgeschwindigkeiten eine vorzeitige Kristallisierung; 2) die hyperbolische Geometrie des Spinnkanals trägt zur konstanten Dehnströmung und somit zur Reduzierung der Fehlorientierung bei.<sup>[59]</sup>

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl das Wissen über den Einfluss von Faktoren wie Proteinzusammensetzung, biochemische Umgebung, Dehnströmung und Scherkräfte auf einzelne Prozesse während der Spinnenseidenproduktion umfangreich ist, sind die Kontrolle, die Abfolge und das komplexe Zusammenspiel dieser Prozesse noch immer nicht aufgeklärt. Die Realisierung einer



**Abbildung 6.** Bionischer Spinnprozess. Die Flüssig-flüssig-Phasentrennung resultiert in der Bildung einer hochdichten Phase, die von der niederdichten Phase für die weitere Verarbeitung abgetrennt wird. Die hochdichte Phase wird durch eine Diffusionseinheit gepumpt, in der Ionenaustausch und Ansäuerung zu einer Flüssig-fest-Umwandlung führen. Der quasifeste Faden wird aus der Drüse herausgezogen, wobei restliches Wasser entfernt wird, um einen festen Faden zu erzeugen.

Kombination aus Extrusions- und Zugprozess mit einer Vielzahl an Modifizierungsmöglichkeiten, z.B. Änderungen der Zuggeschwindigkeit während des Nachstreckens, ist eine der anspruchsvollsten Aufgaben für die technische Spinnenseidenherstellung.

Offensichtlich sind vier Bedingungen für die Herstellung der Spinnenseidenfasern entscheidend:

- 1) optimales Gendesign für effiziente und rekombinante Proteinherstellung und Proteinstrukturbildung inklusive Kontrolle der Größe und der Zahl der  $\beta$ -Faltblattstrukturen (entscheidend für die Faserstärke) sowie der Flüssigkristallausrichtung (beeinflusst die Fließeigenschaften);<sup>[57,59,98,99]</sup>
- 2) optimale chemische und physikalische Bedingungen während der Seidenproteinverarbeitung, um vorzeitige Proteinaggregation zu verhindern;<sup>[57,65]</sup>
- 3) „Wassermanagement“ während des Spinnprozesses;
- 4) kontrollierte äußere Parameter wie Zuggeschwindigkeit und Befeuchtung.

Zwar wurden bereits Fortschritte beim Proteindesign und der Proteinherstellung sowie beim Verständnis der Auswirkungen bestimmter biochemischer Parameter erzielt, es sind aber noch zusätzliche Untersuchungen zur Optimierung des Flüssig-flüssig-Phasentrennungsverhaltens der involvierten Proteine erforderlich. Darüber hinaus wurde das „Wassermanagement“ bis jetzt bei allen In-vitro-Studien vernachlässigt, obwohl es beim natürlichen Spinnprozess eine entscheidende Rolle spielt.

Nach der Entwicklung eines bionischen Spinnverfahrens wird man technische Seidenfäden für eine Vielzahl von Anwendungen nutzen können. So könnten bionische Seidenfäden eines Tages als Ersatz für viele natürliche und künstliche Fasern in den Materialwissenschaften und der Medizin Verwendung finden.

*Wir danken Dr. John Hardy und Eileen Lintz für kritische Anmerkungen und Diskussionen zum Manuskript, Dr. Lin Römer für inspirative Kommentare zu den Abbildungen sowie Claudia Blüm und Ute Slotta für das Korrekturlesen. M.H. bedankt sich für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium nach dem Bayerischen Elitelförderungsgesetz, Universität Bayern e.V. Unsere Arbeiten werden finanziell vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderungsnummer 13N9736) unterstützt.*

Eingegangen am 9. Juli 2008

Online veröffentlicht am 11. Februar 2009

[1] V. B. Gerritsen, *Protein Spotlight* **2002**, 24, 1–2.

[2] F. Vollrath, *J. Biotechnol.* **2000**, 74, 67–83.

[3] L. Römer, T. Scheibel in *Fibrous Proteins* (Hrsg.: T. Scheibel), Landes Bioscience, Austin, **2008**, S. 137–151.

[4] F. Vollrath, E. K. Tillinghast, *Naturwissenschaften* **1991**, 78, 557–559.

[5] M. A. Townley, E. K. Tillinghast, C. D. Neefus, *J. Exp. Biol.* **2006**, 209, 1463–1486.

[6] S. Zschokke, *Bull. Br. Arachnol. Soc.* **1993**, 9, 167–173.

- [7] J. M. Gosline, M. E. Demont, M. W. Denny, *Endeavour* **1986**, 10, 37–43.
- [8] K. Vasanthavada, X. Hu, A. M. Falick, C. La Mattina, A. M. F. Moore, P. R. Jones, R. Yee, R. Reza, T. Tuton, C. Vierra, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 35088–35097.
- [9] F. K. Ko, J. Jovicic, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 780–785.
- [10] T. Scheibel, *Microb. Cell Fact.* **2004**, 3, 14.
- [11] F. Vollrath, D. P. Knight, *Nature* **2001**, 410, 541–548.
- [12] R. W. Work, *Text. Res. J.* **1976**, 46, 485–492.
- [13] Z. Z. Shao, F. Vollrath, *Polymer* **1999**, 40, 1799–1806.
- [14] Z. Shao, F. Vollrath, J. Sirichaisit, R. J. Young, *Polymer* **1999**, 40, 2493–2500.
- [15] J. Perez-Rigueiro, M. Elices, G. V. Guinea, *Polymer* **2003**, 44, 3733–3736.
- [16] L. W. Jelinski, A. Blye, O. Liivak, C. Michal, G. LaVerde, A. Seidel, N. Shah, Z. T. Yang, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 24, 197–201.
- [17] G. V. Guinea, M. Elices, J. Perez-Rigueiro, G. Plaza, *Polymer* **2003**, 44, 5785–5788.
- [18] Y. Liu, Z. Z. Shao, F. Vollrath, *Nat. Mater.* **2005**, 4, 901–905.
- [19] F. I. Bell, I. J. McEwen, C. Viney, *Nature* **2002**, 416, 37.
- [20] O. Emile, A. Le Floch, F. Vollrath, *Nature* **2006**, 440, 621.
- [21] O. Emile, A. Le Floch, F. Vollrath, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, 98, 167402.
- [22] N. A. Ayoub, J. E. Garb, R. M. Tinghitella, M. A. Collin, C. Y. Hayashi, *PLoS ONE* **2007**, 2, e514.
- [23] P. A. Guerette, D. G. Gininger, B. H. Weber, J. M. Gosline, *Science* **1996**, 272, 112–115.
- [24] J. E. Garb, T. Dimauro, V. Vo, C. Y. Hayashi, *Science* **2006**, 312, 1762.
- [25] C. Y. Hayashi, R. V. Lewis, *Bioessays* **2001**, 23, 750–756.
- [26] A. Rising, G. Hjalm, W. Engstrom, J. Johansson, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 3120–3124.
- [27] F. Vollrath, D. P. Knight, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 24, 243–249.
- [28] A. L. Bell, D. B. Peakall, *J. Cell Biol.* **1969**, 42, 284–295.
- [29] A. Plazaola, G. C. Candelas, *Tissue Cell* **1991**, 23, 277–284.
- [30] P. A. Selden, *Palaeontology* **1990**, 33, 257–285.
- [31] R. Beckwitt, S. Arcidiacono, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 6661–6663.
- [32] A. Spönnner, E. Unger, F. Grosse, K. Weisshart, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 840–845.
- [33] W. A. Gaines IV, W. R. Marcotte, *Insect Mol. Biol.* **2008**, 17, 465–474.
- [34] T. Lefevre, J. Leclerc, J. F. Rioux-Dube, T. Buffeteau, M. C. Paquin, M. E. Rousseau, I. Cloutier, M. Auger, S. M. Gagne, S. Boudreault, C. Cloutier, M. Pezolet, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2342–2344.
- [35] D. H. Hijirida, K. G. Do, C. Michal, S. Wong, D. Zax, L. W. Jelinski, *Biophys. J.* **1996**, 71, 3442–3447.
- [36] L. R. Fox, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1975**, 6, 87–106.
- [37] C. Vendrely, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 401–409.
- [38] J. T. Prince, K. P. McGrath, C. M. Digirolamo, D. L. Kaplan, *Biochemistry* **1995**, 34, 10879–10885.
- [39] S. R. Fahnestock, S. L. Irwin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47, 23–32.
- [40] S. R. Fahnestock, Z. Yao, L. A. Bedzyk, *J. Biotechnol.* **2000**, 74, 105–119.
- [41] Y. Fukushima, *Biopolymers* **1998**, 45, 269–279.
- [42] Y. T. Zhou, S. X. Wu, V. P. Conticello, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 111–125.
- [43] S. R. Fahnestock, L. A. Bedzyk, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47, 33–39.
- [44] L. A. Barr, S. R. Fahnestock, J. J. Yang, *Mol. Breed.* **2004**, 13, 345–356.
- [45] J. Scheller, U. Conrad, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, 8, 188–196.

- [46] J. Scheller, K. H. Guhrs, F. Grosse, U. Conrad, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 573–577.
- [47] D. Huemmerich, T. Scheibel, F. Vollrath, S. Cohen, U. Gat, S. Ittah, *Curr. Biol.* **2004**, 14, 2070–2074.
- [48] 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.
- [49] C. N. Karatzas, J. D. Turner, A.-L. Karatzas (Nexia Biotechnologies, Inc.), WO 99/47661, **1999**.
- [50] C. Wong Po Foo, D. L. Kaplan, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, 1131–1143.
- [51] Y. G. Miao, Y. S. Zhang, K. Nakagaki, T. F. Zhao, A. C. Zhao, Y. Meng, M. Nakagaki, E. Y. Park, K. Maenaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 71, 192–199.
- [52] H. T. Xu, B. L. Fan, S. Y. Yu, Y. H. Huang, Z. H. Zhao, Z. X. Lian, Y. P. Dai, L. L. Wang, Z. L. Liu, J. Fei, N. Li, *Anim. Biotechnol.* **2007**, 18, 1–12.
- [53] D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, 43, 13604–13612.
- [54] J. D. Bunning, J. E. Lydon, *Liq. Cryst.* **1996**, 20, 381–385.
- [55] D. P. Knight, F. Vollrath, *Naturwissenschaften* **2001**, 88, 179–182.
- [56] A. E. Terry, D. P. Knight, D. Porter, F. Vollrath, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 768–772.
- [57] C. Dicko, J. M. Kenney, F. Vollrath, *Fibrous Proteins: Amyloids, Prions and Beta-Proteins* **2006**, 73, 17–53.
- [58] F. Vollrath, D. P. Knight, X. W. Hu, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1998**, 265, 817–820.
- [59] D. P. Knight, F. Vollrath, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1999**, 266, 519–523.
- [60] J. Palmer, F. Coyle, F. Harrison, *J. Morphol.* **1982**, 174, 269–274.
- [61] N. Kojic, M. Kojic, S. Gudlavalleti, G. McKinley, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1698–1707.
- [62] H. J. Jin, D. L. Kaplan, *Nature* **2003**, 424, 1057–1061.
- [63] J. D. van Beek, S. Hess, F. Vollrath, B. H. Meier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 10266–10271.
- [64] J. H. Exler, D. Hummerich, T. Scheibel, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 3629–3632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3559–3562.
- [65] S. Rammensee, U. Slotta, T. Scheibel, A. R. Bausch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 6590–6595.
- [66] M. G. Cacace, E. M. Landau, J. J. Ramsden, *Q. Rev. Biophys.* **1997**, 30, 241–277.
- [67] U. Slotta, S. Rammensee, S. Gorb, T. Scheibel, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 4668–4670; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4592–4594.
- [68] J. P. Zbilut, T. Scheibel, D. Huemmerich, C. L. Webber, M. Colafranceschi, A. Giuliani, *ApPhA* **2006**, 82, 243–251.
- [69] S. Islam, C. Karatzas, A. Rodenhiser, A. Alwattari, Y. Huang, C. Turcotte (Nexia Biotechnologies Inc.), US2004/0102614A1, **2004**.
- [70] J. A. Kluge, U. Rabotyagova, G. G. Leisk, D. L. Kaplan, *Trends Biotechnol.* **2008**, 26, 244–251.
- [71] Q. X. Ruan, P. Zhou, B. W. Hu, D. Ji, *FEBS J.* **2008**, 275, 219–232.
- [72] C. W. P. Foo, E. Bini, J. Huang, S. Y. Lee, D. L. Kaplan, *ApPhA* **2006**, 82, 193–203.
- [73] C. Viney, A. E. Huber, D. L. Dunaway, K. Kerkam, S. T. Case in *Silk Polymers. Materials Science and Biotechnology* (Hrsg.: D. L. Kaplan, W. W. Adams, B. Farmer, C. Viney), American Chemical Society, Washington DC, **1994**, S. 120–136.
- [74] D. P. Knight, M. M. Knight, F. Vollrath, *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, 27, 205–210.
- [75] M. Barón, *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 845–895.
- [76] C. Holland, A. E. Terry, D. Porter, F. Vollrath, *Polymer* **2007**, 48, 3388–3392.
- [77] P. J. Willcox, S. P. Gido, W. Muller, D. L. Kaplan, *Macromolecules* **1996**, 29, 5106–5110.
- [78] C. Riekel, F. Vollrath, *Int. J. Biol. Macromol.* **2001**, 29, 203–210.
- [79] Y. Liu, Z. Z. Shao, F. Vollrath, *Chem. Commun.* **2005**, 2489–2491.
- [80] N. Kojic, J. Bico, C. Clasen, G. H. McKinley, *J. Exp. Biol.* **2006**, 209, 4355–4362.
- [81] X. Chen, D. P. Knight, F. Vollrath, *Biomacromolecules* **2002**, 3, 644–648.
- [82] D. O. Olagunju, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* **1999**, 87, 27–46.
- [83] A. Tripathi, K. C. Tam, G. H. McKinley, *Macromolecules* **2006**, 39, 1981–1999.
- [84] R. W. Work, *J. Exp. Biol.* **1985**, 118, 379–404.
- [85] F. Vollrath, B. Madsen, Z. Z. Shao, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **2001**, 268, 2339–2346.
- [86] C. S. Ortlepp, J. M. Gosline, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 727–731.
- [87] J. Perez-Rigueiro, M. Elices, G. Plaza, J. I. Real, G. V. Guinea, *J. Exp. Biol.* **2005**, 208, 2633–2639.
- [88] F. Vollrath, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 24, 81–88.
- [89] F. Vollrath, D. Porter, *ApPhA* **2006**, 82, 205–212.
- [90] B. Madsen, Z. Z. Shao, F. Vollrath, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 24, 301–306.
- [91] D. B. Zax, D. E. Armanios, S. Horak, C. Malowniak, Z. T. Yang, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 732–738.
- [92] M. A. Garrido, M. Elices, C. Viney, J. Perez-Rigueiro, *Polymer* **2002**, 43, 4495–4502.
- [93] J. G. Hardy, L. Roemer, T. Scheibel, *Polymer* **2008**, 49, 4309–4327.
- [94] C. Viney in *Structural Biological Materials: Design and Structure-Property Relationships, Vol. 10* (Hrsg.: M. Elices), American Chemical Society, Washington, DC, **2000**, S. 295–333.
- [95] F. Vollrath, D. P. Knight, WO 01/38614A1, **1999**.
- [96] T. Scheibel, D. Hummerich (Technische Universität München), WO 2007/031301A3, **2007**.
- [97] A. Seidel, O. Liivak, S. Calve, J. Adaska, G. D. Ji, Z. T. Yang, D. Grubb, D. B. Zax, L. W. Jelinski, *Macromolecules* **2000**, 33, 775–780.
- [98] F. N. Braun, C. Viney, *Int. J. Biol. Macromol.* **2003**, 32, 59–65.
- [99] E. Bini, D. P. Knight, D. L. Kaplan, *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 27–40.
- [100] X. Y. Hu, J. Yuan, X. D. Wang, K. Vasanthavada, A. M. Falick, P. R. Jones, C. La Mattina, C. A. Viera, *Biochemistry* **2007**, 46, 3294–3303.
- [101] J. M. Gosline, *J. Exp. Biol.* **1999**, 202, 3295–3303.
- [102] <http://www.polymerprocessing.com/polymers/PA66.html>.
- [103] [http://www2.dupont.com/Kevlar/en\\_US/index.html](http://www2.dupont.com/Kevlar/en_US/index.html).