

Der molekulare Mechanismus der Bildung von Spinnenseide**

Robert Silvers, Florian Buhr und Harald Schwalbe*

Faserproteine · NMR-Spektroskopie · Röntgenbeugung · Proteinstrukturen · Spinnenseide

Spinnenseide, eines der außergewöhnlichsten Biomaterialien, bildet eine Faser von enormer Stabilität, die mechanisch stabiler als Stahl ist, wenn man das geringere Gewicht der Spinnenseide berücksichtigt. Ein Faden aus Spinnenseide, einmal um den Äquator gewinkelt, würde nicht mehr als 500 Gramm wiegen.^[1] Spinnenseide der Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus*) enthält ein Polypeptid, das aus einer so genannten AQ-Wiederholungssequenz aufgebaut ist, die Zusammensetzung ist hoch repetitiv (low-complexity sequence). A steht für ein hydrophobes Polyalaninsequenzmotiv (GPYGPGASA₆GGYGPGSGQQ) und Q für ein hydrophiles, Glutamin- und Glycin-reiches Sequenzmotiv (GPGQQ)₄. Diese Wiederholungssequenz stellt den zentralen Teil der Faser dar, und ihre Funktion erinnert an die Funktion der Wiederholungssequenzen im Kollagen. Zwölf AQ-Sequenzen werden von einem Sekretionssignal sowie nichtrepetitiven (NR) N- und C-terminalen Domänen flankiert. Beide dieser Domänen übernehmen vielfältige Funktionen; so kontrollieren sie Löslichkeit und die Bildung der Faser.^[2]

Wie aber resultieren aus den verschiedenen Strukturelementen die bemerkenswerten Eigenschaften der Spinnenseide? Was ist die molekulare Grundlage für die Bildung von Spinnenseide? Wie kann die Seide von einer löslichen, im Lumen gespeicherten Form in eine unlösliche Faser mit bemerkenswerten mechanischen Eigenschaften umgewandelt werden? In einer vor kurzem in *Nature* erschienenen Arbeit haben die Arbeitsgruppen von Kessler und Scheibel wichtige neue Erkenntnisse veröffentlicht, die dabei helfen, die oben aufgeworfenen Fragen mithilfe sehr genauer biophysikalischer Untersuchungen zu beantworten.^[3] Insbesondere konnten die Forscher die NMR-Struktur der C-terminalen nichtrepetitiven Domäne von Fibroin 3 aus *Araneus diadematus* (ADF-3) in Lösung aufklären (Abbildung 1). Zwei

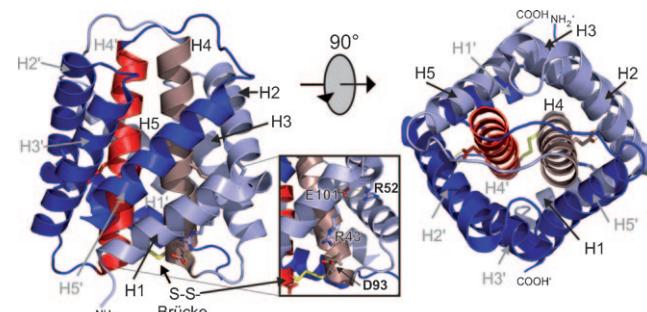


Abbildung 1. NMR-Struktur der C-terminalen NR-Domäne von *Araneus diadematus*-Fibroin 3. Sekundärstrukturelemente sind mit H1–H5 und H1'–H5' bezeichnet. (PDB-ID: 2khn, erstellt mit Pymol).

NR-Domänen bilden eine dimere, hoch symmetrische Struktur. Diese Struktur stellt einen neuen Faltungstyp (new fold) dar, der wie eine fassartige Struktur aussieht, die zwei durch eine Disulfidbrücke verknüpfte Helices einschließt. Das Fass wird weiterhin durch Salzbrücken stabilisiert, die die Helices 1 (H1) und 2 (H2) auf einer Seite der Helix 4 (H4) fixieren. H1 der Polypeptidkette des ersten Monomers ist darüber hinaus wie eine Klammer mit H5' der Kette des zweiten Monomers verzahnt. Die fassartige Struktur des Proteins bewirkt, dass sich hydrophobe Aminosäurereste im Inneren der Struktur befinden, während die hydrophilen Reste zum Lösungsmittel zeigen und so die Löslichkeit des Proteins gewährleisten.

In der gleichen *Nature*-Ausgabe^[4] haben die Gruppen von Johannson und Knight die Röntgenkristallstruktur der N-terminalen NR-Domäne des so genannten „major ampullate spidroin 1“ (MaSp1) aus *Euprosthenops australis* bestimmt und die Funktion dieser Domäne durch minutiose Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Seidenfaserbildung aufgeklärt (Abbildung 2). Ganz wie die C-terminale NR-Domäne bilden auch zwei N-terminale NR-Domänen eine symmetrische homodimere Struktur mit zwei zentralen Helices (H3 und H3'). Die Kontaktflächen der beiden Monomere in der dimeren Struktur sind sehr hydrophob; die Reste in diesen Kontaktflächen sind für alle Spidroinproteine hoch konserviert. Die konservierte Sequenz AxxxAxASS (Reste 68–76 in H3) ist deshalb so wichtig für die Stabilität des Dimers, da sie die enge Packung der Helices H3 und H3' sicherstellt. Zwei Arten von geladenen Aminosäureresten (basisch und sauer) findet man jeweils in einem spezifischen Bereich in jedem

[*] R. Silvers, F. Buhr, Prof. Dr. H. Schwalbe

Institut für Organische Chemie und chemische Biologie
Biomolekulares Magnetresonanz Zentrum
Johann Wolfgang Goethe-Universität
60438 Frankfurt (Deutschland)
Fax: (+ 49) 69-798-29515
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

[**] Unsere Arbeit wird gefördert vom DFG Cluster of Excellence: Macromolecular Complexes. R.S. wird von der Stiftung Polytechnische Gesellschaft und F.B. vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

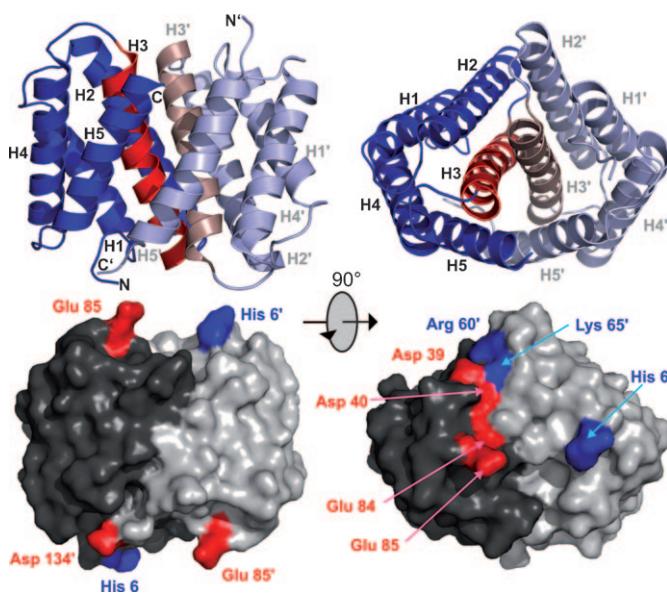


Abbildung 2. Röntgenkristallstruktur der N-terminalen NR-Domäne von MaSp1 aus *Euprosthenops australis*. Sekundärstrukturelemente sind mit H1–H5 und H1'–H5' bezeichnet (PDB-ID: 3LR2, erstellt mit Pymol).

Monomer, weshalb das Protein Dipol-Eigenschaften hat. Die Reste His6, Arg60 und Lys65 sowie Asp39, Asp40, Glu84, Glu85 und Asp134 sind auf gegenüberliegenden Seiten jedes Monomers positioniert, sodass die Monomerdipole sich in entgegengesetzter Orientierung befinden.

Scheibel, Kessler et al. können für die C-terminale Domäne nachweisen, dass sich Helix 1 und der Bereich um die Salzbrücken nach Zugabe chemischer Denaturierungsagentien zunächst lokal entfalten. Interessanterweise ist die Hydrophobie der C-terminalen NR-Domäne gerade in einem solchen partiell entfalteten Intermediat am stärksten ausgeprägt, was auf seine Rolle als Templat für Aggregation und Faserbildung schließen lässt. Sowohl pH- als auch hochsalzinduzierte Entfaltung des Proteins führen zur Bildung eines so genannten „Molten-globule“-Zustands, wie man durch Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Bindung von ANS (8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure) nachweisen kann; in einem solchen „Molten-globule“-Zustand kann typischerweise keine persistente stabile Packung von Helices beobachtet werden.

Für die N-terminalen NR-Domäne untersuchten Johansson, Knight et al. die pH-Abhängigkeit der Selbstorganisation. Diese Experimente wurden an so genannten Minispidroinen, also rekombinant hergestellten Konstrukten mit vier repetitiven Einheiten zusammen mit entweder der N-terminalen oder der C-terminalen Domäne oder beiden Domänen, untersucht. Für Konstrukte, die die N-terminalen Spidroindomäne enthalten, verläuft die Bildung makroskopisch beobachtbarer Fasern bei pH 6 stark beschleunigt, wogegen sowohl niedrigere als auch höhere pH-Werte wie auch hohe Salzkonzentrationen die Faserbildung hemmen. Diese Effekte sind reversibel und werden auch schon für die isolierten Dimere der N-terminalen Domäne beobachtet. Diese Beobachtung lässt uns vermuten, dass die hoch konservierten geladenen und titrierbaren Reste an der Oberfläche dieser Domäne eine wichtige Rolle bei der Faserbildung spielen.

Während die C-terminale Domäne vorhanden sein muss, um kontinuierliche Seidenfasern und nicht amorphe Aggregate zu bilden, reagiert die N-terminalen Domäne auf unterschiedliche pH-Werte und scheint so die Faserbildung in vivo zu regulieren.

Die Strukturbioologie der Spinnenseide hat aber noch mehr Facetten: Die Proteine der Spinnenseide werden in Drüsen der Spinne zunächst synthetisiert und anschließend als sehr dichte, oligomere, selbstorganisierte Micellenstruktur gespeichert, wobei sie eine Mikroemulsion bilden. Jede dieser Micellen besteht aus vielen Spinnenseidenproteinen und wird durch die erstaunlichen Eigenschaften der N- und C-terminalen NR-Domänen stabilisiert. Die Bildung der selbstorganisierten Micelle ist vollständig reversibel, und die Micellen bilden ein isotropes sphärisches Teilchen (Abbildung 3). In der Spinne wird nun die Faserbildung nicht nur durch eine Änderung der chemischen Umgebung beeinflusst, sondern beruht auch auf der Änderung der mechanischen Kräfte in einer besonderen Synergie zwischen mikroskopischen und makroskopischen Effekten (Abbildungen 3 und 4). Um deshalb die spezifischen Eigenschaften der Polypeptidkette zu verstehen, die zur Faserbildung führen, muss man sich auch die mechanischen Aspekte des Extrudierens des micellaren supramolekularen Komplexes vor Augen führen: Unter Anwendung von Scherkräften, Ausschluss von Wasser und Austausch der ionischen Umgebung wird die Bildung der Spinnenfaser ausgelöst. Die C-terminale Domäne spielt dabei eine wichtige Rolle, denn Polypeptide, die nur die AQ-repetitiven Strukturen enthalten, ändern ihre Viskosität bei Anwendung von Scherkräften nicht. Im Unterschied dazu bildet das Vollängenpeptid bei Anwendung von Scherkräften einen „Molten-globule“-Zustand, sodass nur dann definierte fibrilläre Aggregate mithilfe polarisierter FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden können, wenn das Polypeptid die C-terminalen NR-Domäne enthält.

Es lässt sich festhalten, dass die Spinne ein sehr spezielles Protein synthetisiert, um Seide herzustellen. Dieses Protein ist eine Fusion aus einem amphiphatischen peptidischen Blockcopolymer und zwei dimeren α -helicalen Fassstrukturen. Diese Spinnenproteine bilden in der Drüse der Spinne eine supramolekulare, selbstorganisierte Mikroemulsion. Beim Extrudieren des Proteins aus den Drüsen erzeugt die Spinne starke Scherkräfte. Beim Extrudervorgang wird das Protein dehydratisiert, was zur teilweisen Entfaltung der C-terminalen Fassstruktur führt. Bei dieser partiellen Entfaltung werden hydrophobe Reste zugänglich. Dies bewirkt auf makroskopischer Ebene eine Veränderung der Form der Mikroemulsion. Aufgrund dieser makroskopischen Änderung wird eine spezifische Polymerisation in Gang gesetzt, die zur Spinnenfaser mit ihren bemerkenswerten mechanischen Eigenschaften führt.

Die vorgestellten Untersuchungen werfen eine Reihe von interessanten Fragen jenseits der Frage auf, wie denn nun Spinnen ihre Beute umgarnen. Der Konformationsübergang eines gut löslichen supramolekularen, als Micelle in den Drüsen von Spinnen gespeicherten Komplexes zu einer Faser trägt zur Aufklärung auch allgemeiner Fragen zu den Eigenschaften von Proteinen bei. Bei einer Proteininfektion wird häufig die Bildung von Proteinfibrillen beobachtet, die

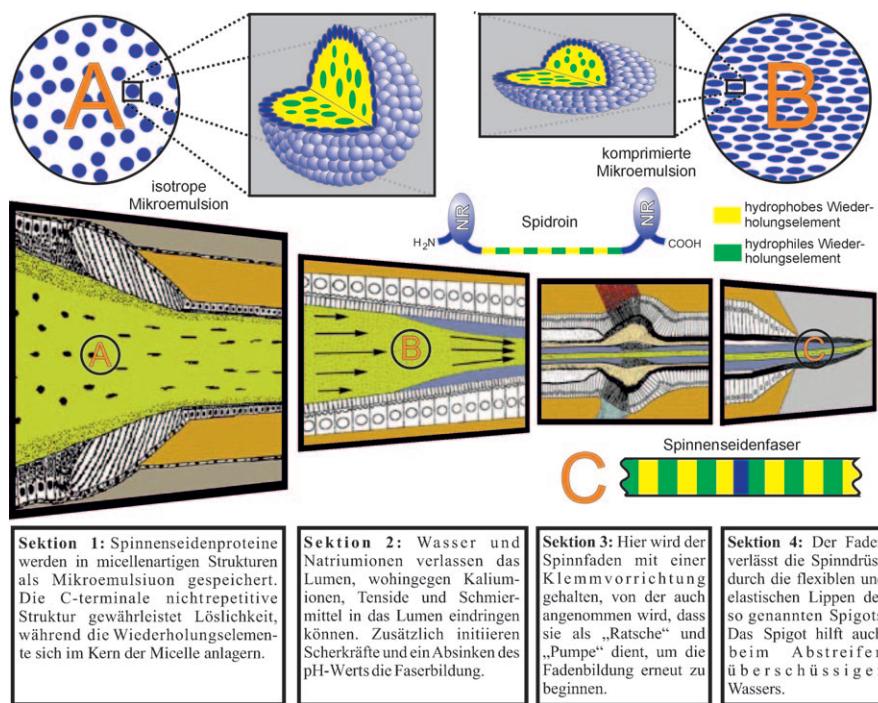


Abbildung 3: Makroskopische Vorgänge in der Spinndrüse einer Spinne. Verändert mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. 2001.^[5]

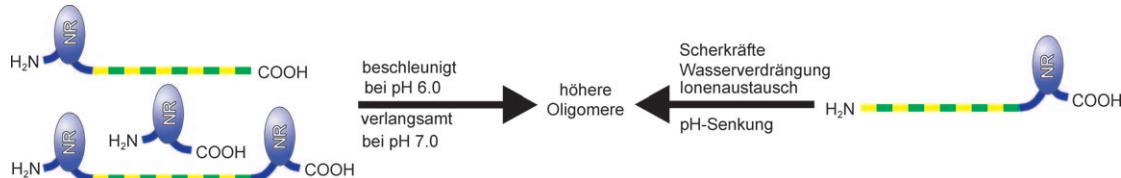


Abbildung 4: Mikroskopische Vorgänge verschiedener Proteinkonstrukte in der Spinndrüse einer Spinne. In Gegenwart der N-terminalen Spindrin-domäne ist die Zusammenlagerung in makroskopische Strukturen bei pH 6.0 stark beschleunigt, wogegen die Zusammenlagerung bei hohen oder niedrigen pH-Werten und hohen Salzkonzentrationen inhibiert wird. All diese Effekte sind reversibel und konnten auch für isolierte dimere N-terminale Domänen nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die hoch konservierten, titrierbaren Oberflächenreste eine wichtige Rolle bei der Zusammenlagerung spielen.

zu tödlichen Konsequenzen bei Krankheiten führt, die durch derartige Proteinfaltungen ausgelöst werden. Andererseits nutzt die Natur aber eine solche Fibrillenbildung offensichtlich auch dann, wenn sie die stabilsten Materialien herstellen will, die man aus Aminosäuren überhaupt herstellen kann. Wirken die N- und die C-terminalen Domänen kooperativ oder reagieren sie auf chemische Umweltbedingungen unterschiedlich? Und wie wird bei der supramolekularen Faserbildung sichergestellt, dass sich einzelne Stränge zu einem Faden zusammenfinden, der meterlang sein kann?

Schließlich stellt sich auch die Frage, wie nur einige wenige Seidendrüsen eine große Zahl unterschiedlicher Fadentypen mit sehr unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften herstellen können.^[4] Eine typische Spinne der Familie *Araneidae* zum Beispiel hat sieben verschiedene, hoch spezialisierte Drüsen, die sehr unterschiedliches Fadenmaterial für vielfältige Aufgaben herstellen können. Dabei wird die Qualität der Seide mithilfe unterschiedlicher Bedingungen bei der Seidenherstellung und durch sehr subtile Unterschiede in den Umweltbedingungen variiert; hierzu zählt auch die Zusammensetzung der Spinnennahrung. Die Eigenschaften eines Seidenfadens beruhen letztlich auf der

Aminosäuresequenz und wie aus ihr in speziellen Spinndrüsen ein Faden produziert wird. Deshalb bleibt auch nach diesen beiden Publikationen die Frage offen, wie das Wechselspiel verschiedener Seidenkomponenten zu einem spezifischen Seidenfaden führt.

Eingegangen am 19. Mai 2010
Online veröffentlicht am 28. Juni 2010

Hinweis: An diesem Manuscript wurden seit seiner Veröffentlichung als Early View geringfügige Veränderungen vorgenommen. Die Redaktion.

- [1] a) M. Heim, D. Keerl, T. Scheibel, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3638–3650; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3584–3596; b) Z. Shao, F. Vollrath, *Nature* **2002**, *418*, 741.
- [2] L. Eisoldt, J. G. Hardy, M. Heim, T. R. Scheibel, *J. Struct. Biol.* **2010**, *170*, 413–419.
- [3] F. Hagn, L. Eisoldt, J. G. Hardy, C. Vendrely, M. Coles, T. Scheibel, H. Kessler, *Nature* **2010**, *465*, 239.
- [4] G. Askarieh, M. Hedhammar, K. Nordling, A. Saenz, C. Casals, A. Rising, J. Johansson, S. D. Knight, *Nature* **2010**, *465*, 236.
- [5] F. Vollrath, D. P. Knight, *Nature* **2001**, *410*, 541.