

**Funktion und Einfluss der nicht-repetitiven, terminalen
Domänen auf Speicherung und Assemblierung von
Spinnenseidenproteinen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

- Doktor der Naturwissenschaften -

im Promotionsprogramm „Molekulare Biowissenschaften“ der
Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften
(BayNAT)

Lukas Eisoldt

Molekulare Biotechnologie (Master of Science)

Bayreuth 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2008 bis Januar 2013 in Bayreuth am Lehrstuhl Biomaterialien unter Betreuung von Professor Dr. Thomas Scheibel angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat).

Dissertation eingereicht am:	05.06.2013
Zulassung durch das Leitungsgremium:	10.06.2013
Wissenschaftliches Kolloquium:	24.09.2013

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prüfungsausschuss:

Prof. Thomas Scheibel	(Erstgutachter)
Prof. Franz Xaver Schmid	(Zweitgutachter)
Prof. Olaf Stemmann	(Vorsitz)
PD Dr. Stephan Schwarzinger	

Für Tina

Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Kurzfassung der Arbeit	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
1.1 Seiden.....	5
1.2 Spinnenseiden	5
1.3 Aufbau von Spinnenseidenproteinen	8
1.4 Die terminalen Domänen	11
1.5 Major Ampullate Seide	13
1.5.1 Die Proteine der MA-Seide.....	13
1.5.2 Struktur der repetitiven Kerndomäne.....	15
1.5.3 Die terminalen Domänen von MaSp-Proteinen	16
1.5.3.1 Die Struktur der aminoterminalen (NT) Domäne.....	17
1.5.4 Nano- und Mikrostrukturierung der MA-Faser.....	19
1.5.5 Der natürliche Spinnprozess	20
1.6 Rekombinante Spinnenseidenproteine.....	22
1.7 Assemblierungseigenschaften von rekombinanten Spinnenseidenproteinen	23
1.7.1 Fasern aus rekombinanter Seide.....	23
1.8 Zielsetzung.....	25
2. Synopsis	27
2.1 Übersicht der verwendeten Proteine	27
2.2 Die NR3-Domäne	28
2.2.1 Lösungsstruktur der NR3-Domäne	28
2.2.2 Einfluss von Salz und Scherkräfte auf das NR3-Dimer.....	30
2.2.3 Zusammenfassung: NR3-Domäne	31
2.3 Einfluss von NR3 auf das Lösungsverhalten von eADF3((AQ) _n) Proteinen	31
2.3.1 Bildung von supramolekularen Assemblaten.....	31

2.3.2 Einfluss der NR3-Domäne auf phosphatinduzierte Aggregation von Seidenproteinen	32
2.3.3 Einfluss von Scherkräften auf die Assemblierung von eADF3-Proteinen mit NR3-Domäne	34
2.3.4 Modell zum Einfluss der NR3-Domäne während des Spinnprozesses.....	37
2.4 Heterodimerisierung von NR3-NR4-Konstrukten.....	38
2.4.1 Bildung des Heterodimers.....	38
2.4.2 Assemblierungseigenschaften des Heterodimers.....	39
2.4.3 Assemblierungsmorphologien der Homodimere im Vergleich zum Heterodimer	39
2.4.4. Bedeutung des Heterodimers	40
2.5 Der Einfluss der terminalen Domänen auf die Orientierung der repetitiven Kerndomäne von rekombinanten Spinnenseidenproteinen	41
2.5.1 pH-abhängige Untersuchung der N1- und N1L-Proteine mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie	42
2.5.2 SEC-MALS-Analyse der N1- und N1L-Proteine	44
2.6 Modell des natürlichen Spinnprozesses.....	45
3. Literaturverzeichnis.....	48
4. Publikationsliste.....	56
5. Darstellung des Eigenanteils	57
6. Teilarbeiten	58
Teilarbeit I	58
Teilarbeit II	73
Teilarbeit III.....	82
Teilarbeit IV	103
Teilarbeit V.....	111
Rechtliches	120
Anhang	121
Danksagung.....	124

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ordnungen, Unterordnungen, Familien und Arten von Webspinnen.....	6
Abbildung 2: Die verschiedenen Seidenarten eines Radnetzspinne	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der zwei Spidroinklassen	8
Abbildung 4: Vergleich der repetitiven Sequenzen der verschiedenen Spidroin Arten.	10
Abbildung 5: Vergleich der Homologie terminaler Sequenzen von verschiedenen Spidroinarten und Spezies.....	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung von MaSp-Proteinen und Sequenzvergleich repetitiver Blöcke von MaSp 1 und 2 Spidroinen.....	14
Abbildung 7: Sequenzvergleich der amino- und carboxyterminalen Domänen von MA-Proteinen	17
Abbildung 8: Struktur der aminoterminalen Domäne von MaSp1 aus <i>E. australis</i>	18
Abbildung 9: Nano- und Mikrostrukturierung der MA-Faser	19
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Spinnapparats.....	21
Abbildung 11: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine	27
Abbildung 12: Lösungsstruktur von NR3.....	29
Abbildung 13: Phosphationen induzierte Aggregation von eADF3-Proteinen.	33
Abbildung 14: Untersuchung scherkraftinduzierter Assemblate von eADF3((AQ) ₂₄) und eADF3((AQ) ₁₂ NR3) mittels Lichtmikroskopie.....	35
Abbildung 15: Polarisierte FTIR Messungen an scherkraftinduzierten Assemblaten von eADF3((AQ) ₂₄) und eADF3((AQ) ₁₂ NR3)	36
Abbildung 16: Einfluss der NR-Domäne auf die Assemblierung von Spinnenseidenproteinen.....	37
Abbildung 17: AFM-Aufnahmen der drei dimeren Spezies.....	40
Abbildung 18: Molekulares Modell des Spinnprozesses innerhalb der MA-Drüse	46
Abbildung 20: pH-abhängige Fluoreszenzmessungen von N1-Proteinen.	43
Abbildung 21: SEC-MALS Analyse von N1-eADF3 und N1-eADF3-NR3 Proteinen in Abhängigkeit vom pH-Wert.	44

Tabelle 1: Vergleich der mechanischen Eigenschaften von ausgewählten Spinnenseidenfasern und synthetischen Fasermaterialien.....	7
Tabelle2: Übersicht der Sequenzmotive der repetitiven Einheiten von MA-, MI- und Flagelliform-spidroinen	9
Tabelle 3: Übersicht der häufigsten Aminosäuren in den einzelnen Spidroinsequenzen.....	9
Tabelle 4: Mechanische Werte von Fasern auf Basis von rekombinanten Spinnenseidenproteinen im Vergleich mit natürlicher MA-Seide.....	24

Abkürzungsverzeichnis

ADF	<i>Araneus diadematus</i> fibroin
AFM	Atomic force microscopy
CD	Circular Dichroismus
CTD	<u>C</u> arboxyterminale <u>D</u> omäne
DLS	Dynamische Lichtstreuung
eADF	<i>engineered</i> ADF
FPLC	<i>fast liquid chromatography</i>
FTIR	Fourier Transform Infrarot
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
MaSp	<i>Major Ampullate</i> Spidroin
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NTD	<u>A</u> minoterminale <u>D</u> omäne
ppm	parts per million
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
MALDI-MS	<i>Matrix-assisted</i> Laser Desorption/Ionization Massenspektrometrie
MALS	<i>multi angle light scattering</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

Kurzfassung der Arbeit

Weibliche Radnetzspinnen sind in der Lage bis zu sechs verschiedene Spinnenseidenfasern mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften herzustellen, die denen von synthetischen Hochleistungsfasern wie Kevlar oder Hochleistungsstahl zum Teil überlegen sind. Die am besten untersuchte Spinnenseide ist diejenige, die für die Speichen, den Rahmen sowie als Abseilfaden verwendet wird. Sie wird als *dragline*-Seide bezeichnet und ist hauptsächlich aus zwei Proteinklassen aufgebaut, die als MaSp1 und MaSp2 (*Major Ampullate Spidroin*) bezeichnet werden. Die mehrere hundert Kilodalton großen Spidroine bestehen im Wesentlichen aus einer repetitiven, strukturell ungeordneten Kerndomäne, die von relativ kleinen, ca. 100-140 Aminosäuren langen nicht-repetitiven, globulären Domänen flankiert ist. Das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen MaSp1 und 2 ist der Prolingehalt der repetitiven Sequenzen wobei in MaSp2 viel (>10%) und MaSp1 (<0,4%) wenig Prolin enthalten sind. In der *dragline* Seide der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* sind zwei Spidroine, genannt ADF3 und 4, mit einem hohen Prolingehalt identifiziert worden, die beide deshalb zur Klasse der MaSp2-Proteine gehören. Die nicht-repetitiven terminalen Domänen sind globulär gefaltet und die Sequenzen sind über verschiedene Seidenarten und Spezies stark konserviert.

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der nicht-repetitiven amino- (NTD) und carboxyterminalen (CTD) Domänen auf das Lösungs- und Assemblierungsverhalten von rekombinanten Spinnenseidenproteinen auf Basis von ADF3 und 4 zu untersuchen. Der Fokus lag dabei zunächst auf der carboxyterminalen Domäne NR3 des Spinnenseidenproteins ADF3 aus *A. diadematus*. Die Struktur der Domäne wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Franz Hagn (AG Kessler – TU München) mit Hilfe von NMR gelöst. Es bildet in Lösung ein parallel orientiertes, mittels Disulfidbrücke kovalent verknüpftes Dimer aus, zu dessen Struktur bisher keine Homologen bekannt sind. Es konnte gezeigt werden, dass die NR3-Domäne in Lösung die Bildung von sphärischen mizellartigen Assemblaten vermittelt, wie sie auch im natürlichen Spintrakt beobachtet wurden. Eine weitere wichtige Rolle konnte bei der scherkraft-induzierten Assemblierung beobachtet werden, wo nur eADF3-Proteine mit der NR3-Domäne in der Lage sind ausgerichtete Faserbündel auszubilden.

In einem weiteren Projektteil wurde die Interaktion zwischen rekombinanten Varianten von ADF3 und 4 untersucht, da beide Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in der Spinne in den gleichen Zellen produziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch Co-Expression der entsprechenden Gene von eADF3-NR3 und eADF4-NR4 in *E. coli* ein

NR3-NR4 vermitteltes Heterodimer entsteht. Dieses Heterodimer besitzt eine vergleichbare strukturelle Integrität wie die entsprechenden Homodimere. Das durch Phosphationen induzierte Assemblierungsverhalten des Heterodimers unterscheidet sich signifikant von dem der Homodimere. Während eADF3-NR3 sphärische Assemblate bildet und eADF4-NR4 mehrere hundert Nanometer lange Fibrillen, wie sie in ähnlicher Form in den natürlichen Fasern beobachtet wurden, lagert sich das Heterodimer zu einem Netzwerk aus im Vergleich dünneren und weniger langen Fibrillen zusammen. Diese Entdeckung ist unter Umständen wichtig für das Verständnis des natürlichen Spinnprozesses. Aus biotechnologischer Sicht stellt die quantitative Verknüpfung von Spinnenseidenproteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften über die carboxyterminalen Domänen einen interessanten Ansatz zur Generierung von neuen Materialien mit einstellbaren Eigenschaften dar.

Letztendlich wurden rekombinante eADF3 Spinnenseidenproteine, die sowohl amino- als auch carboxyterminale Domänen aufwiesen, näher charakterisiert. Die isolierte aminoterminal Domäne bildet bei Senkung des pH-Wertes von 7 auf 6 ein antiparalleles Dimer aus. Es konnte gezeigt werden, dass NTD-eADF3-Proteine, die nur die aminoterminal Domäne N1 enthielten, ebenfalls pH-abhängig Dimere bilden. Bei eADF3-Proteinen mit beiden terminalen Domänen, die per se als CTD-vermitteltes kovalentes Dimer vorliegen, ist die Ausbildung eines aminoterminal vermittelten intermolekularen Dimers-vom-Dimer hingegen nur schwach ausgebildet. Weitere Experimente deuten jedoch darauf hin, dass die NTD in einem intramolekularen Dimer vorliegen. Die Ergebnisse zeigen, dass die CTD einen starken Einfluss auf die Ausrichtung der repetitiven Kerndomäne hat und somit auch die NTD vermittelte intermolekulare Dimerisierung beeinflussen kann.

Die Erkenntnisse wurden verwendet um ein Modell über die molekularen Abläufe während des Spinnprozesses zu erstellen, das sowohl die Speicherung der Proteine als auch die Assemblierung mit einschließt.

Abstract

Female orb weaving spiders are able to produce up to six different silk types each with different mechanical properties rivaling many man-made high performance fibers like Kevlar or steel. The best investigated silk type is the so-called dragline silk which is used for the frame and radii of an orb web, as well as for a life line. Dragline silk comprises two protein classes named MaSp1 and 2 (Major Ampullate Spidroin). Spidroins are usually several hundred kilodalton in size and consist of a large repetitive core domain being flanked by 100-140 amino acid long non-repetitive domains. The main difference between both MaSp protein classes is their proline content with MaSp2 showing a high abundance (>10%) and MaSp1 a low one (<0.4%). The dragline silk of the European garden spider *Araneus diadematus* show two MaSp2 proteins, named ADF3 and 4 (*A. diadematus* Fibroin). The small and globular non repetitive terminal domains show high sequence conservation between different silk types and species.

The aim of this work was to investigate the role of the non-repetitive aminoterminal (NTD) and carboxyterminal (CTD) domains during storage and assembly of recombinant spider silk proteins based on ADF3 and 4. First experiments focused on the non-repetitive carboxyterminal domain NR3 from ADF3. The structure of this protein was solved using NMR techniques in cooperation with Dr. Franz Hagn (AG Kessler, TU München). NR3 forms a parallel dimer, covalently linked by a disulfide bond and with no known structural homologues. It could be shown that NR3 influences eADF3 proteins (engineered ADF3) in solution as well as during assembly. In solution it mediates the formation of spherical, micelle-like assemblies which were also observed in the natural spinning gland during storage of the proteins. It was also shown that upon exposure to shear forces also occurring during the natural spinning process, eADF3 proteins bearing the NR3 domain are able to form well aligned fiber bundles.

Another part of this work dealt with interactions between recombinant variants of ADF3 and 4, since both proteins are probably produced within the same cells inside the spider's spinning gland. The work focused primarily on the highly homologous CTDs NR3 and NR4. It could be shown that upon coexpression of eADF3-NR3 and eADF4-NR4 genes in *E. coli* an NR3-NR4 mediated heterodimer was formed. The structural integrity of the heterodimer was comparable to that of the respective homodimers. When assembly was induced upon addition of phosphate ions, the morphologies of the heterodimer differed significantly from that of the two homodimers. While eADF3-NR3 formed spherical as-

semblates, eADF4-NR4 formed fibrils with several hundred nanometers in length, whereas the heterodimer formed a small-meshed network consisting of in comparison shorter and thinner branched fibrils. The ability to combine silk proteins with different properties via the carboxyterminal domains constitutes a simple and convenient way to produce novel materials with tunable properties.

Finally recombinant eADF3 proteins bearing both the amino- and carboxyterminal domain were characterized. Upon acidification from pH 7 to 6, which was also observed in the natural spinning duct, the isolated NTD forms an antiparallel dimer. It could be shown that NTD-eADF3 proteins also form dimers upon acidification. However, NTD-eADF-CTD proteins, which are present as covalently linked dimers via their CTDs, do not show the formation of pH-induced intermolecular tetramers. Further experiments confirmed that the NTD in those proteins rather formed intramolecular dimers showing a strong influence of the CTD on the orientation of the repetitive core domain.

The findings were used to generate a model for the molecular mechanisms that occur during storage and assembly of the spider silk proteins in the natural spinning process.

1. Einleitung

1.1 Seiden

Umgangssprachlich beschreibt der Begriff „Seide“ häufig die Fasern, die aus dem Kokon des Seidenspinners *Bombyx mori* stammen und in industriellen Prozessen zu Textilstoffen verarbeitet werden. Diese Fasern bestehen hauptsächlich aus Proteinen mit einem speziellen Aufbau, der in ähnlicher Form auch in Fasern anderer Tierarten zu finden ist, weshalb der Begriff Seide aus evolutionsbiologischer Sicht weiter gefasst werden kann. Laut einer treffenden Definition von Catherine Craig aus dem Jahr 1997 sind Seiden faserartige Proteine mit einer hochrepetitiven Aminosäuresequenz, die in flüssigen Zustand gespeichert und durch Scherung oder Verspinnen zu einer Faser werden [1]. Sie werden ausschließlich von den zu den Gliederfüßern (*Arthropoda*) gehörenden Klassen der Insekten (*Insecta*), Tausendfüßer (*Myriapoda*) sowie der Spinnentiere (*Arachnida*) in speziellen Drüsen für die unterschiedlichsten Zwecke gebildet [1].

1.2 Spinnenseiden

Die zur Klasse der Spinnentiere gehörende Ordnung der Webspinnen (*Araneae*) umfasst drei Unterordnungen mit insgesamt ca. 43000 Spezies in 111 Familien [2], wobei die artreichste Unterordnung die Echten Webspinnen (*Araneomorphae*) darstellen (Abbildung 1).

Während alle Spezies mindestens ihren Nachwuchs mittels eines Seidenkokons schützen, nutzen die zur Superfamilie der Netzspinnen (*Araneoidae*) gehörenden Arten die Seiden um Netze für den Beutefang bzw. als Lebensraum zu konstruieren. Bekannte netzbauende Familien sind die Baldachin- (*Linyphiidae*) und Haubennetzspinnen (*Theridiidae*) sowie die Echten Radnetzspinnen (*Araneidae*), welche zusammen etwa ein Viertel aller bekannten Webspinnen ausmachen. Bekannte Vertreter der Haubennetzspinnen stammen aus der Gattung der Echten Witwen (*Latrodectus spp.*), zu der u. a. die Schwarze Witwe (*Latrodectus hesperus*) gehört.

Zu den gut untersuchten Spezies aus der Familie der Echten Radnetzspinnen gehören u.a. die goldene Radnetzspinne (*Nephila spp.*) sowie die europäische Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus*) (Abbildung 1).

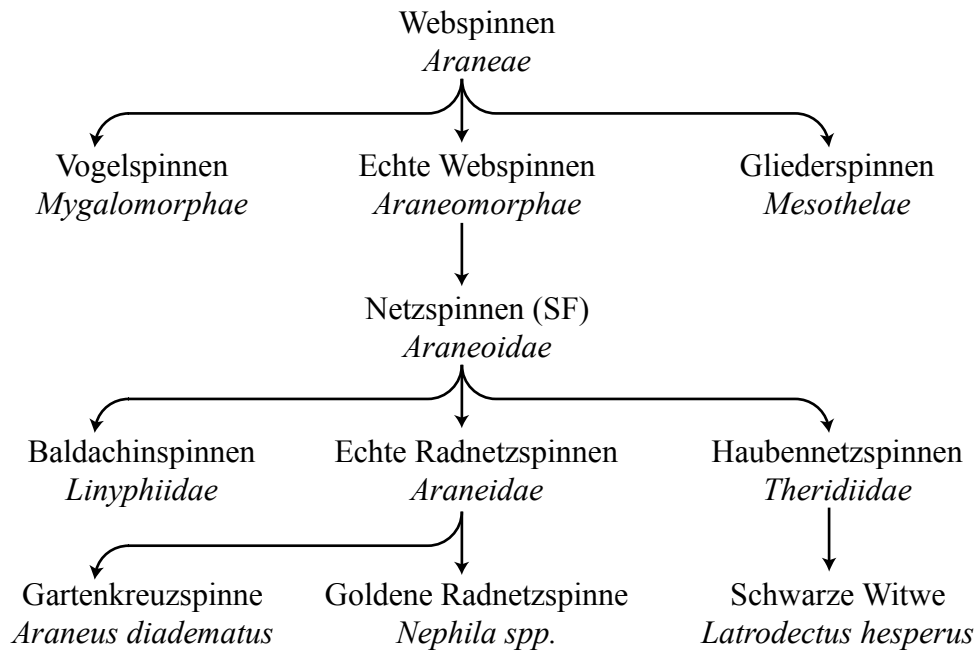


Abbildung 1: Ordnungen, Unterordnungen, Familien und Arten von Webspinnen. Die Ordnung der Webspinnen unterteilt sich in die drei Unterordnungen Vogel-, Wolfs- und Echte Webspinnen. Innerhalb der Echten Webspinnen (*Araneomorphae*) sind die netzbauenden Spinnen in der Superfamilie (SF) der Netzspinnen (*Araneoidae*) zusammengefasst. Baldachin- (*Linyphiidae*), Haubennetz- (*Theridiidae*) und Echte Radnetzspinnen (*Araneidae*) stellen die drei artenreichsten Netzspinnen dar und ergeben zusammen ca. ein Viertel der Ordnung der Webspinnen. Bekannte und gut untersuchte Arten der Netzspinnen sind die Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus*), die Goldene Radnetzspinne (*Nephila spp.*) sowie die Schwarze Witwe (*Latrodectus hesperus*)

Weibliche Radnetzspinnen sind in der Lage bis zu sieben verschiedene Seidenarten, in dafür spezialisierten Drüsen zu produzieren. Allein fünf dieser Seiden werden benötigt um ein Radnetz zu bauen (Abbildung 2). Die Seiden aus den Großen Ampullen- (Major Ampullate, MA) und Flagelliformdrüsen (Flag) bilden mit Rahmen, Speichen und Fangspirale den Hauptteil des Netzes. Zur Verstärkung, z.B. an längeren Spannfäden, wird die Seide aus der kleinen Ampullendrüse (Minor Ampullate, MI) verwendet. Verankert wird das Netz mit Hilfe der Pyriformseide. Damit die Beute nach dem Einschlag durch das Zurückfedern des Netzes nicht herausgeschleudert wird, ist die Fangspirale in regelmäßigen Abständen mit der klebrigen Aggregatseide beschichtet. Die beiden nicht am Netzbau beteiligten Seiden werden für das Einwickeln der Beute (Aciniform) sowie zur Herstellung des Eischale (Tubuliform- bzw. auch manchmal Cylindriformseide) verwendet.

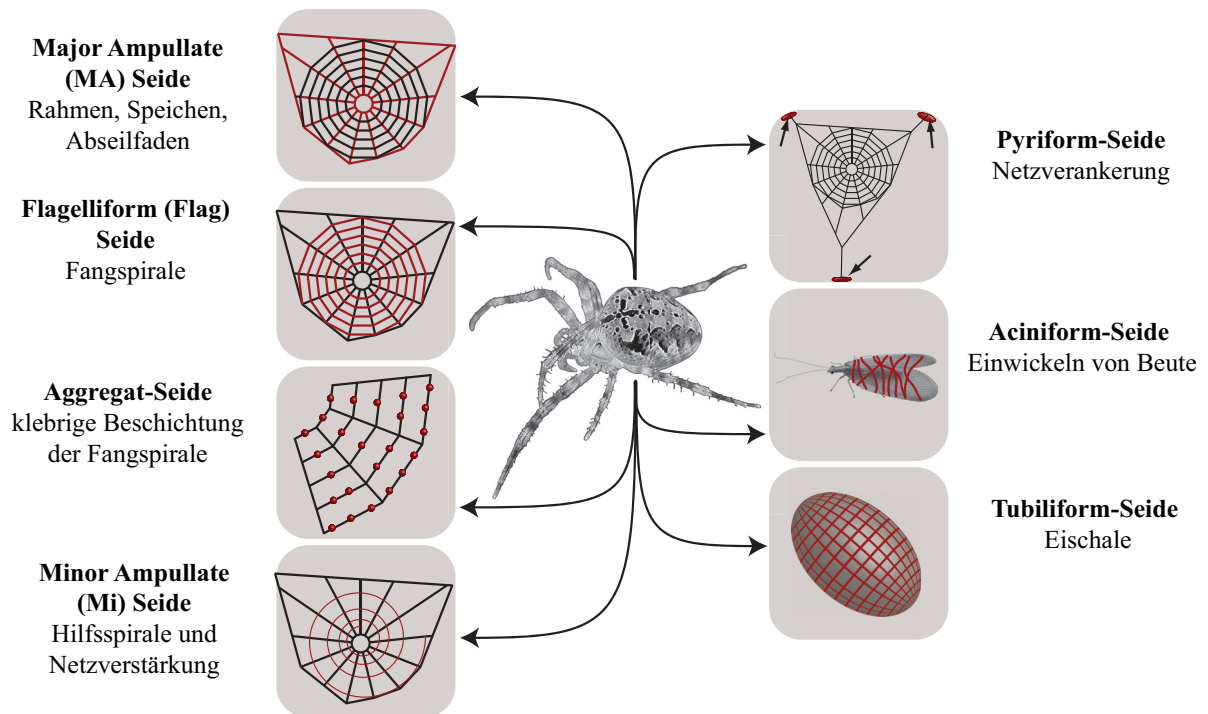


Abbildung 2: Die verschiedenen Seidenarten eines Radnetzspinne. Weibliche Radnetzspinnen können bis zu sechs verschiedene Seidenarten sowie eine Klebesubstanz in dafür spezialisierten Drüsen bilden. Die entsprechenden Seiden sind in der Grafik rot dargestellt. Modifiziert nach [3].

Ein wesentlicher Teil der Faszination für Spinnenseiden ist in den mechanischen Eigenschaften der Fasern begründet, die denen von synthetischen Hochleistungsfasern zum Teil überlegen sind (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich der mechanischen Eigenschaften von ausgewählten Spinnenseidenfasern und synthetischen Fasermaterialien.

Begriffserklärungen: **Reisfestigkeit** = Kraft, die benötigt wird bis die Faser reißt. **Dehnbarkeit** = Länge, bezogen auf die Ausgangslänge um die die Faser gedehnt werden kann, bis sie reißt. **Zähigkeit** = Energie, die benötigt wird um die Faser zu zerreißen. Der Wert errechnet sich aus Reißfestigkeit, Dehnbarkeit und dem Querschnitt der Faser.

Material	Reisfestigkeit (GPa)	Dehnbarkeit (%)	Zähigkeit (MJm ⁻³)	Quelle
Major Ampullate-Seide	1,1	27	160	[4]
Minor Ampullate-Seide	0,9	33	137	[5]
Flagelliform-Seide	0,5	270	150	[4]
Aciniform-Seide	1,1	40	230	[5]
Hochleistungsstahl	1,5	0,8	6	[4]
Kevlar	3,6	2,7	50	
Nylon	0,9	18	80	

Die Spinnenseidenfasern weisen eine besonders hohe Zähigkeit (Erklärung siehe Tabelle 1) auf, was hauptsächlich auf die hohe Dehnbarkeit zurückzuführen ist. So zeigt die Flagelliformseide der Fangspirale eine hohe Elastizität und kann bis zu 600% reversibel gedehnt werden, während die MA-Seide des Rahmens und der Speichen eine hohe Reißfestigkeit bei geringerer Elastizität aufweisen. Durch die unterschiedlichen Reißfestigkeiten und Dehnbarkeiten der Seiden in einem Radnetz kann der Aufprall von fliegender Beute, die größer und schwerer als die Spinne ist, ohne Schädigung des Netzes abgefedert werden [6].

1.3 Aufbau von Spinnenseidenproteinen

Sämtliche Spinnenseidenfasern bestehen größtenteils aus einem oder mehreren Proteinen, welche als Spidroine bezeichnet werden, die zwischen 250 und 650 kDa großen sind und alle den gleichen schematischen Aufbau besitzen. Sie bestehen aus einer großen repetitiven Kerndomäne, die ca. 90% des Proteins ausmacht sowie zwei nicht-repetitiven, terminalen Domänen. Die Spidroine lassen sich anhand der Länge der repetitiven Blöcke in zwei Klassen unterteilen (Abbildung 3).

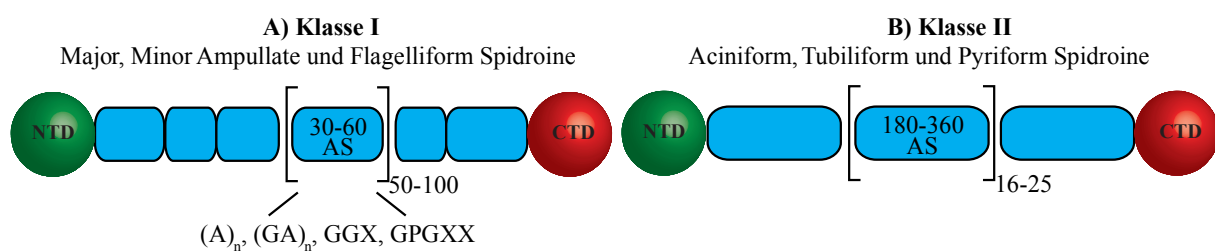


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zwei Spidroinklassen. Sämtliche Spidroine bestehen aus einer repetitiven Kerndomäne (blau) und den nicht-repetitiven aminoterminalen (NT) und carboxyterminalen (CT) Domänen. Anhand der Länge der repetitiven Blöcke der Kerndomäne lassen sich die Spidroine in zwei Klassen einteilen. Die Blöcke in Klasse I (A) weisen eine durchschnittliche Länge von 30-60 Aminosäuren auf und werden wiederum von den Motiven (A)_n, (GA)_n, GGX, GPGXX aufgebaut. Die Längen der bis zu 100 mal wiederholten Blöcke unterscheiden sich innerhalb des Spidroins zum Teil signifikant. Die Größe der Blöcke in Klasse II (B) eine Länge beträgt 180-360 Aminosäuren. Sequenz und Länge der zwischen 16-25 mal vorkommenden Blöcke sind innerhalb eines Spidroins nahezu identisch.

In der ersten Klassen weisen die die repetitiven Blöcke von Major, Minor Ampullate und Flagelliformseide eine durchschnittliche Länge von 30-60 Aminosäuren auf [7-12]. Die Blöcke bestehen wiederum aus der Aneinanderreihung der spezifischen Aminosäuremotive (Ala)₄₋₁₄, (GlyAla)₄₋₆, GlyGlyX sowie GlyProGlyXX, wobei X für jede beliebige Aminosäure steht (Tabelle 2). Die Art und die Anzahl der Wiederholungen dieser vier Motive sind für jede Seidenart spezifisch. Die Länge und Sequenz der repetitiven Blöcke innerhalb ein und desselben Spidroins sind nicht homogen.

Tabelle2: Übersicht der Sequenzmotive der repetitiven Einheiten von MA-, MI- und Flagelliformspidroinen. Die vier Aminosäuremotive sind bei den jeweiligen Spidroinen und damit bei den entsprechenden Seidenarten, die am häufigsten vorkommenden Sequenzmotive.

Seidenart	Protein	Sequenzmotiv			
		(A) ₄₋₁₃	(GA) ₄₋₆	GGX	GPGXX
Abseilfaden	Major Ampullate Spidroin 1 (MaSp1)	✓		✓	
	Major Ampullate Spidroin 2 (MaSp2)	✓			✓
Hilfsfaden	Minor Ampullate Spidroins (MiSp)		✓	✓	
Fangspirale	Flagelliform Spidroin (Flag)			✓	✓

Zu Klasse II gehören Aciniform-, Tubiliform- und Pyriformseide, deren repetitive Blöcke eine Länge von ca. 180-360 Aminosäuren aufweisen, welche zwischen 16-25 Mal wiederholt werden. [13-20]. Die Sequenzen der einzelnen repetitiven Blöcke innerhalb eines Proteins sind untereinander sehr homogen und zum Teil bis auf wenige Basen auf genetischer Ebene nahezu identisch [15]. Die Blöcke der Aciniform und Tubiliform Spidroine besitzen eine komplexe, nicht-repetitive Primärstruktur, während die repetitiven Einheiten der Pyriformseide als eine Mischung zwischen beiden Klassen angesehen werden kann. Ein ca. 200 Aminosäuren langer repetitiver Block der Pyriformseide besteht aus mehreren 10-16 Resten langen, alaninreichen Blöcken sowie einer ca. 80 Aminosäuren langen komplexen Sequenz (Abbildung 3).

Allen Spidroinen gemein ist, dass einige wenige Aminosäuren in ihren Sequenzen deutlich überrepräsentiert sind, wobei Alanin, Glycin, Glutamin, Prolin und Serin die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren in Spinnenseidenproteinen darstellen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der häufigsten Aminosäuren in den einzelnen Spidroinsequenzen. Die Anteile beziehen sich auf die jeweilig bekannte Sequenz wie sie in den Quellen angegeben sind. Aminosäuren, die mehr als 25% der bekannten Sequenz ausmachen, sind farblich (rot) hervorgehoben. Die prozentualen Häufigkeiten der einzelnen Aminosäuren wurden mit Protparam ermittelt.

Spidroin	Häufigste Aminosäuren (%)	Quellen
Major Ampullate Spidroin 1	Ala: 32,7-41,4 / Gly: 29,5-42,4 / Gln: 10,0-11,3	[7-9, 21-24]
Major Ampullate Spidroin 2	Ala: 18,5-31,1 / Gly: 33,5-37,3 / Gln: 6,9-15,0 / Pro: 8,6-13,5%	
Minor Ampullate Spidroine	Ala: 28,0-36,8 / Gly: 37,0-43,8	[10, 11, 25-27]
Flagelliform Spidroin	Ala: 7,9-10,3 / Gly: 49,7-56,8 / Pro: 15,0-17,4	[11, 28, 29]
Aciniform Spidroin	Ala: 14,2-15,1 / Gly: 11,3-15,2 / Ser: 13,1-21,5	[13, 15]
Tubiliform Spidroin	Ala: 25,1-28,0 / Gln: 10,4-12,5 / Ser: 25,9-29,9	[30]
Pyriform Spidroin	Ala: 16,4-42,2 / Gln: 12,7-16,9 / Ser: 8,4-25,7	[19, 31]

In einigen Fällen, wie z. B. bei den MaSp- und MiSp-Proteinen, können zwei Aminosäuren zusammen mehr als die Hälfte der Sequenz ausmachen. Die angegebenen Werte der am häufigsten vorkommenden Aminosäuren zeigen zudem, dass sich selbst innerhalb einer Spidroinart über verschiedene Spezies die Aminosäureanteile erheblich voneinander unterscheiden. Trotz Ähnlichkeiten im Aminosäuregehalt unterscheiden sich die Sequenzen der einzelnen Spidroinarten zum Teil signifikant voneinander (Abbildung 4).

Major Ampullate Sp1

```
1 AAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGYGQGGSGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAA 80
81 GGAGQGGYGRGGAGQGGAAAAAAAAAGAGQGGYGGQAGQGGSGAAAAAAAAAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGSGAAAAAA 160
161 AAGGAGQGGQGGYGQGGYGQGGAGQGGAGAAAAAAAAAGGA
```

Major Ampullate Sp2

```
1 AAAAAASGAGPGRQLGYGPGGSGAAAAAAGGPGYGQQQYGPGGAGAAAAAAGGAGPGRQQTYGPGGSGAAATAAGGS 80
81 GPGGYGQGPSYGPSGPGGQGGYGPGGSGAAAAAAGEAGPGRQQYGRGSGAAAAAAGGPGYGQSGYGPGGAGAAA 160
161 AAAAGGAGPGRQQEYGPGGSGAAAAAAGSGPSYGP
```

Minor Ampullate Sp1

```
1 GAGAGARGADSAGAAAGYGGVGTGTGSSAGYGRGAGAGAGAGAAAGSGAGAAGYGGYGAGAGAGAGAGGATGNRAGD 80
81 AFAQVFSQNVINSQVITSTVTTKNSAQAAASSMVSTAARKSLGLDENTARSMANAMSSYAAAMAKSFRNSDEFIRNMSYQM 160
161 GRMLSNAGAINESTASAAASSASSTVTETVTRTYGPAIIF
```

Flagelliform Sp

```
1 GPGGSGPGGYGPGGSGPGGYGPGGYGPGGSGPGGSGPGGSGPGGYGPGGTGPGGSGPGGYGPGGSGPGGSGPGGYGPGGS 80
81 GPGGFGPGGSGPGGYGPGGSGPGGAGPGGVGPGGFPGGAGPGGAAPGGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGAGP 160
161 GGAGGAGGSGGAGGSGGTTIIEDLDITIDGADGPITISEELPIS
```

Pyriform Sp1

```
1 AAARAQAQAEARAKAEAAARAQAQAEARAKAEATARAKAQAEAAARAQAQAEARAIAEAAARAQAQAEARAKAEAAAAAQ 80
81 AQAIARAEAAARAQAQAEAEARAYAEALARVQAEAAARAQAQTQSRTQAETHSQAHSASHASSQATSETHVESTAHTATETH 160
161 EHTSSNSQAASHTQAASHSQAKAQSEHTYSQAQSAHTI
```

Aciniform Sp1

```
1 GSAGPQGGFGATGGASAGLISRVANALANTSTLRTLRLTGVSQQIASSVVQRAAQSLASTLGVGDGNNLARFAVQAVSRLP 80
81 AGSDTSAYAQAFSSALFNAGVNLNASNIDTLGSRVLSALLNGVSSAAQGLGINVDSGSVQSDISSSSSFLSTSSSSSASYSQ 160
161 ASASSTSGTGYTGSPGPSTGPGSYGGLGGGAPFGQSGF
```

Tubuliform Sp1

```
1 AQAASAAQSSAFAQSQAAAQAFSQAASRSASQSAQAGSSSTSTTTTTTQAASQAASQSASSSSSAASQSAFSAQSSSAL 80
81 ASSSFSSAFSSASSASAVGVGYQIGLNAAQTLGISNAPALADAVSQAVRTVGVGASPFQYANAVSNAPFGQLLGGQGIL 160
161 TQENAAGLASSVSSAISS
```

Abbildung 4: Vergleich der repetitiven Sequenzen der verschiedenen Spidroin Arten. Dargestellt sind 200 AS lange, repräsentative Abschnitte der repetitiven Kerndomäne der einzelnen Spidroine aus unterschiedlichen Spinnen. Major Ampullate Sp1 & 2 aus *L. hesperus* (UniProt: A6YIY1, A6YIY0): Dargestellt sind sechs repetitive Blöcke je bestehend aus Polyalanin- (rot), GGX- (blau) und GPGXX-Motiven (grün). Minor Ampullate Sp1 aus *A. ventricosus* (GeneBank: JX513956.1): Ausschnitt mit GA- (rot), GX/GGX- (grün), Polyalaninblöcken (blau), die den Großteil der Kerndomäne ausmachen sowie einer Spacersequenz (lila). Flagelliform Sp aus *N. clavipes* (UniProt: Q9NHW4): Ausschnitt mit GPGGX- (rot) und GGX-Blöcken (blau), die mehr als 90% der rep. Domäne ausmachen, sowie der zweimal vorkommenden Spacersequenz (lila). Pyriform Sp1 aus *L. hesperus* (UniProt: C7T5D2): Gezeigt ist ein 200 AS langer repetitiver Block bestehend aus 10 – 16 AS langen, kürzeren Blöcken (rot & blau) sowie einer Spacer-Sequenz (lila). Aciniform Sp1 aus *A. trifasciata* (UniProt: Q64K55): Darstellung einer 200 AS langen Wiederholungseinheit. Tubuliform Sp1 aus *L. hesperus* (UniProt: Q4G1Y6): Darstellung einer 178 AS langen Wiederholungseinheit.

1.4 Die terminalen Domänen

Laut UniProt-Datenbank (Stand Januar 2013) sind für ca. 90 Spidroine aller Art (außer Aggregatspidroin) die Sequenzen von mindestens einer der nicht-repetitiven, terminalen Domänen bekannt (detaillierte Übersicht s. Anhang Tabelle A1). Etwa 90% stammen von Arten aus der Unterordnung der Echten Webspinnen (*Araneomorphae*), wobei die Familie der Echten Radnetzspinnen (*Araneidae*) circa die Hälfte der bekannten Sequenzen ausmacht. Die restlichen 10% sind Familien aus der Unterordnung der Vogelspinnenartigen (*Mygalomorphae*) zugeordnet.

Der überwiegende Teil der Sequenzen stammt aus cDNA-Datenbanken auf Basis von mRNA. Dabei wird häufig die mRNA der betreffenden Drüsen mittels Polythymidin-Primern (PolyT), die an den 3'-Poly-Adeninschwanz der mRNA binden, isoliert und in cDNA überführt. Bei der späteren Sequenzierung sind daher eher Sequenzen zu finden, die vom ursprünglichen 3'-Ende der mRNA stammen, welches nach Translation dem Carboxyterminus entspricht. Aufgrund dessen sowie den Schwierigkeiten bei der Sequenzierung von hochrepetitiven Bereichen sind etwa viermal so viele carboxyterminale wie aminoterminalen Sequenzen bekannt (Anhang Tabelle A1). Nur für wenige Spidroinsequenzen sind daher beide terminale Domänen bekannt [8, 15, 27, 32-35]. Die Sequenzen von terminalen Domänen zeigen im Gegensatz zu den repetitiven Kerndomänen eine hohe speziesübergreifende Sequenzkonservierung (Abbildung 5) [30, 33, 36]. Die NT-Domänen sind sogar über verschiedene Spinnenseidenarten von zum Teil weit entfernten Spezies konserviert, was für eine wichtige Funktion spricht [33, 37]. Ihre Größe liegt ohne Sekretionssignalsequenz mit 125-135 Aminosäuren zudem in einem engen Bereich. Mit 75 – 110 Aminosäuren Länge sind die CT-Domänen im Schnitt kleiner und variabler in der Länge als die NT-Domänen. Eine hohe Sequenzkonservierung ist nur innerhalb derselben Spidroinart von näher verwandten Spezies oder Familien (wie z.B. die Netzspinner) festzustellen [24, 36, 37].

A) NT-Sequenzen

Nc_MaSp1	1	-----QNPWSSTELADAFINAFMNEAGRIGAFITADQLDDMSTIGDTIKT
Lh_MaSp2	1	-----ALGQANIPWSSKENADAFIGAFMNAASQSGAFSSDQIDDMSVITNTLMA
Uldiv_MiSp1	1	-FAVFCQAQSYSALGQGASVWSSPQMAENFNGFMSALSQAGAFSGQEMKDFDDVRDIMNS
Nc_Flag	1	-----RGI IANS PFSNPNTAEAFARSEFVSNIVSSGEFGAQGAFDFDDTIQSLIQ
Lh_AcSp1	1	VQVEGRKGHHSSGSSKSPWANPAKANAFVKCLIQKISTSPVFPQOEKEDVEEIVETMMS
Agap_TuSp	1	---QGTSFASSATAGIRNIHGPNNTANFVDCIKGGIQASPAFPRQEQADIQSIASSILS
Bc_Fib1	1	-----RTKVTNVPWIDEAKCKKFTSTFDLDYALDHGLEFPQERDDEATISQNLIP
Konsensus	1	tpws a Fi fm tg F q dM i tim
Nc_MaSp1	46	AMDKMARSNKSSKGLQALNMAFASSMAETAAVEQGG--CLSWDAKTNAIADSI NSAFYQT
Lh_MaSp2	50	AMDNMGGGR--ITQSKLQALDMFAFASSVAETAVAD----EQNVGAATNATSDALRSAFYQT
Uldiv_MiSp1	60	AMDKMIRSGKSGRGAMRAMNAAFGSAIAEIVAANGG----KEYQIGAVLDAVTNTLLQL
Nc_Flag	50	AQ-SMGKGRHDTKAKAKAMQVALASSIAELVIAESS--GQDVQRKTNVTSNALRNALMQL
Lh_AcSp1	61	AFSSMSTSGGSNAKIQAMNMAFASSMAELVIAEDADNPDSISIKTEAPAKSLQQCFKST
Agap_TuSp	58	AGNT---ATKSKAIEQALSTALASSIAELVITESG--GQDYSKQITDNGILSNCFIQT
Bc_Fib1	50	VFRKTMDSGGNAAAKMKALNMAFASSIAEIAVQEGG--AGSIEEKTQAVSEALAHAFLOT
Konsensus	61	a m gkl AlnmAfaSsmAEi v e g g v t ai l f qt
Nc_MaSp1	104	TGAANPQFVNEIRSLINMFAQSSANEVSY-----
Lh_MaSp2	104	TGVVNNQFTTGISSLLIGMFAQVSGNEVSY-----
Uldiv_MiSp1	115	TGNADNGFVNEISRLLITLFSSEVAND-----
Nc_Flag	107	TGSPNEEFVHEVQDLIQMLSQEQINEVDTSGP---
Lh_AcSp1	121	LGSVNRHFLAEIKDLIGMFAREAAAMEEAGD----
Agap_TuSp	112	TGVENKRFVNSIQNLIRLFAESAVSETTNSIQIGP
Bc_Fib1	108	TGSVNIQFVKEIRALITLFAKEGQDNETEN-----
Konsensus	121	tG n Fv ei LI mfa e

B) CT-Sequenzen

Nc_MaSp1	1	GSGASAASAAASRLSSPQASSRVSSAVSNLV---ASG-PTNSAALSSTISNVVVSQIGASN
Lh_MaSp2	1	-SVASSAASAASALSSPTTHARISSHASTLLI---SSG-PTNAAALSNTISNAVSOVSASN
Uldiv_MiSp1	1	-----SAASNRIVSAPAVNRMSAASSTLV---SNG-AFNVGALGSTISDMAAQIQAGS
Nc_Flag	1	-----GSPGAY--YPSRVPMVNGIMSAMQGS-GFNVMQFGNMLSQYSSSGSGTCN
Lh_AcSp1	1	--SLNNILDSPQGLKSPQASSRINRLSSVUNALGPN-GLDINNFSDBGRTTLISQLSSSG
Agap_TuSp	1	-----PVLSSSETGLSSASASSRVNSLASSVASAIASGQALSADSFAKSLIQASQIQSSA
Bc_Fib1	1	-----RLLSSPSGLTSEAAKERISSIIASLLSAKSSQ-DFNALLLSNIPSLISKISQRA
Konsensus	1	al s a Rv stlv n i sqi
Nc_MaSp1	57	PGLSGCDVLIQALLEVVSALIQILGSSSGQVNYGSAGQATQIVGQSVYQALG-----
Lh_MaSp2	56	PGSSSCDVLVQALLEIITLALISILDSSSGQVNYGSSGQYQIVGQSMQQAMG-----
Uldiv_MiSp1	50	QGLSSAATVQALLEVSVLTHMLSSANIGYVDFSRVGDSSAVSOSMAYAG-----
Nc_Flag	50	P--NNVNVLMDALLA----ALHCLSNHGSSSFAPSPTPAAMSAYSNS-----
Lh_AcSp1	58	--LSKKEALETLEAVVALLQVLSAQVNOVDTSSSTVVTSSSLAKALSSLF-----
Agap_TuSp	56	PSFKADVHVHESLLEGISALLIQVINSSYGSPISLSNAQ----TVNAGLVNYFLV----
Bc_Fib1	55	SGLSPTMTEALLEVLAACMEILSSFNVAQGISSSRTSSNALVQVSIINQFSLNAAA
Konsensus	61	s dvli aLle v ali il s i v s v qsv

Abbildung 5: Vergleich der Homologie terminaler Sequenzen von verschiedenen Spidroinarten und Spezies. Um die Vergleichbarkeit der Sequenzkonservierung zu gewährleisten wurden nur Spidroinarten ausgewählt bei denen sowohl die aminoterminalen (A) als auch die carboxyterminalen (B) Domänen bekannt sind. Hochkonservierte Aminosäuren (>70%) sind schwarz hinterlegt und schwache (>50%) grau. In der Konsensussequenz sind die entsprechenden Aminosäuren nach Konservierungsgrad in Groß- (100%) und Kleinschreibung (>70%) dargestellt. Die Quellsequenzen der NT-Domänen wurden vor dem Vergleich mittels SignalP4.1 auf Signalsequenzen überprüft und ggfs. entfernt. Verwendete Sequenzen und Spezies: Nc_MaSp1: *Nephila clavipes* MaSp1(NT: B5SYS5; CT: P19837); Lh_MaSp2: *Latrodectus hesperus* MaSp2 (A6YIY0); Uldiv_MiSp: *Uloborus diversus* MiSp1 (NT: E1AHV5; CT: Q15G88) Nc_Flag: *Nephila clavipes* Falgelliform Spidroin (NT: O44358 – modifiziert nach [33]; CT: O44359); Lh_AcSp1: *Latrodectus hesperus* Aciniform Spidroin1 (GenBank: JX978171.1); Agap_TuSp: *Agelenopsis aperta* (NT: E1AHV9 CT: E1AHV2); Bc_Fib1: *Bothriocyrtum californicum* (NT: E1AHU2 CT: A8UAJ7). Die Alignments wurden mit ClustalOmega und Boxshade erstellt.

1.5 Major Ampullate Seide

Trotz der Vielfalt an interessanten Spinnenseiden ist die Seide der Großen Ampullendrüse (*Major Ampullate*, MA) die mit Abstand am besten untersuchte. Sie wird für den Rahmen und die Speichen eines Radnetzes sowie als Abseil- oder Fluchtfaden in Notsituationen verwendet. Da die Spinne deshalb immer kleines Stück MA-Seide hinter sich herzieht bezeichnet man sie häufig auch als *dragline* Seide (englisch *to drag* = ziehen). Der längste je entdeckte Spannfaden aus MA-Seide der Spinne *Caerostris darwini* ist 25 m lang und besitzt zudem die höchste je berichtete Reißfestigkeit aller Spinnenseidenarten von 1,7 GPa [38]. Neben den mechanischen Werten zeigt *dragline*-Seide einige weitere interessante Eigenschaften. Eine sich abseilende oder hängende Spinne dreht sich kaum um ihre eigene Achse, was bedeutet, dass die *dragline*-Seide eine torsionsdämpfende Funktion besitzt. Ähnliches kann man beobachten wenn man den Faden verdreht und anschließend loslässt. Er oszilliert nicht um seine Achse, sondern rotiert langsam in seine ursprüngliche Form zurück, was für eine Art Formgedächtnis spricht. [39].

Eine weitere Eigenschaft ist die sogenannte Superkontraktion, die auftritt sobald die Luftfeuchtigkeit über 60% liegt oder die Seide nass wird. Dabei nimmt der Fadendurchmesser zu und die Seidenfaser schrumpft dabei um bis zu 50% ihrer Länge [40-43].

1.5.1 Die Proteine der MA-Seide

Die MA-Seide besteht hauptsächlich aus zwei Proteinen, die als Major Ampullate Spidroin 1 und 2 (MaSp) bezeichnet werden [8, 9, 44]. Die repetitive Kerndomäne beider Proteine setzt sich im Wesentlichen aus alternierenden polyalanin- und glycinreichen Blöcken zusammen (Abbildung 6 A). Ein Polyalaninblock ist zwischen 4 und 13 Resten lang, während die Länge der glycinreichen Region zwischen 12 und 50 Aminosäuren variiert. Die NT- und CT-Domänen zwischen beiden Spidroinen sind jeweils hoch homolog [7, 8, 37]. Das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen MaSp1 und 2 ist die Sequenzzusammensetzung der glycinreichen Region. In MaSp1-Proteinen befinden sich in dieser Region hauptsächlich GGX-Motive, während in MaSp2 Proteinen stattdessen GPGXX-Motive zu finden sind. Die einzig bekannten Vollängen MaSp-Proteine stammen aus der schwarzen Witwe (*Latrodectus hesperus*) sowie der Wespenspinne (*Argiope bruennichi*) und sind 250 (MaSp1) bzw. 289 - 311 kDa (MaSp2) groß, wobei es diverse Hinweise gibt, dass andere MaSp-Proteine in derselben Größenordnung liegen [8, 45-47].

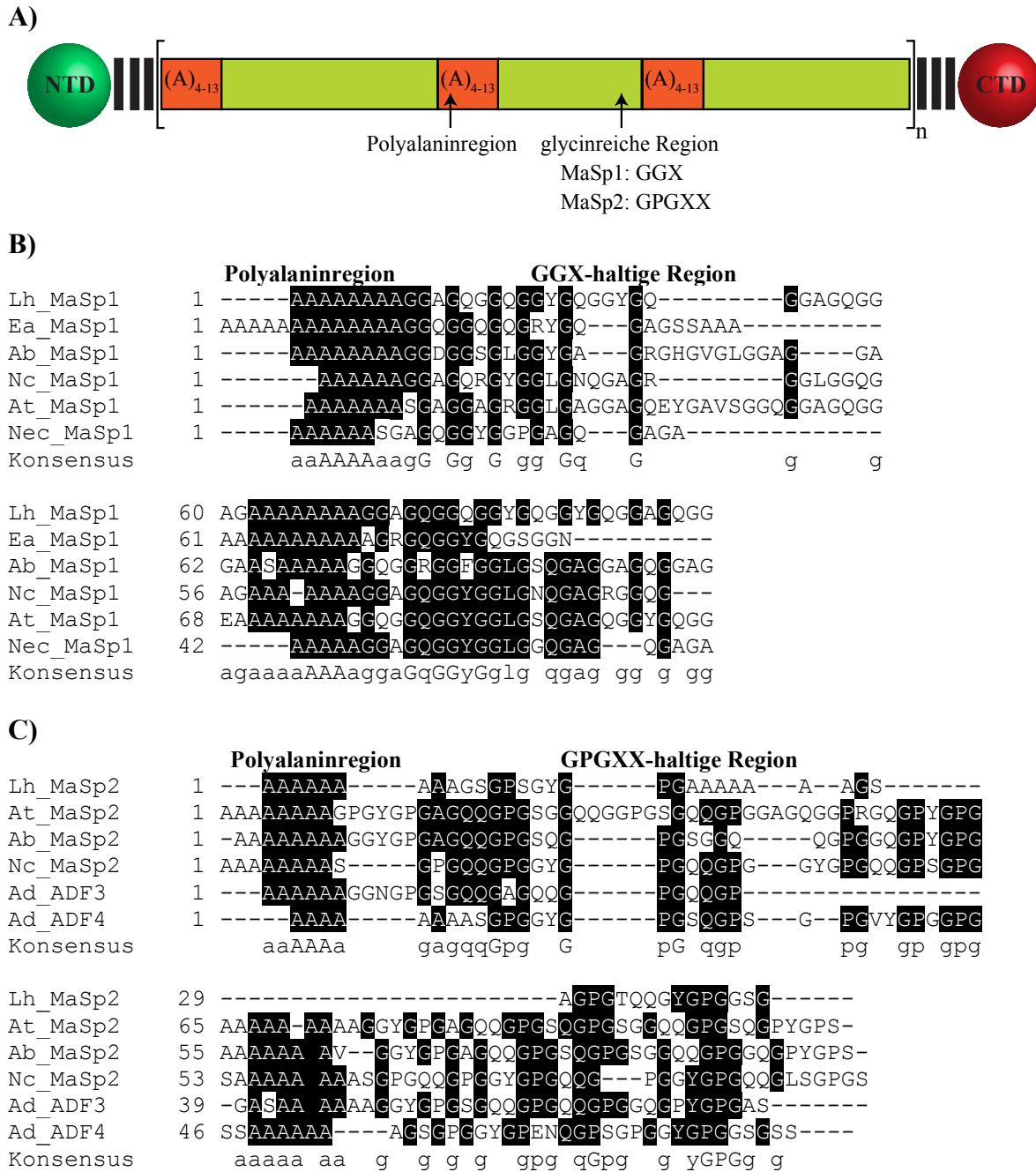


Abbildung 6: Schematische Darstellung von MaSp-Proteinen und Sequenzvergleich repetitiver Blöcke von MaSp 1 und 2 Spidroinen. (A) Schematische, nicht maßstabgetreue Darstellung des Aufbaus von MaSp-Proteinen. Die repetitive Kerndomäne besteht im Wesentlichen aus alternierenden Polyalanin und glycinreichen Blöcken. Die glycinreiche Region enthält je nach MaSp-Variante entweder hauptsächlich GGX (MaSp1) oder GPGXX-Motive (MaSp2). Die Kerndomäne wird zudem von nicht-repetitiven aminoterminalen (NT) sowie carboxyterminalen (CT) Domänen flankiert. (B) & (C) Sequenzvergleich von repetitiven Blöcken von MaSp 1 (B) und MaSp2 (C) Proteinen verschiedener Spezies. Dargestellt sind repetitive Einheiten, die jeweils zwei Polyalaninblöcke enthalten. Aminosäuren mit einem Konservierungsgrad von >70% sind schwarz hervorgehoben. In der Konsensussequenz sind die entsprechenden Aminosäuren nach Konservierungsgrad in Groß- (100%) und Kleinschreibung (>70%) dargestellt. Die Abkürzungen der verwendete Spezies sowie die UniProt-Nummern der Sequenzen lauten: Lh = *Latrodectus hesperus* (MaSp1: A6YIY1; MaSp2: A6YIY0), Ea = *Euprosthenoops australis* (MaSp1: A1INM2), Ab = *Argiope bruennichi* (MaSp1: I6XQ31; MaSp2: I6YNT3), Nc = *Nephila clavipes* (MaSp1: P19837; MaSp2: P46804), At = *Argiope trifasciata* (MaSp1: Q9BIU7), Nec = *Nephilengys cruentata* (MaSp1: A6YP78), Ad = *Araneus diadematus* (ADF3: Q16987; ADF4: Q16988)

Die Sequenzkonservierung der repetitiven Kerndomäne von MaSp Proteinen ist vergleichsweise gering, da Reihenfolge und vor allem Anzahl der Wiederholungen der GGX und GPGXX-Motive innerhalb der glycinreichen Region zum Teil stark variieren (Abbildung 6 B, C). Beide MaSp-Proteine liegen im finalen Faden vor, jedoch variiert das Verhältnis der beiden Proteine speziesübergreifend zum Teil stark [44]. Die jeweilige Menge der beiden Spidroine im Faden ist zudem von vielerlei Umweltbedingungen wie der Nahrungsquellen oder dem Ernährungszustand abhängig [48-50]. Trotz variabler Anteile überwiegt in den meisten bisher untersuchten *dragline* Seiden der MaSp1-Anteil. Die einzige Ausnahme stellt die MA-Seide der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* dar, die einen hohen Prolinanteil von 16% aufweist [7]. Dort besitzen beide bekannte MaSp-Proteine, genannt *Araneus diadematus* Fibroin 3 und 4 (ADF3 u. 4) in repetitiven Blöcken das GPGXX Motiv und sind demnach MaSp2-Analoga [7].

1.5.2 Struktur der repetitiven Kerndomäne

Die Struktur-Funktionsbeziehung der repetitiven Kerndomäne von MaSp-Proteinen wurde mit einer Vielzahl an Methoden, wie Festkörper-NMR, Röntgenstreuung oder IR-Spektroskopie untersucht. Schon relativ früh konnte nachgewiesen werden, dass die Polyalaninmotive im Faden in einer β -Faltblattkonformation vorliegen [51]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Motiv antiparallele β -Faltblattkristalle mit einer Größe von 5x2x7 nm (Länge x Breite x Höhe) ausbildet [52-57]. Die Faltblätter im Kristall sind dabei parallel zur Faserachse angeordnet [58-60].

Die Strukturbestimmung der GGX-Motive innerhalb der Faser hingegen ist weniger eindeutig. Das Motiv kommt sowohl in β -Faltblatt als auch in weniger geordneten, α -helikalen Bereichen vor [56, 61-63]. Es gibt zudem Hinweise, dass das Motiv in Polyglycin-II-Helices vorliegt [56, 61, 64].

Zum Pentapeptid GPGXX liegen die wenigsten Strukturdaten vor. Dem Motiv wird aufgrund des Prolins eine spiralförmige Polyprolin-II-helikale Struktur zugeordnet, wie sie auch von ähnlichen repetitiven Sequenzen (z.B. VPGVG) in Elastin gebildet wird [65]. Diesem Motiv wird zudem eine wichtige Rolle bei der Superkontraktion der *dragline*-Faser zugeschrieben, da Hinweise existieren, dass die Hydratisierung dieser prolinreichen Sequenz zu einer Konformationsumlagerung führt, die das Schrumpfen der Seide bewirkt [41-43, 66-71].

Die Spinnlösung ist ungleich schwerer zu untersuchen als der Faden, da sie außerhalb der Drüse instabil ist und zu Assemblierung bzw. Aggregation neigt [72, 73]. Sie enthält hauptsächlich unstrukturierte Elemente (*random coil*), Polyglycin-II bzw. Polyprolin-II-artige Helices (manchmal auch als 3₁-Helices bezeichnet) und β -Schleifen, sowie geringe Anteile an α -Helices [74-77].

1.5.3 Die terminalen Domänen von MaSp-Proteinen

Mit dem Aufkommen der ersten Sequenzen auf Basis von cDNA-Banken hat sich schnell herauskristallisiert, dass die MA-Spidroine neben der repetitiven Domäne auch eine nicht repetitive carboxyterminale Domäne enthält [7, 9, 23, 24, 36]. Aufgrund der Schwierigkeiten mit der Sequenzierung repetitiver Bereiche sowie der zum Teil enormen Größe der Transkripte von mehr als 9000 bp wurde erst später das Vorhandensein von nicht-repetitiven aminoterminalen Domänen bestätigt [8, 21, 33, 35, 37]. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass vergleichbar zu anderen Spidroinarten die aminoternale Domäne länger ist als die carboxyterminale (Abbildung 7). Die jeweiligen Domänen sind innerhalb der MA-Spidroine stark konserviert, wobei der Konservierungsgrad der NT-Domänen bei weit voneinander entfernten Spezies größer ist [37].

A) NT-Domäne

Lh_MaSp2	1	QSLCALGQANTPWSSKENADAFI	GAFMNAAS	SGAFSSDQ	DDMSVISNTLMAAMDNMGG					
Lg_MaSp1	1	QGLYVLGQANTPWSSKQNADAFI	SAFMTAPS	SGAFSSDQ	DDMSVISNTLMAAMDNMGG					
Lh_MaSp1	1	QSLYALAQANTPWSSKANADAFI	NSFISAASNTG	SFSDQ	DMESLI	IGNTLMAAMDNMGG				
Ni_MaSp2	1	QCIFIAGQANTPWSDTATADAFI	QNFILGAVS	SGAFIPDQ	DDMSTVGD	IMSAMDKMAR				
At_MaSp2	1	QTVFSAGQ	ATPWENSQLAF	SFISRF	LRFIG	SGAFSPNQ	DDMSSI	GD	TLKTATEKMAQ	
Ea_MaSp1	1	QGSSSLASH	TPWTNPGLA	ENFMNS	FMQGLS	SMFGFTASQ	DDMSTI	AQSMVQSI	QSLAA	
Konsensus	1	Q ly lgqanTPWs	AdaFi	Fm a	sqsgaFs	dQidDMS	igntlm	amd	mgg	
Lh_MaSp2	61	R--ITQSKLQALD	MAFASS	AEI	AVAD--	GQNV	GAATNAIS	DAL	RS	SAFYQTTGVVNNQFI
Lg_MaSp1	61	R--ITPTIKLQALD	MAFASS	AEIAA	AVE--	GQNI	GVTTNAIS	DAL	TS	SAFYQTTGVVNNKFI
Lh_MaSp1	61	R--ITPSKLQALD	MAFASS	AEIAA	ASE--	GGDI	GVTTNAIA	DAL	TS	SAFYQTTGVVNSRFI
Ni_MaSp2	61	SNKSSKSKLQALN	MAFASS	AEIAA	AVEQGGQ	SM	DVKTNAIA	NAL	DS	SAFYMTTGSTNQFV
At_MaSp2	61	SRKSSKSKLQALN	MAFASS	AEIA	VAEQGLS	SE	EAKTNAIA	SAL	S	AAFLETTGVVNOQFV
Ea_MaSp1	61	QGRTPNKLQALN	MAFASS	AEIAA	SEEGG	GS	STKTSS	IAS	S	MSNAFLQTTGVVNOQFI
Konsensus	61	t sKLQAL	MAFASS	vAEIAa	e	G v	TnaIa	Alts	AFyqTTGVvNn	Fi
Lh_MaSp2	117	TGIS	SLIGMFAQV	SGNE						
Lg_MaSp1	117	SEIR	SLINMFAQ	ASAND						
Lh_MaSp1	117	SEIR	SLIGMFAQ	ASAND						
Ni_MaSp2	121	NEMR	SLINMLSA	AAVNE						
At_MaSp2	121	NEIK	TLIFMIAQ	ASSNE						
Ea_MaSp1	121	NEIT	QLVSMFAQ	GMND						
Konsensus	121	eirsLi	Mfaqas	Ne						

Fortsetzung auf Seite 17

B) CT-Domäne

Lh_MaSp1	1	SALAAPATSARIS	SSHASALLSN	-GPTNPASIS	SNVISNAVSQI	SSSNPGAS	ACDVLVQALL
Lg_MaSp1	1	SALAAPATSARIS	SSHALTLISN	-GPTNPASIS	SNVISNAVSQI	SSSNPGYSS	CDLVLVQALL
Lh_MaSp2	1	SALSSPTTHARIS	SSHASTLLSS	-GPTNAAALS	SNVISNAVSQV	SASNPGLSS	CDVLVQALL
Ni_MaSp	1	SRLASPDGARG	VSAVSNLVSS	-GPTSSAALSS	VISNAVSQIG	ASNPGLSS	CDVLVQALL
At_MaSp	1	SRLSSPGAASR	VSSAVTSLVSS	GPTNSAALS	NTISNVVVSQI	SSSNPGLSS	CDVLVQALL
Ad_ADF3	1	SRLSSPAASSR	VSSAVSSLVSS	-GPTNQAALS	NTISSVVSQV	SASNPGLSS	CDVLVQALL
Ad_ADF4	1	SRLSSPAASSR	VSSAVSSLVSS	-GPTNGAAVSG	ANSLVQSIS	SASNPGLSS	CDALVQALL
Konsensus	1	S L sPa	RisS stLlSs	GPTn AaiSn	isn VSQis	SNPG SaCDvLvQALL	
Lh_MaSp1	60	ELVTALLTII	GSSNIGSVNY	DSSGQYACQV	VTQSQNAFA		
Lg_MaSp1	60	ELVTALLTII	GSSNNDINYG	SSEQYACMV	SQSQNVFG		
Lh_MaSp2	60	EITLALISIL	DSSVGOVNY	GSSGQYACI	VGQSMQAMG		
Ni_MaSp	60	ETVSACVTIL	SSSISIGOVNY	GAA-----			
At_MaSp	61	ELVSALVHIL	GSANIGOVN	SSGVRASAT	IVGQSTINAFS		
Ad_ADF3	60	ELVSALVSI	LGSSTIGQIN	YGASACQY	TCMVGQSA	ACALA	
Ad_ADF4	60	ELVSALVAIL	SSASISIGOVN	VSSVSGSTQ	MISQALSG---		
Konsensus	61	ElvtAlltIl	Ss igqvNy	gq qvv	qsv n		

Abbildung 7: Sequenzvergleich der amino- und carboxyterminalen Domänen von MA-Proteinen. Es sind Alignments der aminoterminalen (A) und carboxyterminalen (B) Domänen von MaSp1 und 2 dargestellt. Für das Alignment wurden nur NT-Sequenzen ohne die vorhergesagte Sekretionssequenz verwendet. Hochkonservierte Aminosäuren (>70%) sind schwarz hinterlegt und schwache (>50%) grau. In der Konsensussequenz sind die entsprechenden Aminosäuren nach Konservierungsgrad in Groß- (100%) und Kleinschreibung (>70%) dargestellt. Der Pfeil markiert das stark konservierte Cystein in der CT-Domänen. Spezies und GeneBank-Nummern der verwendeten Sequenzen: AtMaSp2: *Argiope trifasciata* MaSp2 (NTD: DQ059136, CTD: AF350266), EaMaSp1: *Euprosthops australis* MaSp1 (AM259067), LgMaSp1: *Latrodectus geometricus* MaSp1 (NTD: DQ059133S1, NRC: DQ059133S2), LhMaSp1: *Latrodectus hesperus* MaSp1 (EF595246) LhMaSp2: *Latrodectus hesperus* MaSp2 (EF595245) NiMaSp2: *Nephila inaurata madagascariensis* MaSp2 (NTD: DQ059135, CTD: AF350278). Die Alignments wurden mit ClustalOmega erstellt [78].

1.5.3.1 Die Struktur der aminoterminalen (NT) Domäne

Von zwei NT-Domänen von MaSp1-Proteinen aus *Euprosthops australis* [79, 80] und der Schwarzen Witwe (*Latrodectus hesperus*) [81] wurden im Laufe dieser Arbeit von anderen Gruppen Strukturdaten generiert, wobei die Strukturbestimmung sowohl mittels Röntgenkristallographie als auch NMR erfolgte. Die beiden gelösten Strukturen von NT-Domänen weisen wenig überraschend eine hohe strukturelle Homologie auf und bestehen aus einem Bündel von fünf α -Helices (Abbildung 8). Das Monomer zeigt eine interessante Ladungsverteilung, da sich positive und negative Ladungen an entgegengesetzten Enden des Proteins zusammenlagern und so einen makroskopischen Dipol erzeugen (Abbildung 8 B). Der interessanteste Aspekt der NT-Domäne ist jedoch die pH-abhängige Ausbildung eines Dimers. Bei $\text{pH} \geq 7,2$ liegt das Protein als Monomer vor, während sich durch Absenken des pH-Wertes auf $\text{pH} \leq 6,2$ ein antiparalleles Dimer ausbildet. Der pH-Bereich in dem die Dimerisierung stattfindet entspricht dem pH-Gefälle, das in der natürlichen Spinndrüse beobachtet wurde [82, 83].

Das Dimerinterface an dem die Helices 2-4 beteiligt sind, zeigt nicht nur innerhalb der MA-Spidroine eine hohe Sequenz- und Strukturkonservierung, sondern auch bei anderen Spidroinen, was für eine Spinnenseidenart-übergreifende Funktion spricht [79].

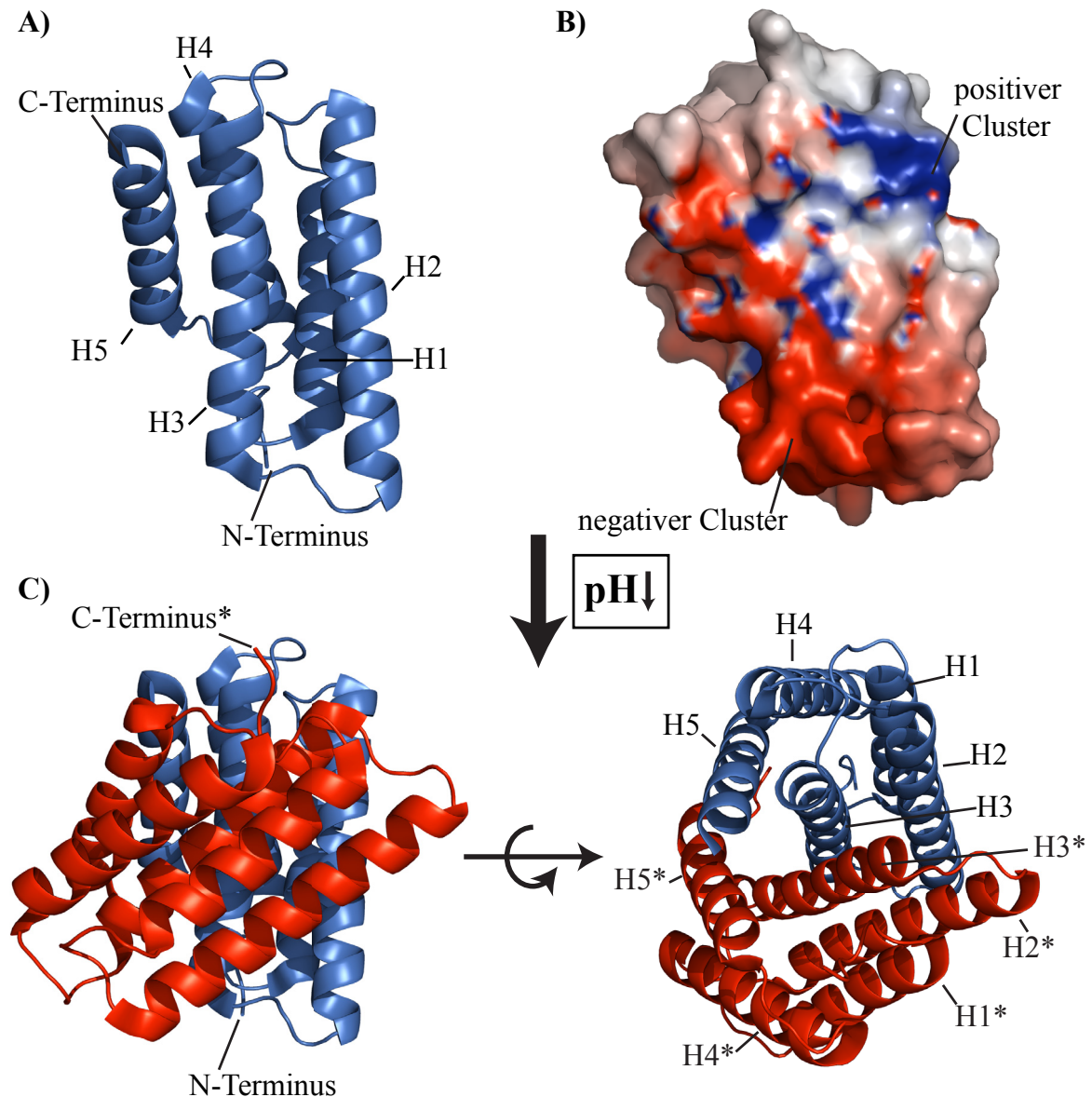


Abbildung 8: Struktur der aminoterminalen Domäne von MaSp1 aus *E. australis*. (A) Gezeigt ist das Monomer, dessen Orientierung so gewählt ist, dass sich die am Dimerinterface beteiligten Helices 2,3 und 5 in der Front befinden. Zur Verdeutlichung sind die an entgegengesetzten Enden liegenden Termini markiert. (B) Darstellung des Oberflächenpotentials des Monomers aus (A). Das Potential ist von -5 (rot) bis +5 kT/e angegeben. (C) Seitenansicht und Aufsicht des Dimers. Der N-Terminus von Monomer 1 (blau) und der C-Terminus von Monomer 2 (rot) sind hervorgehoben. In der Aufsicht sind die Helices von Monomer 1 mit H1-5 und die von Monomer 2 mit H1*-5* gekennzeichnet. Die Abbildung wurde auf Basis der PDB-Struktur 3LR2 in PyMOL erstellt und das Oberflächenpotential mit APBS berechnet [84].

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass das Monomer-Dimer Gleichgewicht durch Salze wie Natriumchlorid stark beeinflusst wird [34, 85]. In Anwesenheit von Natri-

umchlorid, wie es auch während der Lagerung der Spidroine innerhalb der Drüse vorkommt, wird die monomere Form stabilisiert, während in Abwesenheit von Natriumchlorid und einem pH-Wert von über 7,2 die Tendenz zur Dimerbildung ansteigt. Da die Dimerisierung in einem leicht sauren Milieu stattfindet, liegt die Vermutung nahe, dass Protonierungsereignisse an sauren Seitengruppen eine wichtige Rolle spielen. Trotz der Untersuchung mehrerer Mutanten mit Fokus auf eine oder mehrere saure Aminosäuren konnte der genaue Assemblierungsmechanismus noch nicht geklärt werden [80, 86, 87].

Neben den strukturellen Details konnten auch Erkenntnisse zum Einfluss der NT-Domäne auf die repetitive Kerndomäne gewonnen werden. Rekombinante „Mini-Spidroine“ (25 kDa) mit der NT-Domäne assemblieren bei pH 6 schneller als bei pH 7,2, was vermuten lässt, dass die antiparallele Dimerisierung den Assemblierungsvorgang innerhalb des natürlichen Spinntraktes ebenfalls beschleunigt [79].

1.5.4 Nano- und Mikrostrukturierung der MA-Faser

Der Aufbau der *dragline* Faser folgt einem hierarchischen Organisationsprinzip, das sich in mehrere Ebenen aufteilt (Abbildung 9).

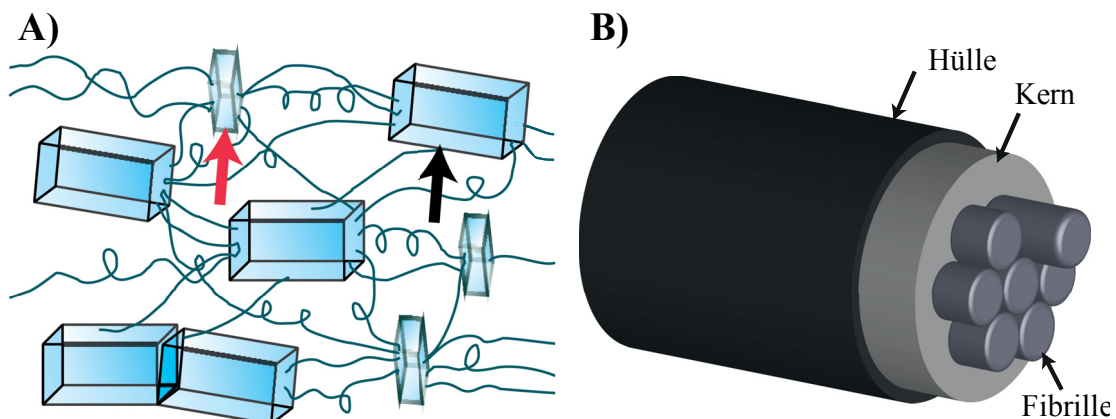


Abbildung 9: Nano- und Mikrostrukturierung der MA-Faser. Auf der Nanoebene (A) sind die β -Faltblattkristalle (roter Pfeil) aus den Polyalaninmotiven von einer amorphen Matrix umgeben, die neben unstrukturierten auch strukturierte Bereiche (schwarzer Pfeil) aus weniger dicht gepackten β -Faltblättern enthält. Auf makroskopischer Ebene ist eine Hülle-Kern-Struktur auszumachen (B). Der Kern wiederum enthält mehrere 100 nm lange Fibrillen, die Hülle besteht aus Glykoproteinen und Lipiden. (Bild modifiziert nach [3]).

Auf der untersten Ebene organisieren sich die einzelnen Aminosäuremotive zu zwei distinkten Funktionsblöcken bzw. Phasen (Abbildung 9 A). Die erste Phase stellen die dicht gepackten β -Faltblattkristalle aus den $(A)_n$ -Motiven dar. Charakteristisch für die zweite

Phase sind weniger homogen strukturierte Bereiche bestehend aus den GGX und GPGXX-Motiven. Diese oft als amorphe Matrix bezeichnete Phase weist unterschiedliche Strukturmerkmale auf. So gibt es Hinweise, dass der Bereich direkt um die Kristalle ebenfalls eine geordnete, β -faltblattreiche Struktur einnimmt [59, 88-92]. Zudem existieren weniger dicht gepackte β -faltblattreiche Strukturen innerhalb der amorphen Matrix. Mit der Unterteilung in zwei Phasen lässt sich ein einfaches Modell erstellen, das die mechanischen Eigenschaften der Faser beschreibt. Darin sind die Kristalle für die mechanische Stärke des Fadens verantwortlich, während die amorphe Matrix die Elastizität vermittelt. Mit diesem einfachen Modell eines „verstärkten Gummibands“ lassen sich die mechanischen Eigenschaften der *dragline*-Seide bereits gut beschreiben [93-96].

Die nächste hierarchische Organisationsstufe beschreibt fibrilläre Strukturen von bis zu mehreren 100 nm Länge innerhalb der Faser (Abbildung 9 B). Je nach verwendeter Methode werden regelmäßige oder unregelmäßig geformte Fibrillen mit einem Durchmesser von 50-200 nm beobachtet, die teilweise miteinander verdrillt sind. [97-102]. Diese Fibrillen bilden den Kern der finalen, je nach Spinnenart 3-10 μ m dicken Faser, die von einer ca. 100 nm dicken Hülle aus Glykoproteinen und Lipiden umgeben ist. [100, 102]

1.5.5 Der natürliche Spinnprozess

Um die Eigenschaften der *dragline*-Seide zu verstehen, reichen Sequenz- und Strukturdaten allein nicht aus. Die Art und Weise, wie die Faser entsteht - der natürliche Spinnprozess – ist essentiell für das Verständnis der Spinnenseidenfasern.

Der Spinnprozess findet im entsprechenden Spinnapparat statt, welcher je nach Spezies bis zu mehrere Millimetern lang und in vier Zonen eingeteilt ist (Abbildung 10). Im ersten fortsatzartigen Teil werden beide Spidroine von dafür spezialisierten Epithelzellen sekretiert. Bisherige Untersuchungen deuten auf eine Koexpression der beiden MaSp-Proteine innerhalb der Zellen hin [8, 35]. Die Proteine werden im zweiten, voluminöseren Bereich, der Ampulla oder dem Speichersack, bei Konzentrationen von bis zu 50 % (w/v) gelagert [52, 103]. Innerhalb dieser hochkonzentrierten Spinnlösung (*spinning dope*) befinden sich supramolekulare, mizellartige Assemblate mit flüssigkristallinem Charakter [104-106].

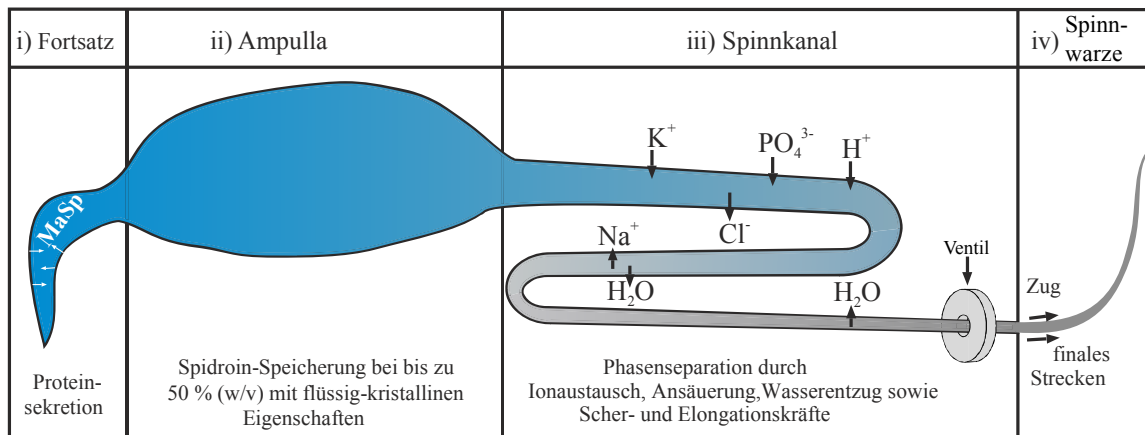


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Spinnapparats. Er lässt sich in vier Abschnitte einteilen. Im Fortsatz werden beide MaSp-Proteine sekretiert, während sie im zweiten Abschnitt, der Ampulla, bei Konzentrationen von bis zu 50% (w/v) gelagert. Die Fadenassemblierung durch eine flüssig-fest Phasenseparation findet im S-förmigen Spinnkanal statt und ist von mehreren physiko-chemischen Änderungen begleitet. Ein ventilartiges Organ innerhalb der Drüse sorgt nach internem Abreißen des Fadens für die Wiederaufnahme des Spinnprozesses. Letzter und wichtiger Bestandteil des Verspinnens stellt das aktive Herausziehen aus der Spinnwarze dar. Modifiziert nach [3].

Die eigentliche Faserassemblierung findet im S-förmigen Spinnkanal statt, der mit einer Art Trichter beginnt. Entlang des Spinnkanals werden die Natrium- und Chloridionen gegen kosmotropere Kalium- und Phosphationen ausgetauscht, der pH-Wert von 7,2 auf 6,3 abgesenkt und dem System aktiv Wasser entzogen [82, 107, 108]. Diese induzieren eine flüssig-fest Phasenseparation, die zu einem festen Faden führt. Durch die Biegungen sowie dem immer enger werdenden Spinnkanal und dem aktiven Zug der Spinne am finalen Faden entstehen Scher- und Elongationskräfte, die die Ausbildung ausgerichteter β -Faltblattkristalle fördern [42, 103-106, 109-111]. Der flüssigkristalline Charakter der Spinnlösung lässt eine Vorstrukturierung der Spidroine vermuten, die den Assemblierungsprozess beschleunigt. Dafür spricht, dass natürliche Seidenproteine nur versponnen werden können, wenn sie direkt aus dem Spinntrakt entnommen werden. Spinnlösungen, die durch Lösen von natürlichen Seiden gewonnen werden, lassen sich nur zu Fasern verspinnen, die im Vergleich mit den natürlichen wesentlich schlechtere mechanischen Eigenschaften aufweisen [110-112]. Bevor der Faden den Spinnkanal verlässt, passiert er ein ventilartiges Organ, das nach einem Reißen des Fadens die Wiederaufnahme des Spinnprozesses unterstützt [113]. Am Ende zieht die Spinne den Faden aus der Spinnwarze und streckt ihn dadurch final. Der gesamte Prozess findet bei ambienten Bedingungen innerhalb von Sekunden statt.

1.6 Rekombinante Spinnenseidenproteine

Spinnen weisen ein kannibalisches Revierverhalten auf, weshalb die industrielle Zucht, wie sie z. B. für den Seidenspinner *Bombyx mori* betrieben wird, als ökonomisch sinnvolle Quelle für Spinnenseiden nicht möglich ist. Um verwertbare Mengen an Spinnenseide zu gewinnen, können jedoch Spinnenseidenproteine rekombinant produziert werden, was in zwei unterschiedlichen Ansätzen verfolgt wird.

Der erste Weg stellt die heterologe Produktion von natürlichen Sequenzen in verschiedenen Wirtsorganismen dar, wie z.B. eukarotischen Zellen, Tabakpflanzen und transgenen Seidenspinnern, Mäusen oder gar Ziegen [114-120]. Dabei werden häufig stark verkürzte 3'-cDNA-Fragmente der Spinnenseiden verwendet. Die Ausbeuten bei der jeweiligen Produktion sind jedoch vergleichsweise gering, so dass keine dieser Ansätze über Machbarkeitsstudien hinausgekommen sind. Ein Grund für die niedrigen Ausbeuten liegt möglicherweise in der speziellen Codonverteilung der Spinnenseidengene [121]. Besonders deutlich wird dies bei den häufig vorkommenden Aminosäuren Glyzin und Alanin, die nur von einer kleinen Anzahl an möglichen Codons codiert werden. Da die Spidroine hohe Anteile von lediglich zwei bis drei Aminosäuren (z.B. Glycin und Alanin) aufweisen, wird vermutet, dass ein beschränkter aber dafür hochverfügbarer Pool an tRNA für die Spinne effizienter ist [8, 122].

Der zweite und wesentlich häufiger verwendete Ansatz rekombinante Spinnenseidenproteine zu gewinnen, ist die Verwendung von artifiziellen Spinnenseidengenen. Die repetitiven Blöcke dieser künstlichen Spinnenseiden bestehen häufig aus Konsensusmotiven der natürlichen Spidroinsequenzen, weshalb die künstlichen Spinnenseidenproteine eine hohe Ähnlichkeit zu ihren natürlichen Vorbildern aufweisen [121, 123, 124]. Die Verwendung von künstlichen Genen erlaubt zudem die Anpassung der Sequenz an die Codon-Verwendung des gewünschten Produktionsorganismus. In den meisten Fällen erfolgt die Herstellung der artifiziellen Spidroine in *E. coli*, vereinzelt auch in Hefen wie *Pichia pastoris* oder in Tabakpflanzen [114, 121, 123, 125, 126]. Die meisten produzierten Proteine haben ein Molekulargewicht von 25 bis 120 kDa und sind damit wesentlich kleiner als die natürlichen Spidroine. Die Produktion von rekombinanten Spidroinen mit einem Molekulargewicht von mehr als 200 kDa ist möglich, jedoch mit aufwändigen Eingriffen in den Metabolismus von *E. coli* verbunden [127].

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Seiden basieren auf den beiden MaSp2-Proteinen ADF3 und 4 der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* und werden zu Beginn von Kapitel 2 im Detail beschrieben [7, 124].

1.7 Assemblierungseigenschaften von rekombinanten Spinnenseidenproteinen

Für diverse rekombinante Spinnenseideproteine existieren eine Vielzahl an nicht-natürlichen Assemblierungsformen wie Filme, Hydrogele, Kapseln oder Kugeln. Die Charakterisierung, Funktionen und vielfältigen Einsatzgebiete dieser Morphologien sind für diese Arbeit nicht relevant und an anderer Stelle sehr ausführlich beschrieben, weswegen nun auf die Faserassemblierung eingegangen wird [128-138].

1.7.1 Fasern aus rekombinanter Seide

Die mechanischen Eigenschaften der natürlichen Spinnenseidenfasern sind besonders bezogen auf ihr Gewicht und die Dichte besonders attraktiv für verschiedene Anwendungsfelder. Die Herstellung einer Faser aus den rekombinanten Seiden stellt daher ein wichtiges Ziel dar.

Mehrere Methoden zur Produktion einer Faser sind beschrieben, wobei die mit Abstand am häufigsten angewandte das sogenannte Nassspinnen (engl. *wet spinning*) darstellt [115, 139-142]. Bei diesem Prozess wird eine konzentrierte Spinnlösung (>10 % w/v) meist durch eine Injektionsnadel mit einem dünnen Querschnitt in ein flüssiges Fällbad injiziert. Das Fällbad enthält häufig hohe Anteile an Alkoholen wie Ethanol, Methanol oder Isopropanol welche ein schnelles Assemblieren bzw. Aggregieren der Proteine bewirken. Die so gewonnenen Fasern sind den natürlichen Seiden hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften jedoch zum Teil weit unterlegen (Tabelle 4).

Die Zähigkeit der Fasern aus rekombinanten Spidroinen liegt häufig eine Größenordnung unter den Natürlichen. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Verwendung von Proteinen, die deutlich kürzer sind als die natürlichen. Zudem werden häufig rekombinante Spidroine verwendet die nur aus repetitiven Blöcken bestehen und nur vereinzelt die CT-Domäne enthalten. Ein weiterer Grund für die schlechteren mechanischen Eigenschaften liegt womöglich im künstlichen Spinnprozess selbst. Um eine hochkonzentrierte Spinnlösung herzustellen werden die rekombinanten Seiden meist in organischen Lösungsmitteln, wie Hexafluoroisopropanol (HFIP) gelöst.

Tabelle 4: Mechanische Werte von Fasern auf Basis von rekombinanten Spinnenseidenproteinen im Vergleich mit natürlicher MA-Seide. Die Werte wurden direkt aus den entsprechenden Quellen entnommen.

Material	Molekülmasse (kDa)	Reisfestigkeit (GPa)	Dehnbarkeit (%)	Zähigkeit (MJm ⁻³)	Quelle
Major Ampullate-Seide	250	1,1	27	160	[4]
1) Rekomb. MaSp2	71	0,045 ± 0,008	3,9 ± 2,6	-	[143]
2) Rekomb. MaSp1	285	0,5 ± 0,11	15 ± 5	-	[127]
3) Rekomb. MaSp1	70	0,132 ± 0,049	22,78 ± 19,06	23,7 ± 18,5	[144]
4) Rekomb. MaSp2/Flag	61	0,049 ± 0,019	34,06 ± 25,30	10,6 ± 10,2	[141]
5) Rekomb. MaSp2	106	0,0646 ± 0,026	10,8 ± 3,1	-	[145]
6) Rekomb. MaSp1	24	0,198 ± 0,019	-	-	[22]

Durch das anschließende Injizieren in ein Fällbad mit mehr als 90 % Alkohol (z. Isopropanol) entstehen Fasern, die kaum Wasser enthalten und dadurch sehr spröde und brüchig werden. Hinzu kommt, dass die Proteine in HFIP eine unnatürliche hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur annehmen, und somit eine Vorstrukturierung, wie sie im natürlichen Spinntrakt vorliegt, nicht möglich ist.

Für Fasern aus rekombinanten Seidenproteinen, die sich in wässrigem Milieu ausbilden, sind lediglich zwei Untersuchungen bekannt. Im ersten Fall bilden sich meterlange Fasern aus einem rekombinanten „Mini-Spidroin“ (ca. 24 kDa) in einem Selbstassemblierungsprozess aus einer relativ gering konzentrierten Lösung ohne äußere Einflüsse [22]. Die mechanischen Eigenschaften liegen jedoch ebenfalls eine Größenordnung unter den natürlichen Seiden (vgl. Tabelle 4, Material 6). Im zweiten Fall werden die Fasern auf Basis von rekombinanten ADF3-Proteinen mit Hilfe einer Mikrofluidikanlage gewonnen, die dem natürlichen Spinnkanal nachempfunden ist [134]. Dazu werden die in wässriger Lösung befindlichen Proteine durch ein modulares System aus dünnen Kanälen gepumpt. Das Ver-spinnen erfolgt, ähnlich wie natürlichen Spinntrakt, durch Absenken des pH-Wertes von 8 auf 6, der Zugabe von Phosphationen sowie einem Elongationsfluss initiiert. Die resultierenden Fasern sind wasserunlöslich und zeigen unter kreuz-polarisiertem Licht Doppelbrechung wie sie auch bei natürlichen MA-Seidenfäden beobachtet wurde, was für stark strukturierte bzw. kristalline Bereiche spricht [115, 146-148].

1.8 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit waren hauptsächlich einzelne Aspekte des natürlichen Spinnprozesses, wie die strukturellen Umlagerungen der für MA-Spidroine typischen Aminosäuremotive (A)_n, GGX und GPGXX, besser untersucht. In einer vorangegangenen Arbeit konnten bereits erste Erkenntnisse über das Assemblierungsverhalten von rekombinanten eADF3 und 4 Proteinen unter ähnlichen Bedingungen (pH-Absenkung, Zugabe von Phosphationen, Elongationskräfte) wie sie im natürlichen Spinnkanal auftreten, gewonnen werden [134]. Über die Funktionen der nicht-repetitiven terminalen Domänen während der Speicherung und des Verspinnens Domänen hingegen waren nicht viel bekannt. Um die Rolle der terminalen Domänen näher zu charakterisieren, wurden diese mit künstlichen repetitiven Domänen auf Basis der Proteine ADF3 und 4 gekoppelt, deren Löslichkeits- und Assemblierungseigenschaften zum Teil bereits charakterisiert waren [124, 132, 134, 135, 149]. Die Untersuchung der Rolle der beiden terminalen Domänen erfolgte in drei unterschiedlichen Teilprojekten.

Der umfangreichste Teil stellt die Charakterisierung der nicht-repetitive carboxyterminale Domäne NR3 des Spinnenseidenproteins ADF3 der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* dar. Als Basis dienten vorangegangene Arbeiten in denen bereits erste Erkenntnisse über den Einfluss von NR3 auf rekombinante Spidroine auf Basis von ADF3 gewonnen werden konnten [124, 134, 149]. Ein wesentlicher Teil der Arbeit mit der NR3-Domäne bestand darin die Struktur-Funktionsbeziehung besser zu charakterisieren. Die Struktur der Domäne sollte dabei mittels NMR in Kooperation mit Prof. Dr. Kessler und Dr. Franz Hagn (TU München) untersucht werden. Die Funktion der NR3-Domäne sollte mit Hilfe von rekombinanten eADF3 Proteinen analysiert werden, wobei der Schwerpunkt dabei auf der Analyse des Löslichkeits- und Assemblierungsverhalten, unter Bedingungen wie sie auch während des natürlichen Spinnprozesses auftreten, lag. So sollten die Proteine unter Scherstress oder in Anwesenheit von kosmotropen Salzen wie Kaliumphosphat untersucht werden.

Da die Spidroine der Großen Ampullendrüse aller Wahrscheinlichkeit nach in den gleichen Zellen produziert werden [8, 35], sollten in einem zweiten Teilprojekt die Untersuchungen auf ein zweites rekombinantes Spinnenseidenprotein auf Basis von ADF4 ausgedehnt werden. Ein besonderer Fokus lag dabei auf möglichen Interaktionen, die durch die stark homologen CT-Domänen NR3 und NR4 vermittelt werden.

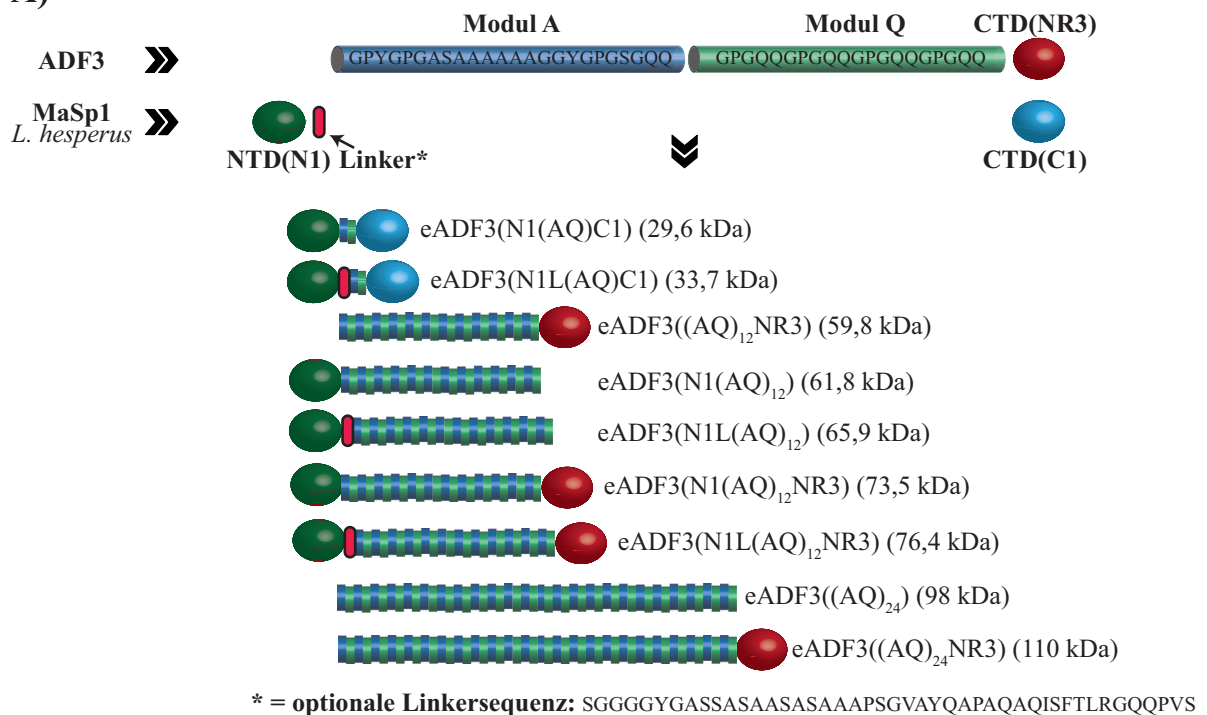
Da natürliche MA-Spidroine zwei terminale Domänen aufweisen, sollten in einem dritten Teilprojekt rekombinante Seidenproteine mit NT- und CT-Domäne untersucht werden. Die NT-Domäne bildet pH-abhängig ein antiparalleles Dimer [34, 79, 85], weshalb besonders das Löslichkeits- und Assemblierungsverhalten bei pH-Bedingungen wie sie in der Drüse vorkommen, untersucht wurden. Da die Sequenzen der NT-Domänen von ADF 3 und 4 nicht bekannt sind, wurden stattdessen diejenigen der MaSp-Proteine der schwarzen Witwe *Latrodectus hesperus* verwendet werden [8].

2. Synopsis

2.1 Übersicht der verwendeten Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Seiden basieren auf den beiden MaSp2-Proteinen ADF3 und 4 der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* [7, 124]. Von den repetitiven Blöcken in ADF3 und 4 wurden entsprechende Konsensusmotive abgeleitet, die modular mittels eines speziell entwickelten Klonierungssystems nahtlos multimerisiert werden können. Aus den repetitiven Blöcken in ADF3 wurden die Module A (Alaninreich) und Q (Glutamin (Q)-reich) generiert, während aus ADF4 das Modul C (Carboxylgruppe des Glutamats) abgeleitet wurde (Abbildung 11).

A)



B)

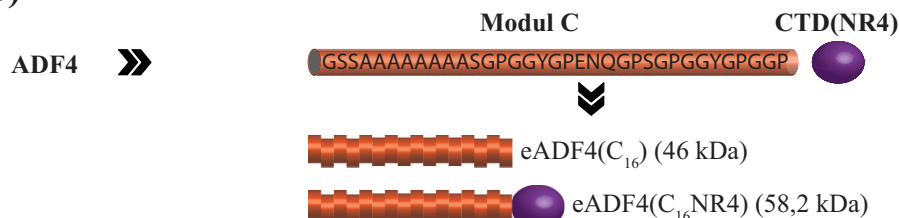


Abbildung 11: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine. Aus den repetitiven Blöcken von (A) ADF3 wurden die Module A und Q, aus (B) ADF4 das Modul C abgeleitet. Die Module können nahtlos multimerisiert werden und mit den Sequenzen der nativen carboxyterminalen Domänen NR3/ NR4 aus ADF3/4 verknüpft werden. Neben den ADF-Termini wurden zudem die beiden terminalen Domänen von Masp1 der schwarzen Witwe (*L. hesperus*) in diverse eADF3-Proteine eingebaut. Alle N1-haltigen Proteine liegen auch in einer Variante mit einer 32 Aminosäure langen Linkersequenz vor, die sich am carboxyterminalen Ende der N1-Domäne befindet.

Die repetitiven Einheiten können mit den jeweiligen nativen Sequenzen der carboxyterminalen Domänen NR3 und NR4 aus ADF3 respektive ADF4 kombiniert werden. Die rekombinanten Proteine werden als eADF3 und 4 (*engineered* ADF3 und 4) bezeichnet [124]. Da die aminoterminalen Domäne von ADF3 und 4 nicht bekannt sind, wurde stattdessen diejenige von MaSp1 der schwarzen Witwe (*L. hesperus*), hier als N1 bezeichnet, verwendet. Die dazugehörige carboxyterminale C1 stand ebenfalls zur Verfügung. Die Sequenzen der beiden MaSp1-Termini wurden auf Basis der Veröffentlichung von Ayoub et al entworfen [8].

2.2 Die NR3-Domäne

2.2.1 Lösungsstruktur der NR3-Domäne

Die Struktur der carboxyterminalen Domäne NR3 des MA-Proteins ADF3 der Spinne *Araneus diadematus* konnte mittels NMR gelöst werden. Die Aufklärung der Struktur sowie Teile der biophysikalischen Charakterisierung der NR3-Domäne wurden hauptsächlich von Franz Hagn durchgeführt [150] (Abbildung 12).

Die nicht-repetitive carboxyterminale Domäne NR3 des natürlichen Spinnenseidenproteins ADF3 bildet in Lösung ein durch eine Cysteinbrücke kovalent verknüpftes, parallel orientiertes Dimer (Abbildung 12). Jedes Monomer besteht aus fünf α -Helices, die die Form einer gekrümmten Hand annehmen. Helix 1 ragt dabei jeweils klammerartig an das andere Monomer heran und interagiert dort mit Helix 5 (Abbildung 12 A). Die Reste zwischen Helix 4 und 5 bilden zudem einen Bogen aus in dem der carboxyterminale Teil von Helix 4* liegt. Trotz paralleler Anordnung der Monomere zeigen die aminoterminalen Enden von Helix 1 und 1*, welche die Verbindung zu den repetitiven Bereichen des Seidenproteins darstellen, in einem Winkel von etwa 100° relativ zueinander von der NR3-Domäne weg. Das zentrale Dimerisierungsinterface um Helix 4 stellt mit mehreren Leucinen und Valinen den hydrophobsten Teil des Proteins dar (Abbildung 12 C, D). Die Interaktion der hydrophoben Seitenketten wird durch eine leichte Verdrehung der beiden zentralen Helices zueinander verstärkt (Abbildung 12 A). Am aminoterminalen Ende von Helix 4 befindet sich ein konserviertes Cystein, das beide Monomere über eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft [24, 36, 151]. In thermischen Entfaltungsexperimenten unter reduzierenden Bedingungen oder mit carboxymethylierten Cysteinresten konnte gezeigt werden, dass die Disulfidbrücke das Protein signifikant stabilisiert. Jedes Monomer enthält zudem zwei Salzbrücken (R43-E101, R52-D92), die jeweils Helix 1, 2 und 4 verbinden (Abbildung 12 B).

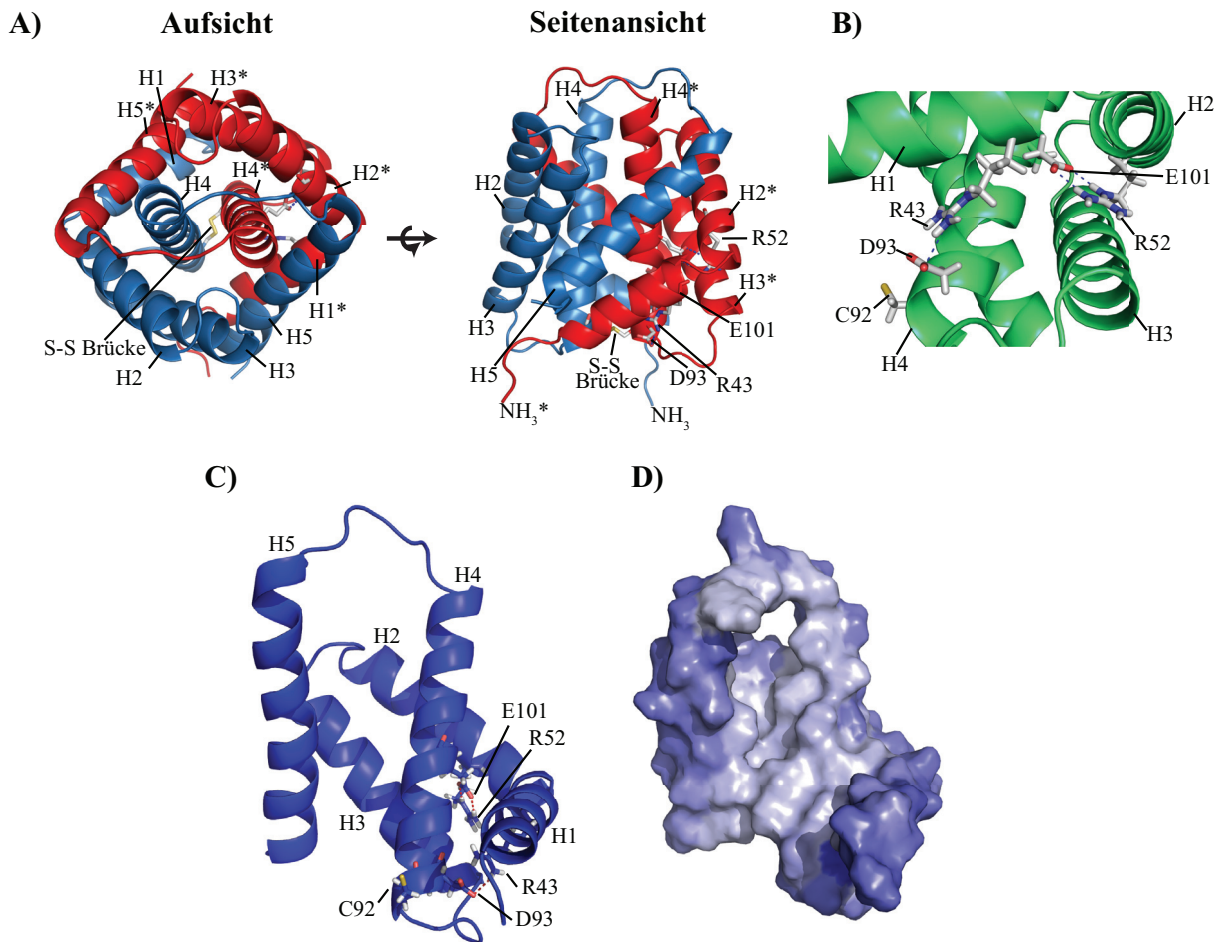


Abbildung 12: Lösungsstruktur von NR3. A) Auf- und Seitenansicht des NR3-Dimers in vereinfachter Darstellung. Die Helices von Monomer 1 (blau) sind mit H1-H5 gekennzeichnet, die von Monomer 2 (rot) mit H1*-H5*. Die Seitenketten der Disulfidbrücke (Cys92) sowie der Salzbrücken R43-D93 und R52-E101 sind gezeigt. B) Vergrößerung des Bereiches um die Salzbrücken sowie des Cysteins in einem Monomer. C) Darstellung eines NR3-Monomers innerhalb der dimeren Struktur. Die Salzbrücken der vier geladenen Aminosäuren sind eingezeichnet. D) Moleküloberfläche des Monomers aus (C) eingefärbt nach der Hydrophobizitätsskala nach Kyte & Doolittle [152]. Grau: hydrophobe Reste; Blau/Dunkelblau: hydrophile Reste. Die Strukturen wurden mit PyMOL gezeichnet.

Diese vier an der Ausbildung der ionischen Bindungen beteiligten Aminosäuren sind die einzigen geladenen in der gesamten bekannten natürlichen ADF3-Sequenz und ebenso wie das Cystein hochkonserviert innerhalb der carboxyterminalen Domänen der MaSp-Proteine [7]. Um die Bedeutung der Salzbrücken näher zu beleuchten wurden thermische Entfaltungsexperimente mit NR3-Mutanten durchgeführt, bei denen jeweils eine geladene Aminosäure gegen Alanin ausgetauscht wurde. Sämtliche Alanin-Mutanten weisen dabei zum Teil erheblich reduzierte Schmelzpunkte auf (Teilarbeit I, Supplement-Abbildung 2 B). Auch eine Umkehr der Polung der Salzbrücken z. B. von R43-D93 zu D43-R93 führte zu einer Reduktion des Schmelzpunktes um ca. 20°C, was zeigt, dass der Bereich um die Salzbrücken sehr sensitiv in Bezug auf die Seitenkettengröße ist.

Mit Experimenten, die Änderungen der chemischen Verschiebungen einzelner Reste detektieren (*chemical shift perturbations*, CSP), konnte nachgewiesen werden, dass dieser Bereich des Moleküls besonders flexibel ist. In Anwesenheit von Harnstoff ist die Dynamik in diesem Teil des Moleküls am größten, was darauf schließen lässt, dass das Protein in diesem Bereich zu entfalten beginnt. In weiteren CSP-Experimenten konnte daher auch gezeigt werden, dass der für hydrophobe Bereiche sensitive Farbstoff Anilinnaphthalen-Sulfonsäure (ANS) bevorzugt in diesem Bereich bindet (Teilarbeit I, Abbildung 3).

2.2.2 Einfluss von Salz und Scherkräften auf das NR3-Dimer

Da die Speicherung der hochkonzentrierten Spidroinlösung in einem Natriumchloridhaltigen Milieu erfolgt [107], wurde der Einfluss des Salzes auf die Struktur und insbesondere auf die Region um die Salzbrücken eingehender charakterisiert.

Dazu wurde in chemischen Entfaltungsexperimenten die Stabilität der NR-Domäne bei steigender Proteinkonzentration in An- und Abwesenheit von Natriumchlorid untersucht. Mit steigender Proteinkonzentration von 5 auf 60 μM sinkt der Übergangspunkt bei Harnstoff-induzierter Entfaltung von ca. 2,8 M auf ca. 2 M Harnstoff. Die Steigung der Kurven und somit die Kooperativität des Entfaltungsvorganges nimmt dabei stetig ab, gezeigt durch den Verlust des typischen sigmoidalen Verlaufs bei 60 μM Proteinkonzentration [150]. Wird das Entfaltungsexperiment bei einer Proteinkonzentration von 60 μM in Anwesenheit von 250 mM Natriumchlorid durchgeführt, ist eine Stabilisierung des Proteins zu beobachten, wie an dem deutlich kooperativeren Übergang sowie einem leicht erhöhten Übergangspunkt zu erkennen. Durch Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 500 mM steigt die Stabilität des Proteins sogar bei einer Konzentration von 60 μM wieder auf einem Niveau mit der 5 μM -Proteinlösung (Teilarbeit I, Abbildung 3 B).

Ein ähnlicher NaCl-abhängiger Effekt ist bei thermischen Entfaltungsexperimenten mit NR3 in stark reduzierendem Milieu zu beobachten, in dem sich die Disulfidbrücke nicht ausbilden kann. Reduziertes NR3 zeigt einen ca. 20°C niedrigeren Schmelzpunkt als das oxidierte, kovalent verknüpfte NR3. Die Anwesenheit von NaCl eliminiert den destabilisierenden Einfluss der fehlenden Disulfidbrücke nahezu vollständig.

Ein Grund für die beiden beobachteten NaCl-abhängigen Effekte kann eine Stabilisierung des hydrophoben Bereiches um das Cystein sein. Wie bereits erwähnt ist dieser Bereich des Moleküls am dynamischsten und zugleich durch hydrophobe Bereiche geprägt. Wie bei anderen Proteinen bereits beobachtet, können durch steigende Salzkonzentration die

hydrophoben Interaktionen gestärkt werden, was die erhöhte Stabilität bei erhöhter Proteinkonzentration und unter reduzierenden Bedingungen erklärt [153-155].

Nach der Speicherung bei hohen Konzentrationen sind die natürlichen Spinnenseidenproteine unter anderem Scherkräften im Spinnkanal ausgesetzt, weshalb auch deren Einfluss auf die NR3-Domäne untersucht wurde. Scherkräfte wurden entweder durch „Vortexen“ oder durch Überkopf-Rotation bei 20-25 Umdrehungen pro Minute erzeugt. Die Experimente wurden zudem in Anwesenheit von 50 und 500 mM NaCl durchgeführt, um den Einfluss von Salz mit zu untersuchen. Es zeigte sich, dass ca. 50% von NR3 selbst bei langsamer Rotation über einen Zeitraum von 18-24 h aggregiert. Im Vergleich zu den thermischen Entfaltungsexperimenten ist durch die Anwesenheit von 500 mM NaCl kein ausgeprägter Stabilisierungseffekt zu erkennen. Durch Anfärben mit dem für hydrophobe Bereiche sensitiven Farbstoff ANS wird deutlich, dass die scherkraftinduzierte Aggregation mit der Exposition von hydrophoben Bereichen einhergeht (Teilarbeit I, Abbildung 3D) [150].

2.2.3 Zusammenfassung: NR3-Domäne

Während des Spinnprozesses steigt die Proteinkonzentration im Spinnkanal durch Wasserentzug stetig an, während die Natriumchloridkonzentration immer mehr abnimmt. Das während der Speicherung in der Drüse vorhandene Natriumchlorid [107] stabilisiert die NR3-Domäne bei steigenden Proteinkonzentrationen und kann somit unerwünschte Aggregation unterdrücken. Scherkräfte, wie sie während des Verspinnens auftreten, fördern hingegen die Aggregation der NR3-Domäne. Zusätzlich nimmt die NaCl-Konzentration während des Verspinnens ab, was eine gleichzeitige Destabilisierung der NR3-Domäne bewirkt und dadurch möglicherweise die Assemblierung weiter beschleunigt. Sowohl bei der NaCl-abhängigen Stabilisierung wie auch der scherkraftinduzierten Aggregation sind Aminosäuren um das hochkonservierte Cystein sowie den Salzbrücken entscheidend involviert.

2.3 Einfluss von NR3 auf das Lösungsverhalten von eADF3((AQ)_n) Proteinen

2.3.1 Bildung von supramolekularen Assemblaten

Um die Funktion von NR3 besser zu verstehen, wurde die Domäne mit rekombinanten Varianten der Kerndomäne des natürlichen Spinnenseidenproteins ADF3 kombiniert und deren Lösungs- und Assemblierungsverhalten untersucht (vgl. Abb. 11). Die rekombinante

Kerndomäne setzt sich aus mehreren Wiederholungen der beiden Konsensusmodule A und Q zusammen. Die so erhaltenen Proteine werden als eADF3((AQ)_nNR3) bezeichnet, wobei n entweder für 12 oder 24 Wiederholungen des AQ-Blocks steht. Da eADF3((AQ)₁₂NR3) aufgrund der NR3-Domäne als Dimer vorliegt, kann es bezüglich des Molekulargewichts mit eADF3((AQ)₂₄) verglichen werden.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits festgestellt, dass rekombinante Varianten von ADF3 mit NR3-Domäne andere Eigenschaften in Lösung zeigen als Varianten ohne diese Domäne [149]. In DSC- und Trübungsmessungen konnte gezeigt werden, dass nur eADF3 Proteine mit NR3 zwischen 20 und 30°C reversibel zu sichtbaren Partikeln assemblieren. Dieses Verhalten ähnelt dem häufig für synthetische Polymere beschriebenen LCST- (*lower critical solution temperature*) Verhalten. Die Übergangstemperatur dieses reversiblen Assoziationsprozesses verringert sich durch steigende Protein- sowie Natriumchloridkonzentration (Teilarbeit I, Abb. 2 D, E). Die temperaturabhängige Trübung von eADF3((AQ)_nNR3)-Lösungen lässt auf die Bildung von supramolekularen Strukturen schließen. Um zu überprüfen um welche Art von Assemblaten es sich handelt, wurden frisch hergestellte Lösungen von eADF3((AQ)₁₂NR3) und eADF3((AQ)₂₄) mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Mit einer Ausgangsproteinkonzentration von 50 µM wurde ein Wert gewählt, der auch bei den DSC- bzw. Trübungsmessungen verwendet wurde. Die Bilder der eADF3((AQ)₂₄)-Proben zeigen keinerlei assemblierte oder aggregierte Strukturen, vergleichbar den Pufferkontrollen. Die Aufnahmen der Proben mit eADF3((AQ)₁₂NR3) hingegen zeigen sichtbare, kapselartige Strukturen, die bis zu mehrere hundert Nanometer groß sind (Teilarbeit II, Abb. 4C). Mizellartige, supermolekulare Morphologien wurden auch in der Spinnrüse beobachtet [104, 105]. Diese Ergebnisse zusammen mit anderen Publikationen [79, 149] deuten darauf hin, dass die nicht repetitiven carboxyterminalen Domänen möglicherweise an der Bildung der supramolekularen Assemblate beteiligt sind und eine nicht-kovalente, reversible Oligomerisierung vermitteln.

2.3.2 Einfluss der NR3-Domäne auf phosphatinduzierte Aggregation von Seidenproteinen

Kosmotrope Ionen, wie das im Spinnkanal vorhandene Phosphat [49, 107], initiieren die Aggregation bzw. Assemblierung von eADF3 Proteinen [124, 134]. Um den Einfluss der NR3-Domäne bei diesem Aussalzprozess zu untersuchen, wurden die Proteine (AQ)₁₂NR3, (AQ)₂₄NR3, (AQ)₂₄ sowie die Mutante (AQ)₁₂NR3_D93A für eine Stunde bei unterschied-

lichen Phosphatkonzentrationen inkubiert, anschließend zentrifugiert und mittels UV-Spektroskopie die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt (Abbildung 13).

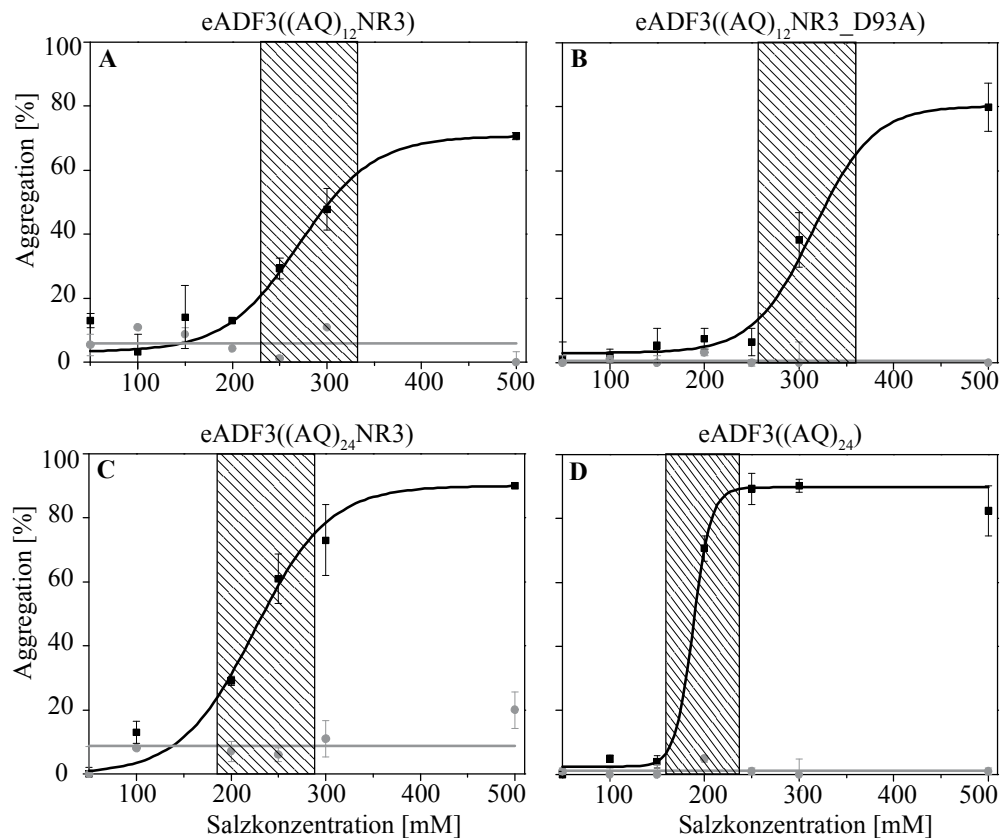


Abbildung 13: Phosphationen induzierte Aggregation von eADF3-Proteinen. Die Proteine wurden in Anwesenheit von Natriumphosphat (schwarz) oder NaCl (grau) bei pH 8,0 inkubiert. (A) eADF3((AQ)₁₂NR3), (B) eADF3((AQ)₁₂NR3_D93A) mit der Mutation Asp → Ala an Position 93 in der NR3-Domäne, (C) eADF3((AQ)₂₄NR3), (D) eADF3((AQ)₂₄). Durch die Punkte wurde zur besseren Übersicht mit einer Sigmoidalfunktion gefittet. Die Konzentrationsbereiche in denen die Zunahme der Aggregation am stärksten ist, sind durch schraffierte Bereiche gekennzeichnet. Modifiziert nach [156].

Die zur Kontrolle bei gleichen Konzentrationen an NaCl inkubierten Proben aggregieren nicht oder nur schwach was zeigt, dass der beobachtete Effekt ausschließlich auf die Phosphationen zurück zu führen ist. Aus dem Experiment geht hervor, dass sich alle NR3-haltigen eADF3-Proteine trotz zum Teil unterschiedlicher Molekulargewichte in Anwesenheit von Phosphationen ähnlich verhalten (Abbildung 13, A-C).

Der Konzentrationsbereich, in dem die Zunahme der Aggregation am stärksten ist, liegt bei allen drei Varianten ca. zwischen 200 und 350 mM Phosphat. Im Gegensatz dazu aggregiert das Protein ohne NR3-Domäne, eADF3((AQ)₂₄), in einem engeren und niedrigeren Konzentrationsbereich von ca. 150-250 mM (Abbildung 2 D). Am auffälligsten ist der Unterschied zwischen (AQ)₂₄ und (AQ)₁₂NR3 mit nahezu identischem Molekulargewicht

(Abbildung 13 A, D). Obwohl beide Proteine in Lösung die gleiche Anzahl an für die Aggregation verantwortlichen AQ-Modulen aufweisen, reagieren sie unterschiedlich auf die entsprechenden Phosphatkonzentrationen.

Das beobachtete Aggregieren der eADF3-Proteine durch die relativ kosmotropen Phosphationen ist ein klassischer Aussalzprozess basierend auf hydrophoben Interaktionen, wie er auch bei anderen Proteinen schon beobachtet wurde [135, 153, 155, 157]. Die hydrophobsten Bereiche in eADF3-Proteinen stellen die Polyalaninsequenzen dar, welche auch in den aggregierten rekombinanten Proteinen mit hoher Wahrscheinlichkeit als β -Faltblattkristalle vorliegen [135, 136, 157]. Die Anwesenheit der NR3-Domäne in den rekombinanten Seidenproteinen scheint das phosphatbedingte Aussalzen abzuschwächen bzw. zu verlangsamen.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde allerdings gezeigt, dass das in dieser Dissertation nicht verwendete $(AQ)_{12}$ in Anwesenheit von 300 mM Kaliumphosphat und ansonsten ähnlichen Bedingungen (pH-Wert, Proteinkonzentration, Inkubationsdauer) weniger stark aggregiert als $(AQ)_{12}NR3$ [124]. Eine mögliche Erklärung ist bei der Abtrennung der jeweiligen Aggregate zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Aggregate bei 17000g abzentrifugiert, während Huemmerich et al diese bei 125000g für einen längeren Zeitraum abgetrennt haben. eADF3-Proteine mit NR3-Domäne neigen wie in dieser Arbeit gezeigt zur Bildung von höheren molekularen Assemblaten, welche durch Anwesenheit von 50-100 mM Phosphat noch verstärkt wird (s. u.a. Teilarbeit III). Möglicherweise wurde daher bei niedrigeren Zentrifugalkräften weniger Protein sedimentiert, so dass die Menge an aggregiertem Protein geringer erscheint. Beide Ergebnisse stehen daher nicht zwingend im Widerspruch zueinander.

2.3.3 Einfluss von Scherkräften auf die Assemblierung von eADF3-Proteinen mit NR3-Domäne

Im Spinntrakt treten aufgrund der Windungen und dem stetig enger werdenden Querschnitt des Kanals Scher- und Elongationskräfte auf, welche bei einer Reihe von Seidenproteinen zur Aggregation bzw. Assemblierung führen [72, 73, 105, 158]. Um den Einfluss der NR3-Domäne auf die Assemblierung der repetitiven Domäne zu untersuchen, wurden deshalb eADF $((AQ)_{12}NR3)$ und eADF $3((AQ)_{24})$ Scherkräften ausgesetzt. Die entsprechenden Proteinlösungen wurden dazu in einem Eppendorfreaktionsgefäß für mind. 18 h bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Untersuchung der erhaltenen As-

semblate erfolgte mittels Lichtmikroskopie und polarisierter Fouriertransform-Infrarotspektroskopie (Abbildung 14 und 15).

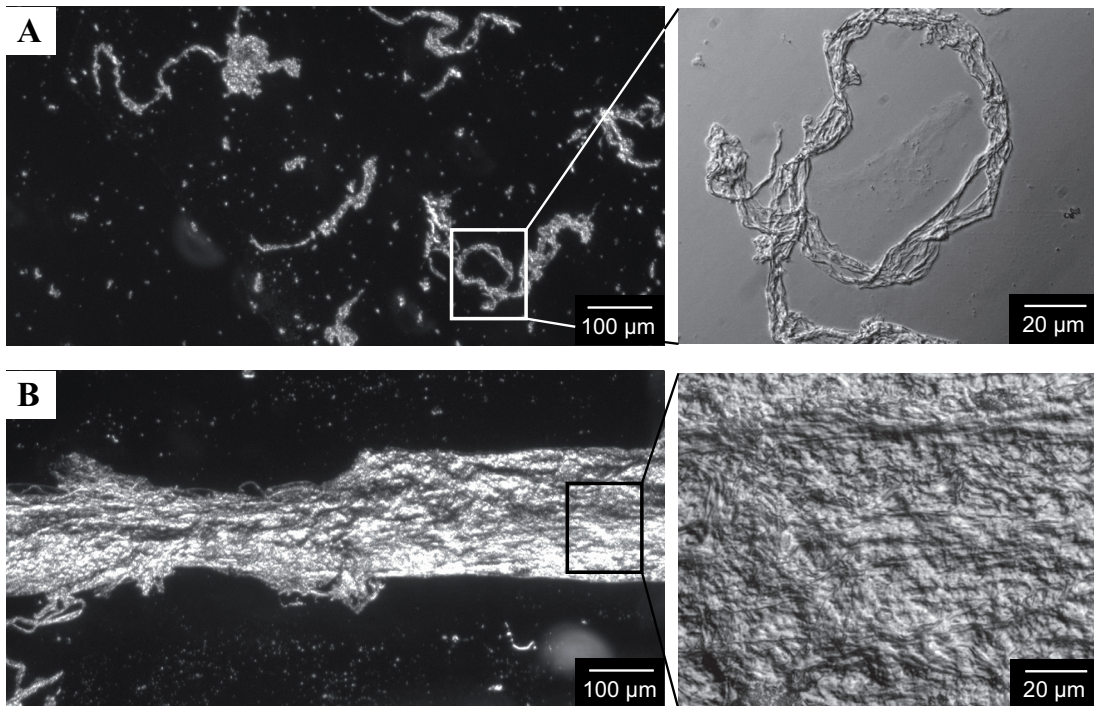


Abbildung 14: Untersuchung scherkraftinduzierter Assemblate von eADF3((AQ)₂₄) und eADF3((AQ)₁₂NR3) mittels Lichtmikroskopie. Gezeigt sind phasenkontrastierte lichtmikroskopische Aufnahmen von (AQ)₂₄ (A) und (AQ)₁₂NR3 (B) in jeweils zwei Vergrößerungsstufen. Modifiziert nach [156].

Unter Scherstress bildet eADF3((AQ)₂₄) kleine Aggregatansammlungen, die größtenteils aus relativ ungeordneten fibrillären Strukturen bestehen. Die einzelnen Fibrillen sind wenige 100 µm lang und meist dünner als 1 µm (Abbildung 14 A). eADF3((AQ)₁₂NR3) hingegen lagert sich zu makroskopisch sichtbaren Fasern zusammen. Unter stärkerer Vergrößerung erkennt man, dass die Fasern aus parallel zur Faserachse orientierten Bündeln bestehen (Abbildung 14 B), die im Gegensatz zu den (AQ)₂₄-Aggregaten stabil gegenüber mechanischen Einflüssen wie schnelles Mischen oder Pipettieren sind.

Die aus den Rotationsassays erhaltenen Fasern wurden mittels polarisierter FTIR-Spektroskopie untersucht. Diese Methode erlaubt es den Grad der Ausrichtung von speziellen Strukturelementen zu untersuchen. So konnte in natürlichen Spinnenseidenfasern den Polyalanin-β-Faltblattkristallen ein spezifisches Absorptionssignal bei 964 cm⁻¹ zugewiesen werden, welches abhängig von der Messrichtung relativ zur Faserlängsachse eine unterschiedliche Intensität aufweist [58, 59]. Das Signal der parallel zur Faserachse ausgerichteten β-Faltblattkristalle [53, 55, 60, 62, 88] ist bei ebenfalls parallel zur Faserachse polarisiertem IR-Licht am höchsten.

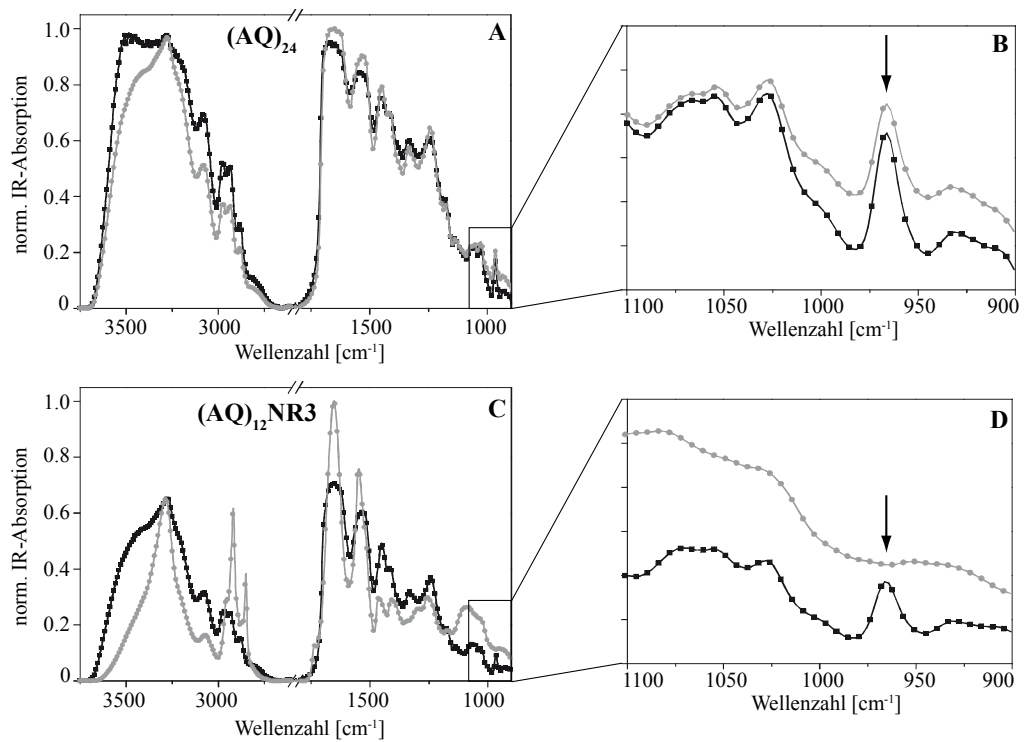


Abbildung 15: Polarisierte FTIR Messungen an scherkraftinduzierten Assemblaten von eADF3((AQ)₂₄ und eADF3((AQ)₁₂NR3). Die Spektren von (AQ)₂₄ (A, B) und (AQ)₁₂NR3 (C, D) wurden mit polarisiertem IR-Licht 90° (grau) bzw. 0° (schwarz) relativ zur Faserachse aufgenommen. Dargestellt sind das Spektrum von 3500 – 900 cm⁻¹ (A, C) sowie Vergrößerungen im Bereich von 1100-900 cm⁻¹. Die Pfeile kennzeichnen das für die Polyanilin-β-Faltblattkristalle typischen Signals bei 964 cm⁻¹. Modifiziert nach [156].

Um zu überprüfen, ob die durch Rotation erhaltenen Fasern eine strukturelle Orientierung aufweisen, wurden Spektren mit polarisiertem IR-Licht in verschiedenen Winkeln relativ zur Faserlängsachse aufgenommen. Die Spektren der (AQ)₂₄ Aggregate zeigen unabhängig vom verwendeten Polarisationswinkel den gleichen Verlauf und ähnliche Intensitäten (Abbildung 15 A). Das Signal der Polyanilin β-Faltblattkristalle ist in beiden Orientierungen sichtbar und ähnlich intensiv (Abbildung 15 B). Sämtliche für die entsprechenden IR-Signale verantwortlichen strukturellen Elemente sind demnach isotrop in den (AQ)₂₄ Aggregaten verteilt. Die Spektren der beiden Polarisierungsebenen der (AQ)₁₂NR3-Assemblate hingegen unterscheiden sich untereinander signifikant, sowohl im Verlauf (Lage und Höhe der Peakmaxima) als auch in ihrer Intensität (Abbildung 15 C). Das β-Faltblattkristall-Signal ist wie im natürlichen Faden [58, 59] nur parallel zur Faserlängsachse messbar (Abbildung 15 D). Die Ergebnisse der Rotationsexperimente zeigen, dass die NR3-Domäne die laterale Assoziation der Proteine vermittelt, ebenso wie die Orientierung der strukturellen Elemente entlang der Faserachse.

2.3.4 Modell zum Einfluss der NR3-Domäne während des Spinnprozesses

Die Untersuchungen an der isolierten NR3-Domäne sowie den unterschiedlichen eADF3 Konstrukten zeigen, dass die carboxyterminale Domäne möglicherweise sowohl bei der Speicherung als auch bei der Assemblierung von Spinnenseidenproteinen eine wichtige Rolle spielt. Mit den Ergebnissen lässt sich ein Modell zur Funktion der NR-Domäne während des Spinnprozesses erstellen (Abbildung 16).

Die NR3-Domäne ist maßgeblich an der Ausbildung von supramolekularen Assemblaten beteiligt, wie sie in Spinndrüsen beobachtet wurden und möglicherweise die Speicherform der Spidroine darstellen [104, 113, 159]. Durch die Anwesenheit von Natriumchlorid während der Speicherung wird die NR-Domäne stabilisiert, was zusätzlich die vorzeitige Aggregation unterbindet. Im weiteren Verlauf des Spinnprozesses sind die Spidroine Scherkräften und einer sinkenden Natriumchloridkonzentration ausgesetzt, welche dazu beitragen die NR3-Domäne partiell zu destabilisieren sowie zu entfalten und hydrophobe Bereiche um die Disulfidbrücke zu exponieren, was den Assemblierungsvorgang beeinflusst. Durch die Zugabe von kosmotropen Phosphationen wird die Assemblierung der repetitiven Bereiche stark beschleunigt. Während dieses Prozesses ermöglicht die NR-Domäne die korrekte Ausrichtung der strukturellen Elemente, wie z. B. die β -Faltblattkristalle, innerhalb der Faser.

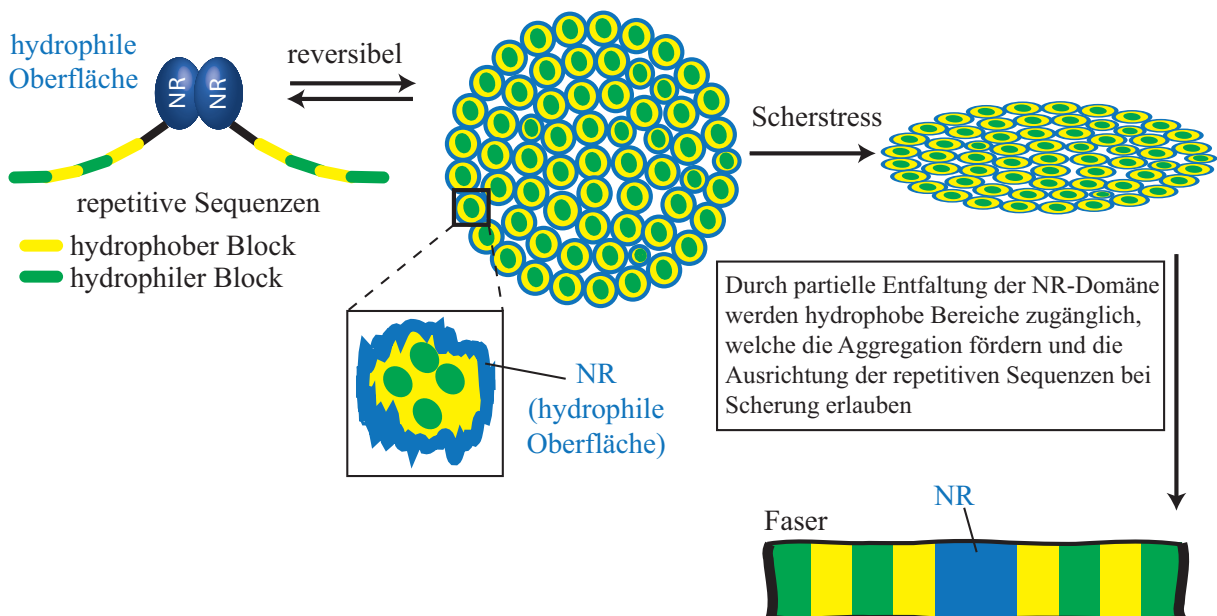


Abbildung 16: Einfluss der NR-Domäne auf die Assemblierung von Spinnenseidenproteinen. Während der Speicherung bei hohen Proteinkonzentrationen lagern sich die NR-vermittelten amphiphilen Dimere zu mizellartigen, supramolekularen Assemblaten zusammen. Durch den Einfluss von Scher- und Elongationskräften wird die NR-Domäne partiell entfaltet und macht dabei hydrophobe Bereiche zugänglich, was den Assemblierungsvorgang zusätzlich beeinflusst. Während dieser Prozesse trägt die NR3-Domäne zur korrekten Ausrichtung der repetitiven Ketten entlang der Faserlängsachse bei. Modifiziert nach [81].

2.4 Heterodimerisierung von NR3-NR4-Konstrukten

2.4.1 Bildung des Heterodimers

Die bisherigen Untersuchungen haben sich lediglich auf eines der beiden ADF-Proteine aus der *dragline*-Seide von *A. diadematus* konzentriert. Da die beiden Proteine ADF3 und ADF4 aller Wahrscheinlichkeit nach in der Großen Ampullendrüse in den gleichen Zellen produziert werden [8, 35], wurden die Untersuchungen auf das zweite bekannte Spinnenseidenprotein auf Basis von ADF4 ausgedehnt. Der Fokus lag hierbei auf möglichen Interaktionen vermittelt durch die homologen CT-Domänen NR3 und NR4.

ADF3 und 4 unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer repetitiven Kerndomäne. eADF4-Proteine sind hydrophober als eADF3-Proteine und zeigen ein anderes Löslichkeits- und Assemblierungsverhalten [134, 135, 160]. So sind eADF3-Proteine in wässriger Lösung bis zu 30% (w/v) löslich, während eADF4-Proteine bis maximal 9% (w/v) löslich sind [124]. Die nicht-repetitiven carboxyterminalen Domänen (CTD) NR3 und NR4 hingegen sind zueinander, wie alle MaSp-CTD-Sequenzen, stark homolog. Daher stellte sich die Frage der natürlichen Interaktion von eADF3-NR3 und eADF4-NR4.

Dazu wurden die beiden Proteine eADF3((AQ)₁₂NR3) und eADF4(C₁₆NR4) sowohl *in vitro* nach individueller Produktion als auch *in vivo* nach Coexpression der entsprechenden Gene untersucht.

Beide Proteine bilden schon während der Produktion in *E. coli* über ihre carboxyterminalen Domänen kovalent verknüpfte Dimere aus, wobei der größte Teil der Proteine in der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss zu finden ist. Die Coexpression hat auf die Löslichkeit der einzelnen Proteine keinen Einfluss. Mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot konnte in den Coexpressionsproben eine Bande identifiziert werden, die eindeutig einem carboxyterminal vermitteltem Heterodimer zugeordnet werden konnte (Teilarbeit III, Abbildung 2b). Solch ein Heterodimer kann man auch durch *in vitro* Experimente erhalten, indem man zu einer 1:1 Mischung chemisch denaturiertem eADF3((AQ)₁₂NR3) und eADF4(C₁₆NR4) ein starkes Reduktionsmittel wie TCEP gibt und die Proteine unter reduzierenden Bedingungen zurückfaltet. Allerdings ist die Menge an gebildeten Heterodimer *in vitro* wesentlich geringer als *in vivo*, wo eine Verteilung der drei dimeren Spezies von nahezu 1:1:1 beobachtet wurde (Teilarbeit III, Abbildung 2c).

2.4.2 Assemblierungseigenschaften des Heterodimers

Um das Heterodimer näher zu charakterisieren, wurde es mittels einer zweistufigen Reinigungsstrategie, bestehend aus einer Nickel-Affinitätschromatografie und einem Anionentauscherschritt gereinigt.

Die strukturelle Integrität des Heterodimers wurde mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht. Das Fern-UV-CD-Spektrum zeigt keine signifikanten Unterschiede zu denen der beiden Homodimeren (Teilarbeit III, Abbildung 2d). Die Struktur des Heterodimers wird reversibel, genau wie die beiden Homodimere, nach denaturierendem Erhitzen und Abkühlen quantitativ renaturiert. Die Schmelztemperatur des Heterodimers liegt mit 66°C zwei Grad über der des (AQ)₁₂NR3-Dimers und 1.5 Grad unter der des C₁₆NR4-Dimers.

In einem weiteren Experiment wurde die *in vitro* Löslichkeit der drei dimeren Proteine bei Phosphat-induzierter Aggregation bzw. Assemblierung untersucht. Die Experimente wurden analog zu den bereits gezeigten aus Teilarbeit I und II durchgeführt. Dieser Assay zeigt, dass die beiden Homodimere (AQ)₁₂NR3 und C₁₆NR4 ca. im gleichen Phosphatkonzentrationsbereich von 150 – 300 mM am stärksten aggregieren. In Assemblierungskinetiken, die mittels Lichtstreuung in Anwesenheit von 100 mM Phosphat aufgenommen wurden, zeigte sich, dass C₁₆NR4 wesentlich schneller assembliert als (AQ)₁₂NR3. Das Heterodimer assembliert interessanterweise nur geringfügig langsamer als C₁₆NR4. Werden die Assemblierungskinetiken in Anwesenheit des β -Faltblatt detektierenden Farbstoffs ThioflavinT (ThT) durchgeführt, zeigte (AQ)₁₂NR3 signifikant weniger ThT-Bindung als die anderen beiden Dimere (Teilarbeit III, Abbildung 3c).

2.4.3 Assemblierungsmorphologien der Homodimere im Vergleich zum Heterodimer

Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen eADF3 und eADF4-Proteinen ist ihr Selbstassemblierungsverhalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eADF4(C₁₆), ein Derivat ohne die NR4-Domäne, in Anwesenheit von bis zu 300 mM Kaliumphosphat Nanofibrillen ausbildet. Diese Fibrillen haben einen hohen β -Faltblattanteil [135]. eADF3-Proteine hingegen bilden keine fibrillären Strukturen in dieser Größenordnung aus sondern neigen in Anwesenheit von Phosphat zur Ausbildung supramolekularer, mizellartiger Assemblate (Teilarbeit II). Um die Selbstassemblierungseigenschaften des AQ/C-Heterodimers zu untersuchen, wurde es in Anwesenheit von 50 – 100 mM Kaliumphosphat für 1-2 Tage inkubiert und anschließend mittels Rasterkraft- (AFM) und Transmissions-

elektronenmikroskopie (TEM) untersucht (Abbildung 17 & Teilarbeit III, Supplement Abbildung 1).

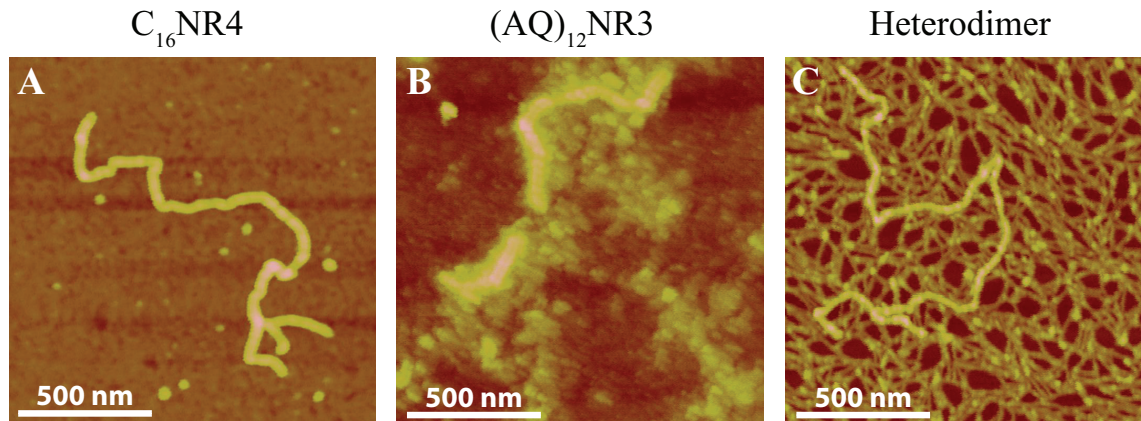


Abbildung 17: AFM-Aufnahmen der drei dimeren Spezies. (A) $C_{16}NR4$, (B) $(AQ)_{12}NR3$ und (C) Heterodimer. Die Proteine wurden vor den Aufnahmen für 24 h in Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 und 50 mM Kaliumphosphat bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bilder wurden im *tapping mode* erstellt.

$C_{16}NR4$ bildet unter den hier getesteten Bedingungen Fibrillen von mehreren hundert Nanometern Länge, die denen der bereits beschriebenen $C_{16}\Delta NR4$ -Fibrillen sehr ähnlich sind [135]. $(AQ)_{12}NR3$ bildet nicht-fibrilläre Morphologien aus, die eher an bereits beschriebenen sphärische, mizellartige Assemblate erinnern (Teilarbeit II). In Transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten diese Assemblate ebenfalls nachgewiesen werden (Teilarbeit III, Supplement Abbildung 1). Das Heterodimer hingegen bildet ebenfalls Nanofibrillen aus, die sich jedoch von $C_{16}NR4$ -Fibrillen signifikant unterscheiden. Sie sind wesentlich dünner und bilden ein hochverzweigtes Netzwerk, wobei die Abstände zwischen den einzelnen Verzweigungspunkten manchmal nur wenige Nanometer betragen.

2.4.4. Bedeutung des Heterodimers

Beide MaSp-Proteine werden in der Drüse im selben Bereich sekretiert [8, 35, 161]. Genomische Untersuchungen an regulatorischen Elementen der Spidroingene deuten auf eine gemeinsame Regulierung der Gene/Proteine hin [8]. Über potentielle Interaktionen zwischen MaSp-Proteinen ist wenig bekannt, lediglich über die Verteilung im Faden [44, 46, 102].

ADF3 und 4 sind aufgrund ihres hohen Prolingehaltes MaSp2 Analoga, wobei ADF4 hydrophober ist als ADF3 [7]. Die beiden zugehörigen carboxyterminalen Domänen NR3 und NR4 weisen eine sehr hohe Homologie auf [81]. Die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse zeigen, dass beide ADF Proteine über ihre carboxyterminalen Domänen bereits

während der Produktion innerhalb der Zellen, z.B. in den Kompartimenten des sekretorischen Systems, interagieren können. Möglicherweise agiert das Heterodimer als zusätzlicher „Quervernetzer“ bzw. als Assemblierungsvermittler zwischen beiden *dragline* Proteinen.

Aus biotechnologischer Sicht stellt die Möglichkeit unterschiedliche Seidenproteine mittels der carboxyterminalen Domänen zu verknüpfen eine einfache Methode dar um verschiedene Materialien mit einstellbaren Eigenschaften herzustellen.

2.5 Der Einfluss der terminalen Domänen auf die Orientierung der repetitiven Kerndomäne von rekombinanten Spinnenseidenproteinen

In den bisherigen Arbeiten (Teilarbeit I-III) wurde ausschließlich der Einfluss der nicht-repetitiven carboxyterminalen Domäne auf eADF3 und 4 Proteine untersucht. Um weitere Erkenntnisse über den Einfluss der terminalen Domänen auf das Lösungs- und Assemblierungsverhalten zu erhalten, wurden rekombinante eADF3-Proteine mit beiden terminalen Domänen untersucht (Teilarbeit VI). Da die native NT-Domäne der ADF-Proteine nicht bekannt ist, kam stattdessen die NT-Region von MaSp1 der schwarzen Witwe (*L. hesperus*) zur Verwendung (vgl. Abbildung 10). In einer anderen Arbeit wurde deren Struktur mittels NMR untersucht und gezeigt, dass diese eine sehr hohe strukturelle Homologie zur einzig bekannten Kristallstruktur einer MaSp-NT-Domäne einer anderen Spinnenart aufweist [79, 85]. Die NT-Domäne aus der schwarzen Witwe dimerisiert ebenfalls durch Absenken des pH-Wertes von 7,2 auf 6,0.

Die Sequenz der NT-Domäne N1 wurde zunächst an eADF3((AQ)₁₂NR3) gekoppelt, da dieses bei den vorangegangenen Arbeiten intensiv charakterisiert wurde. Als Kontrolle wurde parallel dazu eADF3(N1-(AQ)₁₂) ohne die CT-Domäne hergestellt. Um im Rahmen dieser Untersuchungen mögliche Interaktionen zwischen beiden terminalen Domänen besser zu charakterisieren, wurde zudem noch das kurze eADF3-Protein N1-AQ-C1 bestehend aus einem AQ-Block und den beiden terminalen Domänen von MaSp1 der schwarzen Witwe hergestellt (vgl. Abbildung 11). Die C1-Domäne ist homolog zur NR3-Domäne und bildet gekoppelt an eADF3-Proteine ebenso quantitativ Dimere aus (Daten nicht gezeigt).

In der NT-Dimerstruktur ist am carboxyterminalen Ende eines Monomers eine Vertiefung zu erkennen, von der vermutet wird, dass dort Teile einer Linkerregion zur repetitiven Kerndomäne binden und so die Ausrichtung der Ketten arretieren könnten [79]. Da die bisher untersuchte N1-Sequenz diese Linkerregion nicht enthält, wurden zusätzlich Varian-

ten mit der 32 Aminosäuren langen nativen Linkerregion des MaSp1-Proteins der schwarzen Witwe hergestellt (vgl. Abbildung 10) [79].

2.5.1 pH-abhängige Untersuchung der N1- und N1L-Proteine mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie

Die isolierte N1-Domäne zeigte mit fallendem pH-Wert eine erhöhte thermische Stabilität in CD-Experimenten, was als Indikator für die Dimerbildung gilt [85]. Die N1- und N1L-(AQ)₁₂ Konstrukte wurden daher ebenfalls mittels CD-Spektroskopie untersucht (Abbildung 18).

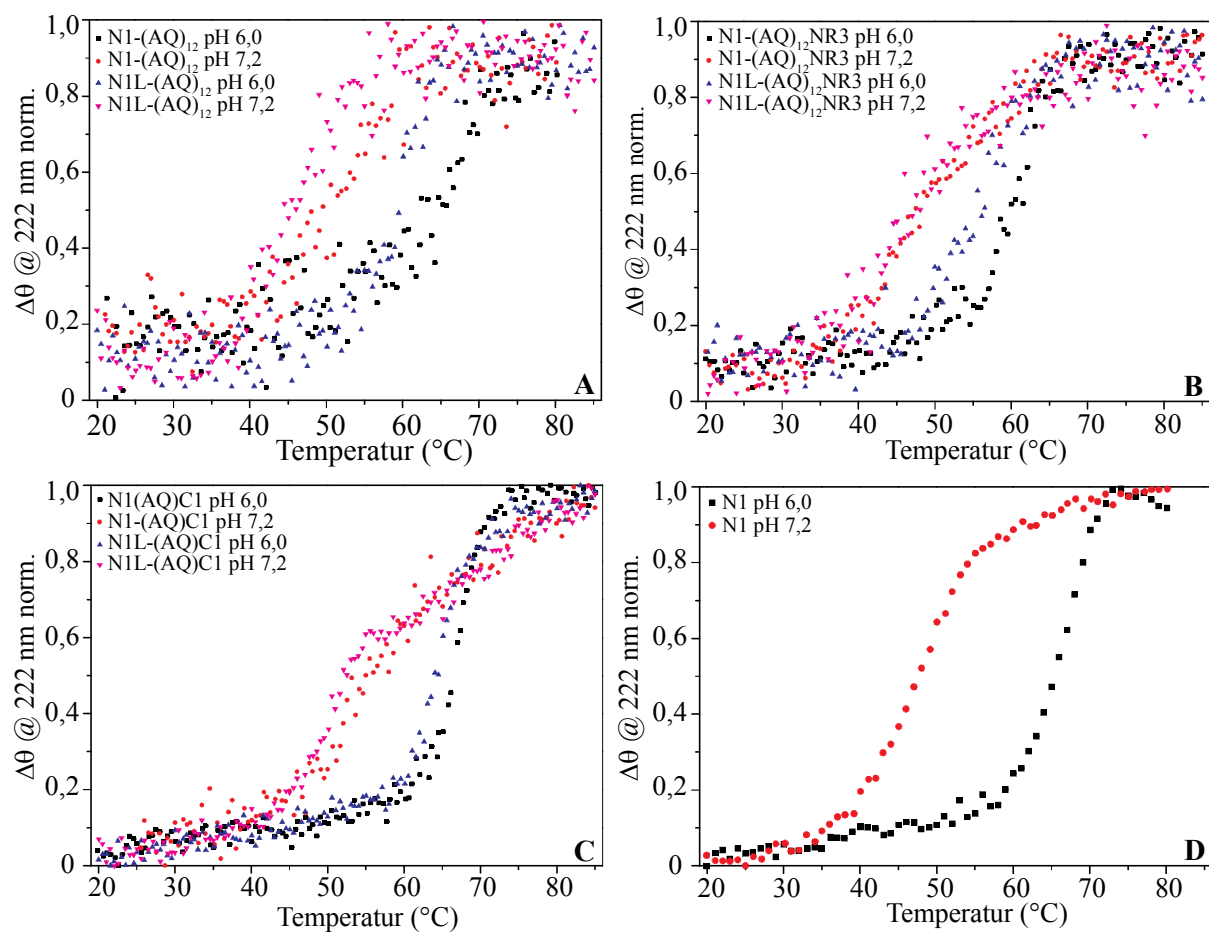


Abbildung 18: pH-abhängiges Schmelzverhalten von N1-haltigen eADF3-Proteinen und der isolierten N1-Domäne. Es sind die Schmelzkurven von (A) N1-(AQ)₁₂ & N1L-(AQ)₁₂, (B) N1-(AQ)₁₂NR3 & N1L-(AQ)₁₂NR3, (C) N1(AQ)C1 & N1L(AQ)C1 sowie der isolierten (D) N1-Domäne jeweils bei pH 6,0 und 7,2 dargestellt. Die Proteinkonzentration betrug bei allen Messungen 4 μM . Die Heiz- und Kühlrate bei den thermischen Entfaltungsanalysen betrug 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Alle Messungen wurden in 10 mM Kaliumphosphatpuffer durchgeführt.

Bei allen Konstrukten sind die Schmelzkurven wie bei der isolierten N1-Domäne auch bei pH 6,0 im Vergleich zu pH 7,2 signifikant zu höheren Temperaturen verschoben (Abbil-

dung 18). Die Linkerregion beeinflusst die thermische Stabilität bei beiden pH-Werten dabei nur marginal. Bei den vier Proteinen mit beiden terminalen Domänen sind bei pH 7,2 zwei Bereiche zu beobachten, die sehr wahrscheinlich den Entfaltungsvorgängen der beiden Termini entsprechen (Abbildung 18 B). Die Schmelztemperaturunterschiede zwischen den pH-Werten bei allen Konstrukten sind vergleichbar mit denen der isolierten N1-Domäne. Die Spektren bei 20°C vor und nach dem Erhitzen der Proteine überlagern sich nahezu vollständig, was für ein quantitatives Rückfalten spricht. Die einzigen Ausnahmen stellen N1(AQ)C1 und die N1-Domäne bei pH 6,0 dar, die beim Erhitzen auf 85°C unter den gewählten Bedingungen vollständig aggregierten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die N1-Domäne besitzt ein einzelnes Tryptophan welches abhängig vom pH-Wert unterschiedliche Fluoreszenzemissionen aufweist [79, 80]. Durch Absenken des pH-Wertes von 7,2 auf 6,0 sinkt bei der isolierten N1-Domäne die Fluoreszenzemission, und das Maximum verlagert sich von ca. 330 nach 345 nm. Dieser Fluoreszenzeffekt basiert auf einer konformationellen Umlagerung des Tryptophans, die während der Dimerisierung auftritt [34, 79, 80]. Um zu überprüfen ob dieser Effekt und damit eine mögliche Dimerisierung bei den N1- und N1Linker-Konstrukten auftritt, wurden diese daher bei pH 7,2 und 6,0 mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht (Abbildung 19).

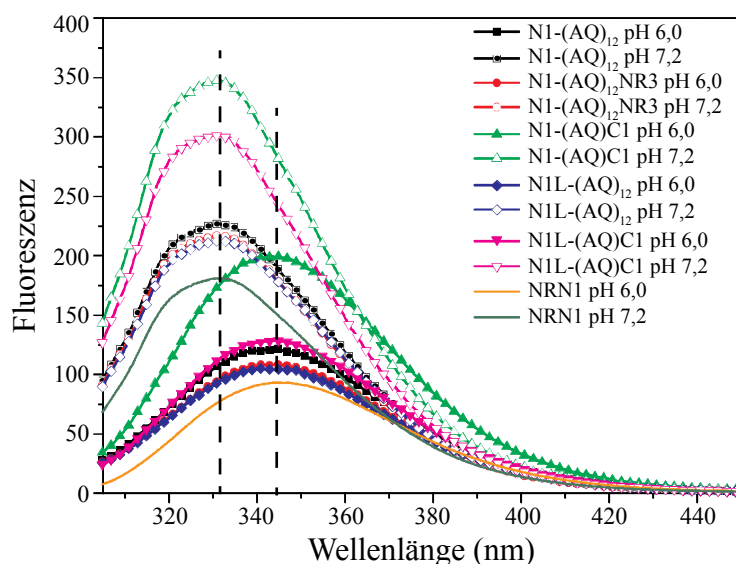


Abbildung 19: pH-abhängige Fluoreszenzmessungen von N1-Proteinen. Dargestellt sind Emissionsspektren bei pH 6,0 (geschlossene Symbole) und pH 7,2 (offene Symbole). Zum Vergleich sind die Spektren der isolierten N1-Domäne mitangegeben (von Joschka Bauer zur Verfügung gestellt). Die Lage der unterschiedlichen Maxima ist durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Die Proteine wurden vor der Messung in Puffern mit den entsprechenden pH-Werten äquilibriert. Die Proteinkonzentration betrug bei den Messungen zwischen 3 und 6 μM . Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm.

Die Fluoreszenzmessungen zeigen, dass alle N1-(AQ)-Proteine bei den beiden pH-Werten das gleiche Verhalten aufweisen wie die isolierte N1-Domäne. Bei pH 6,0 ist die Fluoreszenzintensität geringer und das Maximum zu ca. 345 nm verschoben. Die Maxima bei pH 7,2 liegen alle bei ca. 330 nm. Die Spektren zeigen zudem, dass die Anwesenheit der Linkerregion keinen Einfluss auf den Fluoreszenzeffekt hat. Laut diesen Messungen soll-

ten daher sämtliche N1-Domänen in den eADF3-Konstrukten durch pH-Absenkung dimerisieren.

2.5.2 SEC-MALS-Analyse der N1- und N1L-Proteine

Die pH-abhängige Dimerisierung der N1-Domäne wurde mittels an eine Größenausschlu­schromatographie gekoppelte statische Lichtstreuungsmessung (SEC-MALS) verfolgt [85]. Um zu überprüfen, ob die N1-haltigen eADF3-Konstrukte auch tatsächlich Dimerisieren oder evtl. Oligomerisieren wurden hier ebenfalls SEC-MALS Experimente durchgeführt (Abbildung 20).

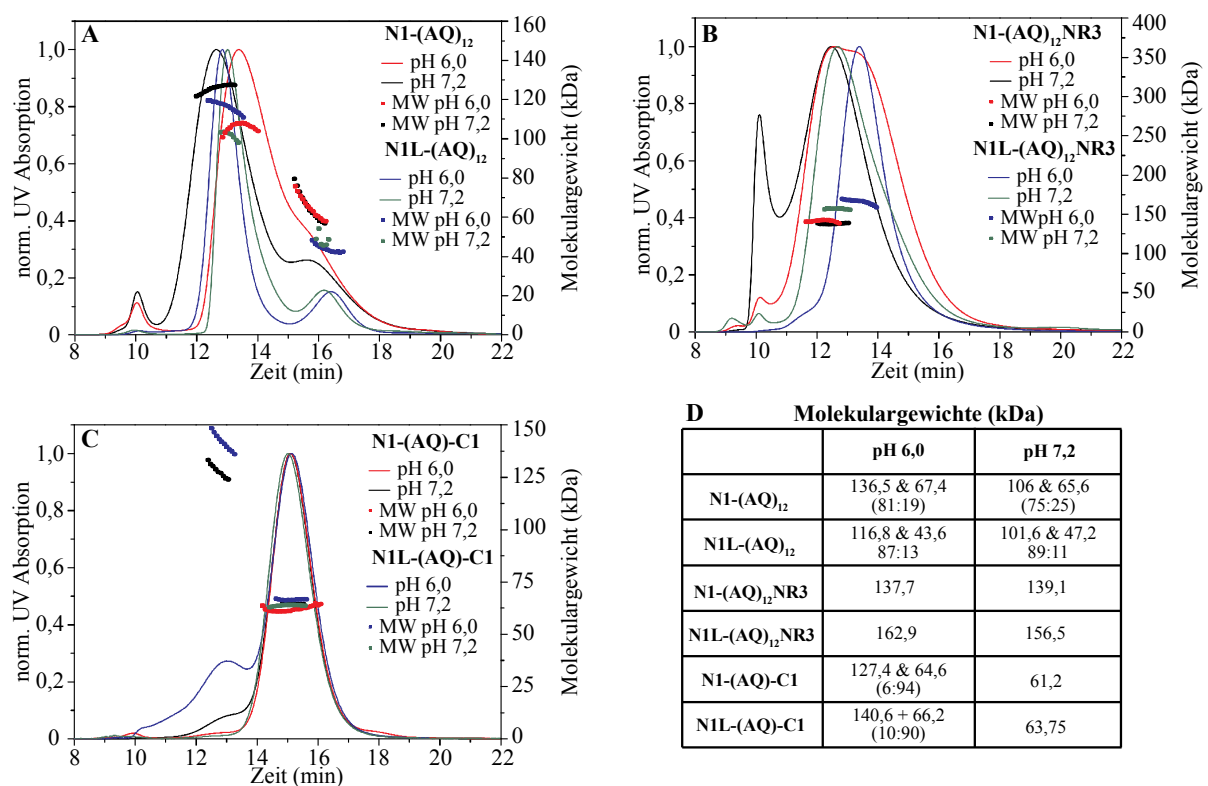


Abbildung 20: SEC-MALS Analyse von N1-eADF3 und N1-eADF3-NR3 Proteinen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Gezeigt ist jeweils das UV-Chromatogramm (durchgezogene Linie) mit der normierten Absorption bei 280 nm sowie die mittels MALS ermittelten Molekulargewichte der Proteinspezies (Punkte). A) N1-(AQ)₁₂ und N1L-(AQ)₁₂. B) N1-(AQ)₁₂NR3 und N1L-(AQ)₁₂NR3. C) N1-(AQ)-C1 und N1L-(AQ)-C1. D) Tabellarische Darstellung der mittels MALS ermittelten Molekulargewichte der einzelnen Proteine bei pH 6,0 und 7,2. Die Proteinkonzentration in allen Läufen betrug ca. 12 µM.

Die SEC-MALS Ergebnisse von N1-(AQ)₁₂NR3 bzw. N1L-(AQ)₁₂NR3 zeigen, dass die Absenkung des pH-Wertes keine Änderung des Assemblierungszustandes bewirkt. Bei beiden pH-Werten liegen die Proteine nahezu vollständig als NR3-vermittelte Dimere vor. Allerdings ist die Retentionszeit des N1L-Konstruktes bei pH 6,0 signifikant größer, was

auf eine Änderung des hydrodynamischen Radius und somit der Proteinpäckung hinweist (Abbildung 20 B). Die wesentlich kleineren N1- und N1L-(AQ)-C1-Konstrukte zeigen ebenfalls nur eine schwache Tendenz zur Ausbildung von intermolekularen Dimeren, wobei hier die Anwesenheit der Linkerregion sichtbar zu einem höheren Dimer-vom-Dimer Anteil beiträgt (Abbildung 20 C). Um zu überprüfen ob die NT-abhängige Dimerisierung tatsächlich in Verbindung mit repetitiven Blöcken funktioniert, wurde als Kontrolle N1-(AQ)₁₂ bzw. N1L-(AQ)₁₂ untersucht. Im Gegensatz zu den Proteinen mit beiden nicht-repetitiven terminalen Domänen zeigen beide Proteine bei pH 6,0 hauptsächlich als N1-vermitteltes Dimer vor. Interessanterweise dissoziieren sie auch bei pH 7,2 nicht quantitativ. Auch hier zeigt sich, allerdings für das N1-Konstrukt, eine signifikant verschobene Retentionszeit bei pH 6,0. Da alle Proteine in etwa bei gleicher Konzentration auf die Säule appliziert wurden, deuten die Ergebnisse auf unterschiedliche Assoziations/Dissoziationskonstanten der verschiedenen N1/N1L-Proteine hin.

Die Anwesenheit der carboxyterminalen Domäne scheint demnach einen Einfluss auf die N1-vermittelte Dimerisierung zu haben. Während Fluoreszenz- und CD-Assays zeigen, dass alle N1-haltigen Proteine auf die Absenkung des pH-Wertes sehr ähnlich reagieren, konnte dies bei den SEC-MALS Experimenten nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die carboxyterminale Domäne NR3 möglicherweise die Konformation und/oder Ausrichtung der repetitiven Bereiche mehr als bisher angenommen beeinflusst. Es sind jedoch noch weiterführende Experimente notwendig um diesen auch für das Verständnis des natürlichen Spinnprozesses wichtigen Sachverhalt weiter zu charakterisieren. Die AQ-Proteine mit beiden terminalen Domänen stellen eine gute Basis für weiterführende Experimente dar.

2.6 Modell des natürlichen Spinnprozesses

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen ein erstes übergreifendes Modell für die Initiierung der Fadenassemblierung zu erstellen (Teilarbeiten IV & V) (Abbildung 21).

Die MA-Spidroine werden zunächst von dafür spezialisierten Zellen produziert und ins Lumen der Drüse sekretiert, welches einen pH-Wert von ca. 7,2 aufweist. Die Spidroingene werden aller Wahrscheinlichkeit nach coexprimiert [8, 35, 162]. Sie liegen aufgrund der CT-Domäne als parallel orientierte kovalent verknüpfte Dimere vor und werden bis zum Verspinnen in der Ampulla bei hohen Konzentrationen von bis zu 50% (w/v) gelagert.

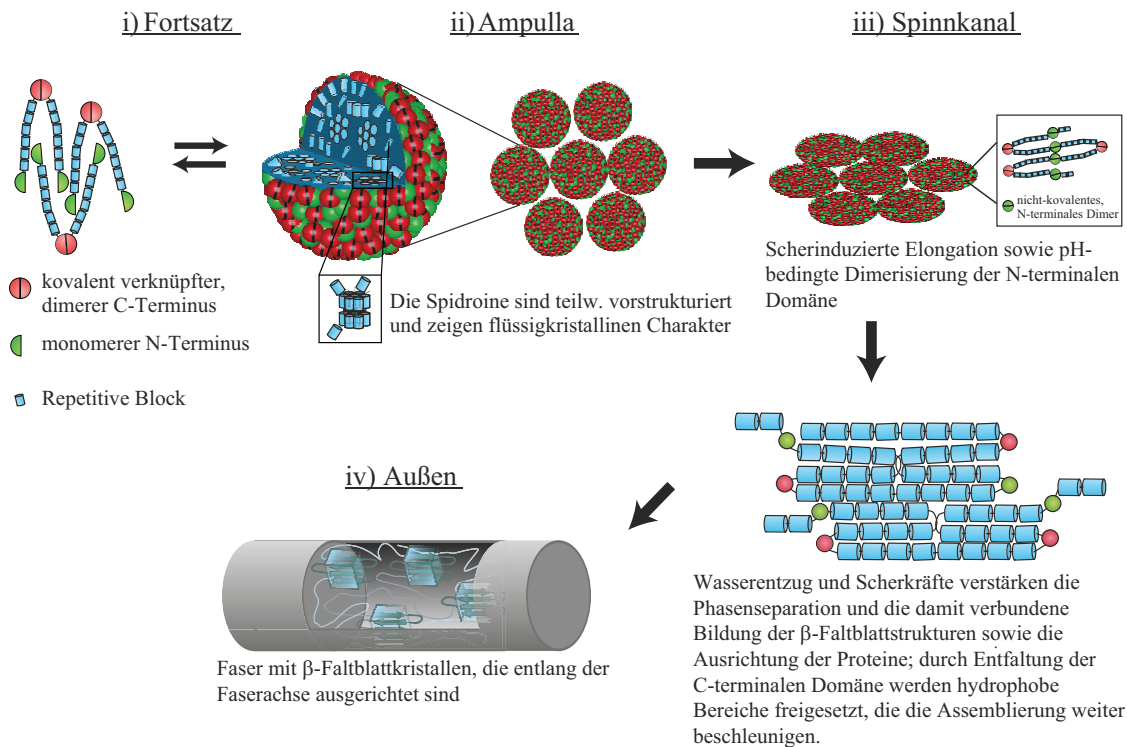


Abbildung 21: Molekulares Modell des Spinnprozesses innerhalb der MA-Drüse. Die Spidroine werden als kovalente Dimere sekretiert und anschließend bei hohen Konzentrationen in Form von Mizellartigen Assemblaten mit flüssigkristallinen Eigenschaften gelagert (i, ii). Durch weiteres Absenken des pH-Wertes im Spinnkanal bilden die NT-Regionen antiparallele Dimere aus, die die Spidroine weiter vernetzen. Das Auftreten von Scher- und Elongationskräften im Spinnkanal sowie der aktive Entzug von Wasser initiiert die Bildung der β -Faltblattkristalle (iii). Gleichzeitig entfalten die CT-Domänen und exponieren so hydrophobe Bereiche, die die Assemblierung weiter beschleunigen. Parallel dazu unterstützt die CT-domäne die Ausrichtung der strukturellen Elemente entlang der Faserachse ermöglichen (iii). Im finalen Faden sind die antiparallelen β -Faltblattkristalle entlang der Faserachse orientiert und tragen so zur mechanischen Stabilität bei. Modifiziert nach [3]

Aufgrund des amphiphilen Charakters der repetitiven Kerndomänen lagern sich die Proteine zu supramolekularen, mizellartigen Assemblaten zusammen, die einen flüssigkristallinen Charakter aufweisen [105]. An der Bildung dieser Assemblate ist möglicherweise die CT-Domäne beteiligt. Das in der Ampulla vorhandene Natriumchlorid stabilisiert die CT-Domäne gegen Entfaltung und damit gegen vorzeitige Assemblierung. Die nicht-repetitive aminoterminal (NT) Domäne liegt in der Ampulla aufgrund des pH-Wertes und der Anwesenheit von Natriumchlorid überwiegend als Monomer vor. Da der pH-Wert innerhalb der Ampulla von 7,2 bis auf ca. 6,5 kurz vor Beginn des S-förmigen Spinnkanal abnimmt, steigt die Tendenz der NT-Domäne antiparallele Dimere zu bilden [82, 83]. Mit Eintritt in den S-förmigen Spinnkanal durch eine Art Trichter verändern sich die physikochemischen Bedingungen in der Drüse. Es kommt zu einer weiteren Ansäuerung durch Protonenpumpen auf ca. pH 6,0 [82, 83] sowie zu Ionenaustauschprozessen bei denen Natriumchlorid durch das kosmotropere Kaliumphosphat ersetzt wird. Durch die Windungen sowie dem

enger werdenden Spinnkanal treten zusätzlich Scher- und Elongationskräfte auf. In Abwesenheit von Natriumchlorid und in Anwesenheit von Scherkräften entfaltet sich die CT-Domäne und fördert durch die Exposition von hydrophoben Bereichen die Assemblierung der Spidroine. Die NT-Domäne dimerisiert unter den Bedingungen im Spinnkanal. Diese antiparallelen Dimere beschleunigen durch die mögliche Vernetzung der Spidroine die Assemblierung. Durch das Kaliumphosphat sowie die Scher- und Elongationskräfte bilden sich intermolekulare β -Faltblattkristalle. Parallel dazu wird im Spinnkanal Wasser entzogen, was die Konzentration der Proteine erhöht und somit zur flüssig-fest Phasenseparation beiträgt [108]. Zusammen mit den zunehmenden Scher- und Elongationskräften gegen Ende des Spinntraktes bewirkt die CT-Domäne eine Ausrichtung der strukturellen Elemente entlang der Faserachse. Durch aktiven Zug aus der Spinnwarze wird die strukturelle Ausrichtung finalisiert.

3. Literaturverzeichnis

1. Craig, C.L., *Evolution of arthropod silks*. Annual Review of Entomology, 1997. **42**(1): p. 231-267.
2. Platnick, N.I. *The World Spider Catalog, Version 13.5*. 2013; Available from: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html>.
3. Eisoldt, L., A. Smith, and T. Scheibel, *Decoding the secrets of spider silk*. Materials Today, 2011. **14**(3): p. 80-86.
4. Gosline, J.M., et al., *The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function*. Journal of Experimental Biology, 1999. **202**(23): p. 3295-3303.
5. Blackledge, T.A. and C.Y. Hayashi, *Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775)*. Journal of Experimental Biology, 2006. **209**(13): p. 2452-2461.
6. Denny, M., *PHYSICAL-PROPERTIES OF SPIDERS SILK AND THEIR ROLE IN DESIGN OF ORB-WEBS*. Journal of Experimental Biology, 1976. **65**(2): p. 483-506.
7. Guerette, P.A., et al., *Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family*. Science, 1996. **272**(5258): p. 112-115.
8. Ayoub, N.A., et al., *Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes*. Plos One, 2007. **2**(6): p. -.
9. Hinman, M.B. and R.V. Lewis, *Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19320-4.
10. Colgin, M.A. and R.V. Lewis, *Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like "spacer regions"*. Protein Science, 1998. **7**(3): p. 667-672.
11. Bittencourt, D., et al., *Spidroins from the Brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae : nephilidae)*. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, 2007. **147**(4): p. 597-606.
12. Hayashi, C.Y. and R.V. Lewis, *Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks*. Journal of Molecular Biology, 1998. **275**(5): p. 773-784.
13. Hayashi, C.Y., T.A. Blackledge, and R.V. Lewis, *Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: Uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family*. Molecular Biology and Evolution, 2004. **21**(10): p. 1950-1959.
14. Vasanthavada, K., et al., *Aciniform spidroin, a constituent of egg case sacs and wrapping silk fibers from the black widow spider *Latrodectus hesperus**. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(48): p. 35088-35097.
15. Ayoub, N.A., et al., *Ancient properties of spider silks revealed by the complete gene sequence of the prey-wrapping silk protein (*AcSpl*)*. Molecular Biology and Evolution, 2012.
16. Hu, X.Y., et al., *Araneoid egg case silk: A fibroin with novel ensemble repeat units from the black widow spider, *Latrodectus hesperus**. Biochemistry, 2005. **44**(30): p. 10020-10027.
17. Huang, W., et al., *Characterization and expression of a cDNA encoding a tubuliform silk protein of the golden web spider *Nephila antipodiana**. Biochimie, 2006. **88**(7): p. 849-858.
18. Zhao, A.C., et al., *Unique molecular architecture of egg case silk protein in a spider, *Nephila clavata**. Journal of Biochemistry, 2005. **138**(5): p. 593-604.
19. Blasingame, E., et al., *Pyriform Spidroin 1, a Novel Member of the Silk Gene Family That Anchors Dragline Silk Fibers in Attachment Discs of the Black Widow Spider, *Latrodectus hesperus**. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(42): p. 29097-29108.
20. Perry, D.J., et al., *Piriform Spider Silk Sequences Reveal Unique Repetitive Elements*. Biomacromolecules, 2010. **11**(11): p. 3000-3006.

21. Motriuk-Smith, D., et al., *Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins*. *Biomacromolecules*, 2005. **6**(6): p. 3152-3159.
22. Stark, M., et al., *Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(5): p. 1695-1701.
23. Xu, M. and R.V. Lewis, *Structure of a Protein Superfiber - Spider Dragline Silk*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. **87**(18): p. 7120-7124.
24. Beckwitt, R. and S. Arcidiacono, *Sequence conservation in the C-terminal region of spider silk proteins (Spidroin) from Nephila clavipes (Tetragnathidae) and Araneus bicentenarios (Araneidae)*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): p. 6661-3.
25. Work, R.W. and C.T. Young, *The Amino-Acid Compositions of Major and Minor Ampullate Silks of Certain Orb-Web-Building Spiders (Araneae, Araneidae)*. *Journal of Arachnology*, 1987. **15**(1): p. 65-80.
26. Lucas, F., *Spiders and their silks*. *Discovery*, 1964. **25**(1): p. 20 - 26.
27. Chen, G., et al., *Full-Length Minor Ampullate Spidroin Gene Sequence*. *Plos One*, 2012. **7**(12): p. e52293.
28. Hayashi, C.Y. and R.V. Lewis, *Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene*. *Science*, 2000. **287**(5457): p. 1477-1479.
29. Gatesy, J., et al., *Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences*. *Science*, 2001. **291**(5513): p. 2603-2605.
30. Garb, J.E. and C.Y. Hayashi, *Modular evolution of egg case silk genes across orb-weaving spider superfamilies*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(32): p. 11379-11384.
31. Geurts, P., et al., *Synthetic Spider Silk Fibers Spun from Pyriform Spidroin 2, A Glue Silk Protein Discovered in Orb-Weaving Spider Attachment Discs[†]*. *Biomacromolecules*, 2010. **11**(12): p. 3495-3503.
32. Rising, A., et al., *Major ampullate spidroins from Euprosthenoops australis: multiplicity at protein, mRNA and gene levels*. *Insect Molecular Biology*, 2007. **16**(5): p. 551-561.
33. Rising, A., et al., *N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins*. *Biomacromolecules*, 2006. **7**(11): p. 3120-3124.
34. Gaines, W.A., M.G. Sehorn, and W.R. Marcotte, Jr., *The spidroin N-terminal domain promotes a pH-dependent association of silk proteins during self-assembly*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(52): p. 40745-40753.
35. Gaines, W.A.t. and W.R. Marcotte, Jr., *Identification and characterization of multiple Spidroin 1 genes encoding major ampullate silk proteins in Nephila clavipes*. *Insect Mol Biol*, 2008. **17**(5): p. 465-74.
36. Challis, R.J., S.L. Goodacre, and G.M. Hewitt, *Evolution of spider silks: conservation and diversification of the C-terminus*. *Insect Molecular Biology*, 2006. **15**(1): p. 45-56.
37. Garb, J., N. Ayoub, and C. Hayashi, *Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains*. *BMC Evolutionary Biology*, 2010. **10**(1): p. 243.
38. Agnarsson, I., M. Kuntner, and T.A. Blackledge, *Bioprospecting Finds the Toughest Biological Material: Extraordinary Silk from a Giant Riverine Orb Spider*. *PLoS ONE*, 2010. **5**(9): p. e11234.
39. Emile, O., A. Le Floch, and F. Vollrath, *Biopolymers: Shape memory in spider draglines*. *Nature*, 2006. **440**(7084): p. 621-621.
40. Work, R.W. and N. Morosoff, *A Physico-Chemical Study of the Supercontraction of Spider Major Ampullate Silk Fibers*. *Textile Research Journal*, 1982. **52**(5): p. 349-356.
41. Jelinski, L.W., et al., *Orientation, structure, wet-spinning, and molecular basis for supercontraction of spider dragline silk*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999. **24**(2-3): p. 197-201.
42. Boutry, C. and T.A. Blackledge, *Evolution of supercontraction in spider silk: structure-function relationship from tarantulas to orb-weavers*. *J Exp Biol*, 2010. **213**(Pt 20): p. 3505-14.

43. Blackledge, T.A., et al., *How super is supercontraction? Persistent versus cyclic responses to humidity in spider dragline silk*. Journal of Experimental Biology, 2009. **212**(13): p. 1980-1988.
44. Sponner, A., et al., *Differential polymerization of the two main protein components of dragline silk during fibre spinning*. Nature Materials, 2005. **4**(10): p. 772-775.
45. Candelas, G.C. and J. Cintron, *A spider fibroin and its synthesis*. Journal of Experimental Zoology, 1981. **216**(1): p. 1-6.
46. Sponner, A., et al., *Characterization of the protein components of Nephila clavipes dragline silk*. Biochemistry, 2005. **44**(12): p. 4727-4736.
47. Pérez-Rigueiro, J., et al., *Supercontraction of dragline silk spun by lynx spiders (Oxyopidae)*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **46**(5): p. 555-557.
48. Crews, S.C. and B.D. Opell, *The features of capture threads and orb-webs produced by unfed Cyclosa turbinata (Araneae : Araneidae)*. Journal of Arachnology, 2006. **34**(2): p. 427-434.
49. Tillinghast Edward, K. and A. Townley Mark, *Silk Glands of Araneid Spiders*, in *Silk Polymers*. 1993, American Chemical Society. p. 29-44.
50. Witt, P., et al., *spider web building in outer space: evaluation of records from the Skylab spider experiment*. Journal of Arachnology, 1976. **4**(2): p. 115-124.
51. Warwicker, J.O., *Comparative studies of fibroins. II. The crystal structures of various fibroins*. Journal of Molecular Biology, 1960. **2**: p. 350-62.
52. Hijirida, D.H., et al., *13C NMR of Nephila clavipes major ampullate silk gland*. Biophysical Journal, 1996. **71**(6): p. 3442-7.
53. Grubb, D.T. and L.W. Jelinski, *Fiber morphology of spider silk: The effects of tensile deformation*. Macromolecules, 1997. **30**(10): p. 2860-2867.
54. Simmons, A., E. Ray, and L.W. Jelinski, *Solid-State 13C NMR of Nephila clavipes Dragline Silk Establishes Structure and Identity of Crystalline Regions*. Macromolecules, 1994. **27**(18): p. 5235-5237.
55. Parkhe, A.D., et al., *Structural studies of spider silk proteins in the fiber*. Journal of Molecular Recognition, 1997. **10**(1): p. 1-6.
56. van Beek, J.D., et al., *The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(16): p. 10266-71.
57. Creager, M.S., et al., *Solid-State NMR Comparison of Various Spiders' Dragline Silk Fiber*. Biomacromolecules, 2010: p. null-null.
58. Papadopoulos, P., et al., *Similarities in the Structural Organization of Major and Minor Ampullate Spider Silk*. Macromolecular Rapid Communications, 2009. **30**(9-10): p. 851-857.
59. Papadopoulos, P., J. Solter, and F. Kremer, *Hierarchies in the structural organization of spider silk-a quantitative model*. Colloid and Polymer Science, 2009. **287**(2): p. 231-236.
60. Riekkel, C., M. Muller, and F. Vollrath, *In situ X-ray diffraction during forced silking of spider silk*. Macromolecules, 1999. **32**(13): p. 4464-4466.
61. Jenkins, J.E., et al., *Quantitative Correlation between the Protein Primary Sequences and Secondary Structures in Spider Dragline Silks*. Biomacromolecules, 2010. **11**(1): p. 192-200.
62. Simmons, A.H., C.A. Michal, and L.W. Jelinski, *Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk*. Science, 1996. **271**(5245): p. 84-7.
63. Lefevre, T., M.E. Rousseau, and M. Pezolet, *Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy*. Biophysical Journal, 2007. **92**(8): p. 2885-2895.
64. Holland, G.P., et al., *Determining Secondary Structure in Spider Dragline Silk by Carbon-Carbon Correlation Solid-State NMR Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(30): p. 9871-9877.

65. Hayashi, C.Y., N.H. Shipley, and R.V. Lewis, *Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins*. International Journal of Biological Macromolecules, 1999. **24**(2-3): p. 271-275.
66. Guan, J., F. Vollrath, and D. Porter, *Two Mechanisms for Supercontraction in Nephila Spider Dragline Silk*. Biomacromolecules, 2011. **12**(11): p. 4030-4035.
67. Holland, G.P., et al., *Solid-state NMR investigation of major and minor ampullate spider silk in the native and hydrated states*. Biomacromolecules, 2008. **9**(2): p. 651-657.
68. Liu, Y., et al., *Proline and processing of spider silks*. Biomacromolecules, 2008. **9**(1): p. 116-121.
69. Liu, Y., Z.Z. Shao, and F. Vollrath, *Relationships between supercontraction and mechanical properties of spider silk*. Nature Materials, 2005. **4**(12): p. 901-905.
70. Holland, G.P., R.V. Lewis, and J.L. Yarger, *WISE NMR characterization of nanoscale heterogeneity and mobility in supercontracted Nephila clavipes spider dragline silk*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(18): p. 5867-5872.
71. van Beek, J.D., et al., *Supercontracted spider dragline silk: a solid-state NMR study of the local structure*. International Journal of Biological Macromolecules, 1999. **24**(2-3): p. 173-178.
72. Chen, X., D.P. Knight, and F. Vollrath, *Rheological characterization of nephila spidroin solution*. Biomacromolecules, 2002. **3**(4): p. 644-8.
73. Kojic, N., et al., *Ex vivo rheology of spider silk*. Journal of Experimental Biology, 2006. **209**(21): p. 4355-4362.
74. Hronska, M., et al., *NMR characterization of native liquid spider dragline silk from Nephila edulis*. Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 834-839.
75. Knight, D.P., M.M. Knight, and F. Vollrath, *Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk*. International Journal of Biological Macromolecules, 2000. **27**(3): p. 205-210.
76. Lefevre, T., et al., *Conformation of spider silk proteins in situ in the intact major ampullate gland and in solution*. Biomacromolecules, 2007. **8**(8): p. 2342-2344.
77. Leclerc, J., et al., *Structure and pH-induced alterations of recombinant and natural spider silk proteins in solution*. Biopolymers, 2012. **97**(6): p. 337-346.
78. Corpet, F., *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(22): p. 10881-90.
79. Askarieh, G., et al., *Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay*. Nature, 2010. **465**(7295): p. 236-U125.
80. Jaudzems, K., et al., *pH-Dependent Dimerization of Spider Silk N-Terminal Domain Requires Relocation of a Wedged Tryptophan Side Chain*. Journal of Molecular Biology, 2012(0).
81. Hagn, F., et al., *A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly*. Nature 2010. **465**(7295): p. 239-42.
82. Dicko, C., F. Vollrath, and J.M. Kenney, *Spider Silk Protein Refolding Is Controlled by Changing pH*. Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 704-710.
83. Vollrath, F., D.P. Knight, and X.W. Hu, *Silk production in a spider involves acid bath treatment*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 1998. **265**(1398): p. 817-820.
84. Baker, N.A., et al., *Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(18): p. 10037-10041.
85. Hagn, F., et al., *pH-Dependent Dimerization and Salt-Dependent Stabilization of the N-terminal Domain of Spider Dragline Silk—Implications for Fiber Formation*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **50**(1): p. 310-313.
86. Wallace, J.A. and J.K. Shen, *Unraveling a Trap-and-Trigger Mechanism in the pH-Sensitive Self-Assembly of Spider Silk Proteins*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2012. **3**(5): p. 658-662.

87. Landreh, M., et al., *A pH-Dependent Dimer Lock in Spider Silk Protein*. Journal of Molecular Biology, 2010. **404**(2): p. 328-336
88. Thiel, B.L., K.B. Guess, and C. Viney, *Non-periodic lattice crystals in the hierarchical microstructure of spider (major ampullate) silk*. Biopolymers, 1997. **41**(7): p. 703-719.
89. Trancik, J.E., et al., *Nanostructural features of a spider dragline silk as revealed by electron and X-ray diffraction studies*. Polymer, 2006. **47**(15): p. 5633-5642.
90. Fossey, S.A. and S. Tripathy, *Atomistic modeling of interphases in spider silk fibers*. International Journal of Biological Macromolecules, 1999. **24**(2-3): p. 119-125.
91. Porter, D. and F. Vollrath, *Silk as a Biomimetic Ideal for Structural Polymers*. Advanced Materials, 2009. **21**(4): p. 487-492.
92. Ene, R., P. Papadopoulos, and F. Kremer, *Combined structural model of spider dragline silk*. Soft Matter, 2009. **5**(22): p. 4568-4574.
93. Keten, S., et al., *Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of beta-sheet crystals in silk*. Nature Materials, 2010. **9**(4): p. 359-67.
94. Nova, A., et al., *Molecular and nanostructural mechanisms of deformation, strength and toughness of spider silk fibrils*. Nano Letters, 2010. **10**(7): p. 2626-34.
95. Keten, S. and M.J. Buehler, *Nanostructure and molecular mechanics of spider dragline silk protein assemblies*. Journal of the Royal Society Interface, 2010.
96. Keten, S. and M.J. Buehler, *Atomistic model of the spider silk nanostructure*. Applied Physics Letters, 2010. **96**(15): p. -.
97. Du, N., et al., *Design of superior spider silk: From nanostructure to mechanical properties*. Biophysical Journal, 2006. **91**(12): p. 4528-4535.
98. Gould, S.A.C., et al., *Short and long range order of the morphology of silk from Latrodectus hesperus (Black Widow) as characterized by atomic force microscopy*. International Journal of Biological Macromolecules, 1999. **24**(2-3): p. 151-157.
99. Li, S.F., A.J. McGhie, and S.L. Tang, *New internal structure of spider dragline silk revealed by atomic force microscopy*. Biophysical Journal, 1994. **66**(4): p. 1209-1212.
100. Augsten, K., P. Muhlig, and C. Herrmann, *Glycoproteins and skin-core structure in Nephila clavipes spider silk observed by light and electron microscopy*. Scanning, 2000. **22**(1): p. 12-15.
101. Miller, L.D., et al., *Investigation of the nanofibrillar morphology in silk fibers by small angle X-ray scattering and atomic force microscopy*. International Journal of Biological Macromolecules, 1999. **24**(2-3): p. 159-165.
102. Spohner, A., et al., *Composition and hierarchical organisation of a spider silk*. PloS one, 2007. **2**(10): p. e998.
103. Vollrath, F. and D.P. Knight, *Liquid crystalline spinning of spider silk*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 541-8.
104. Jin, H.J. and D.L. Kaplan, *Mechanism of silk processing in insects and spiders*. Nature, 2003. **424**(6952): p. 1057-61.
105. Knight, D.P. and F. Vollrath, *Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 1999. **266**(1418): p. 519-523.
106. Willcox, P.J., et al., *Evidence of a cholesteric liquid crystalline phase in natural silk spinning processes*. Macromolecules, 1996. **29**(15): p. 5106-5110.
107. Knight, D.P. and F. Vollrath, *Changes in element composition along the spinning duct in a Nephila spider*. Naturwissenschaften, 2001. **88**(4): p. 179-82.
108. Tillinghast, E.K., S.F. Chase, and M.A. Townley, *Water extraction by the major ampullate duct during silk formation in the spider, Argiope aurantia Lucas*. Journal of Insect Physiology, 1984. **30**(7): p. 591-596.
109. Eles, P.T. and C.A. Michal, *A DECODER NMR study of backbone orientation in Nephila clavipes dragline silk under varying strain and draw rate*. Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 661-665.
110. Shao, Z., et al., *Structure and Behavior of Regenerated Spider Silk*. Macromolecules, 2003. **36**(4): p. 1157-1161.

111. Seidel, A., et al., *Regenerated spider silk: Processing, properties, and structure*. *Macromolecules*, 2000. **33**(3): p. 775-780.
112. Seidel, A., O. Liivak, and L.W. Jelinski, *Artificial Spinning of Spider Silk*. *Macromolecules*, 1998. **31**(19): p. 6733-6736.
113. Vollrath, F. and D.P. Knight, *Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis**. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999. **24**(2-3): p. 243-9.
114. Menassa, R., et al., *Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production*. *Plant Biotechnology Journal*, 2004. **2**(5): p. 431-438.
115. Lazaris, A., et al., *Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells*. *Science*, 2002. **295**(5554): p. 472-476.
116. Miao, Y.G., et al., *Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006. **71**: p. 192-199.
117. Zhang, Y.S., et al., *Expression of EGFP-spider dragline silk fusion protein in BmN cells and larvae of silkworm showed the solubility is primary limit for dragline proteins yield*. *Molecular Biology Reports*, 2008. **35**(3): p. 329-335.
118. Karatzas, A., C.N. Karatzas, and D.J. Turner, *Production of biofilaments in transgenic animals*, N. Biotechnologies, Editor. 2001.
119. Wen, H.X., et al., *Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons*. *Molecular Biology Reports*, 2010. **37**(4): p. 1815-1821.
120. Xu, H.-T., et al., *Construct Synthetic Gene Encoding Artificial Spider Dragline Silk Protein and its Expression in Milk of Transgenic Mice*. *Animal Biotechnology*, 2007. **18**(1): p. 1-12.
121. Vendrely, C. and T. Scheibel, *Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications*. *Macromolecular Bioscience*, 2007. **7**(4): p. 401-409.
122. Candelas, G.C., et al., *Spider silk glands contain a tissue-specific alanine transfer-rna that accumulates invitro in response to the stimulus for silk protein-synthesis*. *Developmental Biology*, 1990. **140**(1): p. 215-220.
123. Rising, A., et al., *Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011. **68**(2): p. 169-184.
124. Huemmerich, D., et al., *Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility*. *Biochemistry*, 2004. **43**(42): p. 13604-13612.
125. Fahnstock, S.R. and L.A. Bedzyk, *Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997. **47**(1): p. 33-39.
126. Yang, J.J., et al., *High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting*. *Transgenic Research*, 2005. **14**(3): p. 313-324.
127. Xia, X.-X., et al., *Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(32): p. 14059-14063.
128. Spiess, K., S. Wohlrab, and T. Scheibel, *Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films*. *Soft Matter*, 2010. **6**(17): p. 4168-4174.
129. Spiess, K., A. Lammel, and T. Scheibel, *Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials*. *Macromol Biosci*, 2010. **10**(9): p. 998-1007.
130. Widhe, M., et al., *Recombinant spider silk as matrices for cell culture*. *Biomaterials*, 2010. **31**(36): p. 9575-9585.
131. Morgan, A.W., et al., *Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation*. *Biomaterials*, 2008. **29**(16): p. 2556-2563.
132. Slotta, U., et al., *Structural analysis of spider silk films*. *Supramolecular Chemistry*, 2006. **18**(5): p. 465-471.
133. Huemmerich, D., U. Slotta, and T. Scheibel, *Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins*. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 2006. **82**(2): p. 219-222.

134. Rammensee, S., et al., *Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(18): p. 6590-6595.
135. Slotta, U.K., et al., *An engineered spider silk protein forms microspheres*. Angewandte Chemie-International Edition, 2008. **47**(24): p. 4592-4594.
136. Lammel, A., et al., *Processing conditions for the formation of spider silk microspheres*. ChemSusChem, 2008. **1**(5): p. 413-6.
137. Hermanson, K.D., et al., *Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk*. Advanced Materials, 2007. **19**(14): p. 1810-+.
138. Schacht, K. and T. Scheibel, *Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein*. Biomacromolecules, 2011. **12**(7): p. 2488-95.
139. Teule, F., et al., *Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers*. Biopolymers, 2012. **97**(6): p. 418-31.
140. Teule, F., et al., *A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning*. Nature Protocols, 2009. **4**(3): p. 341-355.
141. Teule, F., et al., *Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers*. Journal of Materials Science, 2007. **42**(21): p. 8974-8985.
142. Fu, C.J., Z.Z. Shao, and F. Vollrath, *Animal silks: their structures, properties and artificial production*. Chemical Communications, 2009(43): p. 6515-6529.
143. Brooks, A.E., et al., *Properties of synthetic spider silk fibers based on Argiope aurantia MaSp2*. Biomacromolecules, 2008. **9**(6): p. 1506-1510.
144. An, B., et al., *Inducing β -Sheets Formation in Synthetic Spider Silk Fibers by Aqueous Post-Spin Stretching*. Biomacromolecules, 2011. **12**(6): p. 2375-2381.
145. Keerl, D. and T. Scheibel, *Characterization of natural and biomimetic spider silk fibers*. Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials, 2012. **1**(2): p. 83-94.
146. Work, R.W., *DIMENSIONS, BIREFRINGENCES, AND FORCE-ELONGATION BEHAVIOR OF MAJOR AND MINOR AMPULLATE SILK FIBERS FROM ORB-WEB-SPINNING SPIDERS - EFFECTS OF WETTING ON THESE PROPERTIES*. Textile Research Journal, 1977. **47**(10): p. 650-662.
147. Carmichael, S. and C. Viney, *Molecular order in spider major ampullate silk (dragline): Effects of spinning rate and post-spin drawing*. Journal of Applied Polymer Science, 1999. **72**(7): p. 895-903.
148. Carmichael, S., J.Y.J. Barghout, and C. Viney, *The effect of post-spin drawing on spider silk microstructure: a birefringence model*. International Journal of Biological Macromolecules, 1999. **24**(2-3): p. 219-226.
149. Exler, J.H., D. Hummerich, and T. Scheibel, *The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. **46**(19): p. 3559-3562.
150. Hagn, F.X., *NMR Spectroscopy of Molecular Chaperones, the p53 Tumorsuppressor Network and Spider Silk Proteins*. 2009. p. 227-258.
151. Sponner, A., et al., *Conserved C-termini of spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread*. Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 840-845.
152. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein*. Journal of Molecular Biology, 1982. **157**(1): p. 105-132.
153. Arakawa, T. and S.N. Timasheff, *Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions*. Biochemistry, 1982. **21**(25): p. 6545-52.
154. Mayr, L.M. and F.X. Schmid, *Stabilization of a protein by guanidinium chloride*. Biochemistry, 1993. **32**(31): p. 7994-7998.
155. Baldwin, R.L., *How Hofmeister ion interactions affect protein stability*. Biophysical Journal, 1996. **71**(4): p. 2056-2063.
156. Eisoldt, L., et al., *The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins*. Journal of Structural Biology, 2010. **170**(2): p. 413 - 419.

157. Rammensee, S., et al., *Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(18): p. 6590-5.
158. Holland, C., J.S. Urbach, and D.L. Blair, *Direct visualization of shear dependent silk fibrillogenesis*. Soft Matter, 2012. **8**(9): p. 2590-2594.
159. Lin, Z., et al., *Solution structure of eggcase silk protein and its implications for silk fiber formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(22): p. 8906-11.
160. Huebner, D., et al., *Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins*. Current Biology, 2004. **14**(22): p. 2070-2074.
161. Rising, A., et al., *Spider silk proteins--mechanical property and gene sequence*. Zoological Science, 2005. **22**(3): p. 273-81.
162. Blamires, S.J., C.-L. Wu, and I.M. Tso, *Variation in Protein Intake Induces Variation in Spider Silk Expression*. Plos One, 2012. **7**(2): p. e31626.
163. Tian, M.Z. and R.V. Lewis, *Molecular characterization and evolutionary study of spider tubuliform (eggcase) silk protein*. Biochemistry, 2005. **44**(22): p. 8006-8012.
164. Lee, K.S., et al., *Molecular cloning and expression of the C-terminus of spider flagelliform silk protein from Araneus ventricosus*. Journal of biosciences, 2007. **32**(4): p. 705-12.
165. Guinea, G.V., et al., *Minor Ampullate Silks from Nephila and Argiope Spiders: Tensile Properties and Microstructural Characterization*. Biomacromolecules, 2012.
166. Tai, P.-L., G.-Y. Hwang, and I.M. Tso, *Inter-specific sequence conservation and intra-individual sequence variation in a spider silk gene*. International Journal of Biological Macromolecules, 2004. **34**(5): p. 237-243.
167. Ayoub, N.A. and C.Y. Hayashi, *Multiple Recombining Loci Encode MaSp1, the Primary Constituent of Dragline Silk, in Widow Spiders (Latrodectus: Theridiidae)*. Molecular Biology and Evolution, 2008. **25**(2): p. 277-286.
168. Garb, J.E., et al., *Silk genes support the single origin of orb webs*. Science, 2006. **312**(5781): p. 1762-1762.
169. Bittencourt, D., et al., *A MaSp2-like gene found in the Amazon mygalomorph spider Avicularia juruensis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010. **155**(4): p. 419-426.
170. Garb, J.E., et al., *Expansion and Intragenic Homogenization of Spider Silk Genes since the Triassic: Evidence from Mygalomorphae (Tarantulas and Their Kin) Spidroins*. Molecular Biology and Evolution, 2007. **24**(11): p. 2454-2464.
171. Starrett, J., et al., *Early Events in the Evolution of Spider Silk Genes*. Plos One, 2012. **7**(6): p. e38084.

4. Publikationsliste

- I. Hagn, F., **Eisoldt, L.**, Hardy, J.G., Vendrely, C., Coles, M., Scheibel, T., Kessler, H. (2010) A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature*. 465, pp. 239-242
- II. **Eisoldt, L.**, Hardy, J.G., Heim, M., Scheibel, T. (2010) The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J. Struct. Biol.* 170, pp. 413-419
- III. **Eisoldt, L.**, Döring, V., Schiemann, S., Scheibel, T. Counterplay of two MaSp2 spider silk proteins from *A. diadematus*: implications for silk fiber assembly. (2013) *Manuscript in preparation*.
- IV. **Eisoldt, L.**, Smith, A., Scheibel, T. (2011) Decoding the secrets of spider silk. *Materials Today*. 40, pp. 80-86
- V. **Eisoldt, L.**, Thamm, C., Scheibel, T. (2012) The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers*. 97, pp. 355-361

Die Teilarbeiten I-V sind nachfolgend angehängt. Neben dieser Arbeit sind noch weitere Publikationen auf Basis meiner Daten geplant und z.T. in Vorbereitung. Diese sind daher nicht Teil dieser Dissertation:

- VI. **Eisoldt, L.**, Bauer, J., Scheibel, T. (2013) Influence of the non-repetitive terminal domains on the spatial orientation of recombinant spider silk proteins in solution. *Manuscript in preparation – Work in progress*
- VII. Bauer, J., **Eisoldt, L.**, Schmidpeter, P., Scheibel, T. (2013) Investigations on the dimerization mechanism of the MaSp1 NT-domain from the black widow. *Manuscript in preparation – Work in progress*
- VIII. Heidebrecht, A., **Eisoldt, L.**, Schmidt, A., Diehl, J., Geffers, M., Scheibel, T. (2013) Synthetic spider silk fibers with adjustable mechanical properties. *Manuscript in preparation – Work in progress*

5. Darstellung des Eigenanteils

- I. Hagn, F., **Eisoldt, L.**, Hardy, J.G., Vendrely, C., Coles, M., Scheibel, T., Kessler, H. (2010) A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature*. 465, pp. 239-242

Sämtliche NMR-Experimente sowie Entfaltungsstudien und ANS/SYPRO Orange Bindungen an der NR3-Domäne wurden von Franz Hagn durchgeführt. Die Klonierung, Reinigung und Herstellung der eADF3(AQ)-Konstrukte wurde von mir durchgeführt. Die Phosphat- und Rotationsaggregationsassays wurden von mir durchgeführt. Die Lichtmikroskopischen Aufnahmen der Aggregate wurde von mir aufgenommen. Das Manuskript wurde von Franz Hagn, Dr. John Hardy, Horst Kessler, Thomas Schiebel und mir verfasst.

- II. **Eisoldt, L.**, Hardy, J.G., Heim, M., Scheibel, T. (2010) The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J. Struct. Biol.* 170, pp. 413-419

Sämtliche Proteine wurden von mir hergestellt und gereinigt. Alle Aggregationsassays sowie die lichtmikroskopischen Aufnahmen und Teile der FTIR-Messungen wurden von mir durchgeführt. Das Manuskript wurde von Dr. John Hardy, Thomas Scheibel und mir verfasst.

- III. **Eisoldt, L.**, Döring, V., Schiemann, S., Scheibel, T. Counterplay of two MaSp2 spider silk proteins from *A. diadematus*: implications for silk fiber assembly. (2013) *Manuscript in preparation*.

Die Reinigungsstrategie zum Heterodimer wurde von mir in Zusammenarbeit mit Svenja Schiemann und Volker Döring entwickelt. Die Proteine wurden von Volker Döring, Svenja Schiemann und mir gereinigt. Die CD-Messungen, AFM- und TEM-Bilder wurden von mir angefertigt. Das Manuskript haben Thomas Scheibel und ich verfasst.

- IV. **Eisoldt, L.**, Smith, A., Scheibel, T. (2011) Decoding the secrets of spider silk. *Materials Today*. 40, pp. 80-86

Die Konzeption des Artikels stammt von Thomas Scheibel und mir. Das Manuskript wurde von Thomas Scheibel und mir verfasst. Dr. Andrew Smith hat teilweise Literatur bereitgestellt.

- V. **Eisoldt, L.**, Thamm, C., Scheibel, T. (2012) The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers*. 97, pp. 355-361

Die Konzeption des Artikels stammt von Thomas Scheibel und mir. Das Manuskript wurde von Thomas Scheibel und mir verfasst. Die Abbildungen wurden von Christopher Thamm erstellt.

6. Teilarbeiten

Teilarbeit I

Hagn, F., **Eisoldt, L.**, Hardy, J.G., Vendrely, C., Coles, M., Scheibel, T., Kessler, H. (2010) A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature*. 465, pp. 239-242

A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly

Franz Hagn^{1,2}, Lukas Eisoldt³, John G. Hardy³, Charlotte Vendrely^{3†}, Murray Coles⁴, Thomas Scheibel³ & Horst Kessler^{1,2}

A huge variety of proteins are able to form fibrillar structures¹, especially at high protein concentrations. Hence, it is surprising that spider silk proteins can be stored in a soluble form at high concentrations and transformed into extremely stable fibres on demand^{2,3}. Silk proteins are reminiscent of amphiphilic block copolymers containing stretches of polyalanine and glycine-rich polar elements forming a repetitive core flanked by highly conserved non-repetitive amino-terminal^{4,5} and carboxy-terminal⁶ domains. The N-terminal domain comprises a secretion signal, but further functions remain unassigned. The C-terminal domain was implicated in the control of solubility and fibre formation⁷ initiated by changes in ionic composition^{8,9} and mechanical stimuli known to align the repetitive sequence elements and promote β -sheet formation^{10–14}. However, despite recent structural data¹⁵, little is known about this remarkable behaviour in molecular detail. Here we present the solution structure of the C-terminal domain of a spider dragline silk protein and provide evidence that the structural state of this domain is essential for controlled switching between the storage and assembly forms of silk proteins. In addition, the C-terminal domain also has a role in the alignment of secondary structural features formed by the repetitive elements in the backbone of spider silk proteins, which is known to be important for the mechanical properties of the fibre.

Silk proteins are amphiphilic (Fig. 1a) and the C-terminal non-repetitive (NR) domain of such proteins produced by orb-weaving spiders is one of the most conserved regions (Fig. 1b). To determine the structure of the C-terminal NR domain (NR3) of *Araneus diadematus* fibroin 3 (ADF-3), we used high-resolution NMR with an optimized protein construct (Fig. 1c and Supplementary Tables 1 and 2). The structure is a new protein fold composed of a parallel-oriented dimeric five-helix bundle in which the longest helix (helix 4) is the main dimerization site (Fig. 1c, Supplementary Fig. 1). The single cysteine residue of each monomer involved in intermolecular disulphide formation is located at the N-terminal end of helix 4. The dimerization interface consists predominantly of hydrophobic residues. Packing of these residues is facilitated by a slight right-handed twist between helices 4 in both monomers. Helix 1 of one monomer and helix 5 of the second monomer interact in a clamp-like manner. Two salt bridges (R43–D93 and R52–E101) are located within each monomer, which fix helices 1 and 2 at one side of helix 4 (Fig. 1c). These salt bridges use the only charged residues of the entire known sequence of ADF-3 and are located in the most conserved parts of the NR domain (Fig. 1b).

Using mutagenesis experiments, our data show that the charged residues are essential for the structural integrity of the NR domain, as deletion of the salt bridges results in significantly reduced thermal

stability of the entire domain (Supplementary Fig. 2). Of particular note is that although the NR domain is relatively hydrophobic in comparison to the repetitive backbone of the protein (Fig. 1a), in the folded state the hydrophobic residues are buried and the solvent-exposed surface displays hydrophilic amino acids such as glutamine and serine, assuring its hydration (Supplementary Fig. 1b). At low pH (pH 2, where the salt bridges are disrupted) NR3 shows markedly increased hydrophobicity and decreased secondary structure content as probed with 8-anilinoanthracene-1-sulphonic acid (ANS) fluorescence, circular dichroism (CD) and NMR spectroscopy (Supplementary Fig. 3a–d). In addition, a destabilized NR3 salt bridge mutant (D93A) of an engineered ADF-3 analogue, (AQ)₁₂NR3 containing 12 repeats of the ‘A’ and ‘Q’ repetitive sequence elements¹⁶ (see Methods), also shows pronounced ANS binding (Fig. 2b) and molten globule-like thermal unfolding behaviour (a partially structured state that shows higher binding affinity to ANS than the native state), which can be stabilized by the addition of sodium chloride (Fig. 2c). This emphasizes the role of a correctly folded NR domain for silk protein storage and the inhibition of undesired aggregation.

In vivo the transition from soluble protein to solid fibres involves a combination of chemical and mechanical stimuli (such as ion exchange, extraction of water, acidification and elongational flow^{3,13,17}). Hence, we were interested in determining the effect of such stimuli on spider silk-like proteins, and used dimeric (AQ)₁₂NR3 and monomeric (AQ)₂₄ (an analogue of approximately the same molecular mass as the dimer without the NR carboxy-terminal domain). In the absence of shear forces (as silk proteins are stored in the lumen *in vivo*) the extent of protein aggregation *in vitro* is determined by the concentration of salt, and even at extremely high concentrations of sodium chloride (up to 500 mM) the level of aggregation is low (less than 15%), whereas in the presence of equivalent concentrations of sodium phosphate the level of aggregation is markedly higher (up to 100%) owing to the more kosmotropic nature of the phosphate anion (Fig. 2a). Such a finding explains why the proteins are stored inside the lumen in the presence of the relatively chaotropic sodium chloride (approximately 100–150 mM)⁹, and emphasizes the requirement for ion exchange within the spinning duct.

Higher supramolecular assemblies are required to achieve efficient protein storage⁸ and we have previously reported our proteins to be thermoresponsive, displaying fully reversible lower critical solution temperature (LCST, phase separation on increasing the temperature) behaviour owing to a self-assembly process¹⁶. This behaviour was displayed only for silk proteins incorporating the NR domain. Using differential scanning calorimetry (DSC) we show here that the LCST is decreased in the presence of higher concentrations of salt and/or protein (Fig. 2d, e), thereby stabilizing the proteins during storage.

¹Center for Integrated Protein Science (CIPS^M) and ²Institute for Advanced Study, Department Chemie at the Technische Universität München, 85747 Garching, Germany. ³Lehrstuhl für Biomaterialien, Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften, Universität Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany. ⁴Department of Protein Evolution, Max-Planck-Institute for Developmental Biology, 72076 Tübingen, Germany. †Present address: Université de Cergy-Pontoise, 95302 Cergy-Pontoise cedex, France.

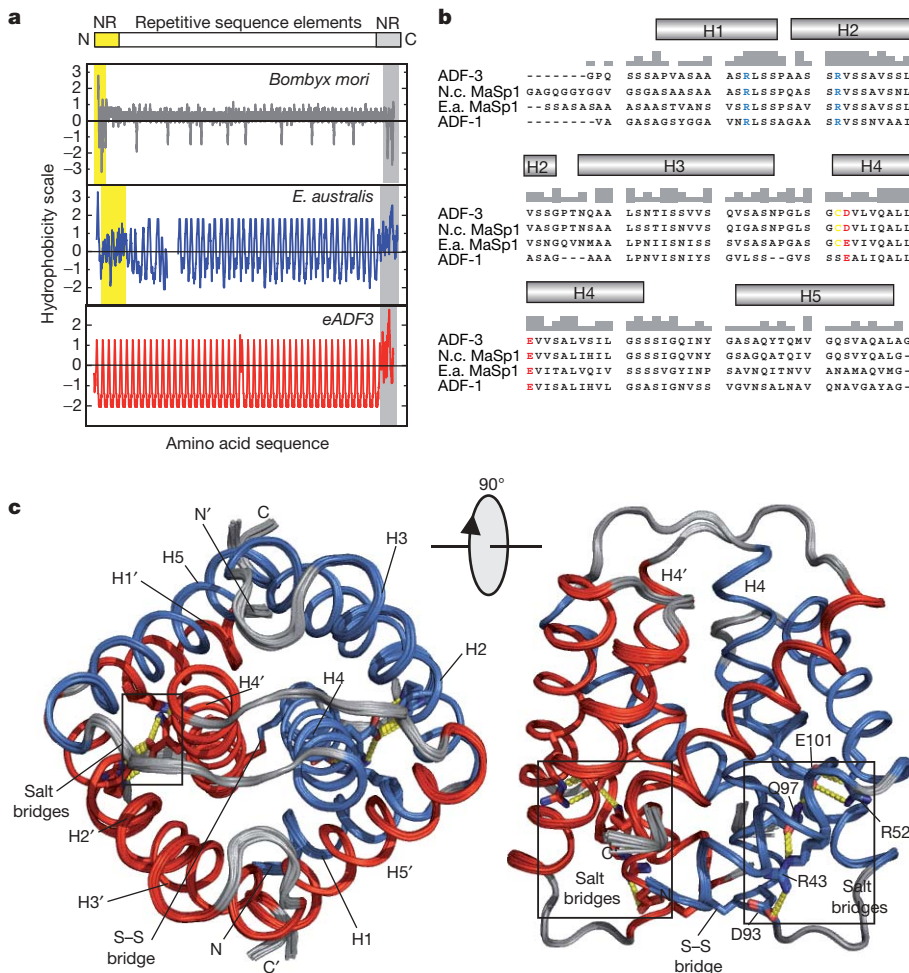


Figure 1 | Sequence analysis and structure of the non-repetitive (NR) domain of ADF-3.

a, Hydrophobicity index of various silk proteins. **b**, Sequence alignment of the C-terminal NR domains of the major ampullate silk proteins (MaSp) of *Araneus diadematus*, *Nephila clavipes* and *Euprostheno australis*, and minor ampullate silk fibroin 1 (ADF-1) of *Araneus diadematus* (top to bottom). Grey bars indicate the degree of conservation between these sequences. The conserved charged residues are coloured. **c**, Overlay of the 20 best-energy structures of the C-terminal NR domain of ADF-3 having a root mean square deviation (r.m.s.d.) of 0.18 Å.

We have also found that the NR domain has an impact on the fibre formation process. On titration of chemical denaturants (urea or guanidine hydrochloride) into solutions of ^{15}N -labelled NR3, NMR chemical shift changes (indicating structural variations or binding) monitored with ^{15}N HSQC (heteronuclear single quantum

coherence) experiments could be observed mainly within helix 1 and around the salt bridges (Fig. 3a, Supplementary Fig. 4), therefore this region seems to unfold first. Titrations with sodium chloride demonstrated chemical shift changes in the same region (where the two salt bridges are located, Fig. 3a), which also shows the highest hydrophobicity in the protein as monitored with chemical shift changes upon the addition of ANS (Fig. 3a and Supplementary Fig. 4). Interestingly, at higher protein concentrations the protein shows a greater tendency to unfold (Fig. 3b). Additionally, SYPRO Orange (an ANS-like fluorescent dye) binding experiments¹⁸ demonstrate that the partially folded state of NR3 is more hydrophobic than the natively folded or the unfolded state (Fig. 3c). It is also noteworthy that the presence of sodium chloride (present during protein storage) stabilizes the NR domain against thermal or chemical denaturation (Fig. 3b, c and Supplementary Fig. 5a) and can even compensate for the loss in stability during reduction of the inter-molecular disulphide bridge (Supplementary Fig. 5b).

Previous rheological studies emphasize the role of the NR domain for shear-induced aggregation of ADF-3, where solutions of proteins with the NR domain exhibit significant viscosity changes under shear,

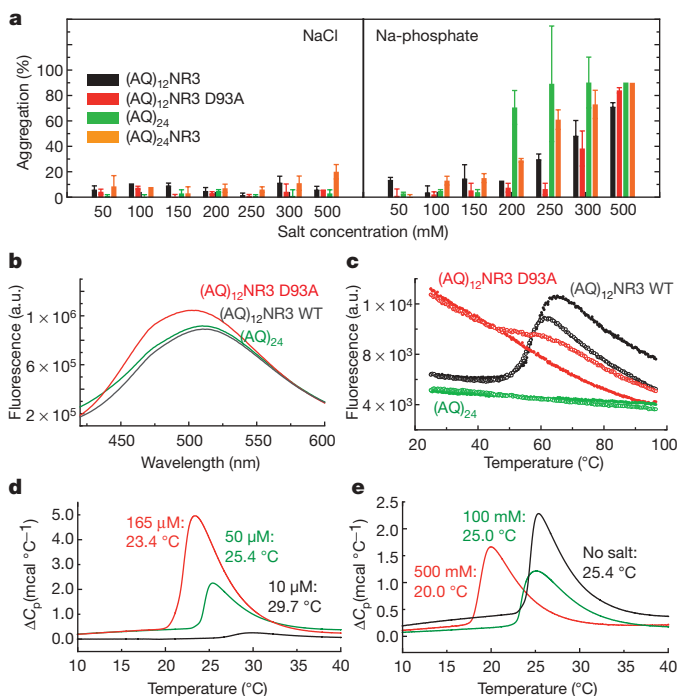


Figure 2 | Assembly and aggregation properties of our spider silk-like proteins. **a**, Salt-induced protein aggregation. Error bars indicate standard deviation. **b**, Binding of hydrophobic ANS by proteins. a.u., arbitrary units; WT, wild type. **c**, Thermal transition experiments indicate molten globule-like behaviour of the D93A variant (red symbols), whereas the wild-type protein binds to the dye only during unfolding (black symbols). A structural transition of the D93A variant can be induced by sodium chloride (open symbols: in presence of 300 mM sodium chloride). Without the NR domain, no transition can be observed (green symbols). **d**, The concentration dependence of the LCST of (AQ)₂₄NR3. **e**, The sodium chloride dependence of the LCST of (AQ)₂₄NR3.

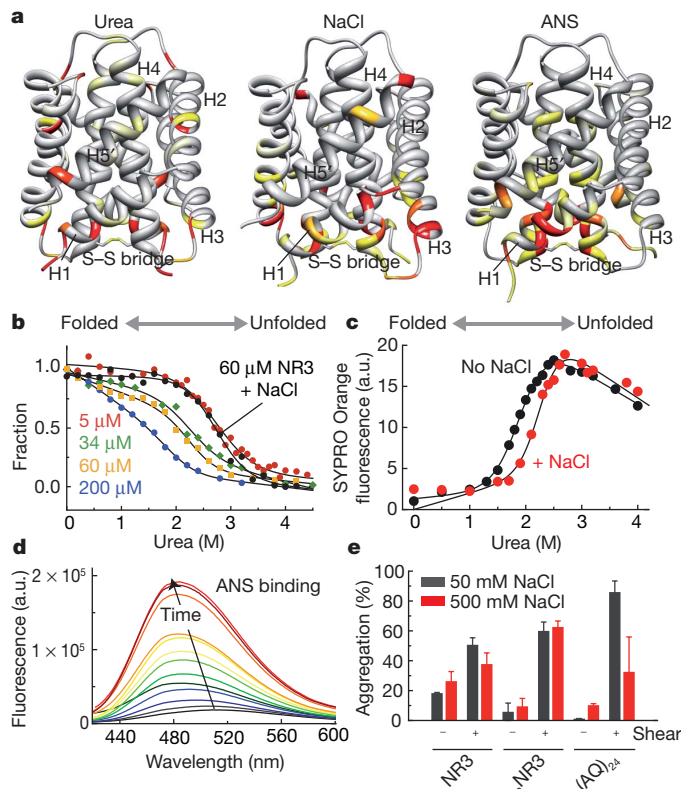


Figure 3 | Stability and folding of spider dragline silk constructs. **a**, NMR chemical shift perturbation experiments with urea, sodium chloride and ANS indicate that the structural elements around the salt bridges represent the most labile and hydrophobic region within the protein. **b**, Urea-induced unfolding of NR3 as determined by CD spectroscopy. **c**, Binding of hydrophobic SYPRO orange to NR3 during urea-induced unfolding. **d**, Shear-induced ANS binding of NR3. **e**, Aggregation of our spider silk-like proteins with and without shear stress. Shear stress leads to increased aggregation and is the most likely trigger for the assembly process in nature. Error bars represent standard deviation.

whereas solutions of proteins without the NR domain exhibit no viscosity changes at various shear rates^{14,19}. ANS binding also increases under shear, indicating that the NR domain partially unfolds, thereby exposing hydrophobic surfaces (Fig. 3d and Supplementary Fig. 6), leading to oligomerization and ultimately β -sheet-rich fibre formation. In further *in vitro* protein aggregation assays under shear stress, we find that aggregation is vastly increased in comparison to corresponding assays in the absence of shear, and that the protein without the NR domain is much more prone to unspecific aggregation (Figs 3e and 4). Exposure of solutions of proteins without the NR domain to shear stress resulted in the formation of ill-defined β -sheet-rich aggregates, typically with dimensions of micro- to millimetre scale (Fig. 4a). By contrast, proteins incorporating the NR domain formed relatively well-defined fibrous aggregates, which optical microscopy showed to be composed of ordered (aligned) bundles of long fibrillar aggregates, implying that the NR domain has a role in stabilizing the protein against undesirable aggregation. Polarized Fourier transform infrared spectra of the fibrous aggregates formed from our protein without the NR domain ((AQ)₂₄) show that the β -sheets are randomly aligned, whereas the β -sheets within fibres formed from our protein with the correctly folded NR domain (that is, wild type and not the D93A mutant) were predominantly aligned with the long axis of the fibres (in analogy to naturally spun fibres) owing to a controlled assembly process (Fig. 4b, c).

To examine the influence of the length of the repetitive backbone on the behaviour of the proteins, we performed aggregation assays with (AQ)₂₄NR3, finding that it was significantly more prone to

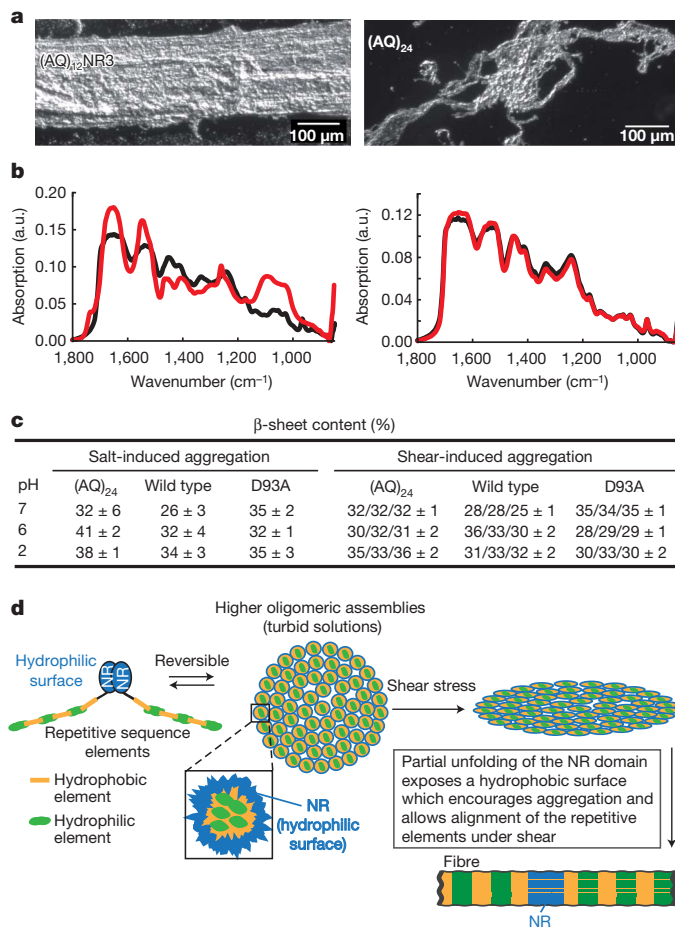


Figure 4 | Fibre assembly mechanism of dragline silk proteins. **a**, A well-defined fibre (dry state) of (AQ)₁₂NR3 and ill-defined fibrous aggregate of (AQ)₂₄ formed under shear. **b**, Infrared absorption spectra of (AQ)₁₂NR3 and (AQ)₂₄ fibres recorded at 0° and 90° relative to the long axis of the fibrous aggregates (black vs red line). **c**, Estimated β -sheet content of the aggregates. The values of β -sheet content for the aggregates formed under shear were recorded at 0°, 45° and 90° relative to the long axis of the fibrous aggregates. **d**, The silk proteins are stored as higher oligomeric assemblies. Exposure of these assemblies to shear and salting out leads to partial unfolding of NR3 and controlled fibre assembly.

aggregation than the equivalent (AQ)₁₂NR3 analogue (Fig. 2a), which leads us to speculate that the α -helical N-terminal NR domain⁴ (not included in our recombinant proteins) might also play an important function in protein storage and fibre assembly, especially in case of the natural system, where the proteins are larger.

Our data indicate that the C-terminal NR domain has a role in both spider silk protein storage and fibre assembly (Fig. 4d). During storage of spider silk proteins, the NR domain stabilizes a solution-competent state of the silk protein via the formation of higher supramolecular assemblies, and the C-terminal NR domain also acts as a trigger for the fast, controlled and efficient salting-out of the proteins in combination with the correct alignment of the β -sheet forming repetitive sequence elements during shear-induced assembly. The hydrophobic surface of the assembly state of the NR domain, in addition to the disulphide bridge, provides anchor points for the correct positioning of the repetitive sequence elements. This mechanism is reminiscent of other fibrillar proteins²⁰ like collagen²¹, where the highly conserved terminal pro-peptides form intermolecular disulphide bridges²² and regulate pro-collagen solubility and lateral assembly²³.

METHODS SUMMARY

Proteins samples were bacterially produced in *Escherichia coli* and purified as described²⁴ or by Nickel-NTA and size-exclusion chromatography. Two- and

three-dimensional NMR experiments were performed with ^{13}C and ^{15}N isotopically enriched protein samples on NMR spectrometers (Bruker Biospin) operating at 600, 750 and 900 MHz proton frequency, respectively. Out of 140 residues in each monomer, the NMR signals of 138 residues could be assigned using a set of conventional experiments²⁵. Structural restraints were generated with nuclear Overhauser enhancement (NOE) spectroscopy experiments²⁶ and high-resolution structures were obtained with the program Xplor-NIH²⁷. Protein folding studies were performed with circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy and protein fibres and aggregates were investigated with optical microscopy and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 20 May 2009; accepted 11 February 2010.

- Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884–890 (2003).
- Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S. & Savage, K. N. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J. Exp. Biol.* **202**, 3295–3303 (1999).
- Vollrath, F. & Knight, D. P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **410**, 541–548 (2001).
- Rising, A., Hjalms, G., Engstrom, W. & Johansson, J. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins. *Biomacromolecules* **7**, 3120–3124 (2006).
- Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules* **6**, 3152–3159 (2005).
- Sponner, A. *et al.* The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 897–902 (2005).
- Ittah, S., Cohen, S., Garty, S., Cohn, D. & Gat, U. An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation. *Biomacromolecules* **7**, 1790–1795 (2006).
- Jin, H. J. & Kaplan, D. L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* **424**, 1057–1061 (2003).
- Knight, D. P. & Vollrath, F. Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Naturwissenschaften* **88**, 179–182 (2001).
- Knight, D. P. & Vollrath, F. Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **266**, 519–523 (1999).
- Knight, D. P., Knight, M. M. & Vollrath, F. Beta transition and stress-induced phase separation in the spinning of spider dragline silk. *Int. J. Biol. Macromol.* **27**, 205–210 (2000).
- Lefèvre, T., Boudreault, S., Cloutier, C. & Pézolet, M. Conformational and orientational transformation of silk proteins in the major ampullate gland of *Nephila clavipes* spiders. *Biomacromolecules* **9**, 2399–2407 (2008).
- Heim, M., Keerl, D. & Scheibel, T. Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 3584–3596 (2009).
- Rammensee, S., Slotta, U., Scheibel, T. & Bausch, A. R. Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 6590–6595 (2008).
- Lin, Z., Huang, W., Zhang, J., Fan, J. S. & Yang, D. Solution structure of eggcase silk protein and its implications for silk fiber formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 8906–8911 (2009).
- Exler, J. H., Hümmerich, D. & Scheibel, T. The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 3559–3562 (2007).
- Hardy, J. G. & Scheibel, T. R. Silk-inspired polymers and proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 677–681 (2009).
- Lavinder, J. J., Hari, S. B., Sullivan, B. J. & Magliery, T. J. High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 3794–3795 (2009).
- Vézy, C., Hermanson, K. D., Scheibel, T. & Bausch, A. R. Interfacial rheological properties of recombinant spider-silk proteins. *Biointerphases* **4**, 43–46 (2009).
- Lupas, A. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 375–382 (1996).
- Brown, J. C. & Timpl, R. The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 484–490 (1995).
- Saccà, B., Renner, C. & Moroder, L. The chain register in heterotrimeric collagen peptides affects triple helix stability and folding kinetics. *J. Mol. Biol.* **324**, 309–318 (2002).
- Lees, J. F. & Bulleid, N. J. The role of cysteine residues in the folding and association of the COOH-terminal propeptide of types I and III procollagen. *J. Biol. Chem.* **269**, 24354–24360 (1994).
- Huemmerich, D. *et al.* Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* **43**, 13604–13612 (2004).
- Sattler, M., Schleucher, J. & Griesinger, C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **34**, 93–158 (1999).
- Diercks, T., Coles, M. & Kessler, H. An efficient strategy for assignment of cross-peaks in 3D heteronuclear NOESY experiments. *J. Biomol. NMR* **15**, 177–180 (1999).
- Schwieters, C. D., Kuszewski, J. J., Tjandra, N. & Clore, G. M. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J. Magn. Reson.* **160**, 65–73 (2003).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements This paper is in memoriam of R. Rudolph who triggered spider silk research in the lab of T.S. We want to thank D. Hümmerich and J. Exler for initial work on the project, S. Quedzuweit for sample preparation in early stages of the project, M. Heim and M. Suhre for cloning work, and H. Krause for mass spectrometry. This work was supported by the Center for Integrated Protein Science Munich (CIPS^M) (to H.K. and T.S.) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft SCHE 603/4-3 (to T.S.). F.H. was supported by the Elitenetzwerk Bayern, Complnt. J.G.H. was supported by the Alexander von Humboldt Foundation.

Author Contributions F.H. designed research, performed cloning work, purified proteins, performed protein folding studies, recorded NMR experiments, performed structure calculations and wrote the manuscript; L.E. performed cloning work, purified proteins and performed aggregation assays. J.G.H. performed aggregation assays, characterized the fibres and wrote the manuscript; C.V. performed cloning work and purified proteins; M.C. was involved in structure calculation and provided software tools for structure calculation and analysis; T.S. designed research and wrote the manuscript; H.K. designed research and wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Author Information The resonance assignment obtained was deposited at the BMRB data bank under accession code 16249 and the atomic coordinates of the best 20 structures plus a regularized average structure have been deposited at the Protein Data Bank under accession code 2khm. Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.K. (horst.kessler@ch.tum.de) or T.S. (thomas.scheibel@uni-bayreuth.de).

METHODS

Cloning, protein production and purification. The initial construct used for NMR resonance assignment (NR3-T7) was produced and purified as described previously²⁴. The gene of a shorter construct (NR3Δ19) used for NOESY experiments was inserted into a pET28a expression system (Merck Biosciences) encoding an N-terminal His₆-tag and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) (Agilent Technologies) at 20 °C for 16–20 h. Purification was achieved by passage over a Ni-NTA column (GE healthcare) and a Superdex75 column. Between both columns the hexahistidine tag was removed by digestion with thrombin. Isotopically (¹³C, ¹⁵N) enriched protein samples were produced by growing bacteria in M9 medium supplemented with 1 g l⁻¹ ¹⁵NH₄Cl and 2 g l⁻¹ ¹³C glucose (Eurisotope). For NMR measurements, the proteins were concentrated up to 1 mM in 10 mM sodium phosphate pH 6.0. Addition of 1% (v/v) trifluoroethanol-d₃ (Eurisotope) was used for sample stabilization. The generation of a mixed ¹³C, ¹⁵N-¹²C, ¹⁴N dimeric sample was achieved by mixing equal amounts of labelled and unlabelled His₆-tagged protein samples and a subsequent addition of guanidine hydrochloride to a final concentration of 4 M and 50 mM DTT to achieve unfolding and reduction of the intermolecular disulphide bridge. For refolding, the mixture was dialyzed against 50 mM Tris/HCl pH 8.0 resulting in an almost quantitative refolding yield. By this procedure, the monomers are allowed to exchange resulting in a 1:2:1 population of the homo-unlabelled, the hetero-labelled and the homo-¹³C, ¹⁵N-labelled species. Genes encoding proteins containing the repetitive elements (AQ)₁₂ and (AQ)₂₄ (A, hydrophobic polyalanine-rich motif: GPYGPASAAAAAGGYGPG SGQQ; Q, hydrophilic glutamine- and glycine-rich motif: GPGQQGPGQQGP GQQGPGQQ) were cloned into a pET29 expression vector (Merck Biosciences) encoding an N-terminal T7-tag and were expressed in *E. coli* strain BLR (DE3) (Agilent Technologies) at 25 °C for 3 h. Purification was carried out as described previously²⁴. Site-directed mutagenesis experiments with the gene of NR3Δ19 were done using the QuikChange mutagenesis kit (Agilent Technologies).

Circular dichroism (CD) spectroscopy. CD spectra and stability measurements were carried out on a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco). For spectra and thermal transitions, a protein concentration of 10 μM was used, and thermal unfolding was monitored by the CD signal at 222 nm in a 1 mm path length cuvette using a heating rate of 60 K h⁻¹ in 10 mM sodium phosphate pH 6.0. For chemical unfolding experiments, samples of 5, 34, 110, 200 and 230 μM concentration were incubated with increasing amounts of urea overnight at 4 °C, and the CD signal at 222 nm was recorded with a path length of 0.1 or 1 cm, respectively, at 20 °C. A bandwidth of 5 nm and a response of 2 s were used. Fitting of the thermally and urea-induced unfolding profiles was done as reported previously²⁸ assuming a two-state folding mechanism.

NMR spectroscopy and structure calculation. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic measurements were conducted at 298 K on Bruker DMX600, DMX750 and Avance900 spectrometers (Bruker Biospin). Backbone resonance assignment was achieved by a set of standard triple resonance experiments²⁵. Side-chain assignment was carried out using a combination of CCH-COSY (correlation spectroscopy via the nuclei C, C, H²⁹) and HCH-TOCSY (total correlation spectroscopy³⁰) on double-labelled samples. Stereospecific assignment of prochiral H^{CB} methylene and valine methyl groups and the resulting rotamer assignment were made using ³J_{NHβ} couplings observed in the HNHB experiment and patterns of NOESY connectivities. Distance data were derived from a set of three-dimensional NOESY experiments including ¹⁵N-HSQC-NOESY, NNH-NOESY on a ¹⁵N-labelled sample and ¹³C-HSQC-NOESY and heteronuclear edited 3D-CCH NOESY and 3D-CNH NOESY experiments²⁶. For obtaining inter-subunit NOE distance restraints, we used a ¹⁴N, ¹²C-filtered/¹³C edited two-dimensional-NOESY experiment on a mixed ¹³C, ¹⁵N-¹²C, ¹⁴N labelled sample. NOESY cross-peaks in the three-dimensional spectra were converted into distance ranges after rescaling according to the corresponding HSQC intensities. Cross-peaks were divided into the following four classes: strong, medium, weak and very weak, which resulted in restraints on upper distance of 2.7, 3.2, 4.0 and 5.0 Å, respectively. Lower distance restraints were also included for very weak and absent sequential H^N-H^N cross-peaks using a minimum distance of 3.2 Å and for medium intensity or weaker sequential and intrareidual H^N-H^α cross-peaks using a minimum distance of 2.7 Å. Allowance for the use of pseudo atoms (using r⁻⁶ averaging) were added for methyl groups (0.8 Å for one methyl and 1.5 Å for two methyls) and nonstereospecifically-assigned methylene groups (0.7 Å). Dihedral angle restraints were derived for backbone φ and ψ angles based on C^α, C^β, C^γ and H^α chemical shifts using the program TALOS³¹. Restraints were applied for predictions consistent with the input chemical shifts, ³J_{HNHα} coupling constants measured from an HNHA experiment and the observed NOE pattern within sequential residues. Accepted predictions were applied using the tolerance calculated by the program ± 5°. The ³J_{HNHα} couplings were also applied as direct coupling constant restraints on the backbone φ angles. Hydrogen bond restraints were applied for 73 residues in

secondary structural elements with low hydrogen exchange rates, as measured with MEXICO experiments^{32,33} and where donor and acceptor were consistently identified in preliminary calculations. The restraints were applied with the inclusion of pseudo covalent bonds as described previously³⁴. Structures were calculated with Xplor-NIH²⁷ using standard protocols. Experimental restraints were applied to only one monomer, with non-crystallographic symmetry restraints over the backbone of ordered residues (S34–L138) used to assure the symmetry of the dimer. Sets of 50 structures were calculated and a final set of 20 structures chosen on the basis of lowest restraints violations. An average structure was calculated and regularized to give a structure representative of the ensemble. The quality of the regularized average structure was assessed with the program PROCHECK-NMR³⁵. Titration experiments were performed with 200–500 μM NR3 in 10 mM sodium phosphate pH 6.0 at 293 K using standard ¹⁵N-HSQC experiments. Chemical shift deviations were calculated as the mean of ¹H and ¹⁵N chemical shift differences using following equation:

$$\Delta\delta_{av} = \left(\sqrt{\Delta\delta_H^2 + (\Delta\delta_N/5)^2} \right) / 2.$$

Fluorescence spectroscopy. Fluorescence spectra of 10 μM ANS and SYPRO Orange in 10 mM sodium phosphate pH 6.0 were recorded with a Fluoromax-4 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon) using excitation at 350 nm (5 nm bandwidth) and by collecting emission spectra from 420 to 600 nm with a bandwidth of 5 nm. With SYPRO Orange, excitation was set to 485 nm and emission was recorded from 520 to 700 nm. Thermofluor experiments³⁶ were performed with a real-time PCR machine (Agilent Technologies) by detection of ANS fluorescence (10 μM ANS was used). Heating rate was 30 K h⁻¹, protein concentration was 50 μM and sample volume was 50 μl in a 96-well plate. Five individual measurements were done for each protein sample and solvent condition.

Differential scanning calorimetry (DSC). DSC experiments were performed using a VP-DSC Micro-Calorimeter (MicroCal). Standard measurements were performed at a protein concentration of 50 μM in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, with a heating rate of 20 K h⁻¹. Evaluation of the LCST behaviour was done using the ORIGIN software (MicroCal).

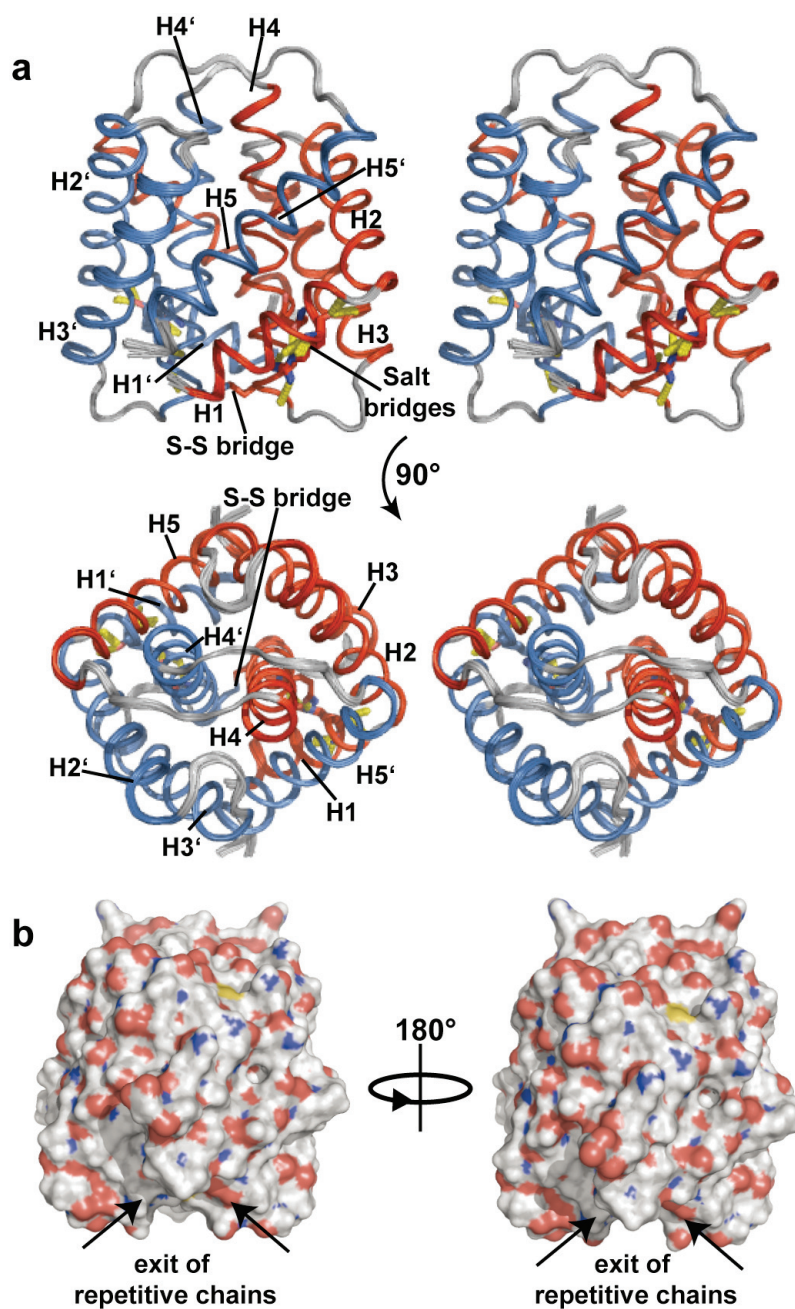
Rotation-induced aggregation. Before the experiment the proteins were dissolved in guanidine thiocyanate solution (6 M) and then dialyzed against 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. Then the proteins were diluted into buffer containing 10 mM Tris/HCl, pH 8 with 50 mM NaCl. Final protein concentrations were adjusted to 40 μM of NR3, 14 μM of AQ₁₂NR3 and 8 μM of AQ₂₄. The samples were incubated for 12 h at 25 °C rotating with 25 r.p.m. After rotation, the clearly visible aggregates were transferred onto glass slides for optical microscopy (DMI3000B, Leica). The samples were then centrifuged at 125,000g to remove non-visible aggregates, and the amount of remaining soluble protein in the supernatant was determined using an ultraviolet spectrometer (NanoDrop ND1000, Thermo Fischer).

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic studies. FTIR spectra of fibres were recorded on a liquid-nitrogen-cooled Bruker Tensor 27 FTIR spectrometer, fitted with a liquid-nitrogen-cooled Bruker Hyperion microscope with IR polarizers supplied by Optometrics Corporation. Spectroscopy was performed on fibres formed during the previously described aggregation assay that were washed with water to remove salts, air dried and placed on highly polished optical grade calcium fluoride disks (Crystal GmbH). Spectra of all aggregates were recorded in absorbance mode at 21 °C, with a 4 cm⁻¹ resolution and 600 scans (corrected for background and atmosphere using OPUS software), and polarized FTIR spectra of aggregates of micrometre scale (and larger) were recorded at three different orientations (0°, 45° and 90° relative to the long axis of the fibrous aggregates) to determine if any of the secondary structural elements were aligned with the fibres.

28. Privalov, P. L. Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* **33**, 167–241 (1979).
29. Ikura, M., Kay, L. E. & Bax, A. Improved three-dimensional ¹H-¹³C-¹H correlation spectroscopy of a ¹³C-labeled protein using constant-time evolution. *J. Biomol. NMR* **1**, 299–304 (1991).
30. Kay, L. E., Ikura, M. & Bax, A. Proton-proton correlation via carbon-carbon couplings: a three-dimensional NMR approach for the assignment of aliphatic resonances in proteins labeled with carbon 13. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 888–889 (1990).
31. Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **13**, 289–302 (1999).
32. Gemmecker, G., Jahnke, W. & Kessler, H. Measurement of fast proton-exchange rates in isotopically labeled compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11620–11621 (1993).
33. Koide, S., Jahnke, W. & Wright, P. E. Measurement of intrinsic exchange-rates of amide protons in a ¹⁵N-labeled peptide. *J. Biomol. NMR* **6**, 306–312 (1995).
34. Truffault, V. et al. The solution structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase. *J. Mol. Biol.* **309**, 949–960 (2001).

35. Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–291 (1993).
36. Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., Detitta, G. T., Dekker, N. & Nordlund, P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* **357**, 289–298 (2006).

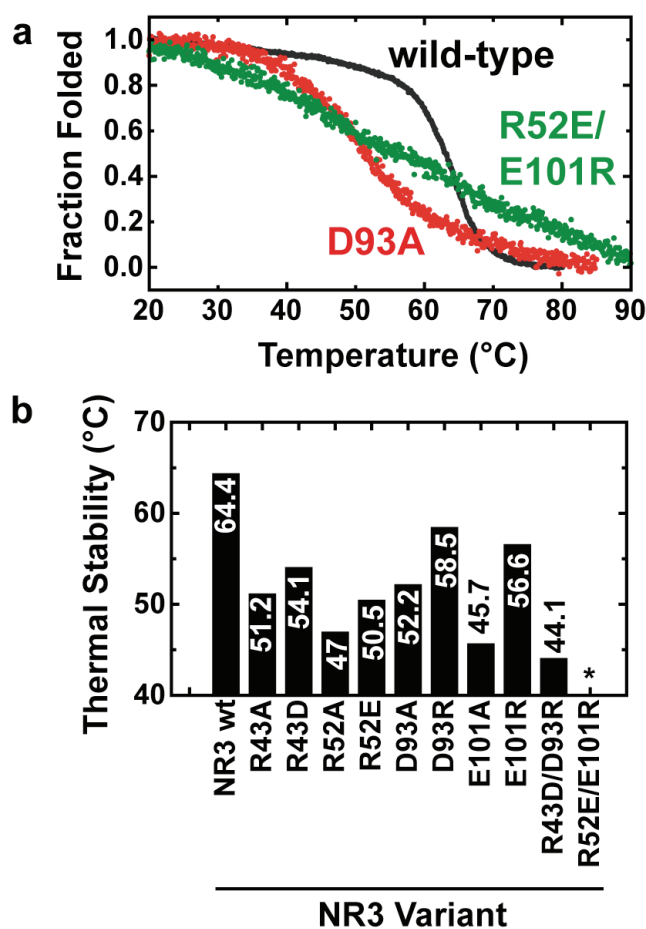
SUPPLEMENTARY INFORMATION



Supplementary Figure 1: Structure of the C-terminal non-repetitive (NR) domain of ADF-3 (NR3)

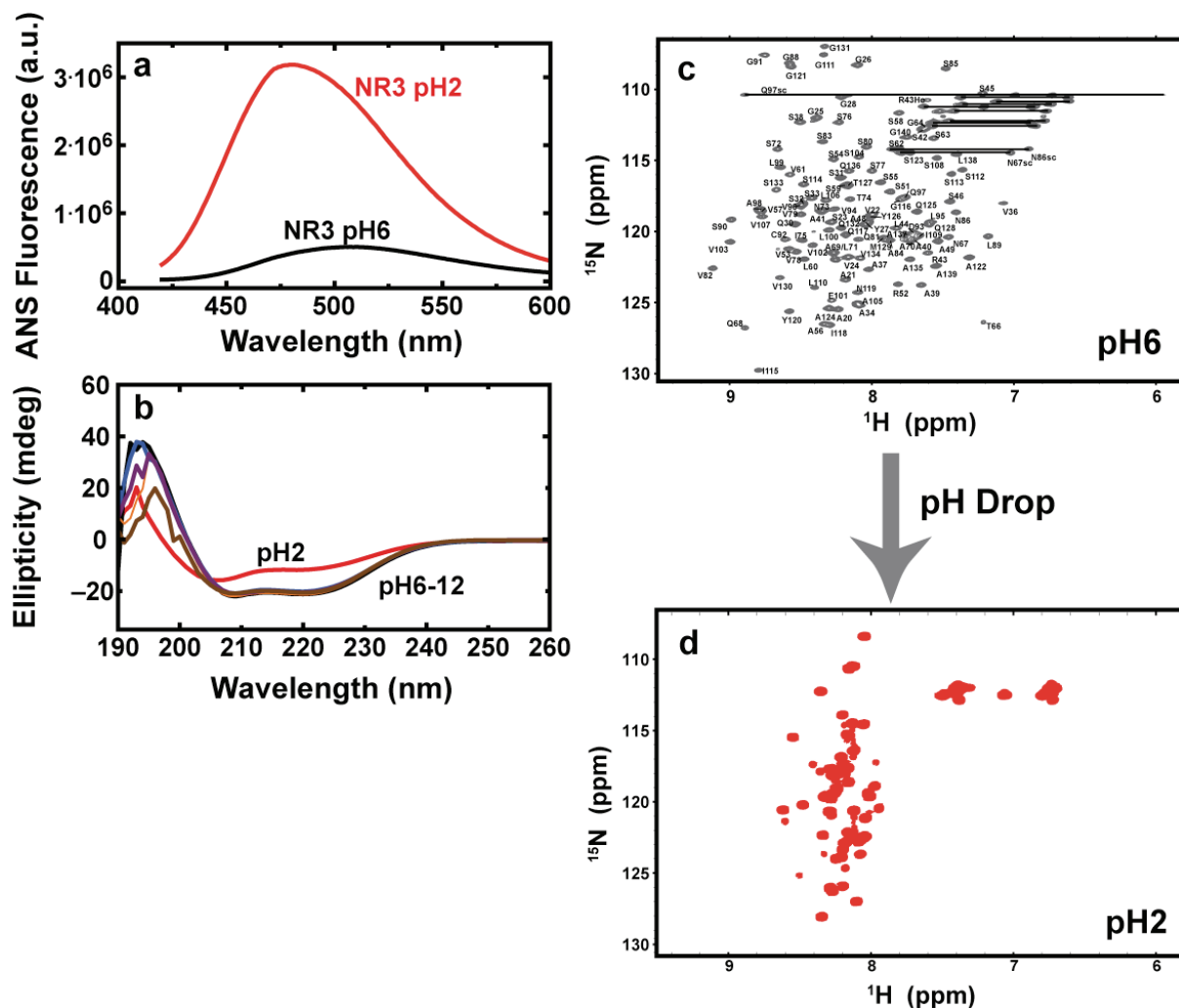
a) Stereo view of the best 20 NMR structures of NR3 at two different orientations. Secondary structural elements and the salt and disulfide bridge are labelled. This superposition has a backbone atom r.m.s.d. of 0.18 Å (see also supporting information table 2).

b) Surface properties of NR3. The surface is covered with serine and glutamine residues. As a result the NR domain is highly soluble in its folded state. Colourings: red, oxygen, blue, nitrogen, yellow sulphur, white, hydrogen.



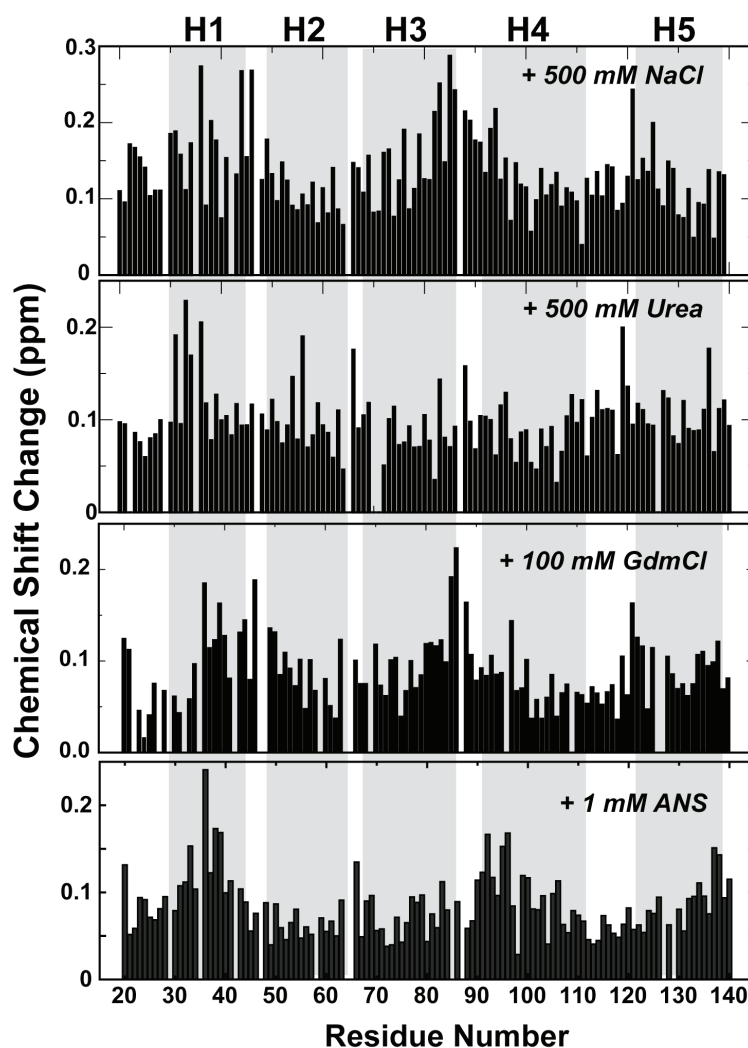
Supplementary Figure 2: Thermal stabilities of NR3 salt-bridge variants.

a) Thermal unfolding traces with CD detection at 222 nm for wild-type and two representative NR3 variants. In addition to significantly reduced thermal stabilities, the unfolding cooperativity also decreases, indicating a less defined structural state of the NR3 variants. Curve fitting was done with established equations¹. b) Thermal stabilities of the investigated NR3 variants. The thermal stabilities are indicated beside the bars and the asterisk indicates missing cooperativity in the thermal unfolding trace (as shown in a)). Thermal stabilities were obtained by CD spectroscopy at 222 nm with a constant heating rate of 60 K/h and 10 μ M protein concentrations in 10 mM Na-phosphate pH 6.0 and in a 1 mm path length cuvette.



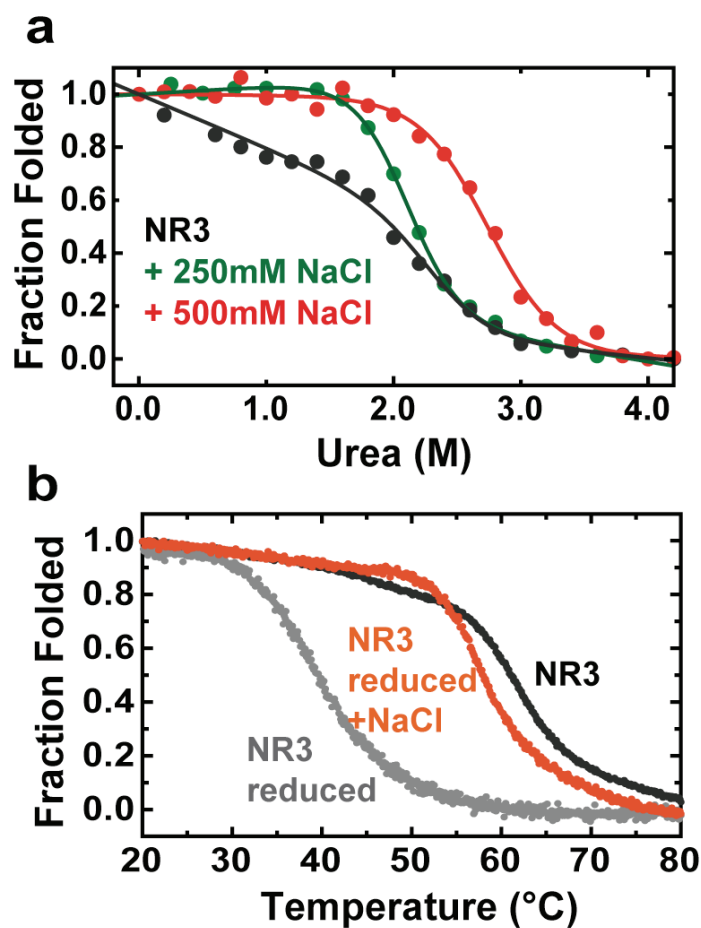
Supplementary Figure 3: pH dependency of ANS binding and structural integrity of NR3.

a) ANS fluorescence spectra of 50 μM NR3 at pH2 and pH6. At pH2 ANS fluorescence is highly increased accompanied by a blue shift of the fluorescence maximum indicating a more hydrophobic environment. 20 μM ANS was used. b) CD spectra of 10 μM NR3 at pH values ranging from pH2 to pH12. At low pH, the salt bridges are disrupted leading to a loss in secondary structure, which is most pronounced at the minimum at 222 nm (characteristic of α -helical geometry). c) ^{15}N HSQC spectrum of NR3 at pH 6. The rather low signal dispersion of the signals is indicative of an α -helical protein. Assignments of the signals are labelled in the spectrum. d) Upon a pH drop to pH 2, the NR domain unfolds and consequently shows a poorly dispersed ^{15}N HSQC spectrum.



Supplementary Figure 4: Chemical shift changes in the ^1H , ^{15}N HSQC spectrum of NR3 Δ 19 upon addition of salt, urea and ANS.

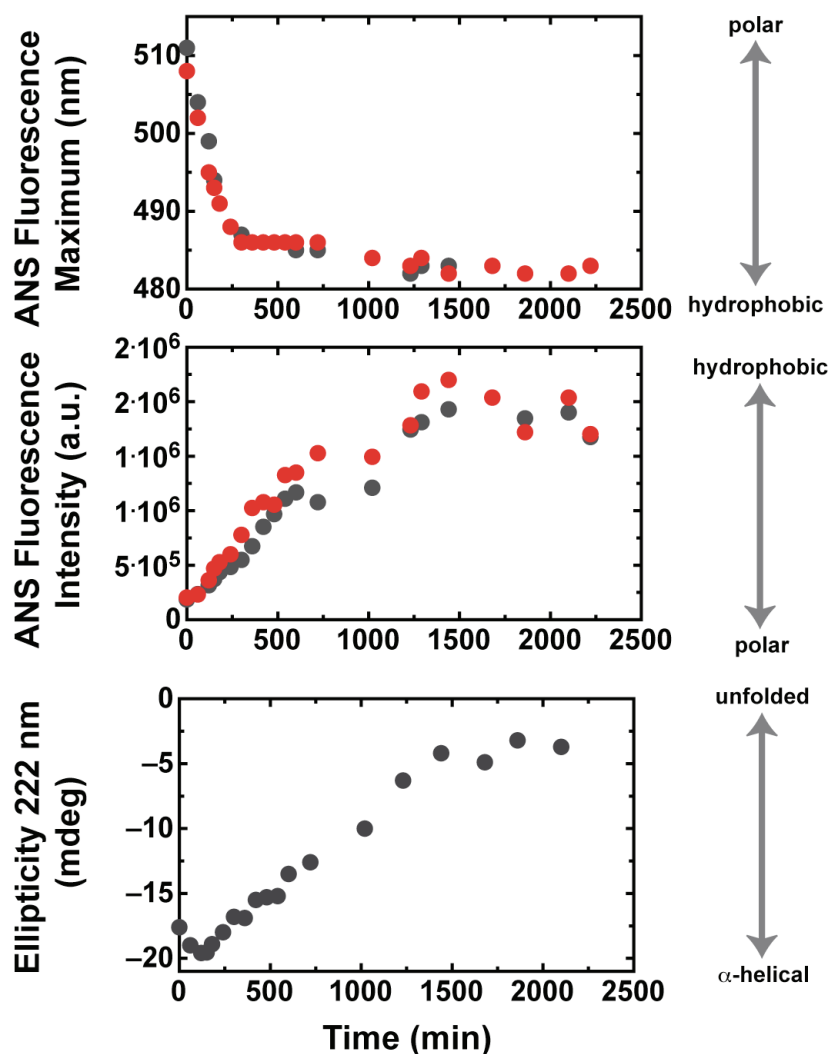
The addition of 500mM sodium chloride results in chemical shift changes within helices 1 and 2 as well in the loop between helices 3 and 4. The disulfide bridge is located at the amino-terminal end of helix 4. Addition of 500mM urea primarily affects the residues in helix 1. This helix is therefore supposed to trigger the unfolding process leading to formation of an intermediate species capable of initiating fibre assembly. The addition of 100mM guanidinium chloride (GdmCl) primarily affects the residues located at the vicinity of the salt bridges. This highlights the importance of these salt bridges for the stability of NR3. The environment-sensitive dye 1-anilinonaphthalene-8-sulphonate (ANS) affects residues located at helices 1 and 5 and the N-terminal part of helix 4. These structural elements form a common hydrophobic surface.



Supplementary Figure 5: Salt-dependent effects on NR3 stability.

a) Urea-induced unfolding transition of 60 μ M NR3 probed with the CD signal at 222 nm. The unfolding profile of NR3 is gradually shifted to higher stability upon increasing sodium chloride concentration. Especially the native state (at low urea concentrations) is significantly stabilised in the presence of salt.

b) Thermal unfolding profile of 10 μ M NR3 in its native form (disulfide bridge oxidised, black points) and in the reduced form (grey points) and additionally in the presence of 500 mM sodium chloride (orange points).



Supplementary Figure 6: Structural changes within the NR domain under shear stress are independent of the presence of sodium chloride.

200 μ M NR3 in 10 mM Na-phosphate pH6.0 was shaken at 900 rpm at 37°C with 250mM (red symbols) or without (grey symbols) NaCl for the indicated time. For each time point, 10 μ l of the NR3 solution was mixed with 490 μ l buffer supplemented with 10 μ M ANS for fluorescence measurements or 290 μ l buffer for CD measurements. ANS (an environment sensitive dye) shows high fluorescence intensity in hydrophobic environment (NR domain unfolded) accompanied by a blue-shift of the fluorescence emission maximum.

Supplementary Table 1: Sequences of the NR3 constructs used for NMR structure determination.

NR3 – T7-Tag[#]

10 20 30 40 50 60
 MASMTGGQQM GRGSMGAASA AVSVGGYGPQ SSSAPVASAA ASRLSSPAAS SRVSSAVSSL
 70 80 90 100 110 120
 VSSGPTNQAA LSNTISSVVS QVSASNPGLS GCDVLVQALL EVVSALVSIL GSSSIGQINY
 130 140
 GASAQYTMV GQSV AQALAG

NR3Δ19[#]

10 20 30 40 50 60
 GSHMAAVSVG GYGPQSSSAP VASAAASRLS SPAASSRVSS AVSSLVSSGP TNQAALSNTI
 70 80 90 100 110 120
 SSVVSQVSAS NPGLSGCDVL VQALLEVVSA LVSILGSSSI GQINYGASAQ YTMV GQSV
 AQALAG

[#] red letters indicate remaining peptide tags or remaining amino acids after tag removal, respectively. Numbering of residues in the structure is according to the first construct (NR3-T7-Tag).

Supplementary Table 2: Structural statistics of the 20 lowest energy structures of the NR3 dimer.

Rmsd from distance restraints (Å) ^a	SA ^b	<SA> _r
all (1313)	0.0191±0.0009	0.019
intraresidual (337)	0.0114±0.0005	0.011
sequential (398)	0.021±0.001	0.021
medium range (162)	0.015±0.001	0.015
long range (67)	0.026±0.003	0.023
intermonomer (112)	0.020±0.002	0.018
Rmsd from dihedral restraints (174)	0.071±0.005	0.078
Rmsd from J-coupling restraints (Hz)(58)	0.45±0.01	0.47
H-bonds restraints (Å /deg) (73) ^c	2.19±0.12 / 19.0±6.9	2.13±0.10 / 16.8±6.5
Deviations from ideal covalent geometry		
Bonds (Å × 10 ⁻³)	3.637±0.023	3.742
Angles (Å)	0.479±0.003	0.487
Impropers (Å)	1.422±0.046	1.541
Ramachandran Map regions (%) ^d (residues 34-140)	96.8 / 3.2 / 0.0 / 0.0	96.8 / 3.2 / 0.0 / 0.0

Atomic Rmsd (Å) ^e	SA versus <SA>		SA versus <SA> _r	
	backbone	all	backbone	all
Ordered residues (34-138)	0.18±0.04Å	0.37±0.05Å	0.30±0.06Å	0.51±0.06Å

^a numbers in brackets indicate the number of restraints per monomer

^b structures are labeled as follows: SA, set of 20 final simulated annealing structures; <SA>, the mean structure calculated by averaging the coordinates of SA structures after fitting over secondary structure elements; <SA>_r, the structure obtained by regularising the mean structure under experimental restraints.

^c H bonds were restrained by treating them as pseudocovalent bonds (see SI methods). Deviations are expressed as the average distance/average deviation from linearity for restrained H bonds.

^d Determined using the program PROCHECK-NMR. Percentages are for residues in allowed/additionally allowed/generously allowed/disallowed regions of the Ramachandran map. Values are calculated for the regularized structure.

^e Based on heavy atoms superimpositions.

Supplementary References

- ¹ Privalov, P. L. Stability of proteins: small globular proteins. *Adv Protein Chem* **33**, 167-241 (1979).

Teilarbeit II

Eisoldt, L., Hardy, J.G., Heim, M., Scheibel, T. (2010) The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J. Struct. Biol.* 170, pp. 413-419



The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins

Lukas Eisoldt, John G. Hardy, Markus Heim, Thomas R. Scheibel*

Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften, Universität Bayreuth, Universitätsstr. 30, 95440 Bayreuth, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2009
Received in revised form 22 December 2009
Accepted 27 December 2009
Available online 4 January 2010

Keywords:

Spider silk
Protein assembly
Salt
Shear

ABSTRACT

Major ampullate silk fibers of orb web-weaving spiders have impressive mechanical properties due to the fact that the underlying proteins partially fold into helical/amorphous structures, yielding relatively elastic matrices that are toughened by anisotropic nanoparticulate inclusions (formed from stacks of β -sheets of the same proteins). *In vivo* the transition from soluble protein to solid fibers involves a combination of chemical and mechanical stimuli (such as ion exchange, extraction of water and shear forces). Here we elucidate the effects of such stimuli on the *in vitro* aggregation of engineered and recombinantly produced major ampullate silk-like proteins (focusing on structure–function relationships with respect to their primary structures), and discuss their relevance to the storage and assembly of spider silk proteins *in vivo*.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Orb web-weaving spiders produce a number of task-specific silk protein-based fibers. One of these fibers is assembled from proteins produced by the major ampullate (MA) silk gland. MA silk fibers are used both in the construction of the web as the frame upon which to attach the capture spiral fibers (flagelliform silk fibers coated with aggregate silk) and as a lifeline to escape from predators (Aphrasiart and Vollrath, 1994; Lin et al., 1995). MA silk fibers of orb web-weaving spiders have impressive mechanical properties due to the fact that the underlying proteins partially fold into helical/amorphous structures yielding relatively elastic matrices that are toughened by anisotropic nanoparticulate inclusions (formed from stacks of β -sheets of the same proteins) (Gosline et al., 1999). The primary structures of MA proteins are reminiscent of amphiphilic multiblock copolymers (Exler et al., 2007; Geisler et al., 2008; Zbilut et al., 2005, 2006), in which the repetitive sequence elements (typically composed of multiple repeats of A_n , $(GA)_n$, $(GGX)_n$, and $(GPGXX)_n$) are flanked by highly conserved non-repetitive (NR) amino- and carboxy-terminal domains (Bini et al., 2004; Foo et al., 2006; Hedhammar et al., 2008; Lewis, 2006; Rising et al., 2006).

In common with other silk proteins, the MA proteins of *Araneus diadematus* spiders (ADF-3 and ADF-4) are stored at very high concentrations (>30 wt.%) without the onset of undesirable aggregation within the lumen of the spider. However, our *in vitro* studies of the repetitive sequence elements of recombinantly produced proteins based upon the consensus sequences of the MA proteins

of *Araneus diadematus* spiders (Guerette et al., 1996) without the NR terminal domains clearly demonstrate that these proteins are not soluble at such high concentrations as found *in vivo* (Huemmerich et al., 2004a, 2004b). Our findings suggest that the NR terminal domains control both the storage of the proteins (by increasing their solubility and/or deterring undesirable aggregation events) and fiber production (allowing/facilitating controlled protein assembly into fibers upon demand) (Hagn et al., in press).

In vivo Raman spectromicroscopy (Lefevre et al., 2008, 2007b) and *in vitro* ^{13}C NMR (Hijirida et al., 1996) studies of the spinning dope indicate that the repetitive sequence elements adopt highly hydrated random coil and 3_1 -helix (polyproline II-like) secondary structures which can be easily transformed into β -sheets. We (Huemmerich et al., 2004b) and subsequently others (Huang et al., 2006; Ittah et al., 2007, 2006; Lin et al., 2009; Stark et al., 2007) have shown the C-terminal NR domains to adopt a predominantly α -helical conformation *in vitro*. These domains have been postulated to form the outer layer of droplet-like structures observed in the spinning dope *in vivo* (Jin and Kaplan, 2003; Lin et al., 2009; Vollrath and Knight, 1999). We have also shown that the C-terminal NR domain is a prerequisite of certain supramolecular self-assembly processes (manifested in the form of fully reversible lower critical solubilisation temperature behavior) of our recombinantly produced proteins (Exler et al., 2007).

In vivo the transition from soluble protein to solid fibers involves a combination of chemical and mechanical stimuli (such as ion exchange, acidification, extraction of water and shear forces (Bini et al., 2004; Foo et al., 2006; Heim et al., 2009; Vollrath and Knight, 2001) that have also been demonstrated to promote protein assembly into fibers *in vitro* (Hardy and Scheibel, 2009a; Hardy et al., 2008; Rammensee et al., 2008). We were consequently

* Corresponding author.

E-mail address: thomas.scheibel@uni-bayreuth.de (T.R. Scheibel).

interested in determining the effect of such stimuli upon the stability of our MA silk-like proteins (Hardy and Scheibel, 2009b).

A protein's solubility in aqueous solution is governed by many factors, of which, one of the most important is its primary structure, which also determines its secondary, tertiary and quaternary structures (Levy et al., 2006; Rossmann and Argos, 1981; SenGupta and Scheibel, 2007). The presence of other solutes (such as ions) also has an effect upon a protein's solubility in water, as they interfere with the highly ordered layer of water (known as the hydration layer) on the protein's surface (Gerstein and Chothia, 1996; Kim and Cremer, 2001; Lesk et al., 1980; Zhang and Cremer, 2006). Low concentrations of salt tend to improve the solubility of proteins (known as 'salting in'), due to the formation of ion-rich hydration layers in the vicinity of charged and polar amino acid residues (as described by the Debye–Hückel theory), whereas high concentrations of salt tend to have the opposite effect, causing the protein to precipitate (known as 'salting out'). The magnitude of this effect is dependent upon the particular ions and usually follows the Hofmeister series, in which 'chaotropic' ions favor salting-in of proteins and 'kosmotropic' ions favor salting-out of proteins, and anions are well-known to have a much greater effect than cations (Baldwin, 1996; Geisler et al., 2008; Gurau et al., 2004; Horinek et al., 2008; Pegram and Record, 2008; Pirzer et al., 2009; Zhang and Cremer, 2006; Zhang et al., 2005).

Knight and Vollrath have investigated the MA gland of *Nephila edulis* spiders, finding that the physiological concentration of sodium chloride in the spinning dope in the lumen to be of the order of 150 mM, and the total concentration of salts was observed to decrease during the spinning process. They also found that as the dope flowed through the spinning duct, sodium cations were replaced by potassium cations, yet other metal cations (e.g. calcium, copper or magnesium) were almost undetectable in the lumen, duct and the naturally spun fibers. Furthermore, they observed that weakly chaotropic chloride anions are replaced with strongly kosmotropic phosphate anions (significantly increased concentrations) and sulfate anions (small increase with a relatively high level of experimental error) during the passage of the spinning dope along the spinning duct (Knight and Vollrath, 2001). Here we investigate the effects of salts (sodium chloride and sodium phosphate) and shear on the *in vitro* aggregation of our recombinantly produced MA silk-like proteins, and discuss their relevance to the storage and assembly of spider silk proteins *in vivo*.

In this study we use recombinantly produced silk proteins based on the consensus motifs of the MA silk *Araneus diadematus* fibroin 3 (ADF3) from the garden cross spider. The repetitive core domains of our proteins are composed of two different sequence modules, denoted A and Q, where module A is a hydrophobic polyalanine-rich motif, and module Q is a more hydrophilic glutamine- and glycine-rich motif (see materials and methods). In this study we use proteins containing 12 or 24 repeats of (AQ). The C-terminal NR3 domain is derived from *adf3* (gi|1263286, obtained from J. Gosline, Vancouver, BC) by using PCR. This domain is mainly α -helical and dimerises via disulfide bond formation between the single cysteine residues contained in two individual NR3 domains (Huemmerich et al., 2004b) (Fig. 1); therefore proteins bearing the NR3 domain are dimeric under non-reducing conditions.

2. Materials and methods

2.1. Cloning, protein expression and purification

The proteins (AQ)₁₂NR3 (dimer of 116 kDa), (AQ)₂₄NR3 (dimer of 212 kDa) and (AQ)₂₄ (monomer of 95 kDa), containing the repetitive elements (A, hydrophobic polyalanine-rich motif: GPYGPASAAAAAAGGYGPGSGQQ; Q, hydrophilic glutamine- and

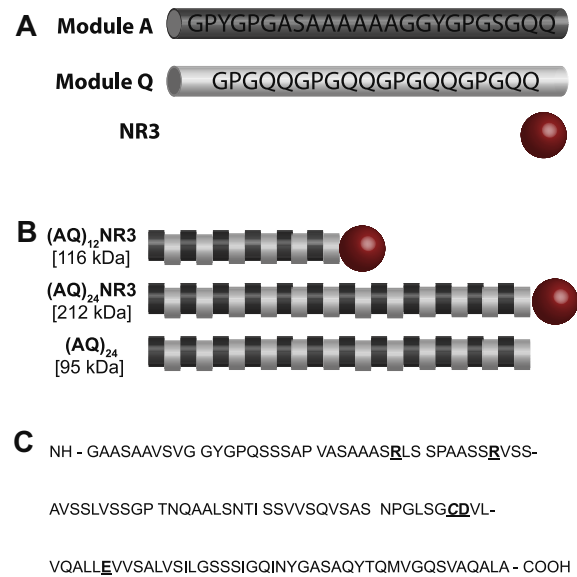


Fig. 1. Employed recombinantly produced proteins based on the consensus sequences of the major ampullate protein (ADF-3) of *Araneus diadematus* spiders. (A) A schematic representation of the repetitive sequence elements (A, hydrophobic polyalanine-rich motif and Q, hydrophilic glutamine- and glycine-rich motif) and the C-terminal non-repetitive domain (NR3). (B) A schematic representation of the engineered and recombinantly produced major ampullate silk-like proteins composed of the elements shown above. For each protein the molecular weight in kDa is given in brackets. Note that proteins bearing the NR domain are dimeric due to interdomain disulfide bond formation. (C) The primary sequence of the C-terminal non-repetitive domain (NR3) of the major ampullate protein (ADF-3) of *Araneus diadematus* spiders, highlighting the residues involved in salt bridges and the cysteine residue responsible for interprotein dimerization. In the (AQ)₁₂NR3 (D93A) mutant the single aspartic acid residue is replaced by an alanine residue, inhibiting the formation of one of the two possible salt bridges.

glycine-rich motif: GPGQQGPGQQGPGQQGPGQQ) were cloned, expressed and purified as previously reported. A D93A mutant (numbering according to the residues of the NR domain; see Fig. 1C) of (AQ)₁₂NR3 was obtained according to the QuikChange protocol from Stratagene (USA).

2.2. Salt-induced aggregation assay

Experiments were carried out in accordance with our previously described protocol (Huemmerich et al., 2004b). Prior to the experiment the proteins were dissolved in guanidinium thiocyanate solution (6 M) and then dialyzed against 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl. The assay was started by the addition of buffered (10 mM Tris/HCl, pH 8.0) solutions of NaCl and NaH₂PO₄ (pH 8.0). Protein concentrations were, respectively, 8.8 μ M, 5.3 μ M and 4.7 μ M for AQ₁₂NR3 (wt and D93A), AQ₂₄ and AQ₂₄NR3. After 1 h of incubation at 25 °C the samples were centrifuged at 17700 g to remove any visible aggregates, and the amount of soluble protein remaining in the supernatant was determined using a UV spectrometer (NanoDrop ND1000, ThermoFischer, USA).

2.3. Shear-induced aggregation assay

Prior to the experiment the proteins were dissolved in guanidinium thiocyanate solution (6 M) and then dialyzed against 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. Then the proteins were diluted into buffer containing 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 with 50 mM NaCl. Final protein concentrations were adjusted to 17.6 μ M of AQ₁₂NR3 and 10.6 μ M of AQ₂₄. The samples were incubated for 16 h at 25 °C without/with rotation at 25 rpm (Intellimixer RM-2, NeoLab, Germany). After rotation, the clearly visible aggregates were transferred onto

glass slides for optical microscopy (DMI3000B, Leica, Switzerland). The samples were then centrifuged at 125000 g to remove non-visible aggregates, and the amount of remaining soluble protein in the supernatant was determined using a UV spectrometer (NanoDrop ND1000, ThermoFischer, USA). The percentage of aggregated protein was calculated as described in section 2.2.

2.4. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic studies

FTIR spectra of fibers were recorded on a liquid nitrogen cooled Bruker Tensor 27 FTIR spectrometer, fitted with a liquid nitrogen cooled Bruker Hyperion microscope with IR polarizers supplied by Optometrics Corporation (Ayer, MA, USA). Spectroscopy was performed on fibers formed during the previously described aggregation assay that were washed with water to remove salts, air dried and placed on highly polished optical grade calcium fluoride

disks (Crystal GmbH, Berlin, Germany). Spectra of all aggregates were recorded in absorbance mode at 21 °C, with a 4 cm^{-1} resolution and 60 scans (corrected for background and atmosphere using OPUS software), and polarized FTIR spectra of aggregates of μm scale (and larger) were recorded at three different orientations (0° , 45° and 90° relative to the long axis of the fibrous aggregates) to determine if any of the secondary structural elements were aligned with the fibers.

2.5. Transmission electron microscopy

Prior to the experiment the proteins were dissolved in guanidinium thiocyanate solution (6 M) and then dialyzed against 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. A droplet (3 μL) was placed on pioloform-coated copper grids and the excess liquid was removed by wicking using a Kimwipe (Kimberly-Clark Corporation, USA). The grid was then

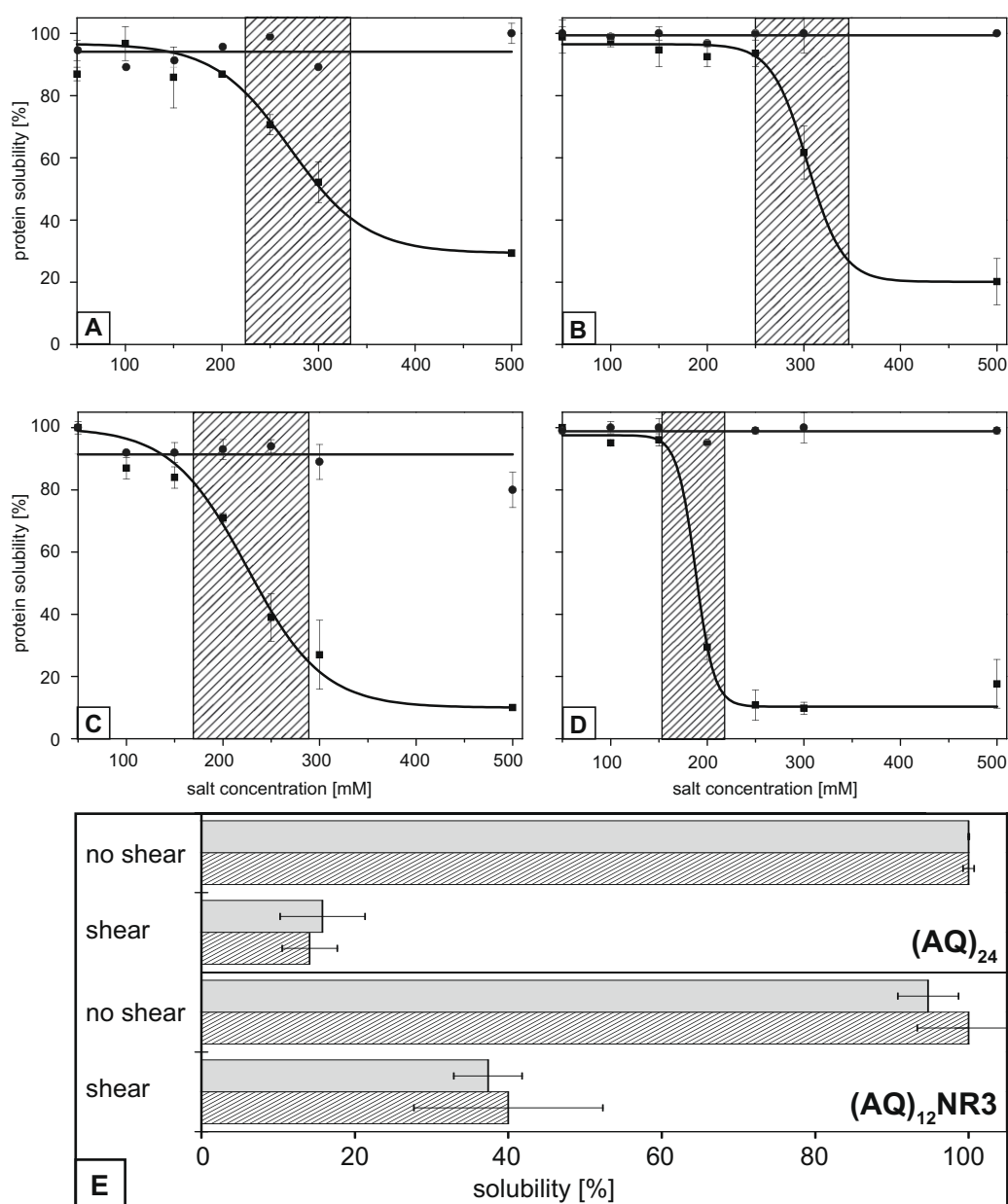


Fig. 2. Salt-induced aggregation of engineered and recombinantly produced major ampullate silk-like proteins after incubation for 1 h at RT: induced by the presence of sodium chloride (grey circles) and by the presence of sodium phosphate (black circles), the concentration regime required to aggregate the proteins is indicated by striped boxes. (A) (AQ)₁₂NR3 (wild type). (B) (AQ)₁₂NR3 (D93A). (C) (AQ)₂₄NR3 (wild type). (D) (AQ)₂₄. (E) A comparison of the degree of aggregation of our spider silk proteins with and without shear; induced in the presence of 50 mM sodium chloride (grey bars), or 500 mM sodium chloride (black bars).

stained with uranyl acetate (1% in water, pH 4.5) and the excess liquid was removed by wicking using a Kimwipe, and allowed to dry in a dust free dessicator. The grids were viewed with a JEOL JEM-2100 transmission electron microscope (Jeol, Eching, Germany).

3. Results and discussion

3.1. The effect of salt on protein aggregation

As noted in the introduction, MA spidroins are stored in the lumen of the gland in the presence of sodium and chloride ions, and during fiber spinning these ions are exchanged for potassium and

phosphate ions (Knight and Vollrath, 2001). Here we investigate the effects of chloride and phosphate anions on the *in vitro* aggregation of our recombinantly produced MA silk-like proteins (Fig. 1).

Our solubility/aggregation assays in the absence of shear forces (similar to the situation of the silk proteins in the lumen of the gland) show that the extent of protein aggregation is determined by the concentration of salt. Our assays with sodium chloride (found in the lumen) indicate that the level of aggregation is low (less than 20%) for all of the tested engineered proteins, even at extremely high salt concentrations (up to 500 mM); whereas in the presence of equivalent concentrations of sodium phosphate (found in the spinning duct) the level of aggregation for each protein is

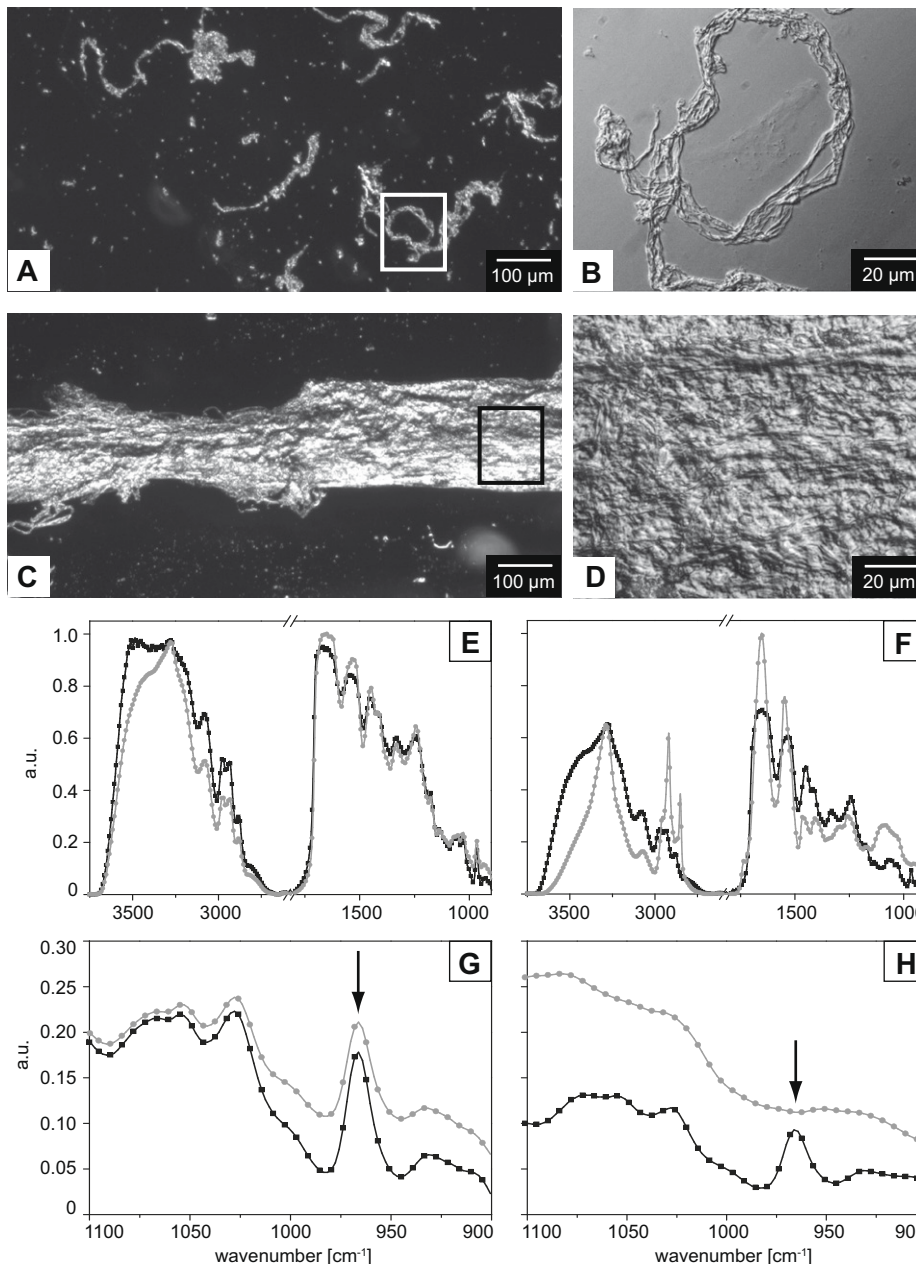


Fig. 3. Shear-induced aggregation of our recombinantly produced major ampullate silk-like proteins. (A) Optical microscope image of aggregates produced by shear-induced aggregation of aqueous solutions of (AQ)₂₄. (B) Magnified image of the (AQ)₂₄ aggregates shown in A) (white frame). (C) Optical microscope image of well-defined fibrous aggregates produced by shear-induced aggregation of aqueous solutions of (AQ)₁₂NR3. (D) Magnified image of one part of the (AQ)₁₂NR3 fiber (black frame). (E) Polarized FTIR spectra from (AQ)₂₄ aggregates from A/B recorded at 0° (black circles) and 90° (grey squares) relative to the long fiber axis. (F) Polarized FTIR spectra from (AQ)₁₂NR3 fibrils from C/D recorded at 0° (black circles) and 90° (grey squares) relative to the long fiber axis. (G) Magnification of the region between 1100 and 900 cm⁻¹ from the (AQ)₂₄ spectra (E). The arrow indicates the characteristic polyalanine β-sheet band at around 960 cm⁻¹ (Papadopoulos et al., 2009). (H) Magnification of the region between 1100 and 900 cm⁻¹ from the (AQ)₁₂NR3 spectra (F). The arrow indicates the characteristic polyalanine β-sheet band at around 960 cm⁻¹.

notably higher (up to 100%) due to the more kosmotropic nature of the phosphate anion (Fig. 2). Therefore, weakly chaotropic chloride anions aid the long term storage of MA spidroins in the lumen (salting-in) and are substituted for strongly kosmotropic phosphate anions (salting out) during the natural fiber spinning process.

3.2. The effect of shear on protein aggregation

During the passage of the spinning dope from the lumen through the spinning duct to the spigot (the point at which the fiber exits the animal), the dope is exposed to shear forces which are known to encourage aggregation in a variety of globular and fibrillar proteins (Bekard and Dunstan, 2009; Cromwell et al., 2006; Hamilton-Brown et al., 2008; Hill et al., 2006; Vezy et al., 2009; Yamaura et al., 1982, 1985); we were therefore keen to find out if shear forces have an effect upon the aggregation of our recombinantly produced MA silk-like proteins *in vitro*.

Our aggregation assays in the presence of shear forces (as the silk proteins are exposed to in the duct during fiber spinning) show that the extent of protein aggregation is dramatically increased in relation to corresponding assays in the absence of shear, in the presence of both low and high concentrations of salt; moreover, the aggregates formed after longer periods of exposure to shear were fibrous with dimensions of μm to mm scale (Fig. 3).

Particularly noteworthy is that water is absorbed from the dope during its passage along the spinning duct (Kojic et al., 2004; Tillin-ghast et al., 1984), which increases the concentration of proteins and consequently increases the shear forces between the proteins in the dope due to strengthened hydrophobic interactions. This leads us to suggest that shear forces are likely to play a greater role than salt effects during the fiber spinning process *in vivo* (Casem et al., 2002; Knight and Vollrath, 2002; Perez-Rigueiro et al., 2001a, 2001b).

3.3. The role of the C-terminal NR domain in fiber storage and assembly

It is widely accepted that higher order supramolecular assemblies are required to achieve silk protein storage at high concentrations within the lumen, and as noted in the introduction, we have

previously shown the highly conserved C-terminal NR domain to be a prerequisite of certain supramolecular self-assembly processes (manifested in the form of fully reversible lower critical solubilisation temperature behavior) of our recombinantly produced proteins (Exler et al., 2007). Interestingly, our transmission electron microscope studies of freshly dialyzed solutions of $(\text{AQ})_{12}\text{NR3}$ show evidence of vesicle-like supramolecular assemblies (of nm to μm scale), which is not the case for $(\text{AQ})_{24}$, a protein of similar molecular weight without the C-terminal NR domain (Fig. 4), which has also been observed by light microscopy in a previous study (Rammensee et al., 2008).

Our salt-induced aggregation studies revealed no significant differences in the behavior of $(\text{AQ})_{12}\text{NR3}$ and $(\text{AQ})_{24}$ in the presence of sodium chloride, whereas in the presence of sodium phosphate (>200 mM) $(\text{AQ})_{24}$ is much more prone to aggregation (Fig. 2A–D) suggesting that the C-terminal NR domain dependent supramolecular assemblies are stabilized to a certain degree against aggregation. Shear stress had an even pronounced effect on protein aggregation (Fig. 2E). Furthermore, exposure of solutions of $(\text{AQ})_{24}$ to shear stress resulted in the formation of ill-defined β -sheet rich aggregates (Fig. 3A and B and Supplementary Table 1), whereas exposure of solutions of $(\text{AQ})_{12}\text{NR3}$ to shear stress yielded relatively well-defined fibrous aggregates which optical microscopy revealed to be composed of ordered (aligned) bundles of long fibrous aggregates (Fig. 3C and D). Interestingly, polarized Fourier Transform Infrared Spectra recorded at two different orientations (0° and 90° relative to the long axis of the fibrous aggregates) showed that the β -sheets within the fibrous aggregates of $(\text{AQ})_{24}$ are randomly aligned, whereas the β -sheets within the fibrous aggregates of $(\text{AQ})_{12}\text{NR3}$ were predominantly aligned with the long axis of the fibers (in analogy to naturally spun fibers (Boulet-Audet et al., 2008; Lefevre et al., 2007a; Rousseau et al., 2009, 2004)) due to a controlled assembly process (Fig. 3E and F) (Hagn et al., *in press*). This finding was further confirmed by FTIR in the region between 1100 and 900 cm^{-1} where specific signals for β -polyalanine crystals (964 cm^{-1}) can be observed, as reported recently (Papadopoulos et al., 2009). Interestingly, a clear difference at the two employed angles using the polarizer can be seen for $(\text{AQ})_{12}\text{NR3}$ aggregates (Fig. 3H), while there is no spectral difference for the $(\text{AQ})_{24}$ aggregates, pointing out that the polyalanine crystals are oriented in the fibers formed

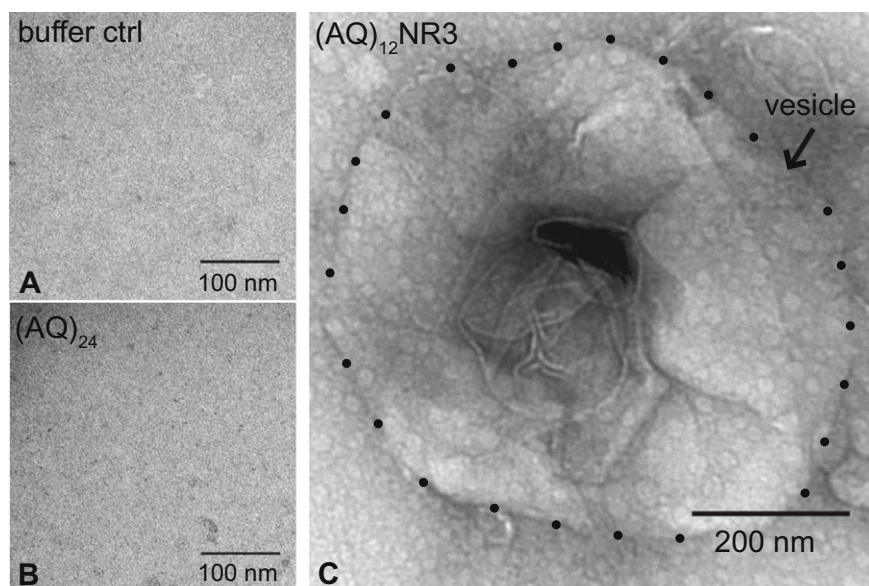


Fig. 4. Images obtained via transmission electron microscopy. (A) Dialysis buffer. (B) Freshly dialyzed solutions of $(\text{AQ})_{24}$. (C) Freshly dialyzed solutions of $(\text{AQ})_{12}\text{NR3}$, showing evidence of higher order supramolecular assemblies.

from the protein with the NR domain, but not in the fibers formed from the protein without the NR domain. These findings suggest that the C-terminal NR domain controls both the storage of the proteins (by increasing their solubility and/or deterring undesirable aggregation events) and fiber formation (by facilitating controlled protein assembly into fibers upon demand).

3.4. The role of the N-terminal NR domain in fiber storage and assembly

The N-terminal NR domains of silk proteins have been shown to be highly conserved between different spider species (Hedhammar et al., 2008; Lin et al., 2009; Motriuk-Smith et al., 2005; Rising et al., 2006). However, due to a lack of any published sequence data of the N-terminal NR domains of MA silk proteins of *Araneus diadematus*, this domain was not included in our engineered protein constructs. Despite this fact, our *in vitro* salt-induced aggregation assays with proteins with higher molecular weights and with longer repetitive sequence elements ((AQ)₂₄NR3 as opposed to (AQ)₁₂NR3) showed them to be more prone to aggregation (Fig. 2), which leads us to speculate that the N-terminal NR domain might also have an effect on higher order supramolecular assembly of silk proteins and therefore play an important role in protein storage and fiber assembly *in vivo*, as the natural proteins are larger than our recombinantly produced analogues (Guerette et al., 1996; Huemmerich et al., 2004b).

4. Conclusions

Our salt-induced aggregation assays clearly demonstrate that chloride (which is present in the lumen during silk protein storage) does not induce significant levels of protein aggregation, whereas phosphate (present in the spinning duct) does induce significant levels of protein aggregation, due to the strongly kosmotropic nature of the phosphate anion. Our shear-induced aggregation assays clearly show that shear forces are likely to play a greater role than salt effects during the fiber spinning process *in vivo*, and moreover, a key role in the alignment of the secondary structural elements within the fibers (which controls their mechanical properties). Our transmission electron microscope studies show that the C-terminal NR domain is a prerequisite for higher order supramolecular assembly of the proteins, which is important for both protein storage and the controlled assembly of fibers. Finally, we speculate that the N-terminal NR domains also play a role in protein storage (and potentially fiber formation).

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the help of Stefan Geimer (Universität Bayreuth) for assistance with the transmission electron microscopy studies. We also acknowledge Franz Hagn and Horst Kessler (Technische Universität München) for supplying us with primers for the D93A mutants. L.E. acknowledges financial support from the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF 13N9736). J.G.H. acknowledges financial support from the Alexander von Humboldt Foundation. M.H. acknowledges financial support from the 'Graduiertenförderung nach dem bayerischen Eliteförderungsgesetz' (Universitäten Bayern, e.V.). T.R.S. acknowledges financial support from the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG SCHE 603/4-3) and the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF 13N9736). This manuscript is in memoriam of Rainer Rudolph.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jsb.2009.12.027.

References

- Aprhisiart, A., Vollrath, F., 1994. Design-features of the orb web of the spider, *Araneus diadematus*. Behavioral Ecology 5, 280–287.
- Baldwin, R.L., 1996. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. Biophysical Journal 71, 2056–2063.
- Bekard, I.B., Dunstan, D.E., 2009. Shear-induced deformation of bovine insulin in couette flow. Journal of Physical Chemistry B 113, 8453–8457.
- Bini, E., Knight, D.P., Kaplan, D.L., 2004. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. Journal of Molecular Biology 335, 27–40.
- Boulet-Audet, M., Lefevre, T., Buffeteau, T., Pezolet, M., 2008. Attenuated total reflection infrared spectroscopy: an efficient technique to quantitatively determine the orientation and conformation of proteins in single silk fibers. Applied Spectroscopy 62, 956–962.
- Casem, M.L., Tran, L.P.P., Moore, A.M.F., 2002. Ultrastructure of the major ampullate gland of the black widow spider, *Latrodectus hesperus*. Tissue & Cell 34, 427–436.
- Cromwell, M.E.M., Hilario, E., Jacobson, F., 2006. Protein aggregation and bioprocessing. Aaps Journal 8, E572–E579.
- Exler, J.H., Hummerich, D., Scheibel, T., 2007. The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. Angewandte Chemie-International Edition 46, 3559–3562.
- Foo, C.W.P., Bini, E., Hensman, J., Knight, D.P., Lewis, R.V., Kaplan, D.L., 2006. Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders. Applied Physics a-Materials Science & Processing 82, 223–233.
- Geisler, M., Pirzer, T., Ackerschott, C., Lud, S., Garrido, J., Scheibel, T., Hugel, T., 2008. Hydrophobic and Hofmeister effects on the adhesion of spider silk proteins onto solid substrates: an AFM-based single-molecule study. Langmuir 24, 1350–1355.
- Gerstein, M., Chothia, C., 1996. Packing at the protein–water interface. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 10167–10172.
- Gosline, J.M., Guerette, P.A., Ortlepp, C.S., Savage, K.N., 1999. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. Journal of Experimental Biology 202, 3295–3303.
- Guerette, P.A., Ginzinger, D.G., Weber, B.H.F., Gosline, J.M., 1996. Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. Science 272, 112–115.
- Gurau, M.C., Lim, S.M., Castellana, E.T., Albertorio, F., Kataoka, S., Cremer, P.S., 2004. On the mechanism of the Hofmeister effect. Journal of the American Chemical Society 126, 10522–10523.
- Hagn, F., Eisoldt, L., Hardy, J.G., Vendrely, C., Murray, C., Scheibel, T., Kessler, H., in press. A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. Nature.
- Hamilton-Brown, P., Bekard, I., Ducker, W.A., Dunstan, D.E., 2008. How does shear affect a beta fibrillogenesis? Journal of Physical Chemistry B 112, 16249–16252.
- Hardy, J.G., Scheibel, T.R., 2009a. Production and processing of spider silk proteins. Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry 47, 3957–3963.
- Hardy, J.G., Scheibel, T.R., 2009b. Silk-inspired polymers and proteins. Biochemical Society Transactions 37, 677–681.
- Hardy, J.G., Romer, L.M., Scheibel, T.R., 2008. Polymeric materials based on silk proteins. Polymer 49, 4309–4327.
- Hedhammar, M., Rising, A., Grip, S., Martinez, A.S., Nordling, K., Casals, C., Stark, M., Johansson, J., 2008. Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprostheno australis*: implications for fiber formation. Biochemistry 47, 3407–3417.
- Heim, M., Keerl, D., Scheibel, T., 2009. Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. Angewandte Chemie-International Edition 48, 3584–3596.
- Hijirida, D.H., Do, K.G., Michal, C., Wong, S., Zax, D., Jelinski, L.W., 1996. C-13 NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. Biophysical Journal 71, 3442–3447.
- Hill, E.K., Krebs, B., Goodall, D.G., Howlett, G.J., Dunstan, D.E., 2006. Shear flow induces amyloid fibril formation. Biomacromolecules 7, 10–13.
- Horinek, D., Serr, A., Geisler, M., Pirzer, T., Slotta, U., Lud, S.Q., Garrido, J.A., Scheibel, T., Hugel, T., Netz, R.R., 2008. Peptide adsorption on a hydrophobic surface results from an interplay of solvation, surface, and intrapeptide forces. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 2842–2847.
- Huang, W., Lin, Z., Sin, Y.M., Li, D., Gong, Z., Yang, D., 2006. Characterization and expression of a cDNA encoding a tubuliform silk protein of the golden web spider *Nephila antipodiana*. Biochimie 88, 849–858.
- Huemmerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U., Ittah, S., 2004a. Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. Current Biology 14, 2070–2074.
- Huemmerich, D., Helsen, C.W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R., Scheibel, T., 2004b. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. Biochemistry 43, 13604–13612.
- Ittah, S., Michaeli, A., Goldblum, A., Gat, U., 2007. A model for the structure of the C-terminal domain of dragline spider silk and the role of its conserved cysteine. Biomacromolecules 8, 2768–2773.

- Ittah, S., Cohen, S., Garty, S., Cohn, D., Gat, U., 2006. An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation. *Biomacromolecules* 7, 1790–1795.
- Jin, H.J., Kaplan, D.L., 2003. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* 424, 1057–1061.
- Kim, J., Cremer, P.S., 2001. Elucidating changes in interfacial water structure upon protein adsorption. *ChemPhysChem* 2, 543–546.
- Knight, D.P., Vollrath, F., 2001. Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Naturwissenschaften* 88, 179–182.
- Knight, D.P., Vollrath, F., 2002. Biological liquid crystal elastomers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 357, 155–163.
- Kojic, N., Kojic, M., Gudlavalleti, S., McKinley, G., 2004. Solvent removal during synthetic and *Nephila* fiber spinning. *Biomacromolecules* 5, 1698–1707.
- Lefevre, T., Rousseau, M.E., Pezolet, M., 2007a. Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy. *Biophysical Journal* 92, 2885–2895.
- Lefevre, T., Boudreault, S., Cloutier, C., Pezolet, M., 2008. Conformational and orientational transformation of silk proteins in the major ampullate gland of *Nephila clavipes* spiders. *Biomacromolecules* 9, 2399–2407.
- Lefevre, T., Leclerc, J., Rioux-Dube, J.F., Buffeteau, T., Paquin, M.C., Rousseau, M.E., Cloutier, I., Auger, M., Gagne, S.M., Boudreault, S., Cloutier, C., Pezolet, M., 2007b. Conformation of spider silk proteins in situ in the intact major ampullate gland and in solution. *Biomacromolecules* 8, 2342–2344.
- Lesk, A.M., Chothia, C., Ramsay, W., Foster, R., Ingold, C., 1980. Solvent accessibility, protein surfaces, and protein folding. *Biophysical Journal* 32, 35–47.
- Levy, E.D., Pereira-Leal, J.B., Chothia, C., Teichmann, S.A., 2006. 3D complex: a structural classification of protein complexes. *Plos Computational Biology* 2, 1395–1406.
- Lewis, R.V., 2006. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials. *Chemical Reviews* 106, 3762–3774.
- Lin, L.H., Edmonds, D.T., Vollrath, F., 1995. Structural-engineering of an orb-spiders web. *Nature* 373, 146–148.
- Lin, Z., Huang, W.D., Zhang, J.F., Fan, J.S., Yang, D.W., 2009. Solution structure of eggcase silk protein and its implications for silk fiber formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8906–8911.
- Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C.Y., Lewis, R.V., 2005. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules* 6, 3152–3159.
- Papadopoulos, P., Ene, R., Weidner, I., Kremer, F., 2009. Similarities in the structural organization of major and minor ampullate spider silk. *Macromolecular Rapid Communications* 30, 851–857.
- Pegram, L.M., Record, M.T., 2008. Thermodynamic origin of Hofmeister ion effects. *Journal of Physical Chemistry B* 112, 9428–9436.
- Perez-Rigueiro, J., Elices, M., Llorca, J., Viney, C., 2001a. Tensile properties of silkworm silk obtained by forced silking. *Journal of Applied Polymer Science* 82, 1928–1935.
- Perez-Rigueiro, J., Elices, M., Llorca, J., Viney, C., 2001b. Tensile properties of Attacus atlas silk submerged in liquid media. *Journal of Applied Polymer Science* 82, 53–62.
- Pirzer, T., Geisler, M., Scheibel, T., Hugel, T., 2009. Single molecule force measurements delineate salt, pH and surface effects on biopolymer adhesion. *Physical Biology* 6. doi:10.1088/1478-3975/6/2/025004.
- Rammensee, S., Slotta, U., Scheibel, T., Bausch, A.R., 2008. Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6590–6595.
- Rising, A., Hjalms, G., Engstrom, W., Johansson, J., 2006. N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins. *Biomacromolecules* 7, 3120–3124.
- Rossmann, M.G., Argos, P., 1981. Protein folding. *Annual Review of Biochemistry* 50, 497–532.
- Rousseau, M.E., Lefevre, T., Pezolet, M., 2009. Conformation and orientation of proteins in various types of silk fibers produced by *Nephila clavipes* spiders. *Biomacromolecules* 10, 2945–2953.
- Rousseau, M.E., Lefevre, T., Beaulieu, L., Asakura, T., Pezolet, M., 2004. Study of protein conformation and orientation in silkworm and spider silk fibers using Raman microspectroscopy. *Biomacromolecules* 5, 2247–2257.
- SenGupta, S., Scheibel, T., 2007. Folding, self-assembly and conformational switches of proteins. In: Zbilut, J.P., Scheibel, T. (Eds.), *Protein Folding–Misfolding: Some Current Concepts of Protein Chemistry*. Nova Publishers, New York. pp. 1–34.
- Stark, M., Grip, S., Rising, A., Hedhammar, M., Engstrom, W., Hjalms, G., Johansson, J., 2007. Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins. *Biomacromolecules* 8, 1695–1701.
- Tillinghast, E.K., Chase, S.F., Townley, M.A., 1984. Water extraction by the major ampullate duct during silk formation in the spider, *Argiope aurantia* Lucas. *Journal of Insect Physiology* 30, 591–596.
- Vezy, C., Hermanson, K.D., Scheibel, T., Bausch, A.R., 2009. Interfacial rheological properties of recombinant spider-silk proteins. *Biointerphases* 4, 43–46.
- Vollrath, F., Knight, D.P., 1999. Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 24, 243–249.
- Vollrath, F., Knight, D.P., 2001. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 410, 541–548.
- Yamaura, K., Okumura, Y., Matsuzawa, S., 1982. Mechanical denaturation of high polymers in solutions. 36. Flow-induced crystallization of bombyx-mori I silk fibroin from the aqueous-solution under a steady-state flow. *Journal of Macromolecular Science-Physics* B21, 49–69.
- Yamaura, K., Okumura, Y., Ozaki, A., Matsuzawa, S., 1985. Flow-induced crystallization of bombyx-mori I silk fibroin from regenerated aqueous-solution and spinnability of its solution. *Applied Polymer Symposia* 205, 220.
- Zbilut, J.P., Scheibel, T., Huemmerich, D., Webber, C.L., Colafranceschi, M., Giuliani, A., 2005. Spatial stochastic resonance in protein hydrophobicity. *Physics Letters A* 346, 33–41.
- Zbilut, J.P., Scheibel, T., Huemmerich, D., Webber, C.L., Colafranceschi, M., Giuliani, A., 2006. Statistical approaches for investigating silk properties. *Applied Physics a-Materials Science & Processing* 82, 243–251.
- Zhang, Y.J., Cremer, P.S., 2006. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 658–663.
- Zhang, Y.J., Furryk, S., Bergbreiter, D.E., Cremer, P.S., 2005. Specific ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series. *Journal of the American Chemical Society* 127, 14505–14510.

Appendix A. Supplementary data.

Table 1

β -sheet content of the aggregates of (AQ)₁₂NR3, (AQ)₂₄ and (AQ)₂₄NR3 (formed at pH 7 in the presence of 50 mM NaCl and shear stress) estimated using OPUS secondary structure determination software (PLS Quant 2) based on infrared absorption between 1730.8 and 1594.8 cm⁻¹. For the aggregates formed in the presence of shear, the values of β -sheet content displayed were recorded at three different orientations (0°/45°/90° respectively) relative to the long axis of the fibrous aggregates.

Position of polarizer relative to the long axis of the fiber	% β -sheet content		
	(AQ) ₁₂ NR3	(AQ) ₂₄	(AQ) ₂₄ NR3
0°	28.39	29.09	35.14
45°	28.26	33.15	34.48
90°	26.11	30.74	34.21

Teilarbeit III

Eisoldt, L., Schiemann, S., Döring, V., Scheibel, T. Counterplay of two MaSp2 spider silk proteins from *A. diadematus*: implications for silk fiber assembly. (2013) *Manuscript in preparation*

Co-expression of two engineered spider silk genes in *E. coli* – implications for novel nanomaterials

Lukas Eisoldt⁺, Volker Döring, Svenja Schiemann, Thomas Scheibel[#]

E-Mail adress of all authors:

Lukas.Eisoldt@bm.uni-bayreuth.de

Svenja.Schiemann@bm.uni-bayreuth.de

Volker.Döring@bm.uni-bayreuth.de

Thomas.Scheibel@bm.uni-bayreuth.de

All authors are members of

Lehrstuhl Biomaterialien – Universität Bayreuth

Universitätsstrasse 30

D-95440 Bayreuth

⁺: present adress:

Lehrstuhl Biologische Chemie

Technische Universität München

Emil-Erlenmeyer-Forum 5

85350 Freising-Weihenstephan

Germany

[#]Corresponding author:

Prof. Dr. Thomas Scheibel

Lehrstuhl Biomaterialien – Universität Bayreuth

Universitätsstrasse 30

D-95440 Bayreuth

Introductory paragraph

Spider dragline silk is a protein fiber with extraordinary mechanical properties that rival many man made fibrous materials such as Kevlar or steel¹. Here we report for the first time the co-expression of two engineered spider silk genes based on the sequences of the two (MaSp2-like) dragline proteins ADF3 and ADF4 from *A. diadematus* in *E.coli*. Recently it has been reported that dragline silk proteins can form homodimers via their non-repetitive carboxy terminal domains^{2, 3}. Strikingly, we identified the formation of a covalently linked heterodimer *in vivo* with fiber assembly properties than the respective homodimers. The results shed light onto interactions between the two dragline silk proteins of *Araneus diadematus* and will allow to develop new tunable high performance materials (e.g. hydrogels or fibers) on the basis of the two-component system.

Main text

Dragline silk threads comprise two protein classes that are produced in the Major Ampullate silk gland of the spider and therefore named Major Ampullate Spidroin 1 (MaSp) and 2. The two protein classes mainly differ in their in their proline content (MaSp 1 low, MaSp2 high) ⁴⁻⁷. Major ampullate spidroins comprise a large, repetitive intrinsically unordered core domain, flanked by small non-repetitive globular terminal domains. Individual repeats consist of 40-60 amino acid residues with prominent amino acid motifs. The most prominent block in MaSp proteins is a polyalanine stretch of 5-14 residues depending on the spider species. In the final fiber it forms tightly packed β -sheet crystals that are thought to be responsible for its mechanical toughness⁸⁻¹¹. Other common motifs are GGX or GPGXX with X representing a variable amino acid. Recent studies indicated that both form loosely structured regions that may contribute to the flexibility of the fiber.¹¹⁻¹³ Within the dragline silk of *Araneus diadematus* two MaSp2 proteins have been identified, named *Araneus diadematus* fibroin 3 and 4 (ADF) (Figure 1a)^{5, 14, 15}. Concerning the terminal domains, the structure and function of the carboxyterminal domain (CTD) from dragline silk protein ADF3 and ADF4 was recently investigated². The domains consist of a 5-helix bundle and forms disulfide linked parallel homodimers ² (Figure 1b). CTDs play a role in the formation of supramolecular, micellar-like assemblies important for storage of the spidroins at high concentrations in the spinning dope, as well as in the alignment of the proteins during fiber assembly ^{2, 3, 16-19}. Here we investigated the putative intermolecular interaction between the two MaSp analogues eADF3((AQ)12NR3) and eADF4(C16NR4) of *A. diadematus*, both in vivo as well as during assembly.

Recombinant spider silk proteins eADF3((AQ)12NR3) and eADF4(C16NR4) differ mainly in their repetitive core domains which determine most of the proteins behavior

as recently described²⁰. To investigate the possible interactions of the two recombinant spider silk proteins eADF3((AQ)₁₂NR3) and eADF4(C₁₆NR4) the encoding genes were co-expressed in *E. coli* from a plasmid where each gene is under the control of its own T7-promoter (Figure 1c). To distinguish between both similar sized proteins in various assays eADF3((AQ)₁₂NR3) was fused with an aminoterminal T7-tag and eADF4(C₁₆NR4) with a hexahistidine (His₆)-tag. When eADF3((AQ)₁₂NR3) and eADF4(C₁₆NR4) are produced individually they form disulfide linked dimers even in the reducing cytoplasm of *E. coli*, since the redoxpotential of the involved cysteins is significantly lower than that of the cytosol of *E. coli*². When produced individually the majority (>66%) can be found in the soluble fractions as judged by western blot analysis (Figure 2a). Coexpression has no influence on the solubility of the proteins under the conditions tested (Figure 2a). Strikingly a carboxyterminal domain mediated heterodimerisation of both proteins could be detected (Figure 2b). Next, we tested the formation of such heterodimer *in vitro*. Therefore, a strong reducing agent (TCEP) was added to a 1:1 mixture of fully chemically denatured (AQ)₁₂NR3 and C₁₆NR4, and the proteins were refold under reducing conditions. After refolding, both homodimers as well as the heterodimer could be detected (Fig 2c). However, the amount of heterodimer formed *in vitro* was much lower *in vivo* with a nearly statistical distribution of 1:1:1 (Figure 2b). To characterize the heterodimer, a purification strategy was established (see Materials and Method section) yielding pure heterodimer (Figure 2c). Far-UV CD spectra of the three proteins showed no substantial differences (Figure 2d). The broad minimum at 205 nm and a plateau at 219 nm indicate a mainly random-coil/PPI-II dominated structure with α -helical portions. The random coil signals arise from the repetitive core domain²⁰, whereas the α -helical contributions are solely from the carboxyterminal regions NR3 and NR4^{2, 20}. Melting experiments showed a melting

point of 66°C for the heterodimer which is 2°C above the one of the (AQ)₁₂NR3 homodimer and 1.5 °C below that of the C₁₆NR4 dimer (Figure 2e). Upon cooling, after thermal denaturation the heterodimer refolds quantitatively like the homodimers (Figure 2d)²⁰. These experiments indicate that the NR3-NR4-heterodimer has a similar structural integrity as the respective homodimers.

As shown previously, eADF3 and eADF4 proteins have different assembly properties when exposed phosphate ions^{20, 21}. Here, we tested the assembly propensity of the three dimeric species in the presence of increasing phosphate ion concentrations.

(AQ)₁₂NR3 as well as the heterodimer aggregated at phosphate concentrations above 50 mM, whereas C₁₆NR4 started to aggregate above 150 mM phosphate (Figure 3a). With increasing phosphate concentration the aggregation kinetics of C₁₆NR4 were accelerated (Figure 3b). Interestingly, the kinetics of the heterodimer were only slightly slower than that of C₁₆NR4. Next, binding of the β-sheet sensitive dye ThioflavinT to the different assemblies were tested (Figure 3c). (AQ)₁₂NR3 showed significantly (5-10 times) less ThT binding than the other two dimeric species.

To characterize the self-assemblies of the heterodimer in comparison to that of the homodimers they were investigated by atomic force microscopy (AFM). AFM images of the C₁₆NR4 samples showed fibrils that are mainly unbranched with an average height of 3-3.5 nm similar to previously reported C₁₆_ΔCTD fibrils²² (Figure 3d). In case of (AQ)₁₂NR3 only amorphous morphologies rather than distinct fibrils could be detected (Figure 3e), with a spherical micelle-like assembly form as recently reported (Suppl. Figure 1)¹⁶. Interestingly the heterodimer also formed nano fibrils which are clearly distinctive in form and shape from the C₁₆NR4 fibrils (Figure 3C and F), with a network of short, sometimes branched fibrils with an average height of 1 nm. The

distances between the branching points is sometimes only a few nanometers in length.

In summary, we present evidence that the two MaSp2-like silk proteins ADF3 and 4 from *A. diadematus* can form covalently linked heterodimers through their native non-repetitive carboxyterminal domains (CTD), with different assembly properties than the individual homodimers (Figure 3d-h), since the heterodimer is able to form fibrillar networks (Figure 3f/i). The findings have impact on understanding the natural silk fiber formation. Both proteins are secreted in the same compartment of the spinning gland^{23, 24}. Recent findings from genomic analysis suggest that both MA proteins are produced within the same rather than in separated cells which leads to the assumption that both proteins can already interact shortly after translation within the cells (e.g. in the secretory pathway compartments)^{25, 26}

Further, our results highlight the possibility to conveniently combine different recombinant silk proteins via the highly similar CTDs to obtain new silk materials with adjustable properties.

Acknowledgments

We thank Dr. Martin Humenik and Dr. Andrew Smith for their valuable input regarding the fiber assembly experiments. We also thank Kristin Schacht for helping to obtain the TEM images. This work was funded by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vollrath, F., Strength and structure of spiders' silks. *J Biotechnol* **2000**, 74, (2), 67-83.
2. Hagn, F.; Eisoldt, L.; Hardy, J. G.; Vendrely, C.; Coles, M.; Scheibel, T.; Kessler, H., A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* **2010**, 465, (7295), 239-42.
3. Hedhammar, M.; Rising, A.; Grip, S.; Martinez, A. S.; Nordling, K.; Casals, C.; Stark, M.; Johansson, J., Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthenoops australis*: Implications for fiber formation. *Biochemistry* **2008**, 47, (11), 3407-3417.
4. Hinman, M. B.; Lewis, R. V., Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two-protein fiber. *J Biol Chem* **1992**, 267, (27), 19320-4.
5. Guerette, P. A.; Ginzinger, D. G.; Weber, B. H. F.; Gosline, J. M., Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* **1996**, 272, (5258), 112-115.
6. Xu, M.; Lewis, R. V., Structure of a Protein Superfiber - Spider Dragline Silk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87, (18), 7120-7124.
7. Rising, A.; Johansson, J.; Larson, G.; Bongcam-Rudloff, E.; Engstroem, W.; Hjalmt, G., Major ampullate spidroins from *Euprosthenoops australis*: multiplicity at protein, mRNA and gene levels. *Insect Mol Biol* **2007**, 16, (5), 551-561.
8. Hijirida, D. H.; Do, K. G.; Michal, C.; Wong, S.; Zax, D.; Jelinski, L. W., ¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophys. J.* **1996**, 71, (6), 3442-7.
9. Simmons, A.; Ray, E.; Jelinski, L. W., Solid-State ¹³C NMR of *Nephila clavipes* Dragline Silk Establishes Structure and Identity of Crystalline Regions. *Macromolecules* **1994**, 27, (18), 5235-5237.
10. Parkhe, A. D.; Seeley, S. K.; Gardner, K.; Thompson, L.; Lewis, R. V., Structural studies of spider silk proteins in the fiber. *J Mol Recognit* **1997**, 10, (1), 1-6.
11. van Beek, J. D.; Hess, S.; Vollrath, F.; Meier, B. H., The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, (16), 10266-71.
12. Lefevre, T.; Leclerc, J.; Rioux-Dube, J. F.; Buffeteau, T.; Paquin, M. C.; Rousseau, M. E.; Cloutier, I.; Auger, M.; Gagne, S. M.; Boudreault, S.; Cloutier, C.; Pezolet, M., Conformation of spider silk proteins in situ in the intact major ampullate gland and in solution. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (8), 2342-2344.
13. Simmons, A. H.; Michal, C. A.; Jelinski, L. W., Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science* **1996**, 271, (5245), 84-7.
14. Sponner, A.; Unger, E.; Grosse, F.; Klaus, W., Differential polymerization of the two main protein components of dragline silk during fibre spinning. *Nat. Mater.* **2005**, 4, (10), 772-775.
15. Li, S. F.; McGhie, A. J.; Tang, S. L., New internal structure of spider dragline silk revealed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **1994**, 66, (4), 1209-1212.
16. Eisoldt, L.; Hardy, J. G.; Heim, M.; Scheibel, T. R., The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J. Struct. Biol.* **2010**, 170, (2), 413 - 419.
17. Stark, M.; Grip, S.; Rising, A.; Hedhammar, M.; Engstrom, W.; Hjalmt, G.; Johansson, J., Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (5), 1695-1701.
18. Sponner, A.; Vater, W.; Rommerskirch, W.; Vollrath, F.; Unger, E.; Grosse, F.; Weisshart, K., The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 338, (2), 897-902.
19. Exler, J. H.; Hummerich, D.; Scheibel, T., The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2007**, 46, (19), 3559-3562.

20. Huemmerich, D.; Helsen, C. W.; Quedzuweit, S.; Oschmann, J.; Rudolph, R.; Scheibel, T., Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* **2004**, 43, (42), 13604-13612.
21. Rammensee, S.; Slotta, U.; Scheibel, T.; Bausch, A. R., Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, (18), 6590-6595.
22. Slotta, U. K.; Rammensee, S.; Gorb, S.; Scheibel, T., An engineered spider silk protein forms microspheres. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2008**, 47, (24), 4592-4594.
23. Vollrath, F.; Knight, D. P., Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **2001**, 410, (6828), 541-8.
24. Vollrath, F.; Knight, D. P., Structure and function of the silk production pathway in the spider *Nephila edulis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 24, (2-3), 243-9.
25. Ayoub, N. A.; Garb, J. E.; Tinghitella, R. M.; Collin, M. A.; Hayashi, C. Y., Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes. *Plos One* **2007**, 2, (6), -.
26. Gaines, W. A. t.; Marcotte, W. R., Jr., Identification and characterization of multiple Spidroin 1 genes encoding major ampullate silk proteins in *Nephila clavipes*. *Insect Mol Biol* **2008**, 17, (5), 465-74.
27. Heukeshoven, J.; Dernick, R., Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *ELECTROPHORESIS* **1988**, 9, (1), 28-32.
28. Korz, D. J.; Rinas, U.; Hellmuth, K.; Sanders, E. A.; Deckwer, W. D., Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **1995**, 39, (1), 59-65.
29. Eisoldt, L.; Thamm, C.; Scheibel, T., The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers* **2012**, 97, (6), 355-361.

Figures and Legends

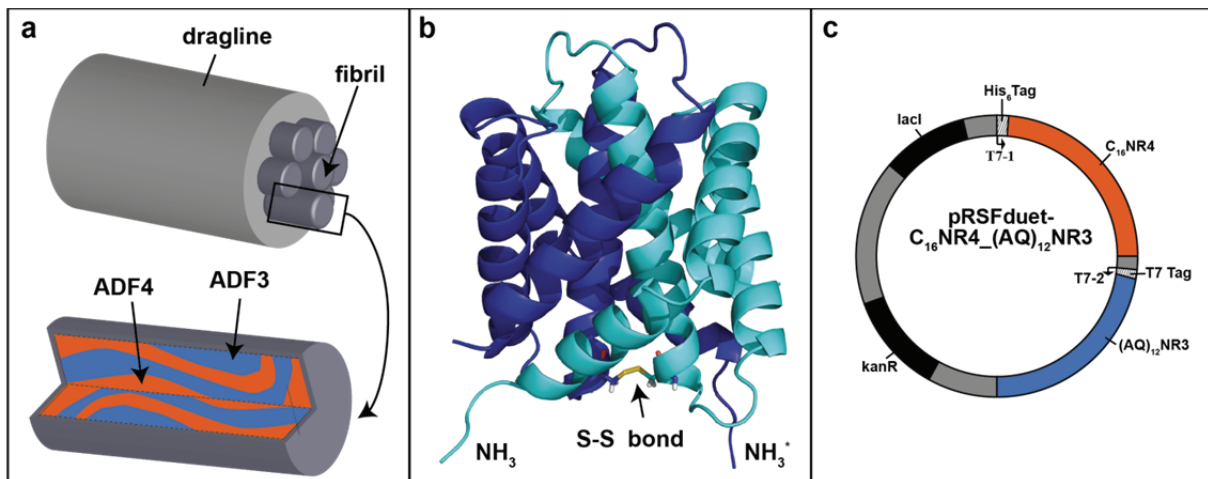


Figure 1: Co-Production of recombinant variants of ADF3 and ADF4.

(A) Simplified scheme of the dragline silk from *A. diadematus*. The two MaSp2-like proteins ADF3 and ADF4 are colocalized within the fiber. (B) Structure of the parallel dimer of the nonrepetitive carboxyterminal domain NR3. Each monomer, one depicted in blue and one in cyan, comprises a five helix bundle each with one conserved cysteine in helix 4 able to form a disulfide bond covalently linking the two monomers. The aminoterminal regions (NH₃ and NH₃^{*}) are highlighted where the CTD is connected to the repetitive domain. (C) Illustration of the plasmid used for the coexpression of the genes encoding eADF3((AQ)₁₂NR₃) and eADF4(C₁₆NR₄). Each silk gene is under the control of its own T7 promoter (T7-1 and T7-2). C₁₆NR₄ is produced with an aminoterminal hexahistidine tag, whereas (AQ)₁₂NR₃ has T7-tag.

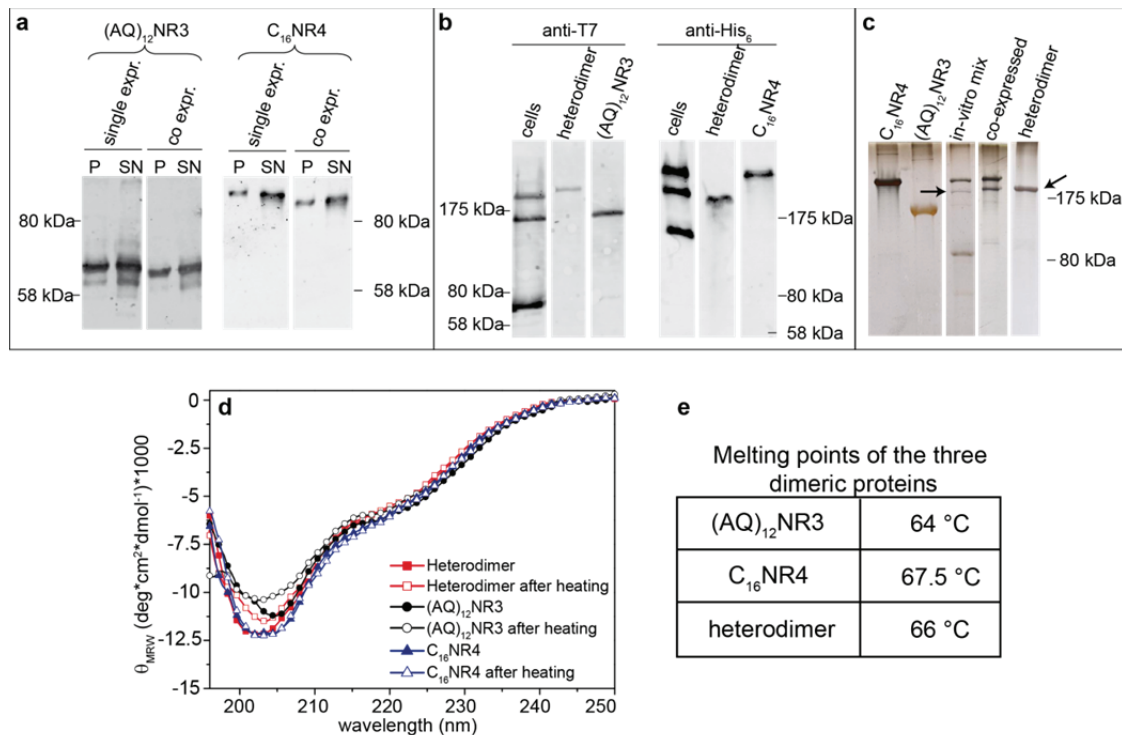


Figure 2: Analysis of heterodimer formation. (a) Comparison of the soluble and insoluble fraction after production and cell disruption of individually produced (AQ)₁₂NR3 and C₁₆NR4 and the respective co-expressed (dual produced) samples. P = pellet (insoluble) fraction, SN = supernatant (soluble) fraction. (b) Western blot analysis of (AQ)₁₂NR3 and C₁₆NR4 heterodimer formation. Lysate: *E. coli* lysate containing both eADF variants. heterodimer: purified (AQ)₁₂NR3-C₁₆NR4 heterodimer. (AQ)₁₂NR3 and C₁₆NR4 : purified homodimers, respectively. M: monomeric (AQ)₁₂NR3. (c) SDS-PAGE analysis (silver stained) of (AQ)₁₂NR3/C₁₆NR4 heterodimers formed *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* formation was achieved by refolding a mixture of both proteins under reducing conditions. The black arrows depict the heterodimer. The last lane shows the purified heterodimer used for all assays in this study. (d) Far UV spectra of homodimers of eADF3((AQ)₁₂NR3) (black) and eADF4(C₁₆NR4) (blue) as well as the heterodimer before and after heating to 90°C (red). (e) Thermal melting points. Protein concentrations in all experiments were 3.4 μM.

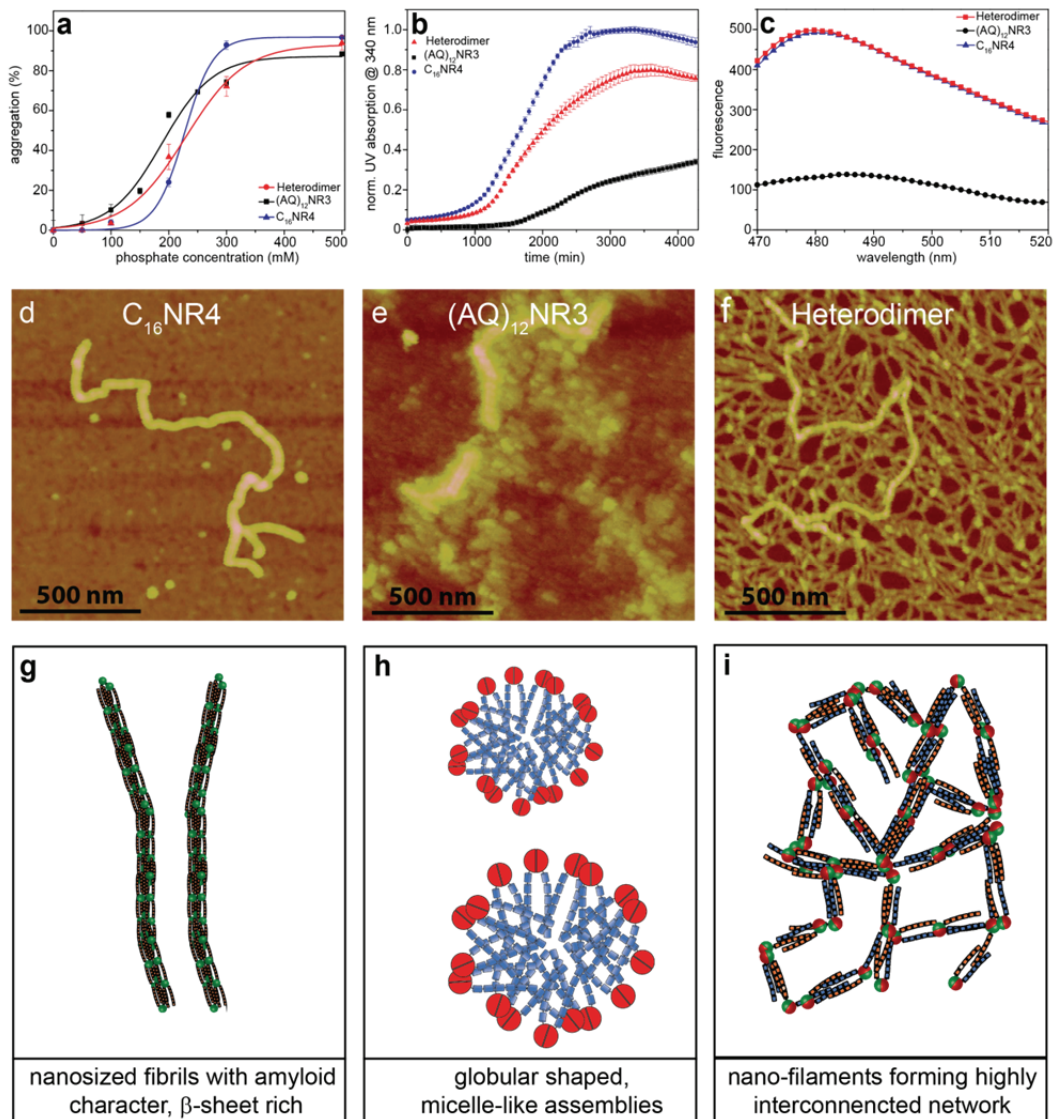


Figure 3: Assembly properties of the three dimeric species. (a) Silk protein assembly in dependence of phosphate concentration after 1 hour of incubation at RT. Data points were fitted with a boltzman function for better visualization. (b) Assembly kinetics of the three dimer species in presence of 100 mM sodium phosphate (pH 8.0) at 20 °C. Selfassembly was determined by measuring turbidity at 340 nm. (c) Binding of ThioflavinT in presence of 100 mM potassium phosphate after 24 h of incubation clearly indicated the presence of β -sheet rich structures in samples made of the heterodimer or $C_{16}NR4$. Morphologies of the assemblies were investigated by AFM. Prior to analysis the three dimeric species were incubated for 24h in Tris-buffer

pH 8.0 with 50 mM of potassium phosphate at room temperature. (d) C₁₆NR4, (e) (AQ)₁₂NR3, (f) heterodimer. AFM pictures were made in tapping mode. (g) Model of the different in presence of phosphate ions. eADF3 preferentially forms large, globular shaped assemblies. eADF4 in contrast forms nanosized unbranched fibrils that are β -sheet rich. The heterodimer forms a highly interconnected network of nanofilaments that also have a high β -sheets content.

Materials & Methods

Cloning. Engineered silk genes based on *Aranaeus diadematus* fibroin (ADF) 3 and 4 as described previously²⁰ were cloned into a pRSFduet-1mut plasmid (a modified pRSFduet-1 plasmid (Novagen – Merk, Germany) with one additional base pair prior to the *NdeI* restriction site in MCS2) containing two multiple cloning sites (MCS) each with a preceding T7-promoter. Sequences encoding for eADF4(C₁₆NR4) were cut out from pCS_C₁₆NR4²⁰ using *BamHI/HindIII*. The gene encoding for eADF3((AQ)₁₂NR3 with an aminoterminal T7 tag was obtained by digesting pET29_(AQ)₁₂NR3 with *NdeI/XhoI*. Both genes were cloned stepwise into pRSFduet-1mut digested with the respective restriction enzymes. The final construct encodes for eADF3((AQ)₁₂NR3) bearing an aminoterminal T7 tag and eADF4(C₁₆NR4) with an aminoterminal hexa-histidine tag. To isolate the desired genes after restriction digest the samples were separated on a 0.8% agarose gel. The desired bands were sliced out and purified using a kit (Promega, Germany). T4-Ligase and restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (USA).

Expression analysis with SDS-PAGE and Western Blot. Freshly prepared HMS174 (DE3) *E. coli* cells were transformed with the plasmid containing the two recombinant silk genes and plated on agar plates with kanamycin. 4 ml precultures from single colonies were grown overnight at 30-37°C overnight. Shaking flasks with 100 ml LB media were inoculated 1:500 (v/v) with the precultures and grown at 30-37°C. The cultures were allowed to grow until they reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6 – 0.8 until protein production was started with the addition of 0.1 mM IPTG. During expression the cells were incubated at 30-37°C. After 4 h of expression the cells were harvested by centrifugation at 6000xg and 6°C in a Sorvall RC6 Plus centrifuge (Thermo Scientific, USA). For cell disruption 1 g of cell pellet

was resuspended in 5 ml of buffer (40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0), incubated with lysozyme (0.2 mg/ml cell suspension) for 30 min on ice and finally treated with ultrasonic (6x30 sec with 2 sec pulses interrupted by 0.5 sec pauses at power input of 40 Watt) using a ultrasonicator with KE76 and MSM73 probes (Bendelin electronic, Germany). The disrupted cells were separated through centrifugation at 27000g and 6°C. The pellet after centrifugation was mixed thoroughly and solved at 100 mg/ml in 8 M urea for at least 4 h under agitation. Samples before and after expression as well as from the supernatant and pellet after cell disruption were diluted into Lämmli-loading buffer with and without β -mercaptoethanol (Roth, Germany). SDS-PAGE with 12.5% acrylamide at 28 mA per gel was done to separate the samples. The gels were either used for silver staining²⁷ or western blotting. Prior to the transfer the methanol treated PVDF membrane (Amersham Hybond™-LFP, GE Healthcare, Germany), the gel and the Whatman paper (GE Healthcare, USA) pieces were incubated for 10 min in transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 1.3 mM SDS, 20 % (v/v) methanol). The proteins were transferred for 90 min with 0.8 mA/cm² membrane area. After blotting the membranes were blocked for at least 30 min with PBS containing either 5% (w/v) milk or BSA to prevent unspecific binding. After rinsing with PBS the membranes were incubated with the primary antibody (anti-His or anti-T7 from mouse, diluted 1:10000 in PBS) for 90 min. After three washing steps with PBS, each 10 min, the membrane was incubated with the secondary antibody (anti-mouse coupled with FITC) for another 60 min. Prior to detection the membranes were again washed three times with PBS and then allowed to dry for 10 min in complete darkness. Fluorescence was detected with an Ettan DIGE imager (GE Healthcare, Germany) using a Cy2-filter. Fluorescence quantification of single bands was done using ImageQuant software.

Fermentation. To obtain sufficient amount of protein high cell density fed-batch fermentations on the basis of a rich medium were done. The base media is composed of peptone: 16.15 g/L, yeast extract: 25 g/L, KH_2PO_4 : 2.15 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 5.4 g/L, $\text{CaCl}_2 \times 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0.11 g/L and $\text{MgSO}_4 \times 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1.2 g/L. The glycerine containing feed solution was made as described elsewhere.²⁸ Batch medium, feed solution without trace elements and MgSO_4 solution for both batch medium and feed solution were autoclaved separately. Trace elements were sterile filtered. Prior to inoculation trace elements were added to the feed solution and MgSO_4 and kanamycin (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added to the batch medium. 2.5 M phosphorous acid and 20 % (v/v) ammonia were used to correct for pH changes during the fermentation. Foam formation was countered with Breox FMT 30 antifoam. Single colonies from freshly transformed HMS174 (DE3) cells were used for a 4 ml LB preculture grown overnight at 37°C. A second preculture with LB media in a 50 ml shaking flask was incubated at 30°C for 12-14 h. The complete second preculture was used to inoculate an Infors bioreactor containing 1.3 L rich medium. Cultures were allowed to grow until OD_{600} values of 40-60 before expression was initiated with 0.1 mM IPTG. The temperature was kept at 30°C during the whole fermentation process. The airflow was adjusted to 4.5-5 L/min. At higher cell densities pure oxygen was added to maintain a pO_2 of 30%. After 4 h of induction the cells were harvested by centrifugation at 6000xg for 15 min at 6°C. The cell pellet was washed three times with buffer (40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0) before resuspending in the same buffer with 5ml buffer per gram cells (cell wet mass). The cells were immediately frozen and stored at -80°C.

Purification. The mixture of both eADF proteins was purified as previously described.²⁰ Briefly, the cells were thawed and disrupted using a high pressure homogenizer in the presence of 1 mM PMSF. After centrifugation (27000xg, 45 min,

6°C) the supernatant was heated to 70°C for 20 min. After cooling down and another centrifugation step (20000xg, 15 min, 6°C) 400-500 mM (NH₄)₂SO₄ was added to the supernatant and incubated for 1 h on ice. After centrifugation the supernatant was discarded, the protein pellet solved in 6 M GdmSCN and then dialyzed against 10 mM NH₄HCO₃. For long term storage the protein was freeze dried and stored at -20°C. The heterodimer consisting of eADF3((AQ)₁₂NR3) and eADF4(C₁₆NR4) was purified through a two-step column based purification. In the first step eADF3 was separated from the hexa-histidine tag bearing eADF4 homodimer and the heterodimer by IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography). The mixture was first solved in 6M GdmSCN to a concentration of 4 mg/ml and then loaded onto the column. Unbound eADF3 was washed off the column with buffer A (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0) and bound eADF4 and the heterodimer were eluted with 300 mM imidazole off the column. The elution fractions were checked for the target proteins with SDS-PAGE, pooled and then dialyzed against 20 mM Tris/HCl. The freshly dialyzed solution was then loaded onto an anion exchange column (QSepharose FF, GE Healthcare, Sweden). To isolate the heterodimer from the eADF4(C₁₆NR4) homodimer a linear gradient from 0 to 500 mM NaCl over 20 column volumes was used. The heterodimer elutes at 60-80 mM whereas the homodimer can only be washed off the column with at least 100 mM NaCl. All elution fractions are checked by SDS-PAGE with subsequent silver staining for the target protein and the most pure ones are pooled and dialyzed against 10 mM NH₄HCO₃ prior to freeze drying.

Circular dichroism spectroscopy. All far-UV CD spectra were obtained using a Jasco CD spectrometer (J-815, Jasco GmbH, Germany) with an attached peltier element (PTC423S/15, Jasco)). Proteins were solved in 6 M GdmSCN to a concentration of approx. 2 mg/mL and dialyzed several times against 10 mM sodium

phosphate pH 8.0. Prior to the measurement the protein solutions were centrifuged at 188000xg for 60 min at 18°C in an ultracentrifuge (Optima Max-XP, BeckmannCoulter GmbH, Germany). The proteins were diluted into degassed and filtered buffer (10 mM sodium phosphate, pH 8.0) to a concentration of 0.2 mg/ml. Spectra were recorded as triplicate in quartz cuvettes with 0.1 cm path length (Hellma Hellma GmbH & Co. KG, Germany) at 25 °C at a scan speed of 50 nm/min, a data pitch of 0.2 nm, an integration time of 1 s and a bandwidth of 1nm. Thermal transitions were done with a heating/cooling rate of 1 °C/min recording changes at 220 nm. All spectra were buffer corrected.

Phosphate ion induced self-assembly. Fibril formation of the various eADF proteins was induced under similar conditions as described previously.²² The purified proteins were solved in 6 M GdmSCN and dialyzed thoroughly against buffer with 10 mM Tris/HCl pH 8.0. After dialysis the samples were centrifuged for 45 min at 188000g in an ultracentrifuge (Optima Max-XP, BeckmannCoulter GmbH, Germany) to remove any residual aggregates. If necessary the samples were diluted to a concentration of 1 mg/ml with 10 mM Tris/HCl. The self-assembly process was started by the addition of a 1 M potassium phosphate solution (pH 8.0) to a final concentration of 50 mM (samples for AFM) or 100 mM (for turbidity measurements). All buffers and solutions were filtered using 0.22 µm filters.

Assembly kinetics using turbidity measurements.

Protein samples were directly taken from preparation for the phosphate induced self-assembly procedure as described above. The protein solutions were carefully transferred into Quarz UV-microcuvettes and tightly sealed to prevent any solvent evaporation over the course of the experiment. Turbidity was measured at 340 nm in triplicate for each protein using a UV/VIS spectromter (Cary50, Varian Inc., USA)

kept at 20°C. Data points were collected every 10 minutes with samples exposed to light only for collecting data.

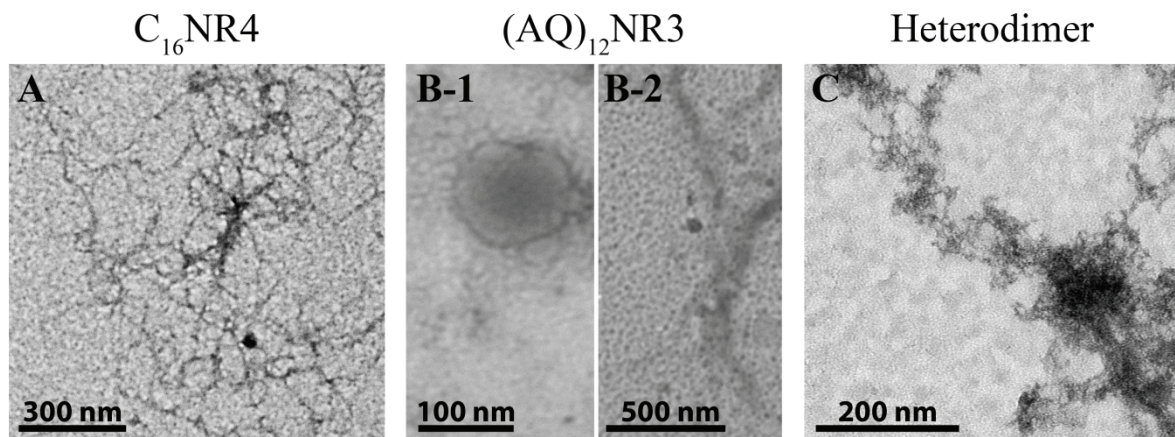
ThioflavinT binding. Proteins were prepared as described in the assembly kinetics section. ThioflavinT (50µM) was added to the solution right after the assembly was started by mixture with phosphate buffer. ThioflavinT fluorescence was monitored using a fluorescence spectrometer (FP-6500, Jasco GmbH, Germany) adjusted to 25°C.

Phosphate-induced aggregation. Experiments were carried out as previously described^{20, 29}. If not noted otherwise the dimeric proteins were first dissolved in 1-2 ml 6 M guanidine thiocyanate and then dialyzed over the course of 24 h against 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 (three times 5 L). Prior to the experiments the protein solutions were centrifuged for 1 h at 180000xg to remove any aggregated protein. The assay was started by the addition of NaH₂PO₄ (pH 8.0) from a 1 M stock solution. The final protein concentration in each sample was adjusted 1 mg/ml. After addition of phosphate the samples were incubated for 1 h at room temperature and then centrifuged at 17700xg for 10 min to pellet any aggregates. Immediately after centrifugation the amount of soluble protein remaining in the supernatant was determined by UV spectroscopy (NanoDrop ND1000, ThermoFischer, USA) which allows the calculation of the portion of aggregated protein.

Atomic force microscopy (AFM). Shortly before preparation the samples from the self-assembly experiments were diluted 1:1 into ultrapure water. In order to get a smooth and clean surface three layers of meica were removed using tape prior to the sample preparation. 10 µl of the samples were pipetted onto meica attached to 15 mm AFM sample disks (Ted Pella, Redding, CA, USA). The samples were allowed to settle for 5 min at room temperature and washed several times with ultrapure water.

Tapping-mode imaging was done with a Dimension 3100 Nanscope IV (Veeco Instrument Inc., N.Y., USA) using Si_3N_4 cantilevers (Olympus, Tokyo, Japan).

Supplemental Information



Supplemental Figure 1: Transmission electron microscopy images of the three dimeric species. (A) C₁₆NR4 forming fibrils with length of several hundred nanometers. (B) (AQ)₁₂NR3 was observed forming mainly spherical, micelle-like assemblies (B-1) and sporadic as fibrillar structures with a low electron density (B-2). (C) The heterodimer forms a network of thin and short (<10 nm), sometimes stick-like fibrils. Prior to analysis the three dimeric species were incubated for 18-24h in Tris-buffer pH 8.0 with 50 mM of potassium phosphate at room temperature. Droplets containing the samples were placed on pioloform-coated copper grids and the excess liquid was removed using paper towels (Kimberly-Clark Corp, USA). The grid was stained with uranyl acetate (1% in water) and the excess liquid was again removed with papertowels. The samples were viewed with a JEOL JEM-2100 transmission electron microscope (Jeol, Germany).

Teilarbeit IV

Eisoldt, L., Smith, A., Scheibel, T. (2011) Decoding the secrets of spider silk. *Materials Today*. 40, pp. 80-86



Decoding the secrets of spider silk

Spider silks have been employed by man for several thousands of years. Spider silks possess extraordinary mechanical properties due to a combination of strength and extensibility that are superior to most man-made fibers. Spider silk fibers are a protein-based material produced in a highly sophisticated hierarchical process under mild conditions. Here, we review the current understanding of spider silk and its assembly process, as well as discuss the application of silk-based materials to the fields of biomedicine and materials engineering.

Lukas Eisoldt, Andrew Smith, Thomas Scheibel*

Universität Bayreuth, Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften, Lehrstuhl für Biomaterialien, Universitätsstraße 30, 95447 Bayreuth, Germany

*E-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

Silk has been produced by a large variety of arthropods for hundreds of millions of years. Humans have used silk materials for several thousands of years for all kinds of applications, ranging from textiles to wound dressings to uses in the military. The main source of silk is the mulberry silkworm *Bombyx mori*, since it is easy to farm (farming started about 5000 years ago in China). The silk of spiders cannot be collected as easily, but the nets of orb weaving spiders (*Araneidae*) have also been historically employed for applications such as fishing or wound coverage, due to their outstanding mechanical and biomedical properties. Orb webs can be found all over the world, with web diameters ranging from a few centimeters to several meters. Very recently spiders in Madagascar have been discovered to spin single threads which span across rivers, with a length of about 25 m¹. Orb webs have been adapted over millions of years to withstand and compensate for the kinetic impacts of the large (in comparison to the fiber diameter) prey of the spider. When examined by the naked eye all threads in an orb web appear to be the same, but in fact a web

is built from up to five different silk types. A female orb weaving spider is even able to produce up to seven different silks, including one special silk for egg cases² (Fig. 1). Spider silks are tailored for specific purposes and exhibit a great variation in mechanical properties. Between the different silk types their strength (the stress needed to break the fiber) ranges from 0.02 to a remarkable 1.7 GPa, which exceeds steel (1.5 GPa), while the extensibility varies between 10 and 500 %^{3,4}. Interestingly, most spider silks have a sophisticated combination of strength and extensibility, which yields a very high toughness (the amount of energy absorbed per volume before breakage) that exceeds most natural or man-made fibers. Also common for all silks is their viscoelastic behavior, since upon stretching energy is dissipated in the form of heat, diminishing any elastic recoil⁵.

The most investigated spider silk is dragline silk, the lifeline a spider always drags behind, which shows the most remarkable combination of strength and extensibility. It is produced in the major ampullate gland (individual glands exist for each silk type) of a spider, and therefore its

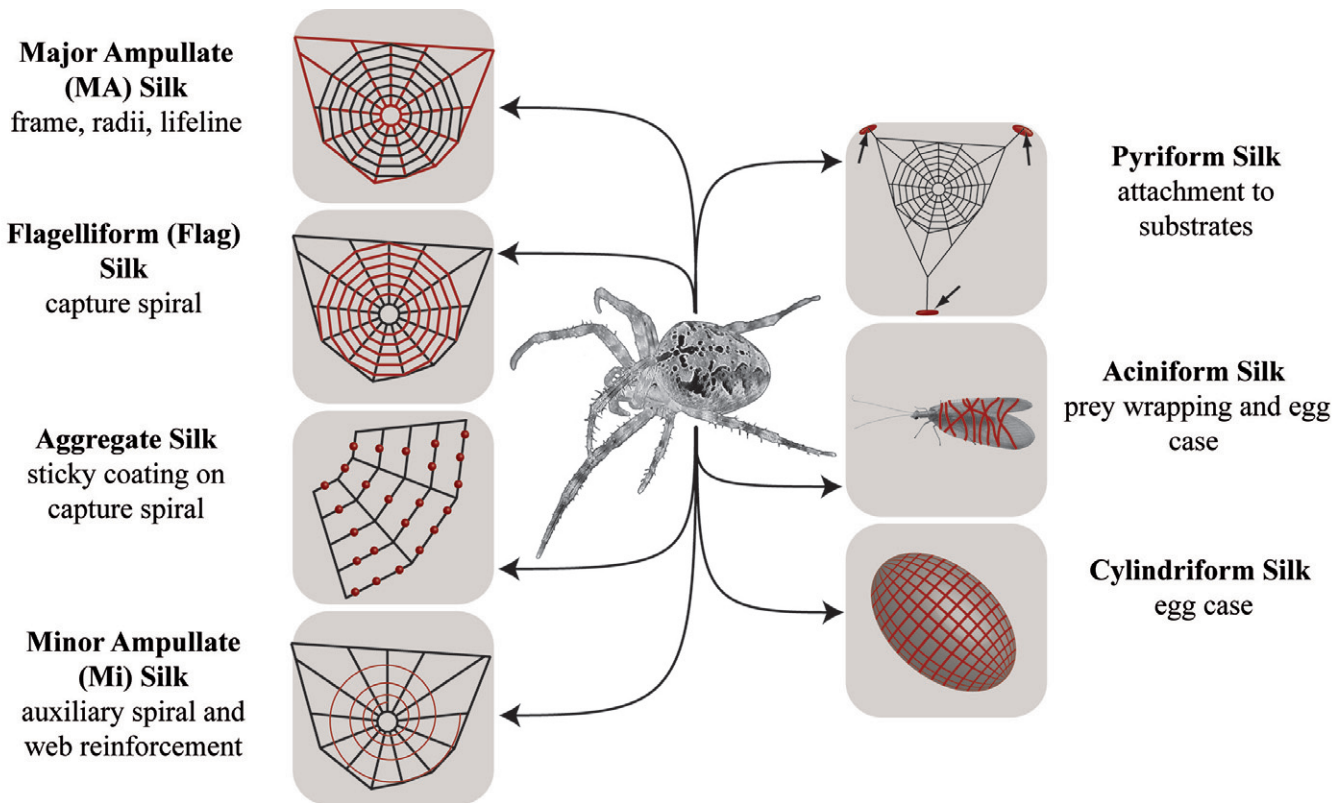


Fig. 1 Schematic overview of different silk types produced by female orb weaving spiders (*Araneae*). Each silk type (highlighted in red) is tailored for a specific purpose.

correct biological name is major ampullate silk (MAS). MAS is used for the frame and radii of an orb web, as well as the aforementioned lifeline by most spiders. The mechanical properties of dragline silk of several different species have been extensively analyzed^{4,6-8}. In comparison to man-made fibers, the maximum strength of up to 1.7 GPa (dragline of *Caerostris darwini*) is in the range of high-tech materials. Although, Kevlar or carbon fibers have a higher strength and stiffness, spider silk fibers have a much higher toughness due to their greater extensibility⁹. However, dragline silk offers even more interesting features. For example, a hanging spider hardly ever twists, indicating an interesting torsional dampening behavior of the dragline thread. When a dragline thread is twisted it does not oscillate around the new position, like a Kevlar fiber would. After a while, the fiber slowly returns to its initial position, indicating that there is a sort of a shape memory within the fiber¹⁰. Another interesting feature of spider silk is its ability to undergo supercontraction. When dragline silk is wetted, or when the relative humidity is above 60 %, a silk thread swells in diameter and shrinks in length by about 50 %^{11,12}. Other spider silk types show this behavior as well, but in these cases this behavior is much less pronounced¹³.

Besides dragline silk the other silk types also show interesting properties like an extraordinary extensibility of up to 500 % (flagelliform silk) or a glue-like behavior (aggregate silk), but in this review we will continue to focus on dragline silks.

Primary structure of spider silks – less (complexity) is more

All spider silk threads are mainly composed of one or more proteins, called spidroins, which tend to be large (up to 350 kDa per monomer)¹⁴. Despite their different properties, all spidroins share a common primary structure pattern comprising a large central core of repeated modular units, accounting for approximately 90 % of the amino acids of the protein, flanked by non-repetitive domains (Fig. 2a). These non-repetitive terminal domains have a folded globular structure and are comprised of approximately 100 – 140 amino acids. Their sequences are highly conserved throughout different spider species and silk types¹⁵⁻¹⁷. The terminal domains are essential for storage of spidroins in the silk glands and fiber formation in the spinning duct, since it is here that they trigger crucial steps in the complex assembly of the spidroins upon environmental changes, like pH or ionic composition and strength^{18,19}.

The sequence of the repetitive core is tailored for the individual mechanical functions of the different silk types. In general, it consists of modular units each with about 40 – 200 amino acids^{7,14,20,21}, and the modular units are repeated up to approximately 100 times within the core domain¹⁴. In major ampullate, minor ampullate and flagelliform silk, the modular units are mainly comprised of a subset of the sequence motifs $(Ala)_{4-14}$, $(GlyAla)_n$, GlyGlyX and GlyProGlyXX,

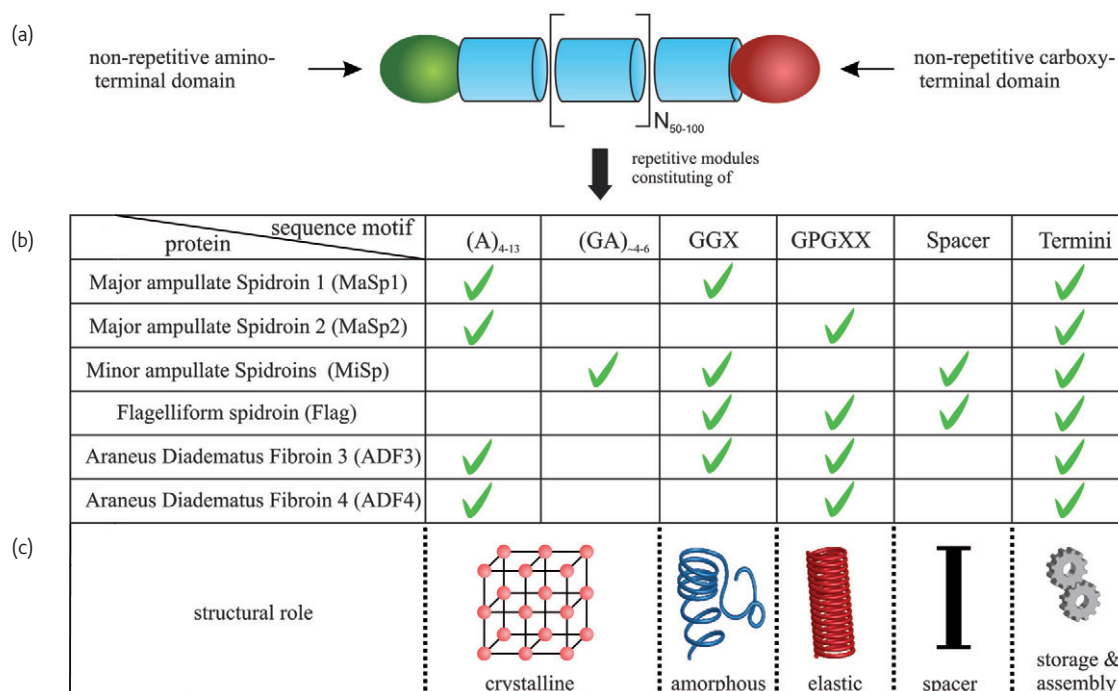


Fig. 2 The hierarchical setup of spider silk proteins. (a) Illustration of a spidroin comprised of up to 100 repetitive modules (blue) and two terminal domains (red and green). The components are not drawn to scale. (b) The repetitive modules of the most prominent silk types comprise a distinct subset of amino acid motifs. (c) Each motif is thought to fulfill a distinct structural role and contributes to the mechanical properties of the final fiber.

with X representing a variable amino acid (Fig. 2b). The subset, the sequential order and the number of these motifs in each module are important for the mechanical properties of the final fiber. In contrast to terminal domains, the core region is intrinsically unfolded, as long as the spidroins are stored in the gland²²⁻²⁵.

From sequence to structure

The dragline fiber is not only the best characterized spider silk in terms of mechanical properties, but also concerning its structure-function relationship. Unlike other spider silks, dragline fibers can be collected from orb webs or by “milking” (forced silking) of spiders. Electron, atomic force and light microscopy have revealed a core-shell structure for the dragline fiber^{26,27}. The shell is quite thin and contains different biomolecules like lipids, glycoproteins and other silk proteins²⁸. The core consists mainly of two proteins produced in the major ampullate gland named MaSp (Major ampullate Spidroin) 1 and 2.

A single modular unit of MaSp1 usually comprises a polyalanine block and several GGX motifs. In modules of MaSp2 the GGX motif is replaced by the motif GPGXX, increasing the proline content of MaSp2 dramatically. Several dozens of repeats of these modular units build the complete core region of these spidroins. The potential structures of the individual motifs and their contribution to the properties of the final fiber have been intensively investigated over the last two decades (Fig. 2b). Using different NMR techniques and x-ray diffraction it

has been shown that the polyalanine motif forms defined nano-sized crystals (2 × 5 × 7 nm) based on tightly packed anti-parallel β-sheets^{22,29-34}, in which it is very likely that polyalanine stretches from different silk molecules constituting very strong non-covalent cross-links. The structure of the GGX motif in dragline silk is less understood. Recent NMR studies provided evidence that these motifs might form β-sheets as well as less ordered helical structures^{33,35-37}. Meanwhile, the structure of the GPGXX motif from MaSp2 seems to be clear. Due to the proline residue, this pentapeptide likely forms β-turns which, when repeated, yield a spiral structure as suggested for elastin³⁸.

It should be noted that in the case of *Araneus diadematus* both MAS components, named ADF 3 and 4 (*Araneus diadematus* fibroin) due to historical biological reasons, have similar proline contents (~ 13 %)²¹. Compared to other MAS fibers *Araneus* silk shows no significant differences concerning its mechanical behavior indicating that the presence of low-proline-content spidroins is not necessary for the mechanical performance. It is worth noting that a macroscopic effect of the proline content is only seen when dragline silk is wetted. The amount of proline influences the degree of supercontraction and the mechanical properties of wetted silk³⁹⁻⁴¹. However, it seems to be more important to have a pair of hydrophobic/hydrophilic spidroins, since comparing the hydrophobicity of MA spidroins between different species revealed that MaSp1/ADF4 are more hydrophobic and MaSp2/ADF3 are more hydrophilic.

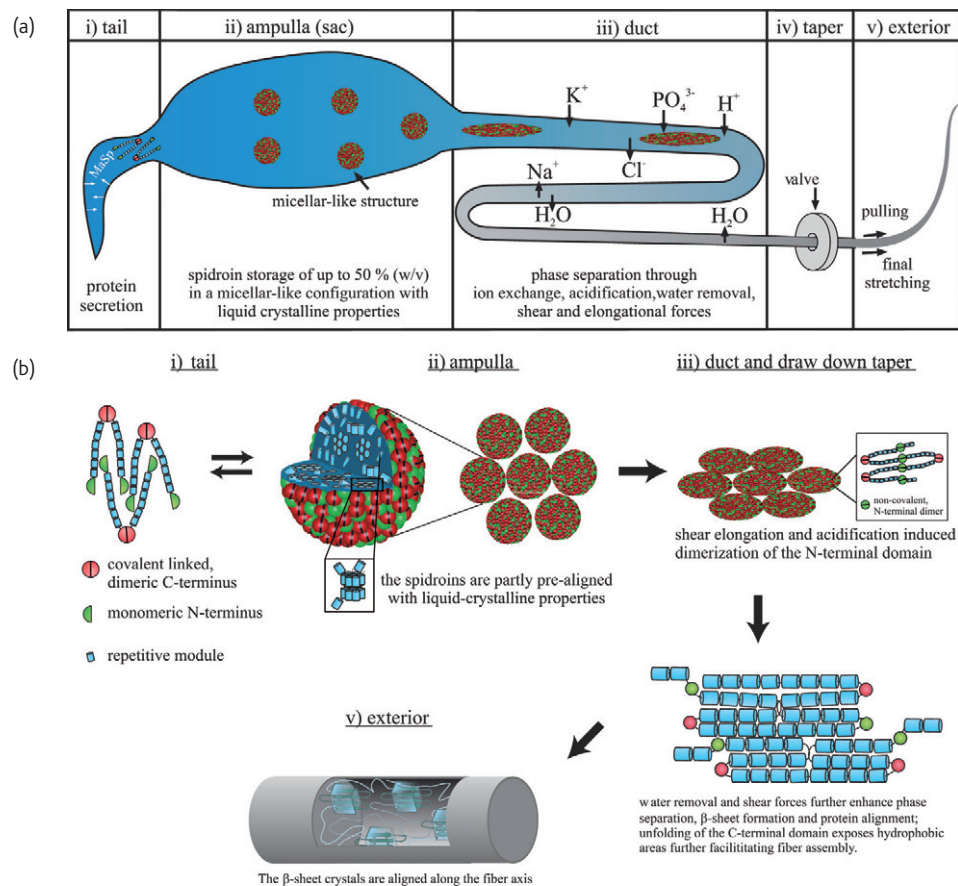


Fig. 3 The natural spinning process. (a) Illustration of a spider's spinning gland divided into four parts. (b) Schematic model of the silk fiber assembly mechanism occurring along the spinning apparatus.

The natural spinning process

The primary structure of silk proteins alone does not explain the outstanding properties of a dragline silk fiber. Fibers technically spun from reconstituted spidroins (i.e. spidroins obtained from chemically dissolved spider silk fibers) or from spidroins from the original spinning dope show completely different mechanical properties compared to fibers spun by spiders, indicating that the spinning process is also crucial^{42,43}.

The spiders spinning apparatus can be divided into four parts (Fig. 3a). In the first part, the tail, the spidroins are secreted from specialized cells. In the second part, the sac or ampulla, the spidroins are stored, and further compounds are added later forming the skin of the fiber. The protein concentration during storage in the ampulla can reach up to 50 % (w/v)^{22,44}. This is a remarkably high concentration, since most proteins tend to aggregate irreversibly under such conditions. To prevent unspecific aggregation, spidroins form micellar-like structures controlled by their amphiphilicity^{19,45–48} and by the non-repetitive termini which induce or support the formation of such supramolecular assemblies^{18,19,48} (Fig. 3b). The stored spidroins in the ampulla, constitute the so-called spinning dope which has characteristics of a nematic liquid crystalline phase^{47,49}. In the third

part of the spinning apparatus, an S-shaped duct, the liquid crystalline fluid is exposed to a constant elongational flow. The liquid crystallinity allows the molecules to flow in a pre-aligned manner and to further align along the flow axis during the passage through the duct. Due to its tapering, the shear forces increase along the duct leading to the formation of β -sheet crystals^{19,40–50}. In the last part of the spinning apparatus the shear stress further increases, due to pulling of the fiber out of the spigot (Fig. 3b). The pulling forces lead to some structural changes in the spidroins (especially their terminal regions) accompanied by exposure of hydrophobic areas followed by a phase separation between the solvent (i.e. water which is actively removed by epithelial cells^{51–53}) and the spidroins^{54,55} (Fig. 3b). The structural changes in the terminal domains re-arrange the position of the core regions within the micellar-like structures, and this together with mechanical forces supports phase separation and spidroin assembly.

As well as mechanical influences, chemical changes trigger a structural arrangement, especially in the S-shaped duct. There the exchange of sodium and chloride ions for the relatively kosmotropic potassium and phosphate ions is responsible for the exposure of hydrophobic areas within the C-terminal non-repetitive domain^{19,56}. Upon lowering the

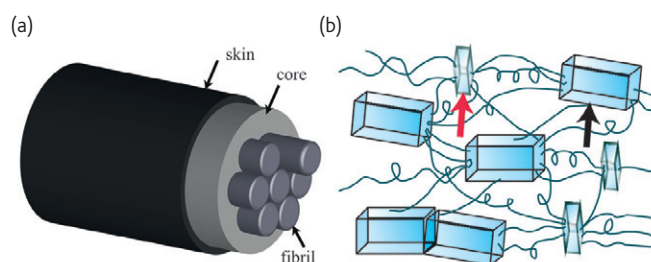


Fig. 4 Illustration of the hierarchical spider silk structure. (a) The fiber shows a skin-core structure with fibrils forming the core. (b) On the nanostructural level the fibrils comprise small tightly packed β -sheet crystals (red arrow) and larger crystalline regions (black arrow) interconnected by an amorphous matrix.

pH value from roughly 7 to 6, the amino-terminal non-repetitive domains dimerize, likely acting as additional physical cross-links between the spidroins^{48,57,58}.

Before the fiber exits the spigot it passes the so-called "valve", an organ that assists in restarting the spinning process after internal rupture⁵². It twists the duct back and forth, thereby moving the ruptured fiber end into the opened valve. Once the fiber has left the spider, the spider pulls and stretches the fiber leading to further water evaporation and additional alignment of the molecules inside the fiber.

All the mechanisms of this highly sophisticated spinning process enable the spider to efficiently produce a very tough fiber under mild conditions; a process yet unrivaled by any man-made fiber spinning process.

The structural organization of a dragline fiber

The structure of dragline silk fibers reveals three hierarchical levels⁵⁹. On the macroscopic level the fiber shows a core-shell structure (Fig. 4a). On the mesoscopic level, fibrils oriented along the fiber axis form the core of the fiber, resembling the structure of a rope. On the molecular level small crystallites ($2 \times 5 \times 7$ nm) comprising tightly packed alanine β -sheets and larger crystalline regions (> 100 nm) based on glycine-alanine sequences with high β -sheet content can be found. Both crystalline regions are interconnected by a so-called amorphous matrix which contains loosely arranged helical structures oriented along the fiber axis (Fig. 4b). In this two-phase-model the crystalline regions mediate the strength of the fiber, whereas the matrix is responsible for the elasticity of the fiber. However, results obtained from various x-ray and NMR methods indicate that parts of the amorphous regions are much more ordered and oriented, leading to a model with a third phase which interconnects the crystalline regions with the amorphous phase⁶⁰⁻⁶². For further detailed information we recommend consulting additional literature⁶³⁻⁶⁶.

Biotechnological production of spider silk proteins

In contrast to silkworms (*Bombyx mori*), most spiders cannot be farmed due to their cannibalistic behavior. Collecting silks from webs is also

very time-consuming and therefore not profitable, especially if a specific silk type (other than dragline silk) is desired. In order to achieve spider silk on a large scale, biotechnological production of spidroins is the only feasible solution. For recombinant protein production, the DNA sequence from a donor organism (here the spider) has to be recombined with that from an acceptor (a so-called host) which is used for the production. Most recombinant silk proteins are produced in the bacterium *Escherichia coli* which is a well-established host for the industrial scale production of proteins. It allows a fast and scalable production within 3 – 4 days from the initiation of production to the finally purified protein.

Attempts to produce recombinant MA silk proteins based on fragments of native silk genes from spiders in bacteria resulted in low yields, mainly due to the different codon usage of spiders and *E. coli*⁶⁷. However, in gene engineering approaches the codon usage of the genes can be adapted to the host organism. In the case of silk genes, the repetitive character allows a straight forward approach. As depicted above, most spider silk proteins show a simple primary structure composed of repeated modular units which contain 100 – 200 amino acids based on smaller sequence motifs (e.g. polyalanine). The arrangement and the exact sequence of the motifs differ from silk type to silk type and from species to species, but within an individual spidroin they are quite regular. Thus, by analyzing a spidroin's amino acid sequence, one can identify the modular units and design artificial gene encoding for silk proteins using host-specific codons. With this method it is possible to create recombinant silk proteins with a high sequence similarity (on a protein level) to the natural blueprints. Additionally, completely novel silk-proteins can be created by hybridizing motifs of different silk types. This approach has been used by several groups to produce various engineered silk proteins. Most of these engineered proteins are based on the sequences of MaSp1/2^{68,69} from various species or ADF3/4⁷⁰, but some also engineered recombinant flagelliform spidroins⁷¹⁻⁷⁴.

The majority of the recombinantly produced silk proteins are smaller (30 – 110 kDa) than natural spidroins (300 – 350 kDa). This is due to the biological limitation of *E. coli*, which lowers the protein yields dramatically with increasing protein size^{75,76}. However, this problem can be partly circumvented by modifying the production host⁷⁷. Strikingly, all artificial spidroins, except one protein based on the sequence of ADF3⁴⁶, show much lower solubilities in aqueous solution than the natural spidroins (see^{68,69} and references therein). A lot of these proteins tend to self-assemble or aggregate into small fibrillar structures with sizes ranging from a few micrometers to centimeters⁷⁸. Although these spontaneously formed fibrils show β -sheet structures, they are only remotely reminiscent of natural silk fibers, since in this self-assembly process some crucial structural alignment steps do not take place.

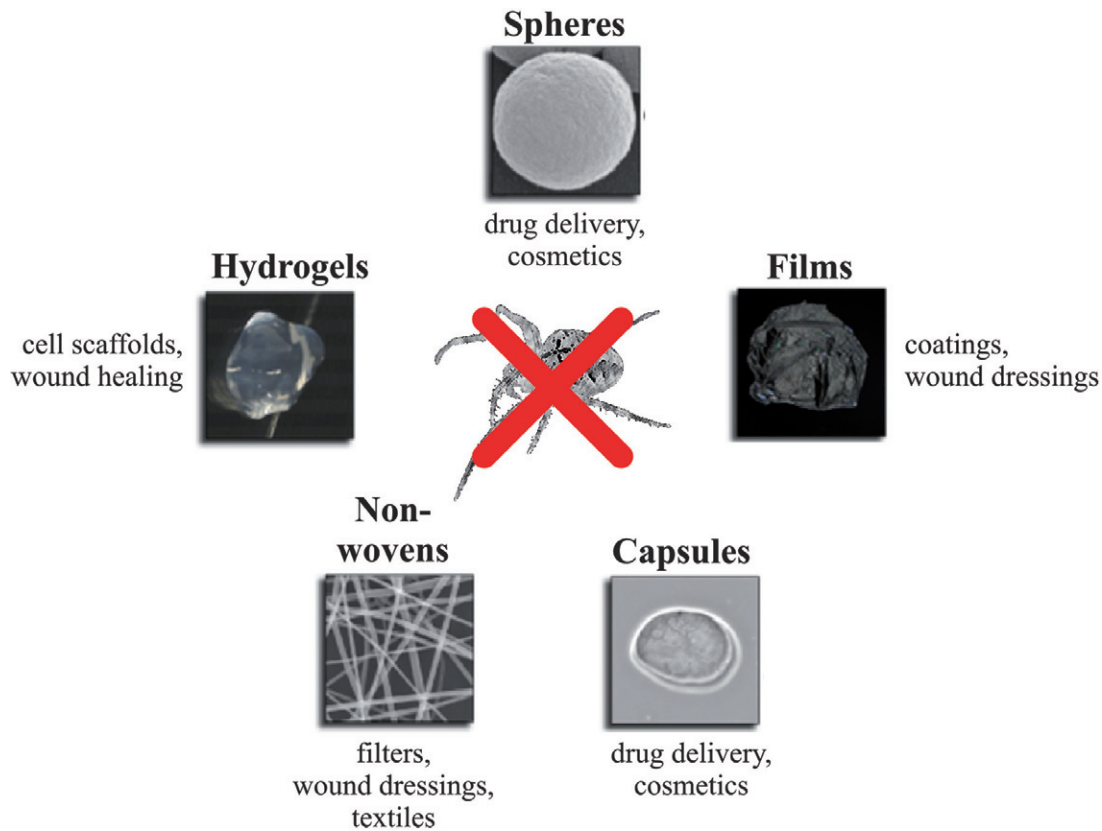


Fig. 5 Different non-natural assembly forms (bold text) of recombinant spider silk proteins and potential applications thereof.

Exploiting the application potential of recombinant spider silks

So far, no biomimetic spinning process exists that would allow the formation of native-like spider silk fibers from recombinant silk proteins. However, despite the nonexistent spinning process most recombinant spider silks can self-assemble into non-natural shapes such as spheres, capsules, films, non-wovens or hydrogels (Fig. 5), which have a high application potential⁷⁹⁻⁸³.


Depending on the processing conditions the assembly forms have different material properties linked to the molecular structure of the employed silk protein. Morphologies with high β -sheet contents (spheres, hydrogels) that are formed by fast salting-out or slow self-assembly processes are water-insoluble^{55,81,84,85}. In contrast, forced assembly (e.g. into films or non-wovens) out of fast evaporating organic solvents such as hexafluoroisopropanol yields α -helical rich compositions rendering the structures water soluble. Interestingly, such structures can be post-treated with substances that induce β -sheet formation leading to the gain of water-insolubility^{80,82,86}. Not only water solubility, but the mechanical properties of the silk materials are also linked to the β -sheet content. Since recombinant spider silk proteins are monodisperse (in comparison to synthetic polymers), high degrees of assembly control and, therefore, the final material's properties are possible.

Concerning applications, the aforementioned silk shapes can be used as carriers for drugs or as scaffolds in tissue engineering⁸⁰, since natural silks show a good biocompatibility (cytocompatibility, low immunogenicity, biodegradability, low toxicity) *in vivo* and *in vitro*^{69,87-92}. Recombinant spider silk proteins have a similar cytocompatibility to natural silks making them suitable for biomedical applications⁹³⁻⁹⁵.

Besides its biocompatibility recombinant spider silk structures share some other interesting features with natural spider silk fibers, like its smooth surface, making them suitable for technical applications as well. These features can be used in technical applications, e.g. non-wovens as air filtering devices or spheres, as additives for cosmetics to give the product a "silken" smooth feeling.

Future perspective

Spider silks are impressive biopolymers that have evolved over millions of years. Over the last several decades a lot of progress has been made in unraveling some of its secrets. Nevertheless, certain questions, especially concerning solubility, storage and assembly of the underlying spider silk proteins, which are crucial for the technical production of e.g. silk fibers, are still unanswered. The biotechnological production of recombinant spider silk in larger scales is a landmark in spider silk research, since now investigations are enabled to answer such questions. Furthermore, recombinant spider silk proteins can be

processed into many different morphologies and shapes which have great potential in various technical and biomedical applications. With recombinant production technologies it is possible to create tailor-made silk-based biopolymers for many different purposes on a large scale within a relatively short amount of time. 

Acknowledgements:

This work was supported by the Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit, project U8793-2008/11-2. We would to thank Dr. Martin Humenik for his creative input and technical support in creating the artwork.

REFERENCES

1. Agnarsson, I., et al., *PLoS ONE* (2010) **5**, e11234.
2. Andersen, S. O., *Comp Biochem Physiol* (1970) **35**, 705.
3. Denny, M., *J Exp Biol* (1976) **65**, 483.
4. Blackledge, T. A., and Hayashi, C. Y., *J Exp Biol* (2006) **209**, 2452.
5. Gosline, J. M., et al., *Endeavour* (1986) **10**, 37.
6. Vollrath, F., *J Biotechnol* (2000) **74**, 67.
7. Hayashi, C. Y., et al., *Mol Biol Evol* (2004) **21**, 1950.
8. Madsen, B., et al., *Int J Biol Macromol* (1999) **24**, 301.
9. Heim, M., et al., *Angew Chem-Int Edit* (2009) **48**, 3584.
10. Emile, O., et al., *Nature* (2006) **440**, 621.
11. Work, R. W., and Morosoff, N., *Text Res J* (1982) **52**, 349.
12. Jelinski, L. W., et al., *Int J Biol Macromol* (1999) **24**, 197.
13. Gosline, J. M., et al., Elastomeric Network Models for the Frame and Viscid Silks from the Orb Web of the Spider *Araneus diadematus*. In *Silk Polymers*, American Chemical Society, (1993), **544**, 328.
14. Ayoub, N. A., et al., *Plos One* (2007) **2**, e514.
15. Motriuk-Smith, D., et al., *Biomacromolecules* (2005) **6**, 3152.
16. Rising, A., et al., *Biomacromolecules* (2006) **7**, 3120.
17. Challis, R. J., et al., *Insect Mol Biol* (2006) **15**, 45.
18. Askarieh, G., et al., *Nature* (2010) **465**, 236.
19. Hagn, F., et al., *Nature* (2010) **465**, 239.
20. Hinman, M. B., and Lewis, R. V., *J Biol Chem* (1992) **267**, 19320.
21. Guerette, P. A., et al., *Science* (1996) **272**, 112.
22. Hijirida, D. H., et al., *Biophys J* (1996) **71**, 3442.
23. Hronska, M., et al., *Biomacromolecules* (2004) **5**, 834.
24. Lefevre, T., et al., *Biomacromolecules* (2008) **9**, 2399.
25. Lefevre, T., et al., *Biomacromolecules* (2007) **8**, 2342.
26. Li, S. F., et al., *Biophys. J.* (1994) **66**, 1209.
27. Sponner, A., et al., *PLoS ONE* (2007) **2**, e998.
28. Augsten, K., et al., *Scanning* (2000) **22**, 12.
29. Warwicker, J. O., *J Mol Biol* (1960) **2**, 350.
30. Grubb, D. T., and Jelinski, L. W., *Macromolecules* (1997) **30**, 2860.
31. Simmons, A., et al., *Macromolecules* (1994) **27**, 5235.
32. Parkhe, A. D., et al., *J Mol Recognit* (1997) **10**, 1.
33. van Beek, J. D., et al., *PNAS* (2002) **99**, 10266.
34. Creager, M. S., et al., *Biomacromolecules* (2010) **11**, 2039.
35. Jenkins, J. E., et al., *Biomacromolecules* (2010) **11**, 192.
36. Simmons, A. H., et al., *Science* (1996) **271**, 84.
37. Lefevre, T., et al., *Biophys J* (2007) **92**, 2885.
38. Hayashi, C. Y., et al., *Int J Biol Macromol* (1999) **24**, 271.
39. Savage, K. N., and Gosline, J. M., *J Exp Biol* (2008) **211**, 1937.
40. Eles, P. T., and Michal, C. A., *Biomacromolecules* (2004) **5**, 661.
41. Boutry, C., and Blackledge, T. A., *J Exp Biol* (2010) **213**, 3505.
42. Shao, Z., et al., *Macromolecules* (2003) **36**, 1157.
43. Seidel, A., et al., *Macromolecules* (2000) **33**, 775.
44. Vollrath, F., and Knight, D. P., *Nature* (2001) **410**, 541.
45. Jin, H. J., and Kaplan, D. L., *Nature* (2003) **424**, 1057.
46. Exler, J. H., et al., *Angew Chem-Int Edit* (2007) **46**, 3559.
47. Knight, D. P., and Vollrath, F., *Proc R Soc Lond Ser B-Biol Sci* (1999) **266**, 519.
48. Hagn, F., et al., *Angew Chem-Int Edit* (2010) **50**, 310.
49. Willcox, P. J., et al., *Macromolecules* (1996) **29**, 5106.
50. Eisoldt, L., et al., *J. Struct. Biol.* (2010),
51. Bonthron, K. M., et al., *Proc R Soc Lond Ser B-Biol Sci* (1992) **248**, 141.
52. Vollrath, F., and Knight, D. P., *Int J Biol Macromol* (1999) **24**, 243.
53. Vollrath, F., et al., *Proc R Soc Lond Ser B-Biol Sci* (1998) **265**, 817.
54. Knight, D. P., et al., *Int J Biol Macromol* (2000) **27**, 205.
55. Rammensee, S., et al., *PNAS* (2008) **105**, 6590.
56. Knight, D. P., and Vollrath, F., *Naturwissenschaften* (2001) **88**, 179.
57. Landreh, M., et al., *J Mol Biol* (2010) **404**, 328.
58. Gaines, W. A., et al., *J Biol Chem* (2010) **285**, 40745.
59. Heim, M., et al., *Chem Soc Rev* (2010) **39**, 156.
60. Thiel, B. L., et al., *Biopolymers* (1997) **41**, 703.
61. Trancik, J. E., et al., *Polymer* (2006) **47**, 5633.
62. Fossey, S. A., and Tripathy, S., *Int J Biol Macromol* (1999) **24**, 119.
63. Porter, D., and Vollrath, F., *Adv Mater* (2009) **21**, 487.
64. Vollrath, F., and Porter, D., *Soft Matter* (2006) **2**, 377.
65. Ene, R., et al., *Soft Matter* (2009) **5**, 4568.
66. Papadopoulos, P., et al., *Colloid Polym Sci* (2009) **287**, 231.
67. Arcidiacono, S., et al., *Appl Microbiol Biotechnol* (1998) **49**, 31.
68. Vendrely, C., and Scheibel, T., *Macromol Biosci* (2007) **7**, 401.
69. Rising, A., et al., *Cell Mol Life Sci* (2010) **68**, 169.
70. Hueimmerich, D., et al., *Biochemistry* (2004) **43**, 13604.
71. Teule, F., et al., *J Mater Sci* (2007) **42**, 8974.
72. Miao, Y. G., et al., *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) **71**, 192.
73. Zhou, Y. T., et al., *Biomacromolecules* (2001) **2**, 111.
74. Heim, M., et al., *J Struct Biol* (2010) **170**, 420.
75. Fahnestock, S. R., et al., *J Biotechnol* (2000) **74**, 105.
76. Fahnestock, S. R., and Irwin, S. L., *Appl Microbiol Biotechnol* (1997) **47**, 23.
77. Xia, X.-X., et al., *PNAS* (2010) **107**, 14059.
78. Hueimmerich, D., et al., *Curr Biol* (2004) **14**, 2070.
79. Hermanson, K. D., et al., *Advanced Materials* (2007) **19**, 1810.
80. Spiess, K., et al., *Macromol Biosci* (2010) **10**, 998.
81. Slotta, U. K., et al., *Angew Chem-Int Edit* (2008) **47**, 4592.
82. Spiess, K., et al., *Soft Matter* (2010) **6**, 4168.
83. Hardy, J. G., and Scheibel, T. R., *Prog Polym Sci* (2010) **35**, 1093.
84. Slotta, U., et al., *Supramol Chem* (2006) **18**, 465.
85. Lammel, A., et al., *ChemSusChem* (2008) **1**, 413.
86. Hueimmerich, D., et al., *Appl Phys A-Mater Sci Process* (2006) **82**, 219.
87. Vollrath, F., et al., *In Vivo* (2002) **16**, 229.
88. Allmeling, C., et al., *J Cell Mol Med* (2006) **10**, 770.
89. Allmeling, C., et al., *Cell Proliferat* (2008) **41**, 408.
90. Gellynck, K., et al., *J Mater Sci-Mater M* (2008) **19**, 2963.
91. Gellynck, K., et al., *J Mater Sci-Mater M* (2008) **19**, 3399.
92. Hakimi, O., et al., *J Biomed Mater Res A* (2010) **92A**, 1366.
93. Agapov, I., et al., *Dokl Biochem Biophys* (2009) **426**, 127.
94. Widhe, M., et al., *Biomaterials* (2010) **31**, 9575.
95. Fredriksson, C., et al., *Materials* (2009) **2**, 1908.

Teilarbeit V

Eisoldt, L., Thamm, C., Scheibel, T. (2012) The role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers*. 97, pp. 355-36

Review

The Role of Terminal Domains During Storage and Assembly of Spider Silk Proteins

Lukas Eisoldt, Christopher Thamm, Thomas Scheibel

Universität Bayreuth, Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften, Lehrstuhl Biomaterialien,
Universitätsstraße 30, Bayreuth 95447, Germany

Received 4 August 2011; accepted 21 October 2011

Published online 5 November 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22006

ABSTRACT:

Fibrous proteins in nature fulfill a wide variety of functions in different structures ranging from cellular scaffolds to very resilient structures like tendons and even extra-corporal fibers such as silks in spider webs or silkworm cocoons. Despite their different origins and sequence varieties many of these fibrous proteins share a common building principle: they consist of a large repetitive core domain flanked by relatively small non-repetitive terminal domains. Amongst protein fibers, spider dragline silk shows prominent mechanical properties that exceed those of man-made fibers like Kevlar. Spider silk fibers assemble in a spinning process allowing the transformation from an aqueous solution into a solid fiber within milliseconds. Here, we highlight the role of the non-repetitive terminal domains of spider dragline silk proteins during storage in the gland and initiation of the fiber assembly process. © 2011 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers* 97: 355–361, 2012.

Keywords: spider silk; biomaterials; silk assembly; non-repetitive termini; fibrous proteins

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of the preprint by emailing the Biopolymers editorial office at biopolymers@wiley.com

INTRODUCTION

Fibrous proteins are present within all kingdoms of life and widely divergent organisms, ranging from protozoa to humans. One of the most abundant proteins in mammals is the fibrous protein collagen. Although collagen fibers have some remarkable mechanical properties,¹ several extra-corporal protein fibers exceed even these. Prominent examples are the byssus of mussels which contains pre-collagens as major building blocks and the silk fibers used in the cocoon of the mulberry silkworm *Bombyx mori* or in spider silk found in orb webs. For details see recent reviews on human collagens,¹ mussel pre-collagens,^{2,3} silkworm silk,^{4,5} and spider silk.^{6–9}

Here, we highlight some similarities concerning assembly of the proteins into fibers. All four protein classes exhibit a highly repetitive core region with specific amino acid motifs repeated up to several hundred times. The repetitive core regions largely determine the macroscopic properties of the fibers, i.e., their mechanical behavior. However, the precise control of initiating assembly and of fiber elongation depends on non-repetitive terminal domains which can be post-translationally modified and proteolytically processed as is the case with mammalian collagens (Figure 1). In both silkworm and spider silk, as well as in the mussel pre-collagens, the terminal regions are likely maintained in the mature protein, possibly without proteolytical processing.^{3,10} The role of the termini during storage and assembly has been thoroughly characterized in case of mammalian collagen. Here, we highlight recent results concerning the role of

Correspondence to: Thomas Scheibel; e-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

Contract grant sponsor: US Army grant

Contract grant number: W911NF-08-1-0284

Contract grant sponsor: DFG project

Contract grant number: SCHE603/4-4

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

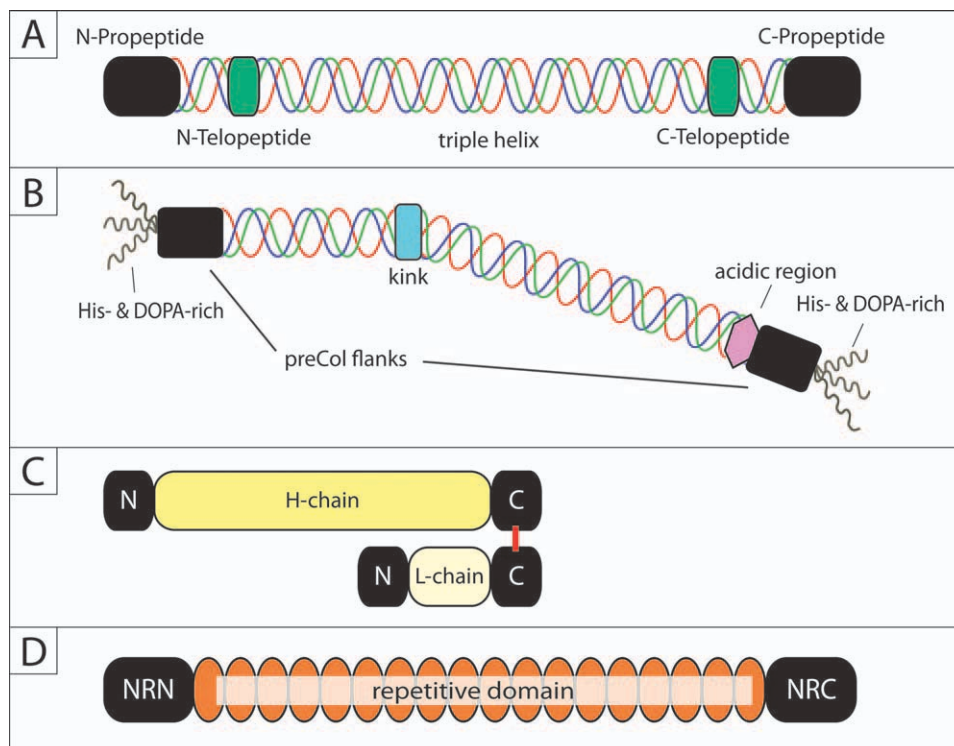


FIGURE 1 Schematic illustration of four fibrous proteins and their terminal domains. (A) Procollagen, comprising a triple helical core domain, amino- and carboxy-terminal propeptides as well as telopeptides. The carboxy-terminal propeptide is known to direct the formation of the triple helix, whereas the telopeptides mediate lateral assembly into collagen fibrils (B) Mussel pre-collagens consist of a triple helical domain, flanked by preCol-specific regions (silk-, elastin-, or cell-wall-like). The outermost regions are rich in histidine and DOPA (dihydroxyphenylalanine) residues. (C) Silkworm fibroin consisting of a covalently linked highly repetitive heavy and non-repetitive light chain. (D) Spider silk spidroins consist of a large repetitive core domain flanked by non-repetitive amino-(NRN) and carboxy-terminal (NRC) domains.

terminal domains in spider silk proteins in storage and assembly.

SPIDER SILK PROTEINS

Female spiders from the order *Araneae* are able to produce up to seven different silk types each tailored to a specific purpose (i.e., web frame, capture spiral, prey wrapping, glueing etc.) with different mechanical properties (for more details see Refs.^{11–14} and other chapters of this special issue). The underlying proteins, also called spidroins, are named after the glands in which they are produced, e.g., major ampullate spidroin (MaSp), flagelliform spidroin (FlagSp), or aciniform spidroin (AcSp). Despite the different mechanical properties of the fibers, which are based on different amino acid sequences and on slightly different processing conditions, they all share one common structural principle on a molecular level. All spider silk proteins comprise a large repetitive core sequence, accounting for approximately 90% of the

amino acid residues, flanked by non-repetitive amino-(NRN) and carboxy-terminal (NRC) domains (Figure 1D). The large core domain consists of ensemble repeats, each ensemble consisting of 40–200 amino acids (Figure 2A) which may be repeated up to 100 times in some cases.^{15–18} Some ensembles (in MaSp, MiSp, and FlagSp) comprise distinct amino acid motifs, like β -sheet-crystal forming polyalanine stretches, but the type and arrangement of those small motifs differ significantly between silk types. Therefore, the sequence similarity in the ensemble repeats can be quite low between different silk types.^{12,15}

In contrast to the core domains, the amino- and carboxy-terminal domains are highly conserved for each silk type throughout different species (Figure 2B) and in some cases even between different silk types (Figure 2C).^{19–22} The sequence similarity may decrease between distantly related species, but interestingly, the predicted size of the termini seems to be consistent. While mature NRN-domains (without signal sequences for secretion) are composed of

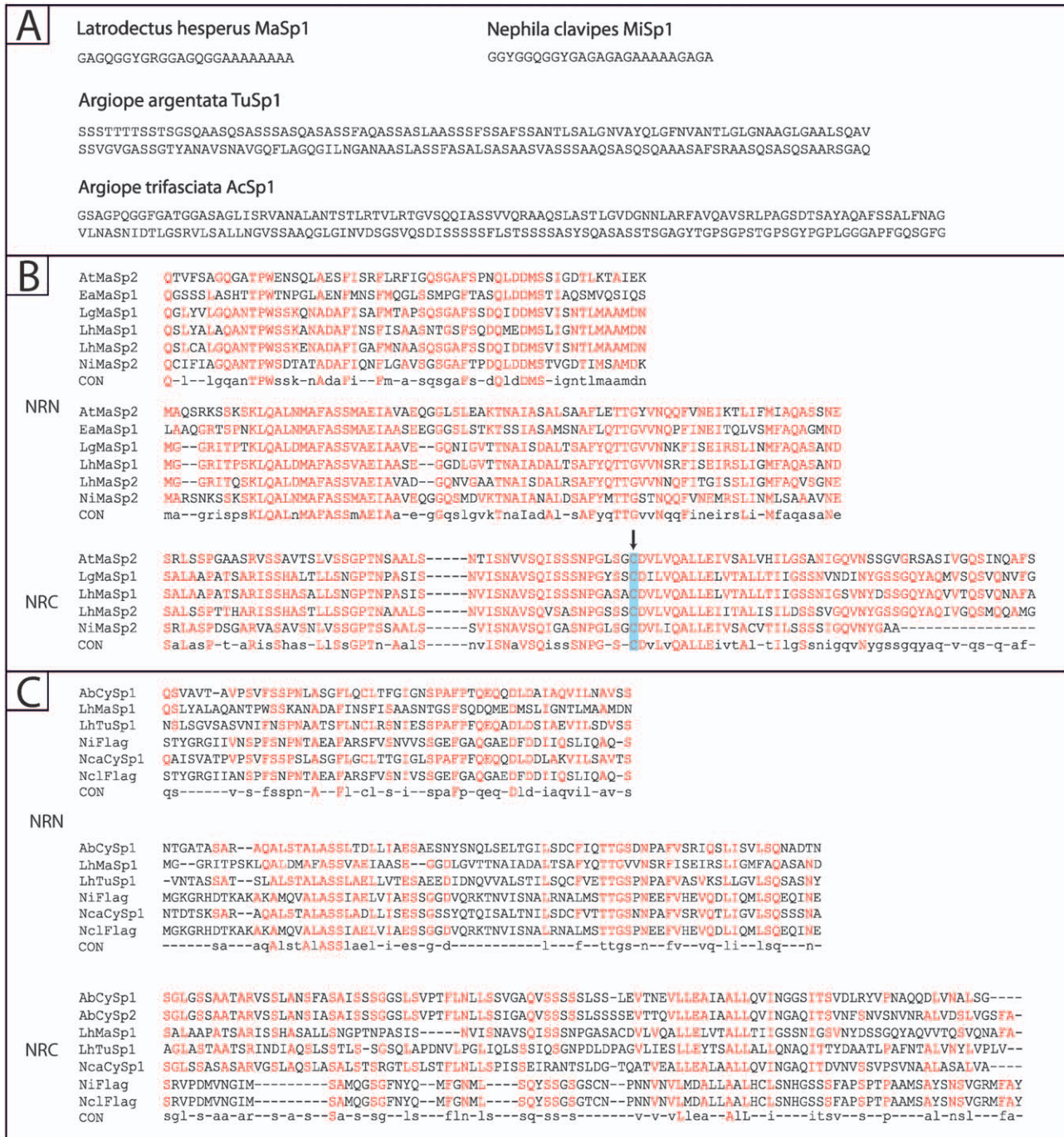


FIGURE 2 Sequence alignments of various spider silk sequences. AtMaSp2: *Argiope trifasciata* MaSp2 (NRN sequence: DQ059136, NRC sequence: AF350266), EaMaSp1: *Euprosthenoops australis* MaSp1 (AM259067), LgMaSp1: *Latrodectus geometricus* MaSp1 (NRN sequence: DQ059133S1, NRC sequence: DQ059133S2), LhMaSp1: *Latrodectus hesperus* MaSp1 (NRN sequence: EF595246), LhMaSp2: *L. hesperus* MaSp2 (EF595245), NiMaSp2: *Nepenthes inaurata madagascariensis* MaSp2 (NRN sequence: DQ059135, NRC sequence: AF350278), AbCySp1: *Argiope bruennichi* CySp1 (AB242144), AbCySp2: *A. bruennichi* CySp2 (AB242145), LhTuSp1: *L. hesperus* TuSp1 (NRN sequence: DQ379383, NRC sequence: AY953070), NiFlag: *N. i. madagascariensis* Flag (NRN sequence: AF218623S1, NRC sequence: AF218623S2), NcaCySp1: *Nephila clavata* CySp1 (NRN sequence: AB218974, NRC sequence: AB218973), NclFlag: *Nephila clavipes* Flag (NRN sequence: AF027972, NRC sequence: AF027973). (A) Consensus sequence of one repeating unit from different spiders. (B) Sequence comparison of MaSp NRN and NRC domains from different species. Red: high sequence conservation (>50%), black: low sequence conservation. Con: Consensus sequence, where conserved residues in all sequences are indicated by capitals and residues with conservation of 50% or more in lowercase letters. The highly conserved cysteine residues are marked with a black arrow. (C) Sequence comparison of NRN and NRC domains from different species and spider silk proteins. Red: very high sequence conservation (>90%), black: high sequence conservation (>50%).

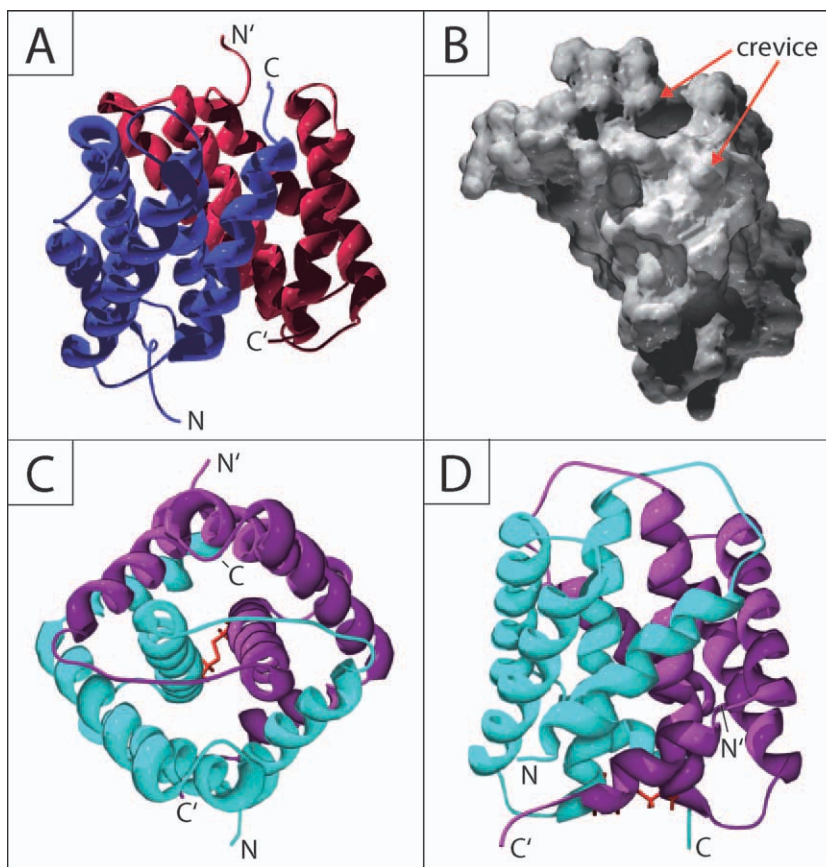


FIGURE 3 High resolution structures of both MaSp terminal domains. (A) NRN dimer from *Euprostenops australis* MaSp1. The dimer is formed by two identical monomers (red and blue) in slightly twisted, antiparallel arrangement. Side chains are not shown for clarity. (B) NRN monomer from *E. australis* MaSp1. Monomeric NRN1 with calculated solvent accessible surface. The crevice is indicated by red arrows into which the linker region (to the repetitive core domain) possibly binds. (C) and (D) NRC dimer from *Araneus diadematus* ADF3. Two identical monomers (blue and magenta) form a parallel dimer. The molecule is shown from a top-view (C) and side-view (D). The intermolecular thiol bond is depicted in red.

120–130 amino acids, NRC-domains are always smaller with on average 87–110 amino acid residues.²² In comparison, NRN-domains seem to have a higher homology and similarity than NRC-domains,²² indicating a more conserved function for the amino-terminal region.

THE TERMINAL DOMAINS OF DRAGLINE SILK PROTEINS

The existence of highly conserved terminal domains in different silk types and species is a first indication of a highly important function. For longer period, it was not clear whether the non-repetitive terminal domains are actually present in any the mature protein fiber, but both immunological experiments using specific antibodies and mass-spectrometry analysis revealed at least the presence of the carboxy-terminal domains in mature fibers of different silk types.^{10,22–24} Since the two dragline silk spidroins, MaSp 1 and 2, have slightly

different amino acid sequences, specific antibodies were created against the individual NRC-domains. Using these antibodies, it was possible to visualize the non-homogeneous distribution of the two MaSp proteins within the fiber.²⁵ However, several results based on various sequence comparisons together with structural data of different silk types strongly indicate that the non-repetitive amino-terminal domain is also present in the mature fiber.^{20,22,26}

A significant step toward understanding the role of the terminal domains in storage and assembly was the determination of atomistic structures of the non-repetitive terminal regions of MaSp proteins. Interestingly, both terminal domains are mainly composed of unique α -helix-bundles but with different folds, neither of which have structural homologues so far.^{26–28}

The MaSp NRN domains from *Euprostenops australis* and *Latrodectus hesperus* (black widow) consist of five α -heli-

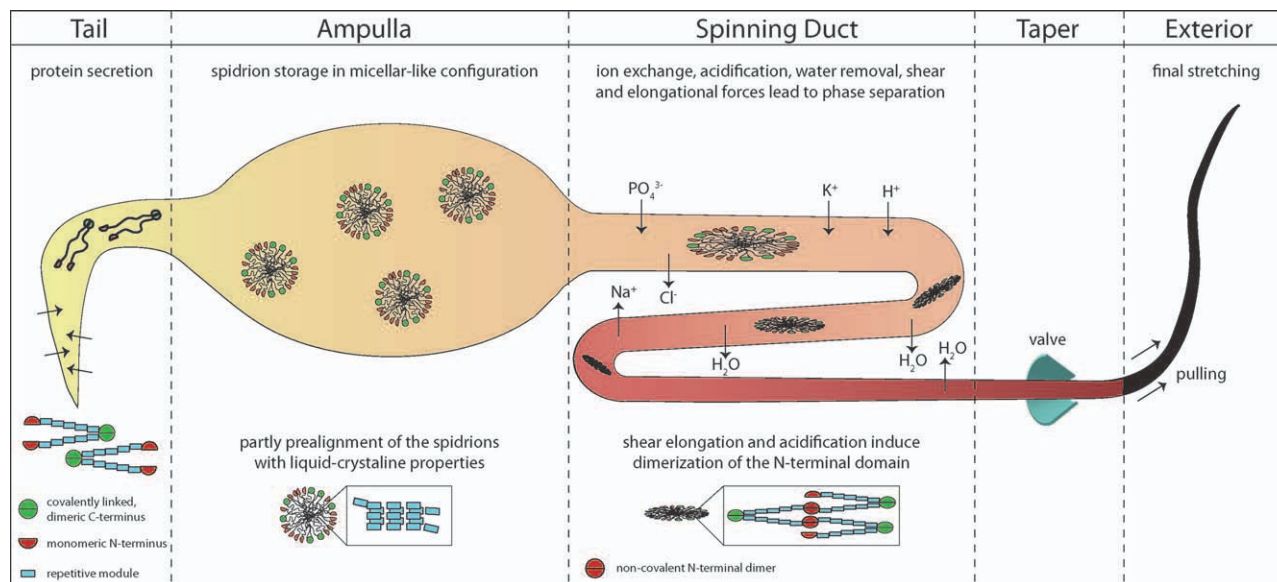


FIGURE 4 The natural spinning process of spider silk. Spidroins are produced and secreted in the tail of the spinning gland. The proteins are stored in the ampulla at concentrations of up to 50% (w/v). To prevent unspecific aggregation, the proteins likely form micellar-like structures. In the S-shaped spinning duct, the assembly process is initiated. Ion exchange, acidification and shear forces along the spinning duct induce a phase separation (the solid fiber is separated from aqueous solution). Before exiting the duct, the fiber passes the “valve,” which helps to reinitiate the spinning process after internal rupture of the fiber. Final stretching of the fibers is caused by pulling.

ces and are monomeric at pH 6.8 and above. On acidification they form tight, antiparallel dimers (Figures 3A and 3B). The dimer interface is mainly hydrophobic and conserved throughout different species and silk types.²⁶ The dimer reveals an interesting charge distribution with positive and negative charges clustering in opposite directions, forming a macromolecular dipole. Modeling experiments showed that this feature seems to be conserved in different NRN domains from different species and silk types. Another interesting feature of the dimeric form is a structurally conserved crevice located at the poles. The crystal structure of NRN of *E. australis* revealed that the linker region of one subunit connecting NRN with the repetitive core domain fits into this crevice, probably acting as a structural lock.²⁶

The NRC domain of the MaSp2 analog ADF3 (*Araneus diadematus* fibroin 3) from *A. diadematus* (European garden spider) also consists of five α -helices (Figure 3C). In contrast to the amino-terminal domain, the NRC region is a permanent, parallel dimer, covalently linked by a disulfide bond. The cysteine residue in each monomer is highly conserved within MaSp NRC domains (Figure 2B). The α -helices are arranged in a way that one helix of each monomer is domain swapped into the other monomer, forming a clamp-like structural arrangement.²⁷ Strikingly, the primary sequence of the NRC region is the most hydrophobic part of the known

ADF3 sequence, with all hydrophobic residues being buried within the dimer in its folded state. The solvent exposed surface shows an even distribution of hydrophilic patches ensuring the solubility of the domain.²⁷

MASP TERMINI SWITCH THEIR STRUCTURE UPON EXTERNAL TRIGGERS

To fully understand the properties of spider silk fibers, it is necessary to investigate the relationship between the structure of the mature fiber and the primary sequence of the underlying proteins. It is also important to understand the assembly process in which the spidroins are converted from a soluble structure into a solid fiber, taking only milliseconds or less at ambient temperatures (Figure 4).^{29,30} After secretion from the glandular cells, the major ampullate spidroins are stored in the ampulla at remarkably high concentrations of up to 50% (w/v) at approximately pH 7 and in the presence of sodium chloride.³¹ Under such storage conditions, micellar-like structures of the spidroins have been reported, likely presenting a metastable state to prevent undesirable aggregation.^{32–34} The assembly process is initiated in the tapered S-shaped spinning duct where sodium and chloride ions are exchanged for the more kosmotropic potassium and phosphate ions, accompanied by a reduction of the pH value to about 6.2. As shear forces increase along the duct, β -sheet

crystals form and align along the fiber axis. Recent results, supported by the atomic resolution structures of MaSp-termini (see above), indicate that both terminal domains act as environmentally triggered structural switches significantly influencing the solubility as well as the initiation of assembly.^{26–28,35}

Both MaSp1 amino-terminal regions, one from *Euprosthena australis* and one from *L. hesperus* (black widow), are monomeric at storage conditions (pH 7 in presence of sodium chloride). In the complete absence of salt, the NRN domain has a slight tendency to dimerize, which is fully suppressed in the presence of 300 mM sodium chloride.^{28,36} The presence of the NRN domain in engineered, recombinant spider silk proteins decelerates the rate of aggregation by more than one order of magnitude, indicating a stabilizing role during storage.²⁶

Acidification to a pH below 6.4, which naturally occurs during the spinning process, induces the formation of a tight antiparallel NRN dimer, probably acting as an intermolecular crosslinker. This dimerization is completely reversible and strongly depends on two charged residues. One aspartic acid is highly conserved in all sequenced NRN-domains from different species and spidroins.²² Mutating this aspartic acid residue into its non-charged counterpart, asparagine prevents dimerization as observed by mass-spectrometry.³⁵ NRN further assembles into higher oligomeric structures as seen in light-scattering experiments, supporting the fact that NRN is critically involved in storage and assembly.²⁶

In contrast to NRN, the NRC domain is a covalently linked dimer with one intermolecular disulfide bond. In further contrast to the antiparallel dimer of the amino-terminal domain, the NRC domain reflects a parallel dimer, acting as a “clamp” to hold two spidroins together. Recombinant spidroins bearing the NRC domain are able to form supramolecular assemblies resembling micellar-like structures, depending on the spidroin concentration and the ionic strength of the solution. The presence of NRC seems to stabilize spidroins against phosphate induced aggregation.³⁷ Therefore, together with the NRN domain, NRC also plays an important role in storage.^{38,39}

Four charged residues per monomer in the NRC domain of ADF3 are the only charged residues in the entire known ADF3 sequence.¹⁸ These four charged residues form two intramolecular salt-bridges located at the junction of the terminal to the repetitive core domain. These residues play an important role in stabilizing the NRC dimeric structure. In presence of salt the structure of the dimer is stabilized. With decreasing ionic strength the structure surrounding the salt bridges becomes more flexible, exposing hydrophobic patches which can enhance the assembly process in the spinning duct.

In vitro it could be shown that the presence of NRC domains significantly influenced fiber assembly yielding even macroscopic fibers which could not be detected in absence of such

domain.^{40–42} This behaviour is even more pronounced in the presence of shear stress where recombinant spidroins with NRC assemble into millimeter-long fibers, while in the absence of the NRC domain only amorphous aggregation could be detected.^{27,39,43} The assembled fibers seem to consist of bundles of smaller fibrils ordered along the fiber axis. Intriguingly, β -sheet crystals formed by the polyalanine stretches are aligned along the axis of these fibers similar to their arrangement in the natural silk fiber.^{44,45} This finding indicates that in addition to its involvement in storage of the spidroins, the NRC domain also influences the pre-orientation of the structures of the repetitive core domain.

Combining structural information of both terminal domains with data from fibril assembly experiments, it is evident that both terminal domains contribute to the solubility of the spidroins under storage conditions, either by preventing unspecific aggregation or by facilitating the formation of micellar-like structures in the dope. Upon transfer of the dope to the spinning duct the environmental conditions change (including acidification, ion exchange, shear stress), influencing/changing the fold of the terminal domains. Under these altered conditions, both domains show a structural “switch.” In case of the amino-terminal domain, this results in a tight antiparallel dimer which acts as an intermolecular crosslinker facilitating the assembly process. The structural switch in NRC-domains, on the other hand, leads to exposition of hydrophobic patches which are able to enhance the assembly process and to direct spidroin alignment.

OUTLOOK

Small terminal domains are highly important for the assembly of structural proteins such as collagens or silks. Recent structural insights into termini of major ampullate spidroins indicate their involvement in both storage and assembly. One remaining question is concerning the contribution of the termini to the mechanical properties of the mature fiber.

Based on the first solved protein structures, it would be of interest to characterize further terminal domains of other silk types and silk from other spiders. Similarities or differences in their structure and function would deepen the understanding of the silk assembly process — a prerequisite of mimicking silk fiber assembly *in vitro*.

The authors thank Eileen Lintz for proof reading the article.

REFERENCES

1. Shoulders, M. D.; Raines, R. T. *Ann Rev Biochem* 2009, 78, 929–958.
2. Harrington, M. J.; Waite, J. H. In *Fibrous Proteins*; Scheibel, T. R., Ed.; Landes Bioscience: Austin, Texas, 2008; pp 30–45.

3. Waite, J. H.; Qin, X. X.; Coyne, K. J. *Matrix Biol* 1998, 17, 93–106.
4. Winkler, S.; Kaplan, D. L. *Rev Mol Biotechnol* 2000, 74, 85–93.
5. Hardy, J. G.; Romer, L. M.; Scheibel, T. R. *Polymer* 2008, 49, 4309–4327.
6. Eisoldt, L.; Smith, A.; Scheibel, T. *Mater Today* 2011, 14, 80–86.
7. Heim, M.; Keerl, D.; Scheibel, T. *Angew Chem Int Ed* 2009, 48, 3584–3596.
8. Rising, A.; Widhe, M.; Johansson, J.; Hedhammar, M. *Cell Mol Life Sci* 2010, 1–16.
9. Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. *Science* 2010, 329, 528–531.
10. Sponner, A.; Unger, E.; Grosse, F.; Weisshart, K. *Biomacromolecules* 2004, 5, 840–845.
11. Denny, M. *J Exp Biol* 1976, 65, 483–506.
12. Blackledge, T. A.; Hayashi, C. Y. *J Exp Biol* 2006, 209, 2452–2461.
13. Vollrath, F. *J Biotechnol* 2000, 74, 67–83.
14. Madsen, B.; Shao, Z. Z.; Vollrath, F. *Int J Biol Macromol* 1999, 24, 301–306.
15. Hayashi, C. Y.; Blackledge, T. A.; Lewis, R. V. *Mol Biol Evol* 2004, 21, 1950–1959.
16. Ayoub, N. A.; Garb, J. E.; Tinghitella, R. M.; Collin, M. A.; Hayashi, C. Y. *Plos One* 2007, 2.
17. Hinman, M. B.; Lewis, R. V. *J Biol Chem* 1992, 267, 19320–19324.
18. Guerette, P. A.; Ginzinger, D. G.; Weber, B. H. F.; Gosline, J. M. *Science* 1996, 272, 112–115.
19. Motriuk-Smith, D.; Smith, A.; Hayashi, C. Y.; Lewis, R. V. *Biomacromolecules* 2005, 6, 3152–3159.
20. Rising, A.; Hjalms, G.; Engstrom, W.; Johansson, J. *Biomacromolecules* 2006, 7, 3120–3124.
21. Challis, R. J.; Goodacre, S. L.; Hewitt, G. M. *Insect Mol Biol* 2006, 15, 45–56.
22. Garb, J.; Ayoub, N.; Hayashi, C. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10, 243.
23. Hu, X. Y.; Kohler, K.; Falick, A. M.; Moore, A. M. F.; Jones, P. R.; Vierra, C. *Biochemistry* 2006, 45, 3506–3516.
24. La Mattina, C.; Reza, R.; Hu, X.; Falick, A. M.; Vasanthavada, K.; McNary, S.; Yee, R.; Vierra, C. A. *Biochemistry* 2008, 47, 4692–4700.
25. Sponner, A.; Unger, E.; Grosse, F.; Klaus, W. *Nat Mater* 2005, 4, 772–775.
26. Askarieh, G.; Hedhammar, M.; Nordling, K.; Saenz, A.; Casals, C.; Rising, A.; Johansson, J.; Knight, S. D. *Nature* 2010, 465, 236–U125.
27. Hagn, F.; Eisoldt, L.; Hardy, J. G.; Vendrely, C.; Coles, M.; Scheibel, T.; Kessler, H. *Nature* 2010, 465, 239–242.
28. Hagn, F.; Thamm, C.; Scheibel, T.; Kessler, H. *Angew Chem Int Ed* 2010, 50, 310–313.
29. Hijirida, D. H.; Do, K. G.; Michal, C.; Wong, S.; Zax, D.; Jelinski, L. W. *Biophys J* 1996, 71, 3442–3447.
30. Vollrath, F.; Knight, D. P. *Nature* 2001, 410, 541–548.
31. Knight, D. P.; Vollrath, F. *Naturwissenschaften* 2001, 88, 179–182.
32. Jin, H. J.; Kaplan, D. L. *Nature* 2003, 424, 1057–1061.
33. Hu, X. Y.; Yuan, J.; Wang, X. D.; Vasanthavada, K.; Falick, A. M.; Jones, P. R.; La Mattina, C.; Vierra, C. A. *Biochemistry* 2007, 46, 3294–3303.
34. Knight, D. P.; Vollrath, F. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 1999, 266, 519–523.
35. Landreh, M.; Askarieh, G.; Nordling, K.; Hedhammar, M.; Rising, A.; Casals, C.; Astorga-Wells, J.; Alvelius, G.; Knight, S. D.; Johansson, J.; Jörnvall, H.; Bergman, T. *J Mol Biol* 2010, 404, 328–336.
36. Gaines, W. A.; Sehorn, M. G.; Marcotte, W. R., Jr. *J Biol Chem* 2010, 285, 40745–40753.
37. Huemmerich, D.; Helsen, C. W.; Quedzuweit, S.; Oschmann, J.; Rudolph, R.; Scheibel, T. *Biochemistry* 2004, 43, 13604–13612.
38. Exler, J. H.; Hummerich, D.; Scheibel, T. *Angew Chem Int Ed* 2007, 46, 3559–3562.
39. Eisoldt, L.; Hardy, J. G.; Heim, M.; Scheibel, T. R. *J Struct Biol* 2010, 170, 413–419.
40. Stark, M.; Grip, S.; Rising, A.; Hedhammar, M.; Engstrom, W.; Hjalms, G.; Johansson, J. *Biomacromolecules* 2007, 8, 1695–1701.
41. Sponner, A.; Vater, W.; Rommerskirch, W.; Vollrath, F.; Unger, E.; Grosse, F.; Weisshart, K. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 338, 897–902.
42. Hedhammar, M.; Rising, A.; Grip, S.; Martinez, A. S.; Nordling, K.; Casals, C.; Stark, M.; Johansson, J. *Biochemistry* 2008, 47, 3407–3417.
43. Rammensee, S.; Slotta, U.; Scheibel, T.; Bausch, A. R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105, 6590–6595.
44. Papadopoulos, P.; Ene, R.; Weidner, I.; Kremer, F. *Macromol Rapid Commun* 2009, 30, 851–857.
45. Papadopoulos, P.; Solter, J.; Kremer, F. *Colloid Polym Sci* 2009, 287, 231–236.

Reviewing Editor: David Nate Breslauer

Rechtliches

Für die Publikationen in den Teilarbeiten II, IV und V wurden die Rechte zur elektronischen und gedruckten Vervielfältigung des jeweiligen vollständigen Artikels im Rahmen dieser Dissertation bei den Verlagen eingeholt. Für Teilarbeit I gewährt der Verlag (Nature Publishing Group) jedem Autor das Recht den vollständigen Artikel im Rahmen einer Thesis/Dissertation in elektronischer und gedruckter Form zu vervielfältigen (Punkt a. unter „Author Requests“ auf <http://www.nature.com/reprints/permission-requests.html>).

Anhang

Tabelle A1: Übersicht bekannter carboxyterminaler (CT) und aminoterminaler (NT) Sequenzen von verschiedenen Spidroinen und Arten. Die Sequenzen wurden der UniProt-Datenbank entnommen (<http://www.uniprot.org/uniprot/>, Stand Januar 2013) und soweit möglich publizierte Quellen mit angegeben. Der Übersicht halber wurden redundante Spidroinsequenzen, die auf unterschiedlichen cDNA-Klonen basieren nicht mit aufgenommen. Die Sequenzen sind nach Unterordnung und jeweilige Familie sortiert. Die Arten innerhalb der Familien sind alphabetisch sortiert. Bei Spidrintypen, die mit „Fibroin“ gekennzeichnet sind, konnten die jeweiligen repetitiven Bereiche nicht den bekannten Spidroinklassen zugeordnet werden. Die terminalen Domänen zeigen jedoch eine signifikante Verwandtschaft zu Sequenzen von terminalen Spidroindomänen. Die publizierte Nucleotidsequenz aus der die mit * gekennzeichneten NT-Sequenz des Flagelliform Spidroins von *N. clavipes* (O44358) hervorgeht enthält an Position 110 ein Adenosin zu viel, welches die Proteinsequenz ab Position 36 verfälscht. Die korrigierte Sequenz ist in [33] angegeben, Verwendete Abkürzungen: MaSp: Major Ampullate Spidroin; MiSp: Minor Ampullate Spidroin; Flag: Flagelliform Spidroin; AcSp: Aciniform Spidroin; TuSp: Tubuliform Spidroin; Pyriform Spidroin

Spezies	Spidroin	Bekannter Terminus	UniProt-Nummer	Quelle
Unterordnung Echte Webspinnen (<i>Araneomorphae</i>)				
Echte Radnetzspinnen (<i>Araneidae</i>)				
<i>Araneus bicentenarius</i>	MaSp1	CT	P46802	[24]
	MaSp2	CT	Q9TY62	[24]
<i>Araneus diadematus</i>	MaSp1	CT	Q16986	[7]
	MaSp2	CT	Q16987	[7]
<i>Araneus genmoides</i>	TuSp1	CT	Q3BCG3	[163]
<i>Araneus ventricosus</i>	MaSp1	CT	G9JKN1	-
	MiSp	NT + CT	K4MTL7	[27]
	Flag	CT	A0FK72	[164]
	AcSp1	CT	E1AW39	-
<i>Argiope amonea</i>	MaSp1	CT	Q2TV51	-
	MaSp2	CT	Q3ZTQ8	-
	AcSp1	CT	E1AW40	-
<i>Argiope argentata</i>	MiSp1	CT	I4CJN7	[165]
	TuSp1	NT + CT	NT: E1AHW1 CT: Q4G1Y5	[30, 37]
<i>Argiope aurantia</i>	MaSp2	CT	Q9BIV0	[29]
	TuSp1	CT	Q4G1X5	[30]
<i>Argiope bruennichi</i>	MaSp1	CT	I6XQ31	[47]
	MaSp2	NT + CT	I6YNT3	[47]
<i>Argiope trifasciata</i>	MaSp1	CT	Q9BIU7	[29]
	MaSp2	NT + CT	NT: Q2VLH1 CT: Q9BIU6	[21]
	Flag	CT	Q9BIU9	[29]
	AcSp1	CT	Q64K55	[13]
	PySp1	CT	E2DEK3	-
<i>Cyrtophora moluccensis</i>	MaSp1	CT	Q5UNI2	[166]
	TuSp1	CT	Q4G1X3	[30]
<i>Gasteracantha cancriformis</i>	MaSp2	CT	Q9BIU1	[29]
<i>Gea haptagon</i>	TuSp1	CT	Q4G1X4	[30]
<i>Metepeira grandiosa</i>	MiSp1	NT + CT	NT: E1AHV7 CT: E1AHU9	[37]
<i>Nephila clavipes</i>	MaSp1	NT + CT	NT: B5SYS5 CT: P19837	[23, 35]
	MaSp2	NT + CT	NT: B5SYS7 CT: P46804	[9, 35]
	Flag	NT + CT	*NT: O44358 CT: O44359	[12]
	TuSp1	CT	Q3BCG2	[163]
	PySp1	CT	E2DEK5	[20]
	PySp2	CT	G0WJ15	[31]

<i>Nephila inaurata mada-gascariensis</i>	MaSp1	CT	Q9BIT6	[29]
	MaSp2	NT + CT	NT: Q2VLH2 CT: Q9BIT5	[21, 29]
	Flag	NT	Q9NHW2	[28]
<i>Nephila pilipes</i>	MaSp1	CT	Q5UNI6	[166]
<i>Nephila senegalensis</i>	MaSp1	CT	Q9BIT4	[28]
	Masp2	CT	Q9BIT3	[28]
<i>Nephilengyys cruentata</i>	MaSp1	CT	A6YP78	[11]
	MiSp1	CT	A6YP79	[11]
	Flag	CT	A6YP76	[11]
	TuSp1	CT	A6YP77	[11]
	PySp1	CT	E3SH49	-
<i>Parawixia bistrata</i>	MaSp1	CT	I6LKZ4	-
	MaSp2	CT	I6LKZ5	-
	MiSp1	CT	E9JEC3	-
	AcSp1	CT	I6LKZ2	-
<i>Tetragnatha kauaiensis</i>	MaSp1	CT	Q9BIS8	[29]
<i>Tetragnatha versicolor</i>	MaSp1	CT	Q9BIS7	[29]
Haubennetzspinnen (Theridiidae)				
<i>Latrodectus geometricus</i>	MaSp1	NT+ CT	NT: B0F665 CT: Q9BIU0	[29, 167]
	MaSp2	NT + CT	NT: B0F656 CT: Q9BIT8	[29, 167]
	TuSp1	CT	Q4G1X7	[30]
<i>Latrodectus hasseltii</i>	TuSp1	CT	Q4G1X6	[30]
<i>Latrodectus hesperus</i>	MaSp1	NT + CT	A6YIY1	[8]
	Masp2	NT + CT	A6YIY0	[8]
	MiSp	NT + CT	NT: E1AHV0, CT: E1AHV1	[37]
	AcSp1	NT + CT	GenBank: JX978171.1	[15]
	TuSp	NT + CT	NT: Q1KXY8 CT: Q4G1Y6	[30]
	PySp	CT	C7T5D2	[19]
<i>Latrodectus mactans</i>	MaSp1	NT	E5G5R4	[34]
	Tusp1	CT	Q4G1X9	[30]
Netzwerfende Spinnen (Deinopidae)				
<i>Deinopis spinosa</i>	MaSp2	CT	Q15G92	[168]
	MiSp1	CT	Q15G96	[168]
	Flag	CT	Q15G95	[168]
	TuSp1	CT	Q4G1Y3	[168]
Kräuselradnetzspinnen (Uloboridae)				
<i>Uloborus diversus</i>	MaSp1	CT	Q15G89	[168]
	MaSp2	CT	Q15G85	[168]
	MiSp1	NT + CT	NT: E1AHV5 CT: Q15G88	[37]
	AcSp1	CT	Q15G87	[168]
	TuSp1	CT	Q4G1Y4	[168]
<i>Octonoba varians</i>	MaSp1	CT	Q5UNK3	[166]
Trichterspinnen (Agelenidae)				
<i>Agelenopsis aperta</i>	MaSp1	NT + CT	NT: E1AHV3 CT: Q6Q294	[37, 169]
	TuSp1	NT + CT	NT: E1AHV9 CT: E1AHV2	[37]
Raubspinnen (Pisauridae)				
<i>Euprostenops australis</i>	MaSp1	NT + CT	NT: Q05H60 CT: A7M8L1	[32, 33]
	MaSp2	CT	A7M8K6	[32]
Psechridae				
<i>Psechrus sinensis</i>	MaSp1	CT	Q5UNJ3	[166]
Luchsspinnen (Oxyopidae)				
<i>Peucetia viridans</i>	MaSp1	CT	D5JG83	[47]
Diguetidae				
<i>Diguetia canities</i>	MaSp1	NT + CT	NT: E1AHU4 CT: E1AHU5	[37]
Lochröhrenspinnen (Filistatidae)				

<i>Kukulcania hibernalis</i>	MaSp1	NT	E1AHU3	[37]
Unterordnung Vogelspinnartige (Mygalomorphae)				
<i>Cyrtoucheniidae</i>				
<i>Aptostichus spp.</i>	Fibroin1	CT	A8UAJ5	[170]
	Fibroin2	CT	A8UAJ6	[170]
<i>Antrodiaetidae</i>				
<i>Atypoides riversi</i>	Fibroin1	CT	I6ULS5	[171]
Eigentliche Falltürspinnen (Ctenizidae)				
<i>Bothriocyrtum californicum</i>	Fibroin1	NT + CT	NT: E1AHU2 CT: A8UAJ7	[37, 170]
Doppelschwanzspinnen (Dipluridae)				
<i>Euagrus chisoseus</i>	Fibroin1	CT	Q9BIU2	[29]
<i>Mecicobothriidae</i>				
<i>Megahexura fulva</i>	Fibroin1	CT	I6ULT0	[171]
Vogelspinnen (Theraphosidae)				
<i>Avicularia juruensis</i>	MaSp1	CT	D4HL83	[169]
	MaSp2	CT	D4HL84	[169]
Trichternetzspinnen (Hexathelidae)				
<i>Macrothele holsti</i>	MaSp1	CT	Q5UNJ2	[166]

Danksagung

Ein großer Dank geht an meinen Betreuer und wissenschaftlichen Mentor Prof. Thomas Scheibel, der stets für mich da war und mir die Gelegenheit wie auch die Freiheiten gab auf diesem spannenden Projekt zu promovieren.

Den Mitgliedern des ursprünglichen „Fiberlabs“, namentlich Anja, Christian, Kristina, Simone und Ute, möchte ich für all die Hilfen, schon vor Beginn der Doktorarbeit, und den schönen Stunden in und vor allem auch außerhalb des Labors danken.

All meinen Kollegen und Freunden des Lehrstuhls Biomaterialien gebührt ebenfalls mein Dank. Hier sei natürlich besonders die Gummibärchenverpflegungsstation um Claudia Mädels-Büro, die unzählige Male für den nötigen Zuckerschub erwähnt. Das hat so manchen Forschertag oder –abend gerettet. Ein Dank auch an die regelmäßigen Gäste des TripleB, Aniela, Chris, Elena, Felix, Kristin, Martina und Steffi für die sehr gemütliche Zeit sowie an den tapferen Mitstreiter Markus für gewisse FAN-Feten-Bars. Eileen, danke für die kurzweiligen Fahrten von Bayreuth nach München und zurück. Vielen Dank auch an unsere Post-Docs Martin, Andrew und John für all die kleinen und nützlichen Tipps. John gebührt mein aufrichtiger Dank, besonders in den ersten 2,5 Jahren der Arbeit!

Ein spezieller Gruß geht an dieser Stelle an den Herz Achter bzw. die Bayreuther Schafkopfrunde um Andreas, Gregor, Markus, Johannes und Michi. Anderl und Johannes, sowie hier natürlich auch Jasmin, Claudia S. und Dani, danke ich natürlich auch für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Ein besonderer Dank geht an meine Kollegen und Freunde im Büro Martin und Michael. Ohne die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen wäre vieles nicht so gekommen wie es heute hier steht. Auch die weniger wissenschaftlichen Gespräche waren wichtig und werden in guter Erinnerung bleiben. Meinem langjährigen Mitstreiter Michael gebührt ein besonderer Dank, nicht nur für all die gemeinsamen und mühevollen Stunden auf der Suche nach dem einen Haken, der Betreuung von OSI-Layer 8 oder sonst einer der unzähligen Administrationstätigkeiten, sondern auch für all die Hilfen, Gespräche und das gesamte Drumherum.

Natürlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne die das alles, beginnend mit dem Studium, nicht möglich gewesen wäre. Ohne eure Unterstützung wäre das nicht gegangen. Zuletzt geht das größte Dankeschön an meine Frau Tina, die während der gesamten Zeit an meiner Seite war und vieles ermöglicht und auch ertragen musste. Vielen, vielen lieben Dank, mein Schatz.

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 05.06.2013

.....

Lukas Eisoldt