



Bayerische  
Akademie der Wissenschaften

Kommission BAdW Forum Technologie

**17. April 2015**

**Das Geheimnis der Arachne:  
das Phänomen Spinnenseide**

**Horst Kessler und Franz Hagn**

Institute for Advanced Study der TU München

Louise Bourgeois (1911- 2010) “Maman” (1999)  
Bilbao, Guggenheim Museum



# September 2011, im Park des Hotels in Peking typischer Smog

Spinnen



# Die Kiefern waren voller Spinnen



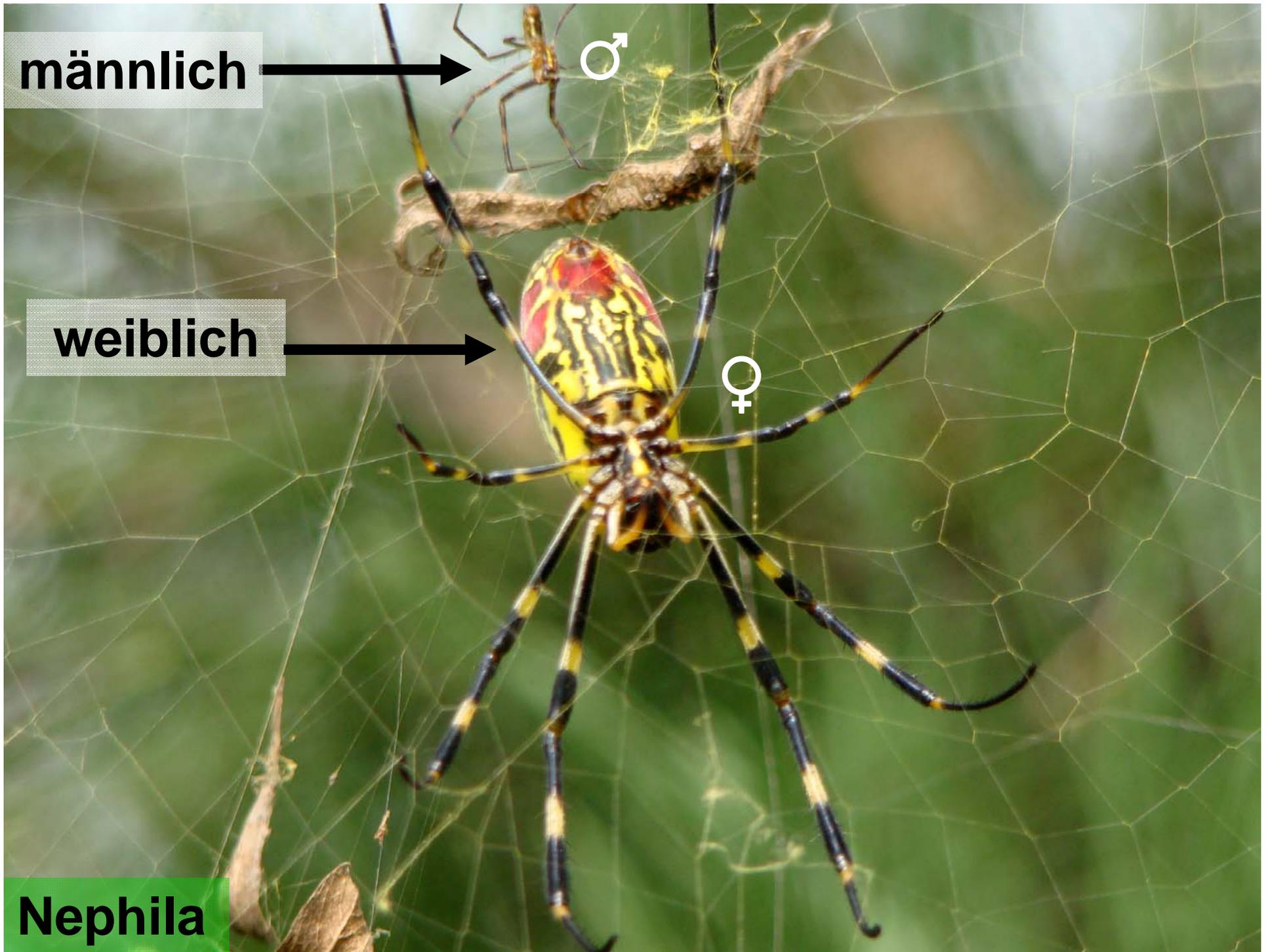
männlich

♂

weiblich

♀

Nephila



**Nicht jeder mag diese netten Tierchen**

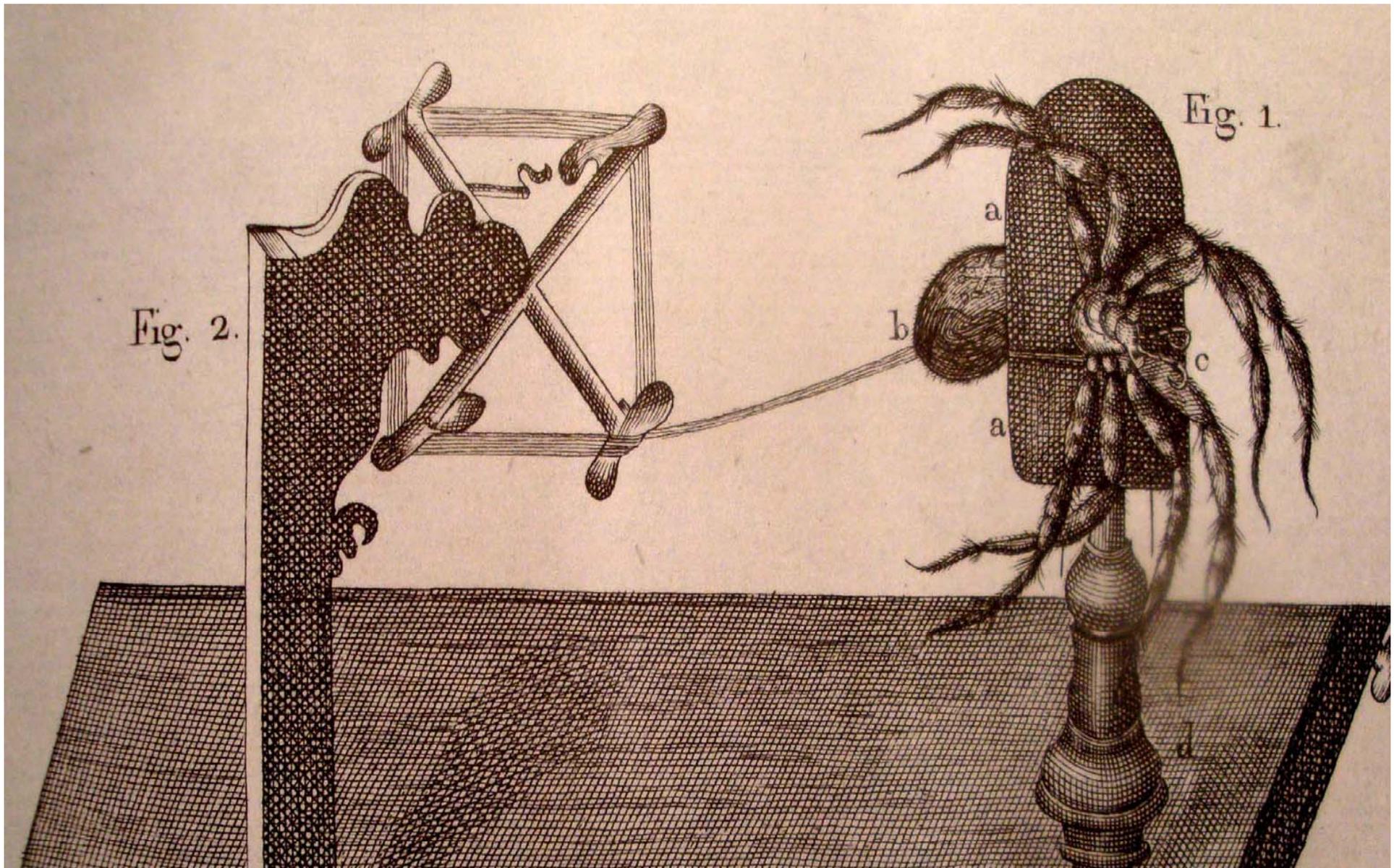


## Nephila, webt ein Netz aus goldener Seide

Die weiblichen Spinnen *Nephila pilipes* werden im Südpazifik zur Herstellung von Fischernetzen genommen. Man macht einen Rahmen aus Bambus, in den die Spinne ihr Netz macht. Dieses wird dann zum Fischen benutzt..

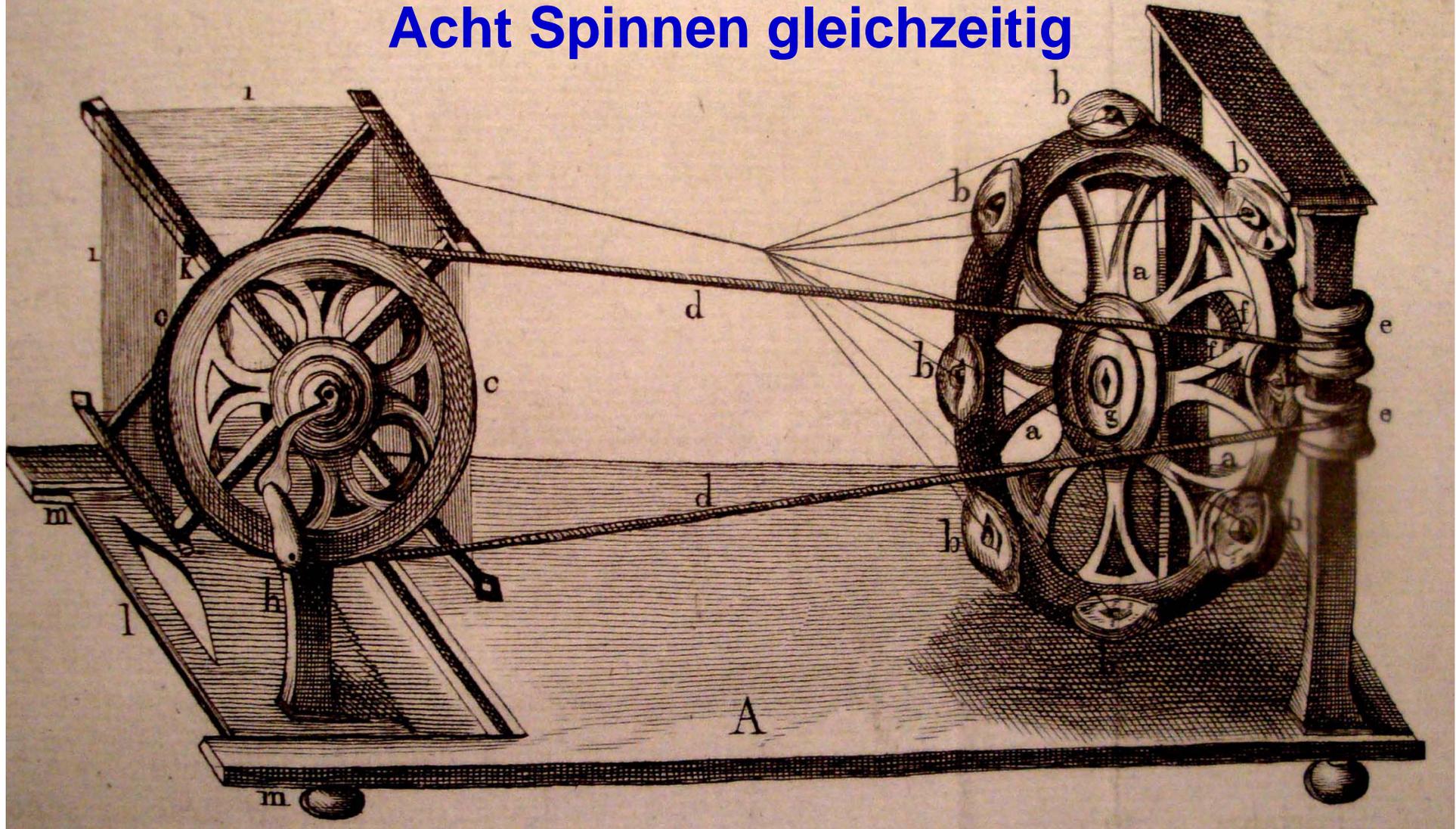
Die Ureinwohner essen die weiblichen Spinnen als Proteinquelle roh oder geröstet. Sie können auch mit rohen Kartoffeln oder Salat gemischt werden.



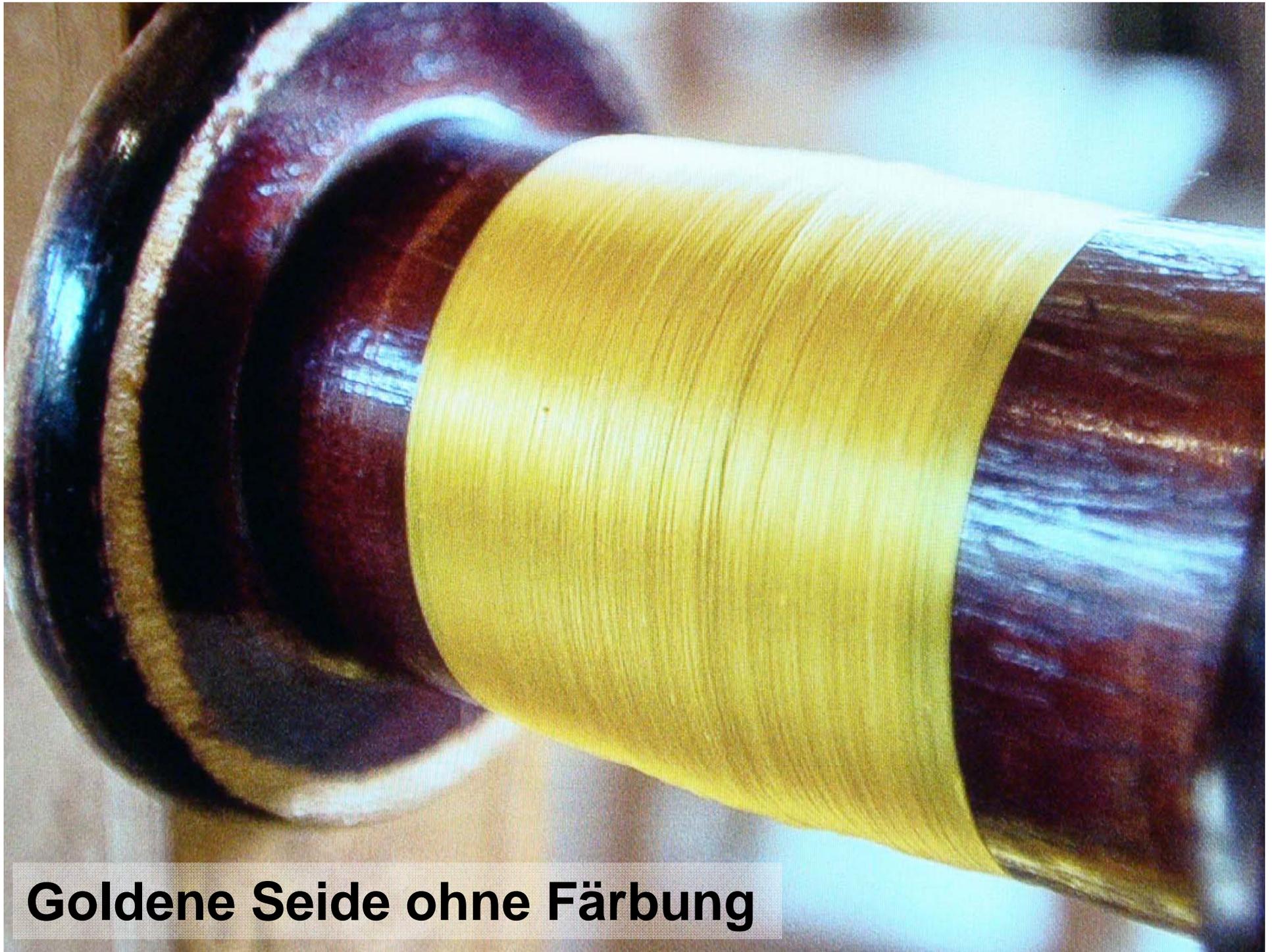


Um die Textilien zu machen werden die Spinnen jeden Morgen gesammelt und in eine spezielle Vorrichtung gespannt. Ein geübter Arbeiter kann 24 Spinnen gleichzeitig bearbeiten.

## Acht Spinnen gleichzeitig



Im Mittel geben 23,000 Spinnen 30 g Seide. Der extreme Arbeitsaufwand macht diese Textilien so außerordentlich selten und teuer.



**Goldene Seide ohne Färbung**



**25.1.- 6.6. 2012**  
**Victoria and Albert**  
**Museum, London**

## **Golden Spider Silk**

In dieser Ausstellung werden die größten Spinneseiden Stücke gezeigt, die jemals hergestellt wurden.

Es sind ein Brokat-Schal und ein Cape zu dem mehr als 1 Millionen Spinnen gebraucht wurden.

Herstellungsort: das Hochland von Madagaskar.

**80 Leute sammelten in 5 Jahren auf Madagaskar das Material. Es wurde in einer 4-jährigen Arbeit zu den beiden Textilien verarbeitet.**



**Das bestickte Cape und der vier Meter lange Brokat-Schal sind die einzigen großen Textilien, die aus der goldenen Spinnenseide hergestellt wurden ( Golden Orb spiders).**



Der Schal (gewebt)



Das Cape (Brokatstickerei)



# Das wohl teuerste Cape der Welt



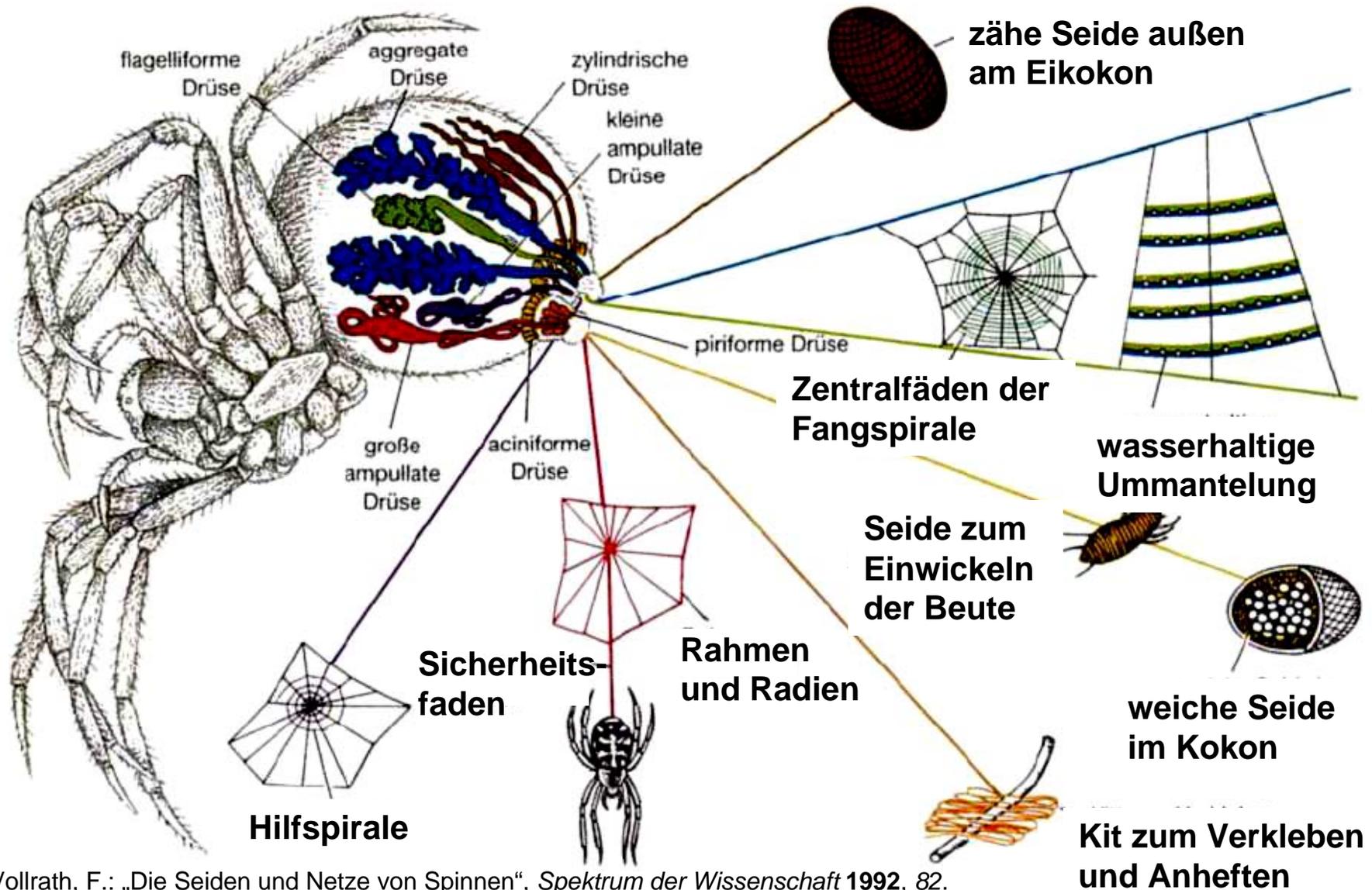
# **Spidroin:**

**ein “intelligentes Material” mit phantastischen Eigenschaften**

- hat einzigartige mechanische Eigenschaften (optimiert auf Dehnbarkeit, Elastizität und Festigkeit),**
- eine Spinne kann bis zu 6 verschiedene Seiden machen,**
- es wird unter hoher Konzentration gespeichert, ohne zu verklumpen,**
- es bildet den Seidenfaden “auf Kommando” in Bruchteilen von Sekunden.**
- es ist ökologisch: die Spinne frisst den Faden wieder auf und verarbeitet ihn neu**

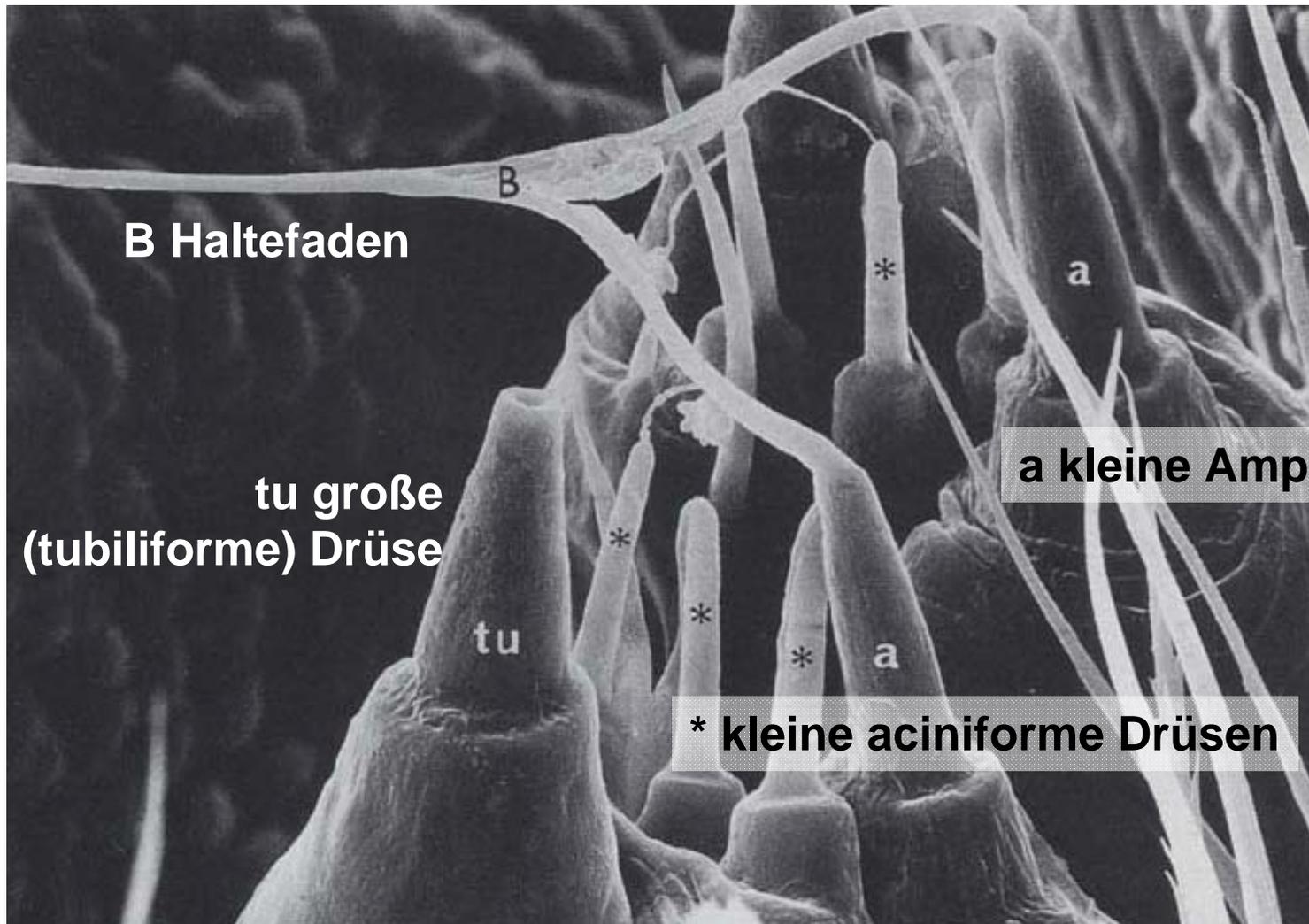
**die wesentlichen Elemente sind in der Evolution über mehrere Hundert Millionen Jahre konserviert**

# Hohe Spezialisierung: für jeden Zweck das geeignete Protein



# Verschiedene Spinndrüsen

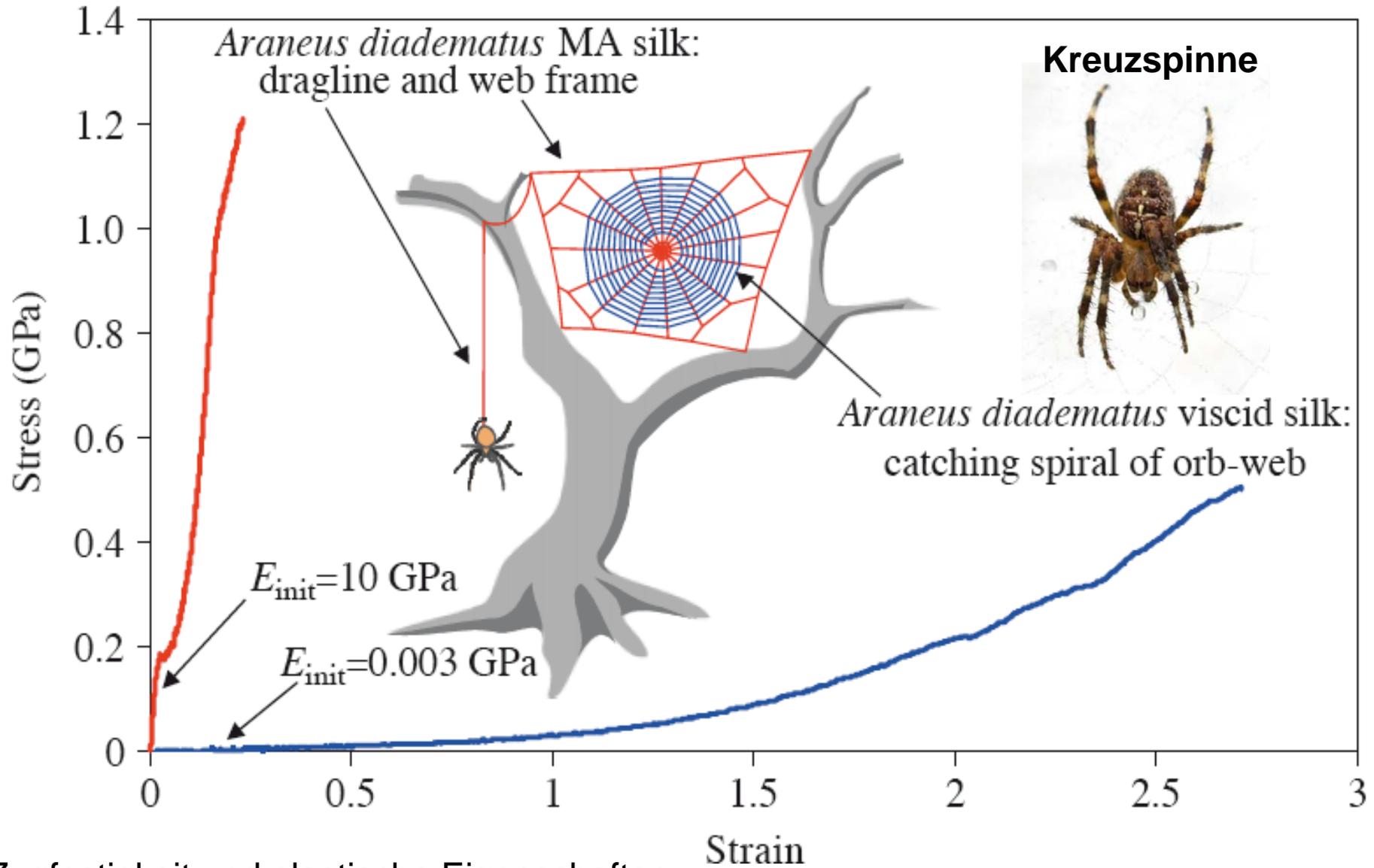
(1900fach) (Linyphia triangularis, Baldachinspinne)



a kleine Ampullendrüse

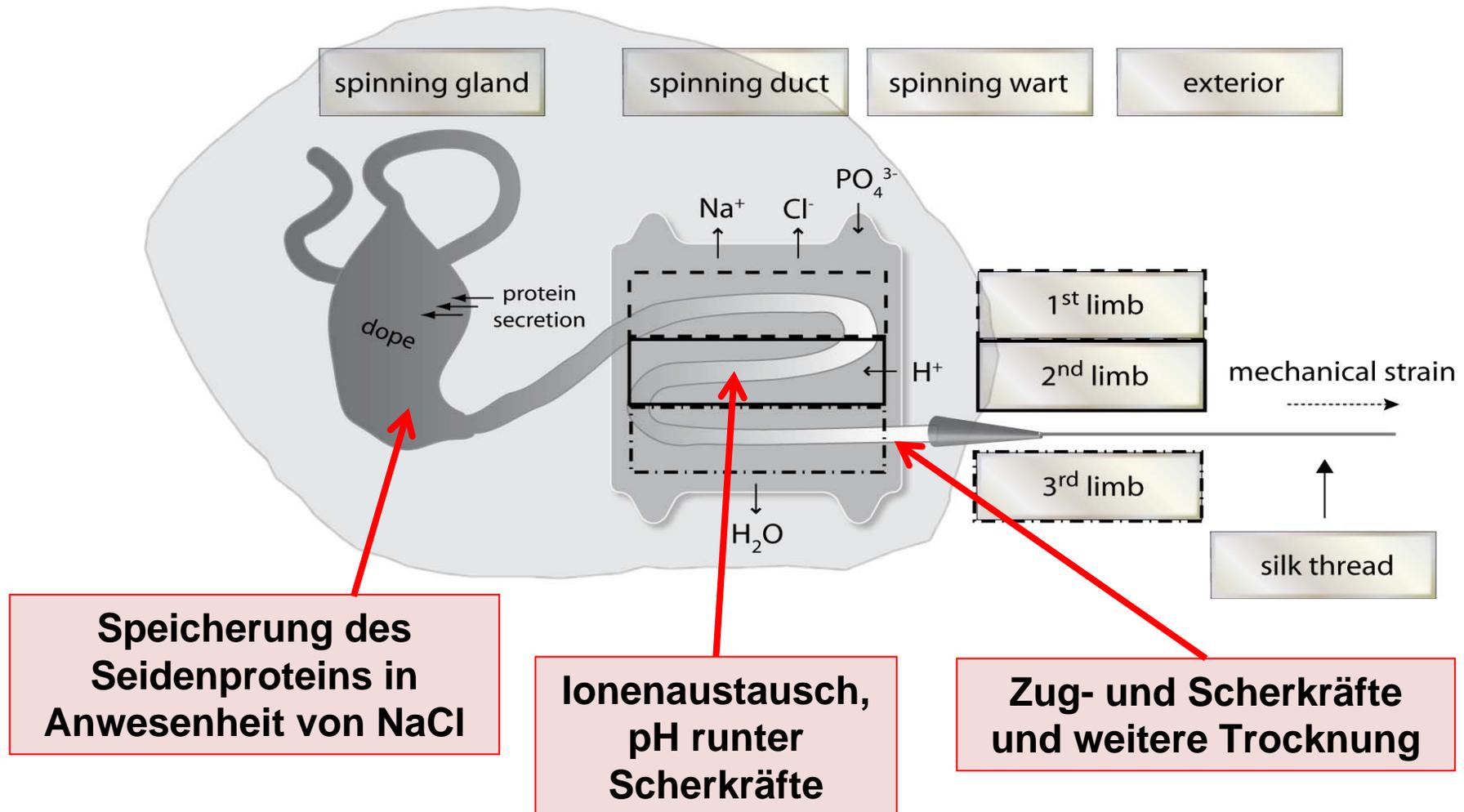
\* kleine aciniforme Drüsen

# Unterschiedliche Dehnbarkeit und Reißfestigkeit

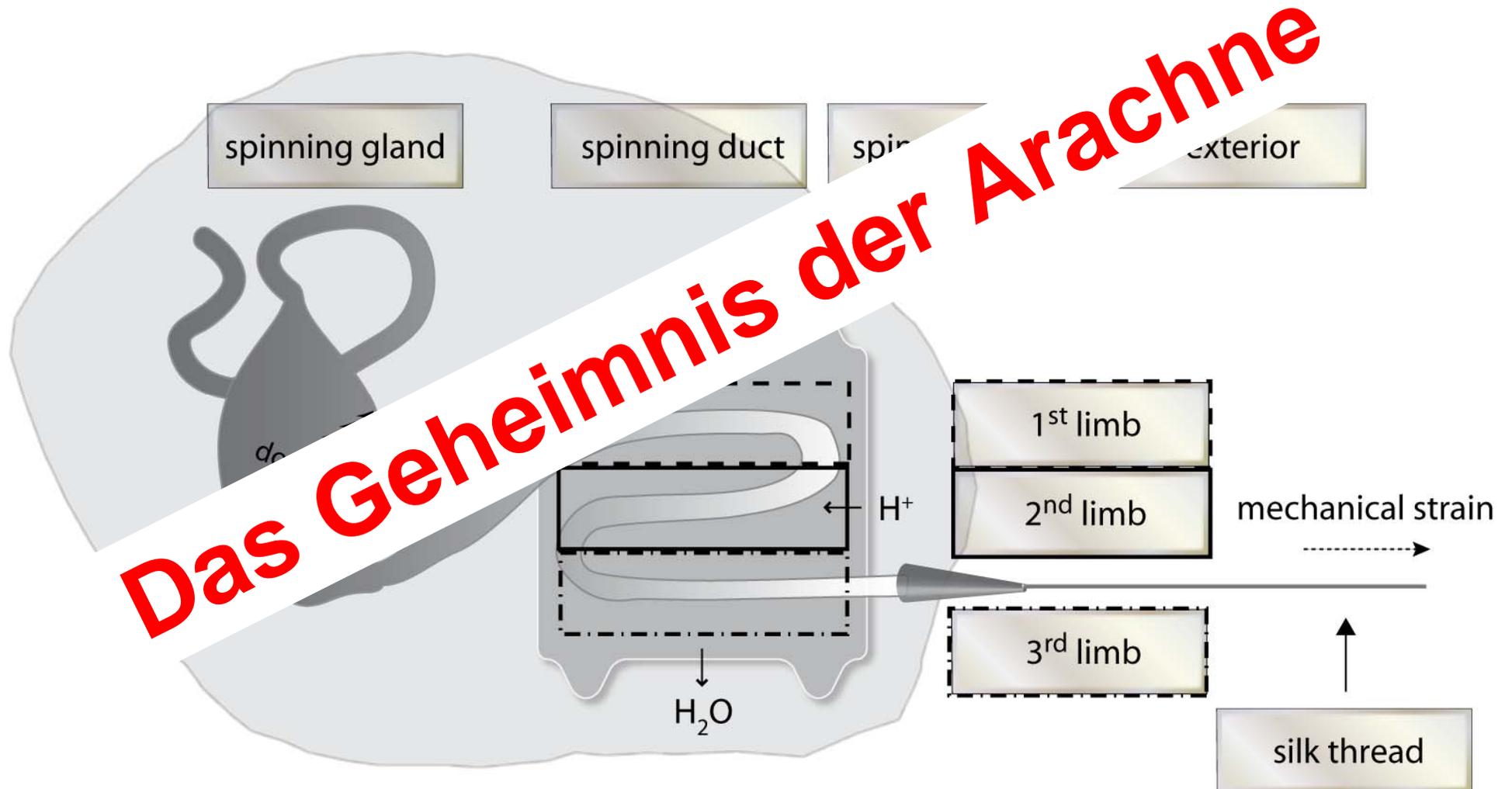


Zugfestigkeit und elastische Eigenschaften

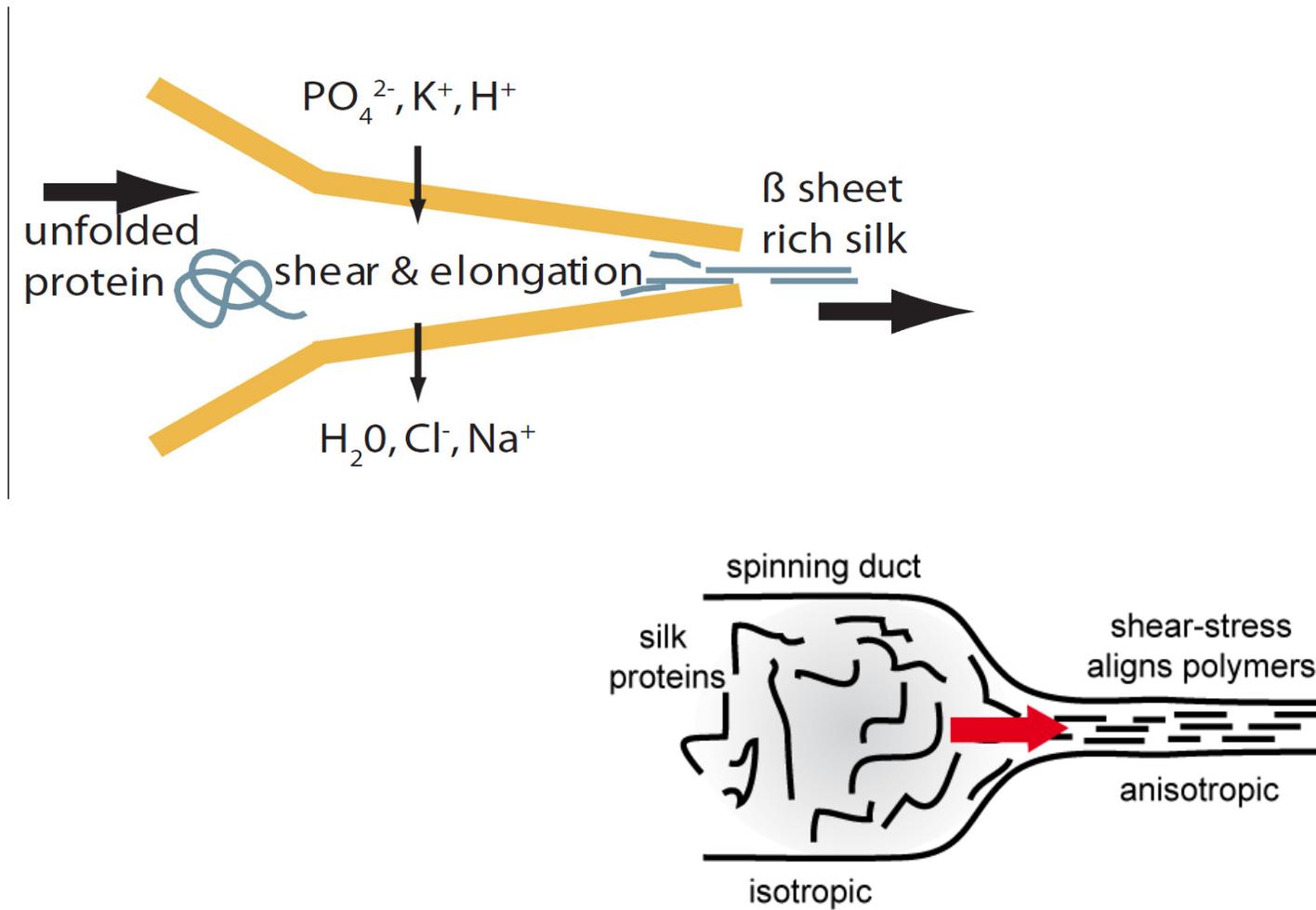
# Bildung des Spinnenfadens



Wie kann ein Protein unter hoher Konzentration (>30%) ohne Aggregation gespeichert werden und unter 1 Sekunde einen Faden bilden, der 5x stärker als Stahl ist?

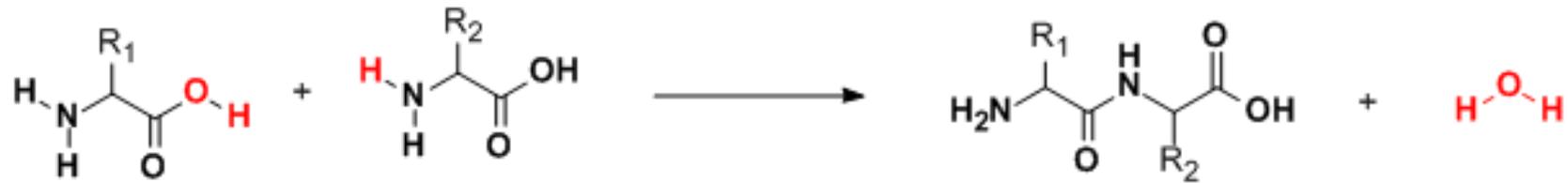


# Parallel Ausrichtung durch Scherkräfte und Dehnung



S. Rammensee, U. Slotta, T. Scheibel, A.R. Bausch,  
*PNAS* **2008**, *105*, 6590-6595

# Proteine sind lange Ketten, die aus den 21 natürlichen Aminosäuren gebildet werden

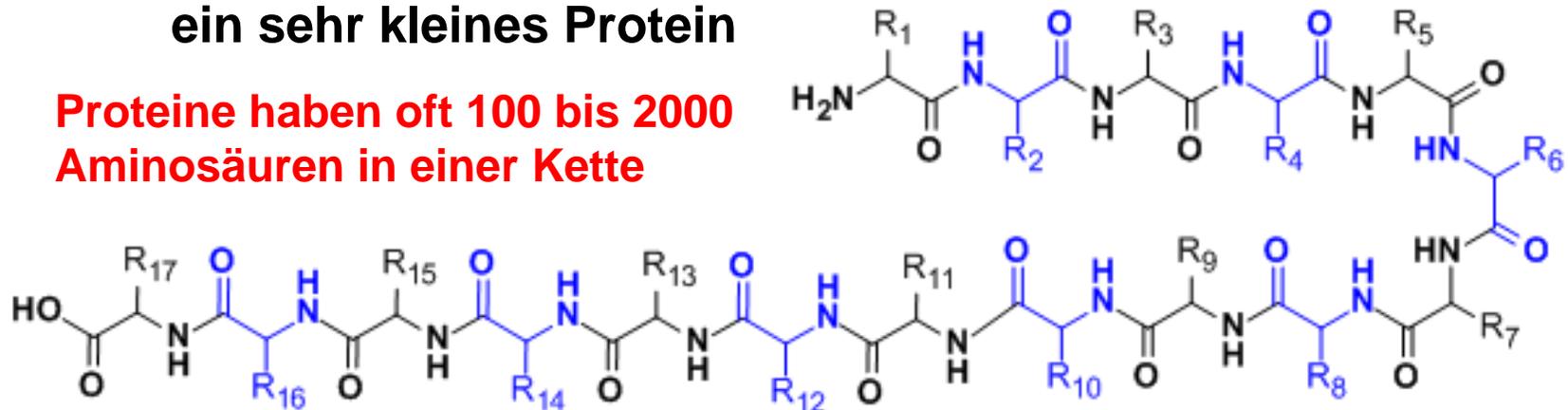


2 Aminosäuren

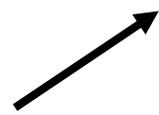
ein Peptid

ein sehr kleines Protein

Proteine haben oft 100 bis 2000 Aminosäuren in einer Kette



**Struktur**

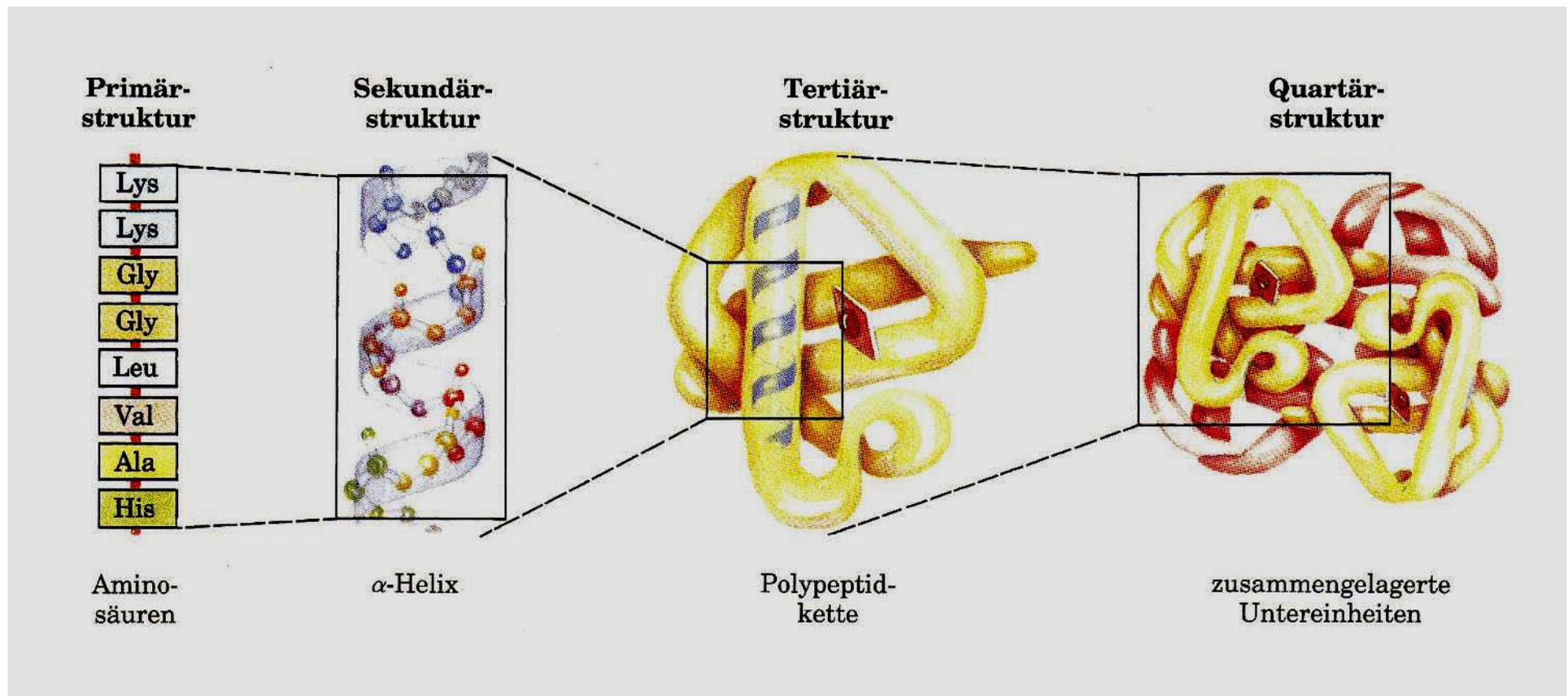


**physikalische und  
biologische Eigenschaften**



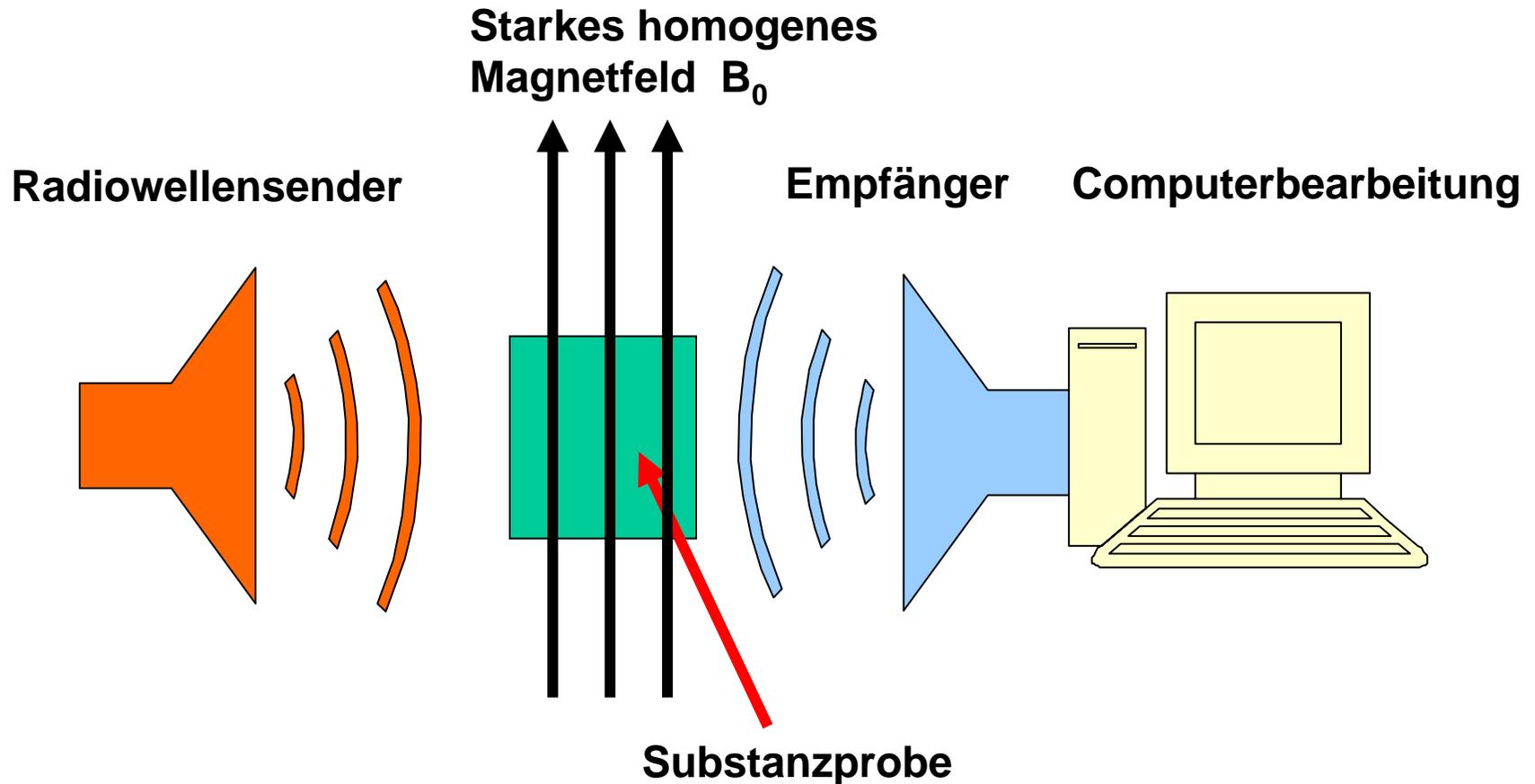
**biologische Funktionen**

# Die Proteinketten "falten" sich je nach der Art der Aminosäuren zu einer charakteristischen 3D Struktur



# NMR-Spektroskopie

Nuclear Magnetic Resonance = Kern Magnetische Resonanz



Man sieht jeden einzelnen Atomkern in seiner Umgebung  
Wasserstoff  $^1\text{H}$ , Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  und Stickstoffisotop  $^{15}\text{N}$

**900 MHz**



**750 MHz**



**600 MHz**



**250MHz**



**900 MHz**

**2017 bekommen das Bayerische  
NMR-Zentrum das dann größte NMR-  
Spektrometer der Welt (1,2 GHz)**



**600 MHz**



**250MHz**

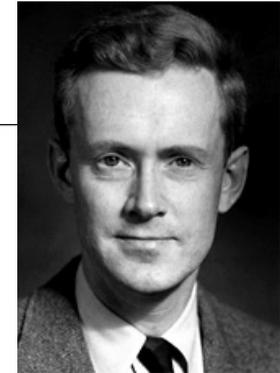


# Chemische Verschiebung

Änderung der molekularen Umgebung ändert die



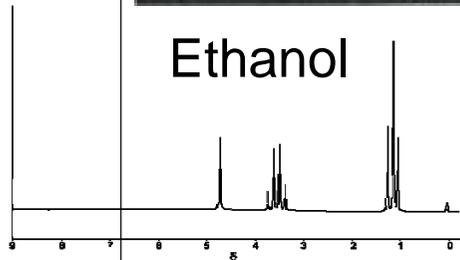
Resonanzfrequenz der Atome



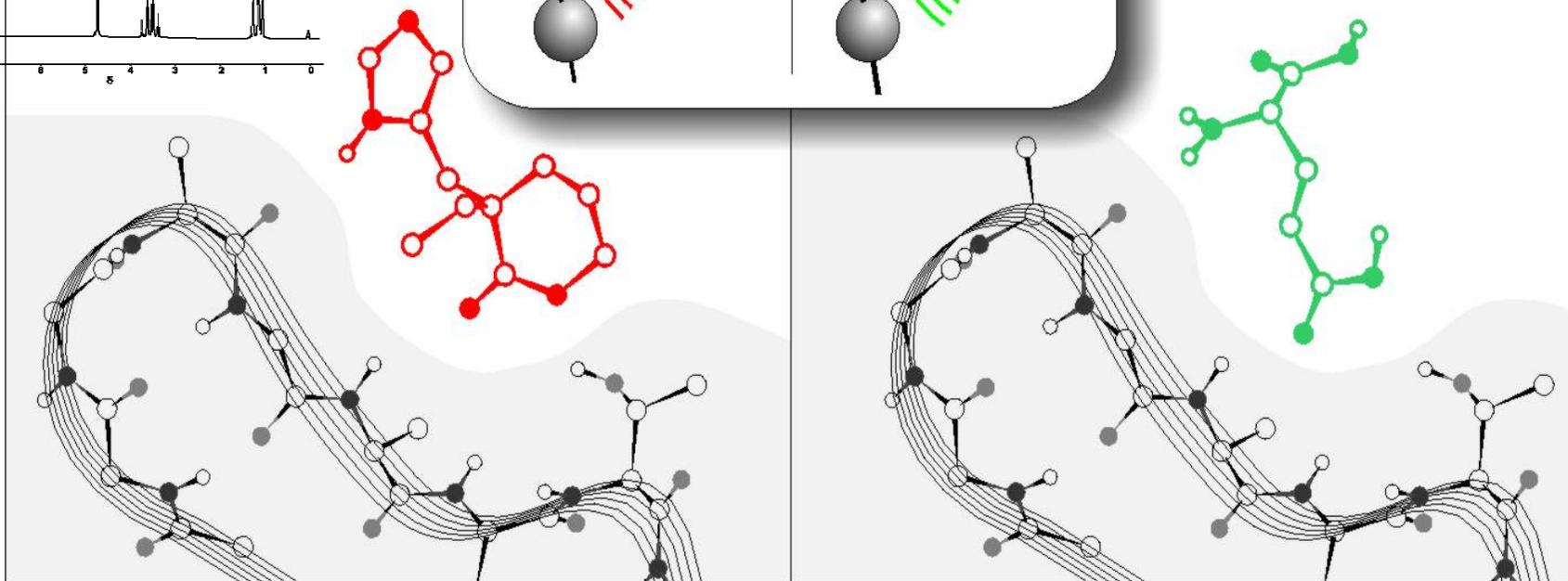
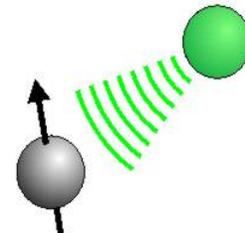
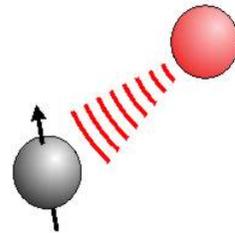
Edward Purcell  
Nobelpreis 1952



Ethanol



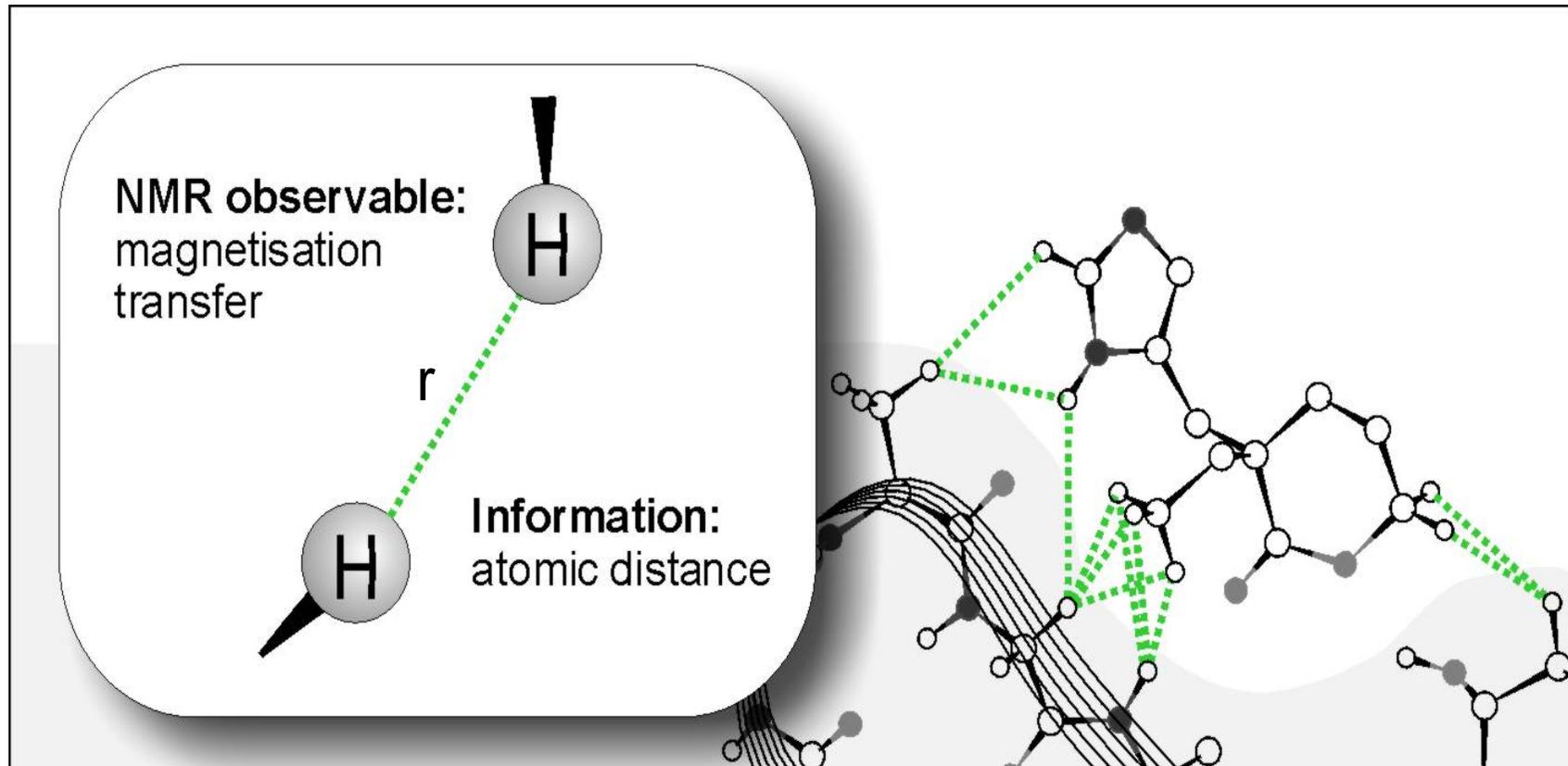
NMR observable: chemical shift  
Information: molecular binding



# Nuclear Overhauser Effekt (NOE)

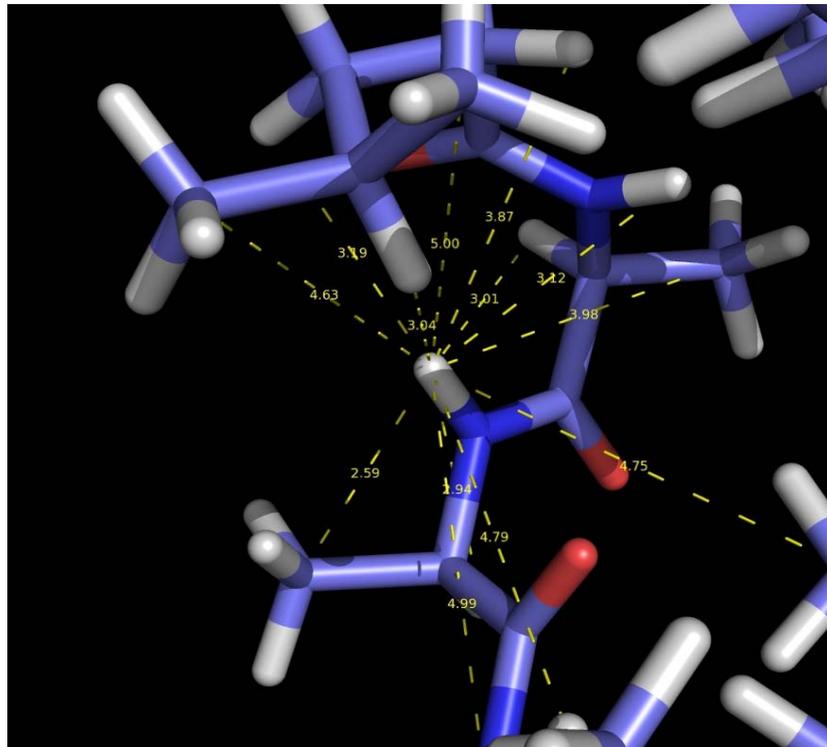
## Internukleare Abstände

Nur allernächste Abstände.  $\text{NOE} \sim r^{-6}$



**Zur Strukturbestimmung eines Proteins mißt man alle Abstände von Wasserstoffkernen (viele Tausende) und rechnet daraus die 3-dimensionale Struktur des Proteins.**

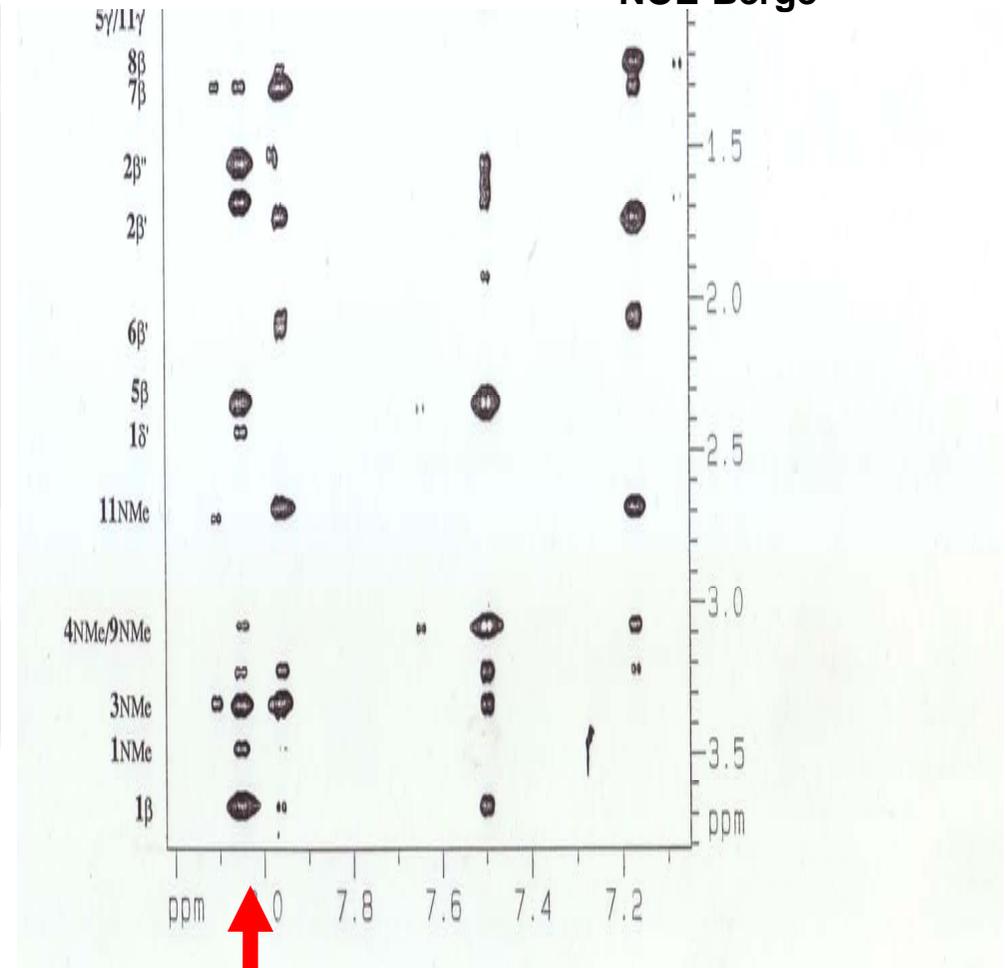
# Vom NMR-Spektrum über paarweise Distanzen zur 3D-Struktur



Je größer das Volumen des Signals, desto kürzer ist der Abstand

→ Abstandsmatrix

“Landkarte” der NOE-Berge



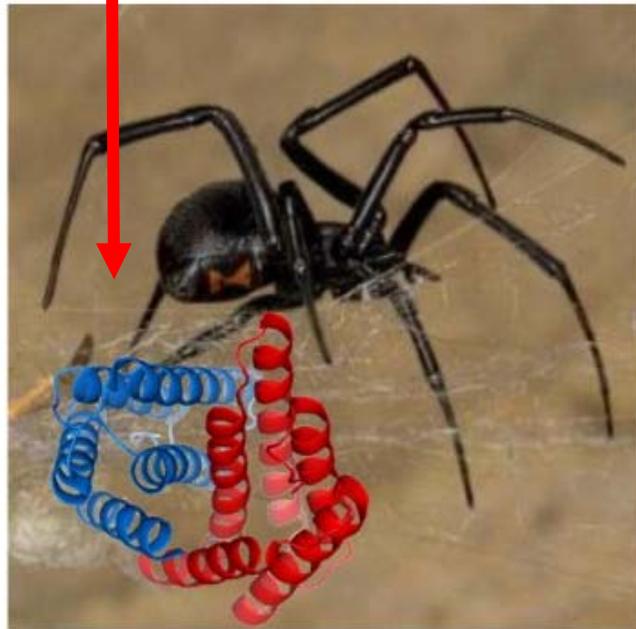
# Anfang und Ende des Spinnenseidenproteins

## Lüftung des Geheimnisses der "Arachne"

N-terminale  
Domäne

Protein: eine sehr lange Kette  
aus Aminosäuren

C-terminale  
Domäne

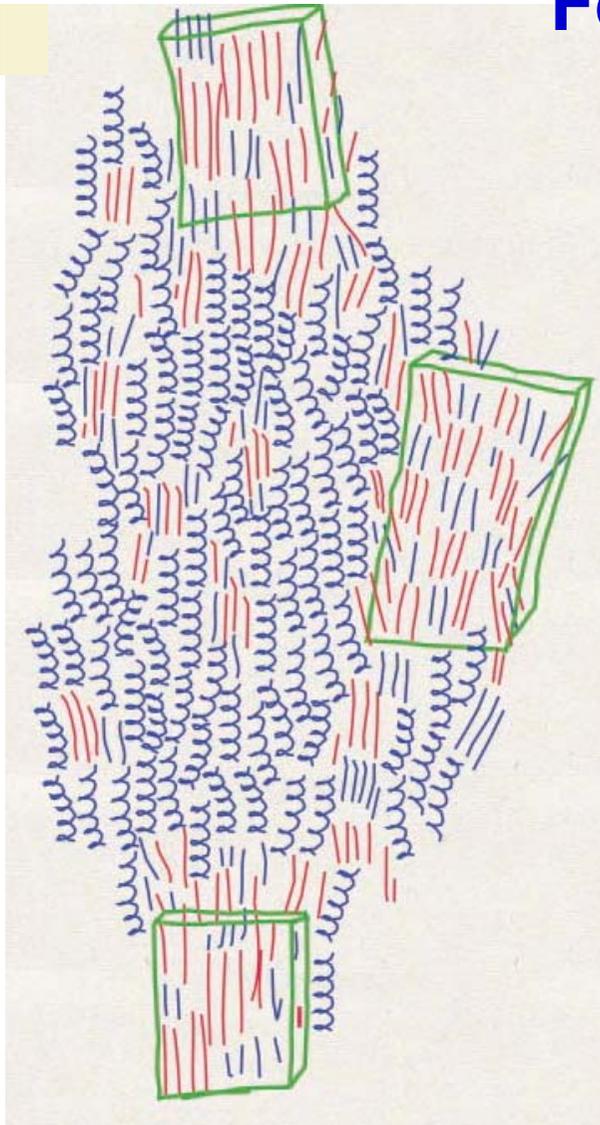


Schwarze Witwe



Kreuzspinne

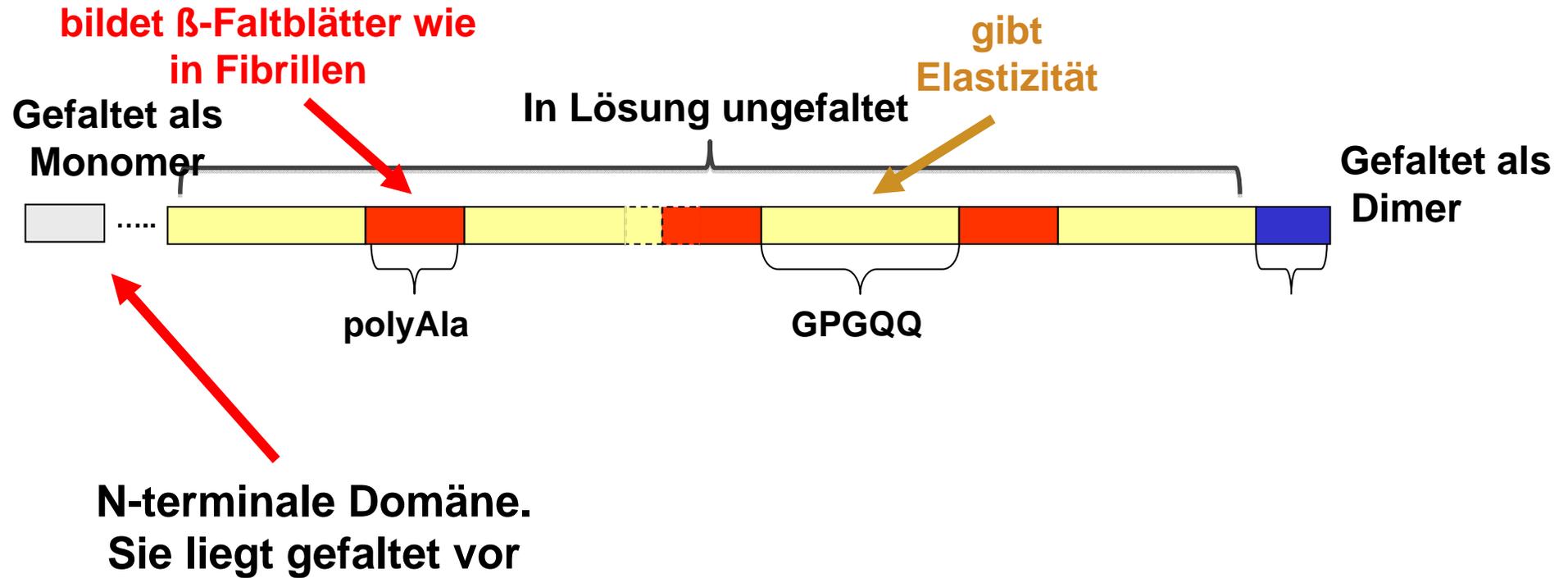
## Festkörper-NMR



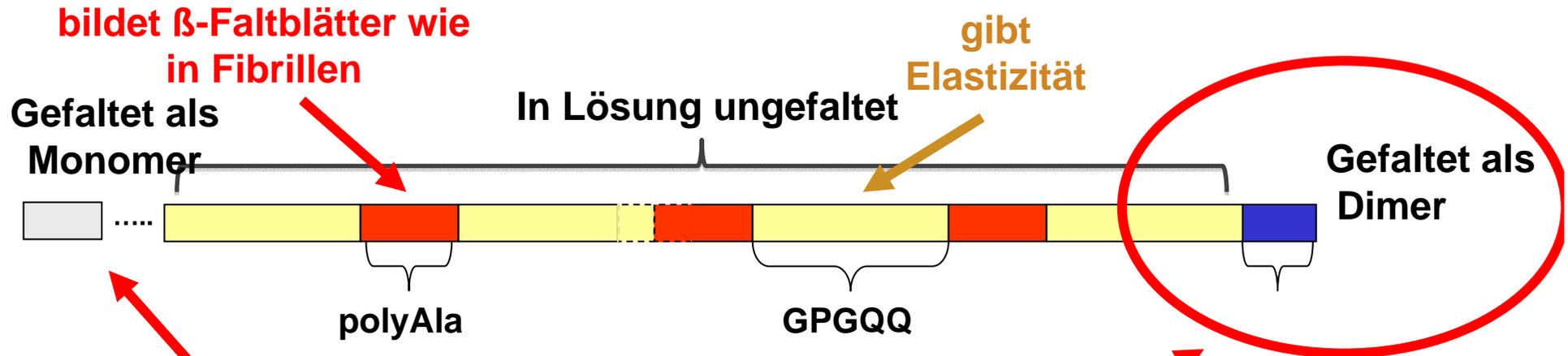
**Sowohl die  
mikrokristalline Phase als  
auch die so-genannte  
Glycin-reiche Phase sind  
entlang der Achse des  
Fadens orientiert**

J.D. van Beek, S. Hess, F. Vollrath, B.H. Meier,  
*PNAS* **2002**, 99, 10266-10271

# Modular Sequenzelemente



# Modular Sequenzelemente



**N-terminale Domäne.  
Sie liegt gefaltet vor**

**C-terminale Domäne.  
Sie liegt gefaltet vor  
und bildet Disulfid-  
verbrückte Dimere**

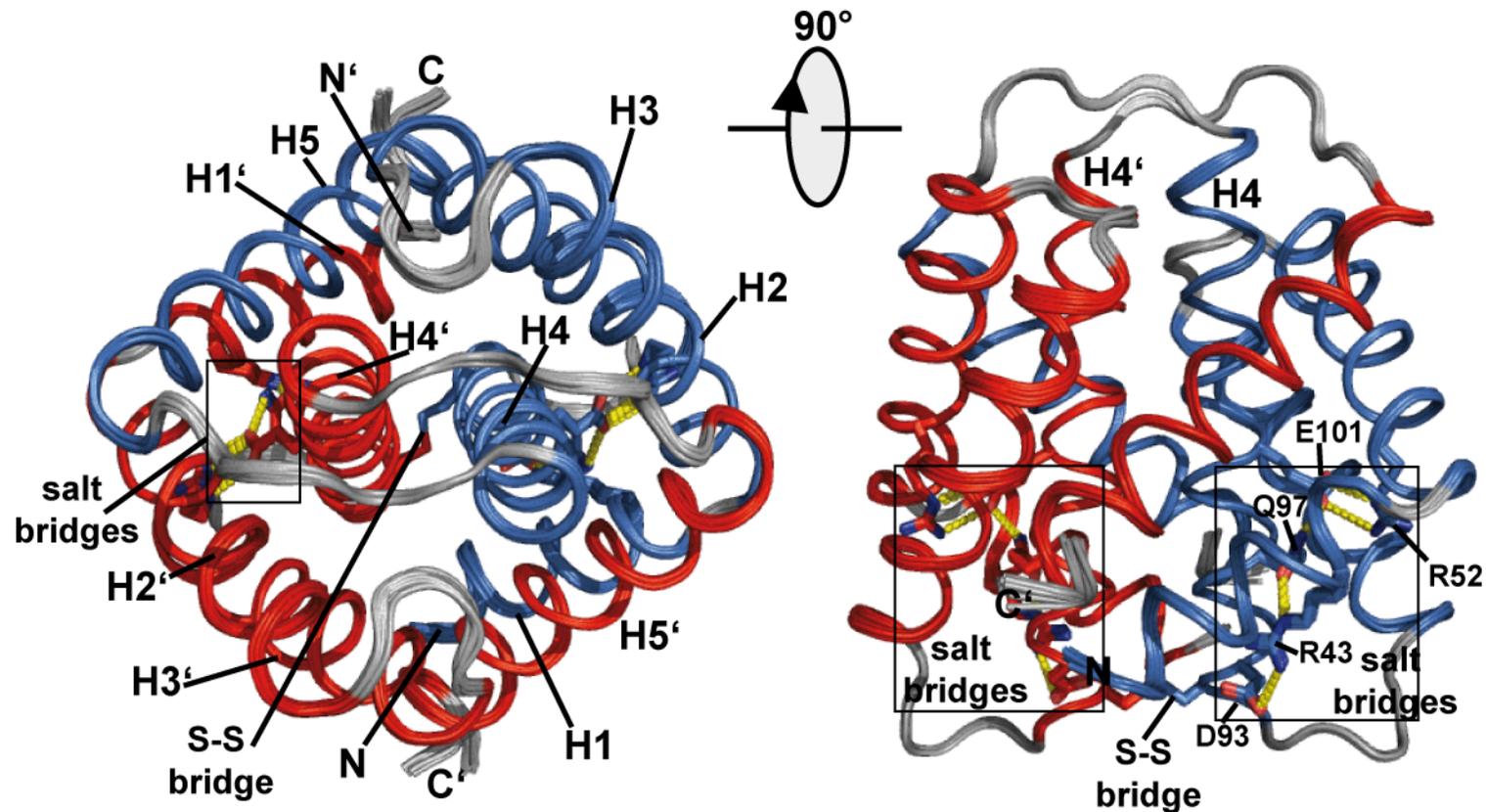


**Thomas Scheibel**

promovierte bei Johannes Buchner, auch Post-Doktorand in München, gründete die Firma Amsilk, jetzt Professor in Bayreuth

# Die NMR Struktur des dimeren Spidroins

exprimiert in *E. coli* mit mehreren spezifischen Markierungen mit Isotopen ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ )



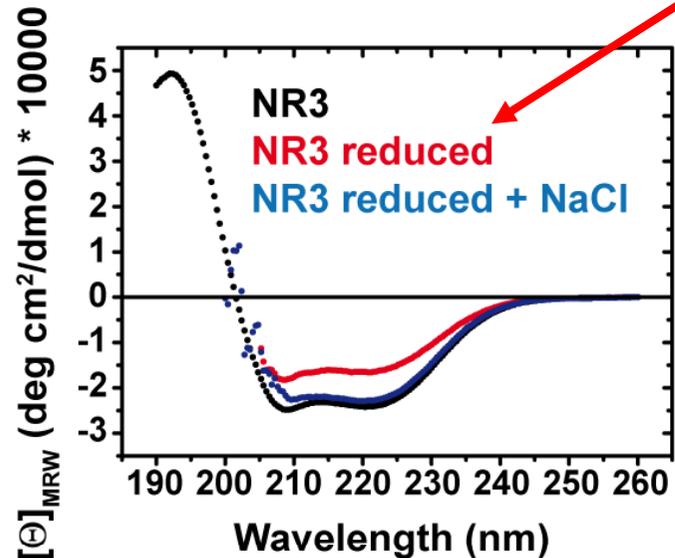
**Untereinheit A, Untereinheit B**

Rückgrat RMSD = 0.18Å

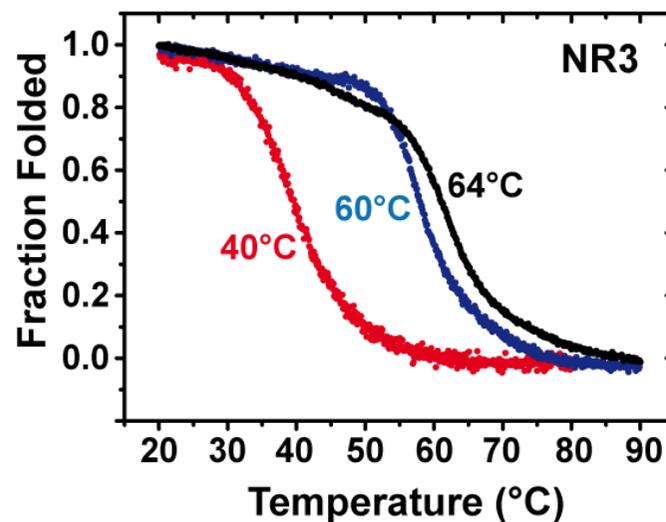
Hagn, F., Eisoldt, L., Hardy, J.G., Vendrely, C., Coles, M., Scheibel, T. and Kessler, H., *Nature* **2010**, 465, 239-242.

# Einfluss der Disulfid-Brücke auf die thermische Stabilität der CTD

Disulfidbrücke geöffnet

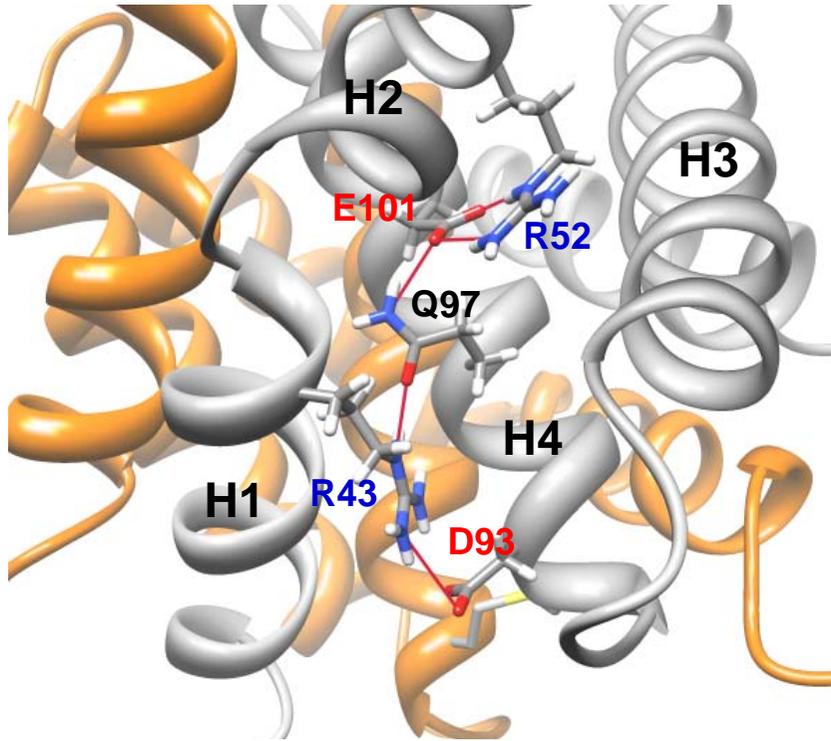


das CD Spektrum zeigt die helikale Struktur. Kochsalz stabilisiert das Protein

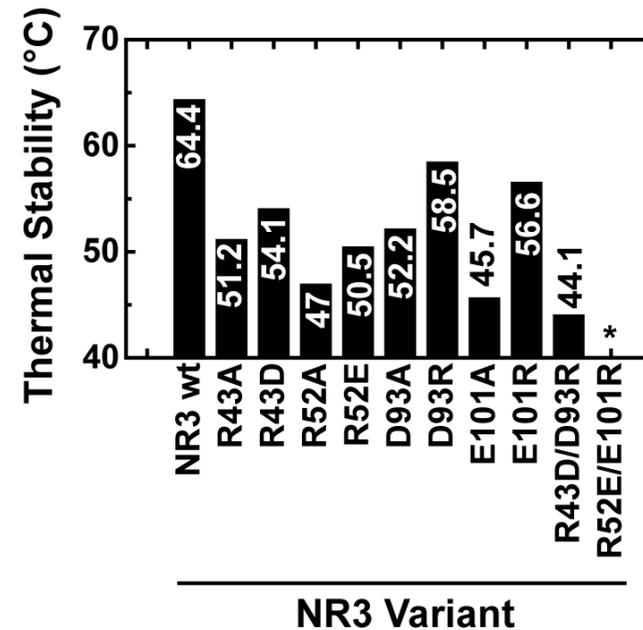
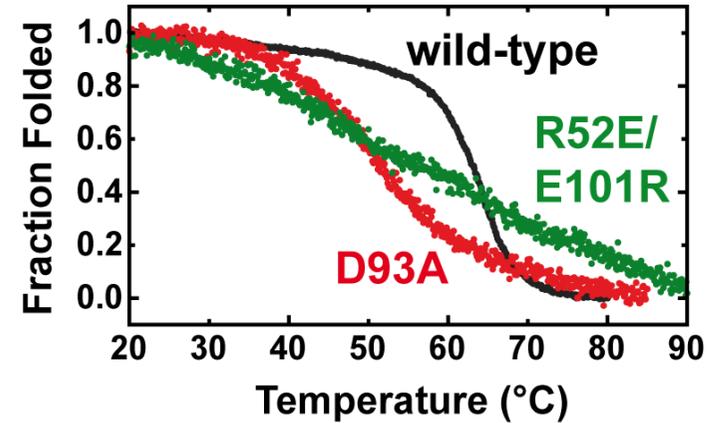


Die thermische Entfaltung geht schneller wenn die Disulfidverbrückung geöffnet wird. Kochsalz stabilisiert wieder.

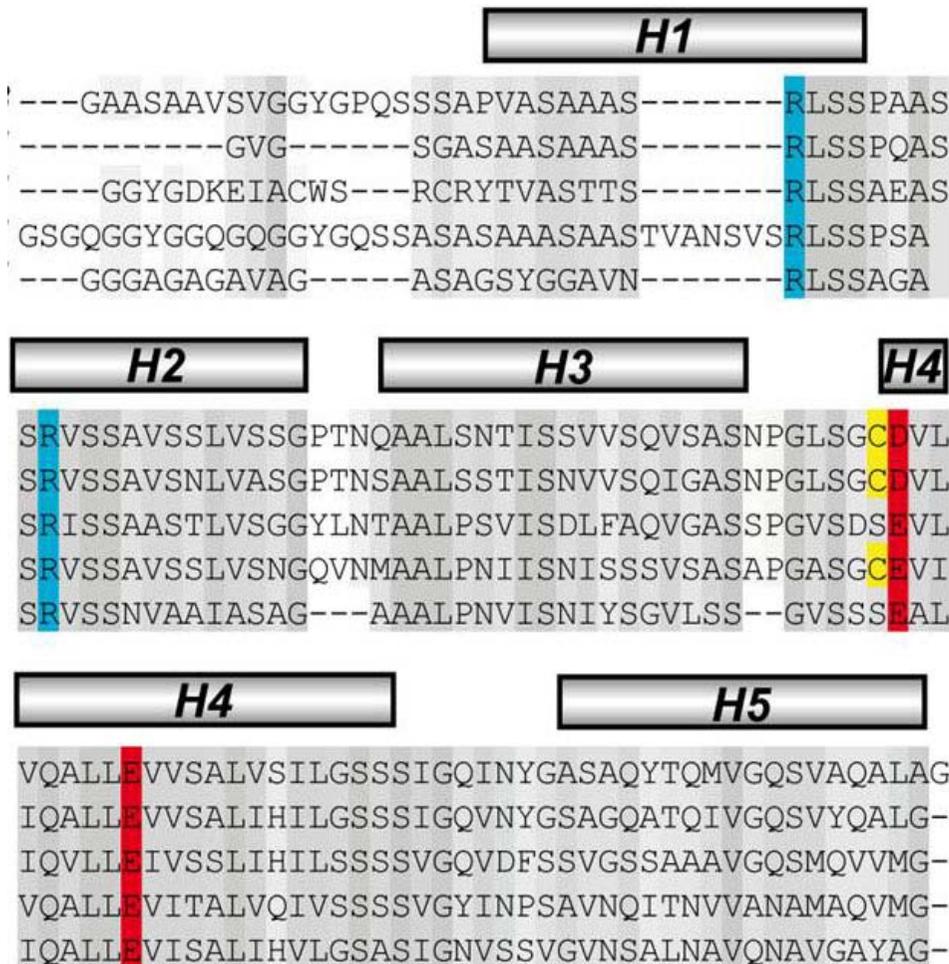
# Zwei Salzbrücken bestimmen die Stabilität der CTD (diese Salzbrücken finden sich in allen Webspinnen)



jede Veränderung in den Salzbrücken destabilisiert das Spidroin



# Zwei Salzbrücken bestimmen die Stabilität der CTD (diese Salzbrücken finden sich in allen Webspinnen)



Die hohe Konservierung der einzigen polaren Gruppen in der CTD zeigt die Bedeutung dieser Salzbrücken.

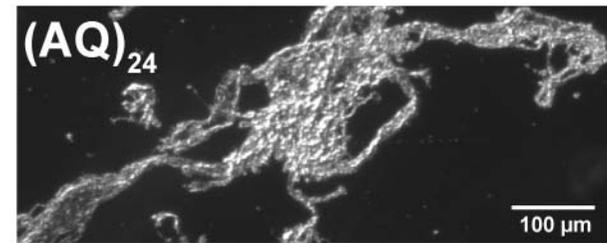
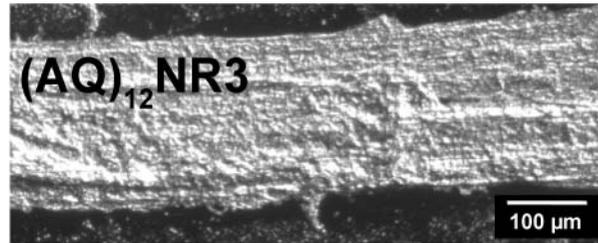
Sie finden sich in allen Webspinnen seit mehreren Hundert Millionen Jahren.

# Die CTD ist für die kontrollierte Fadenbildung essentiell

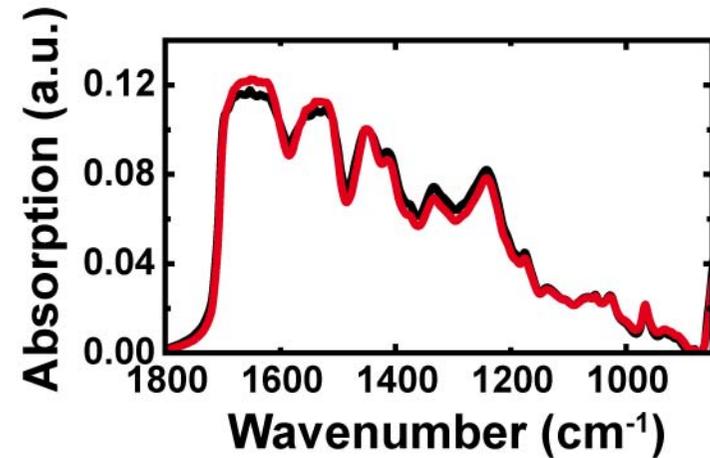
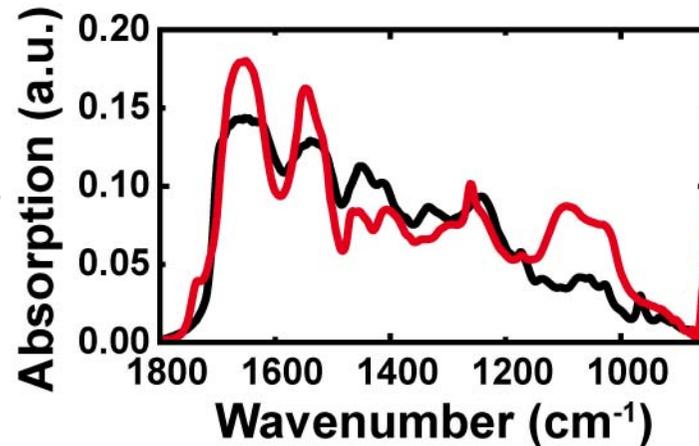
mit C-terminaler Domäne

ohne C-terminale Domäne

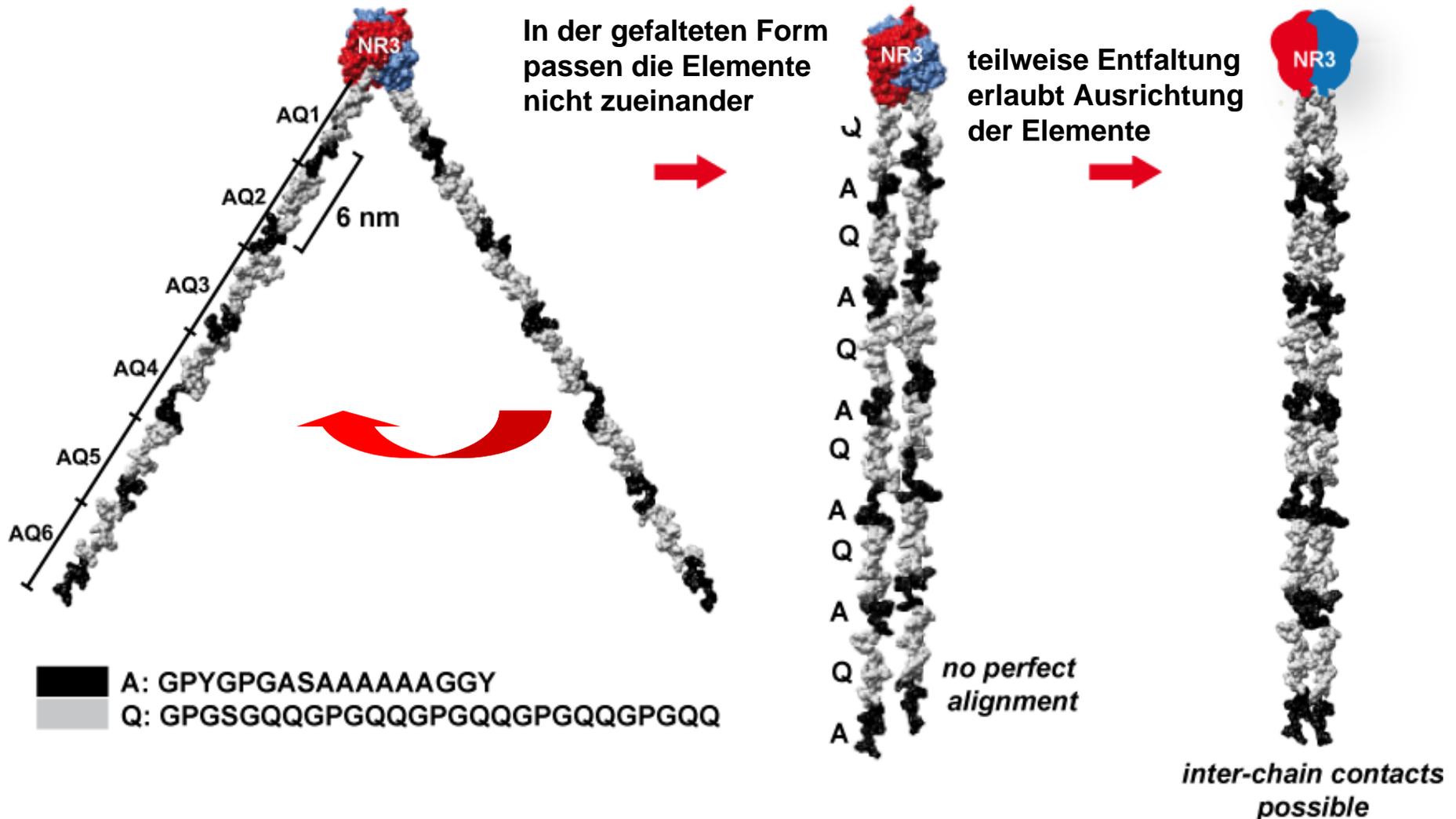
optische  
Mikroskopie



Infrarot-  
Spektroskopie

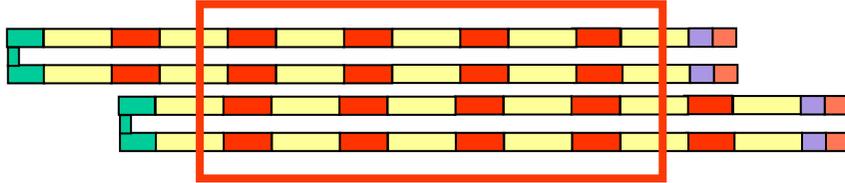


# In der Speicherform können die poly-Ala Segmente (schwarz) sich nicht richtig anordnen



F. Hagn, L. Eisoldt, J. Hardy, C. Vendrely, M. Coles, T. Scheibel, H. Kessler, *Nature* **2010**, 465, 239-242.

# Schematischer Aufbau des Spinnfadens

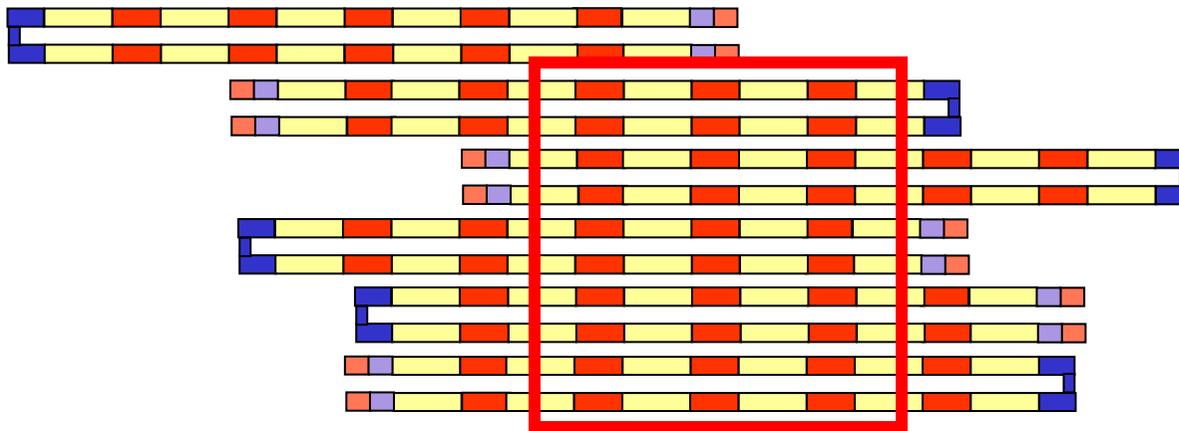


Durch die partielle Entfaltung des **C-terminalen Domäne** gibt es erste Kristallisationskeime

Daran kann sich ein weiteres dimeres Spidroinmolekül anlagern

# Schematischer Aufbau des Spinnenfadens

Die **poly-Ala-Sequenzen** lagern sich zusammen und bilden mikrokristalline Bezirke



**Die Rolle der CTD ist jetzt klar  
("Schalter für Aggregation")**

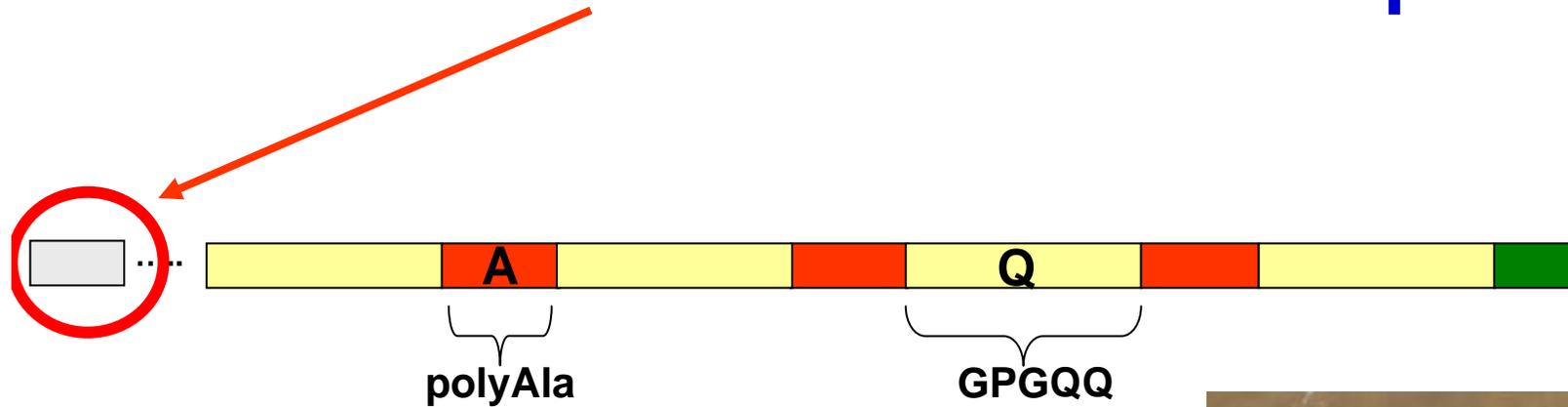
**aber**

**Was ist die Rolle der N-  
terminalen Domäne ?**

**Wie bilden sich die Mizellen unter  
den Speicherbedingungen?**

**Woraus resultiert die extreme  
mechanische Festigkeit ?**

# Die N-terminale Domäne des Spidroins



F. Hagn, C. Thamm, T. Scheibel, H. Kessler  
*Angew.Chem.Int. Ed.* **2011**, *50*, 310-313.

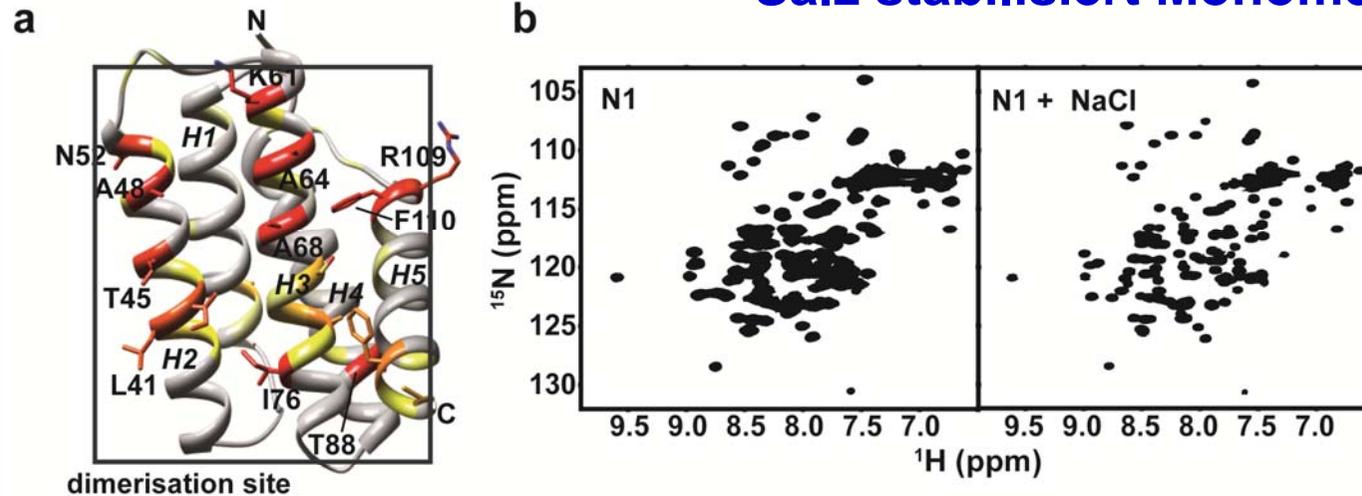
**Latrodectus hesperus**  
(Schwarze Witwe)



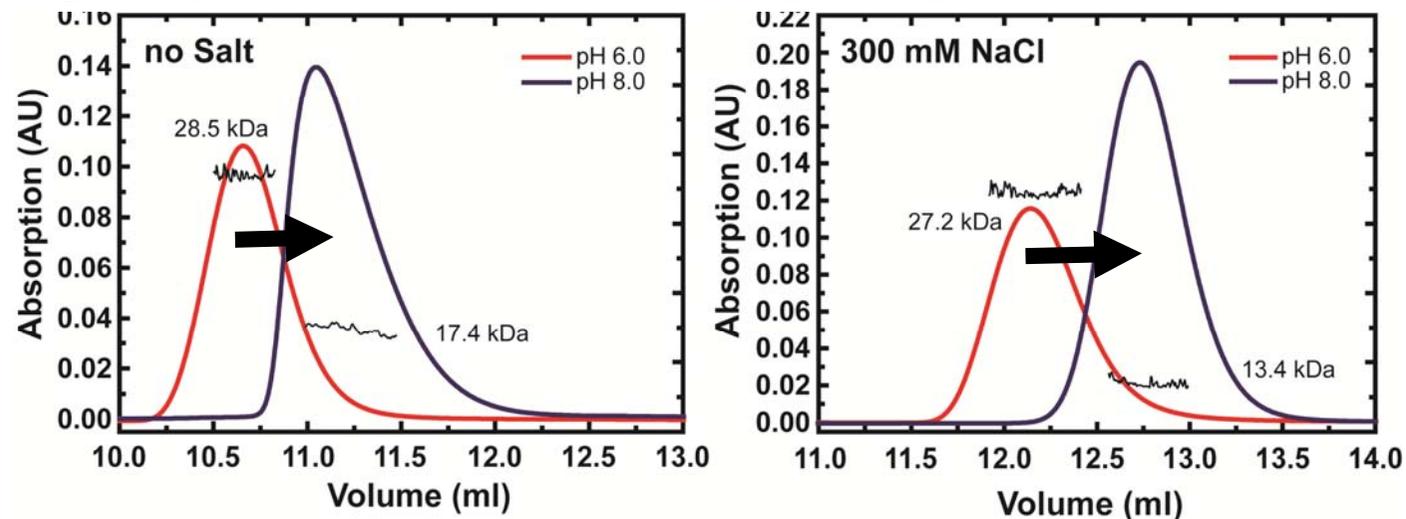


# Größen-Ausschluss-Chromatographie und MS bei verschiedenem pH

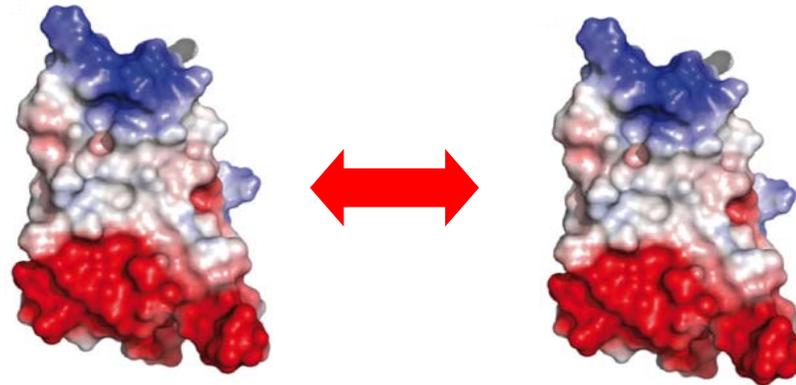
Salz stabilisiert Monomer



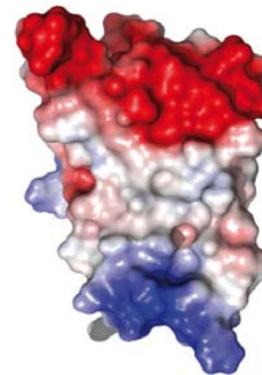
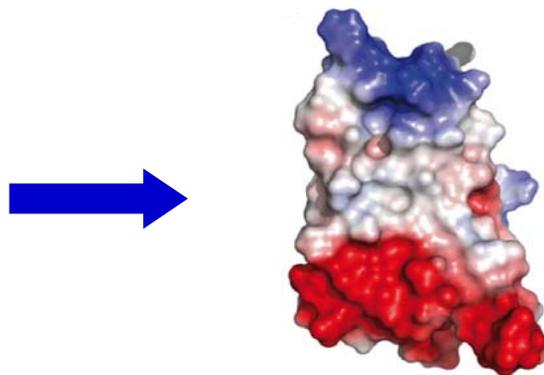
niedriger pH dimer; hoher pH (partiell) monomer



# Die Orientierung der NTD-Dipole ist entscheidend



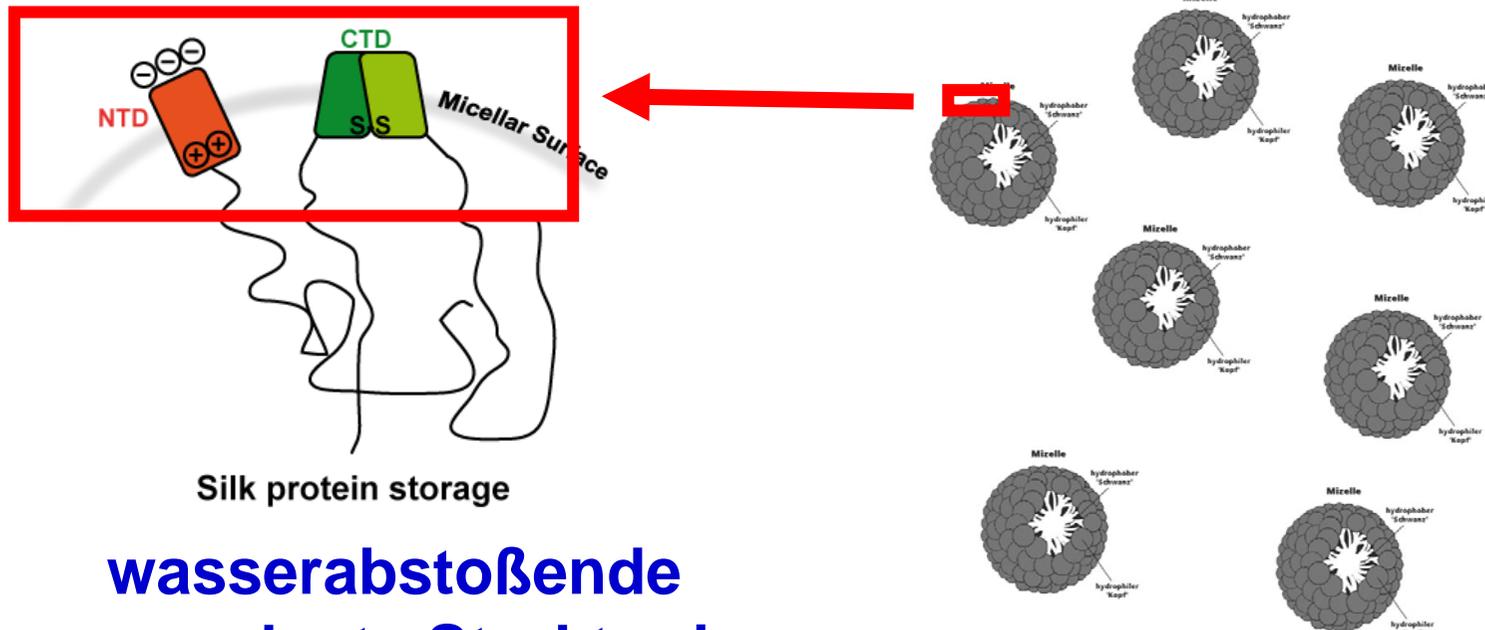
**Ladungen  
stoßen sich ab**



**Ladungen  
ziehen sich an**

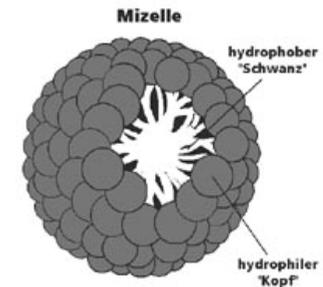
# Speicherung

## Wasserphase



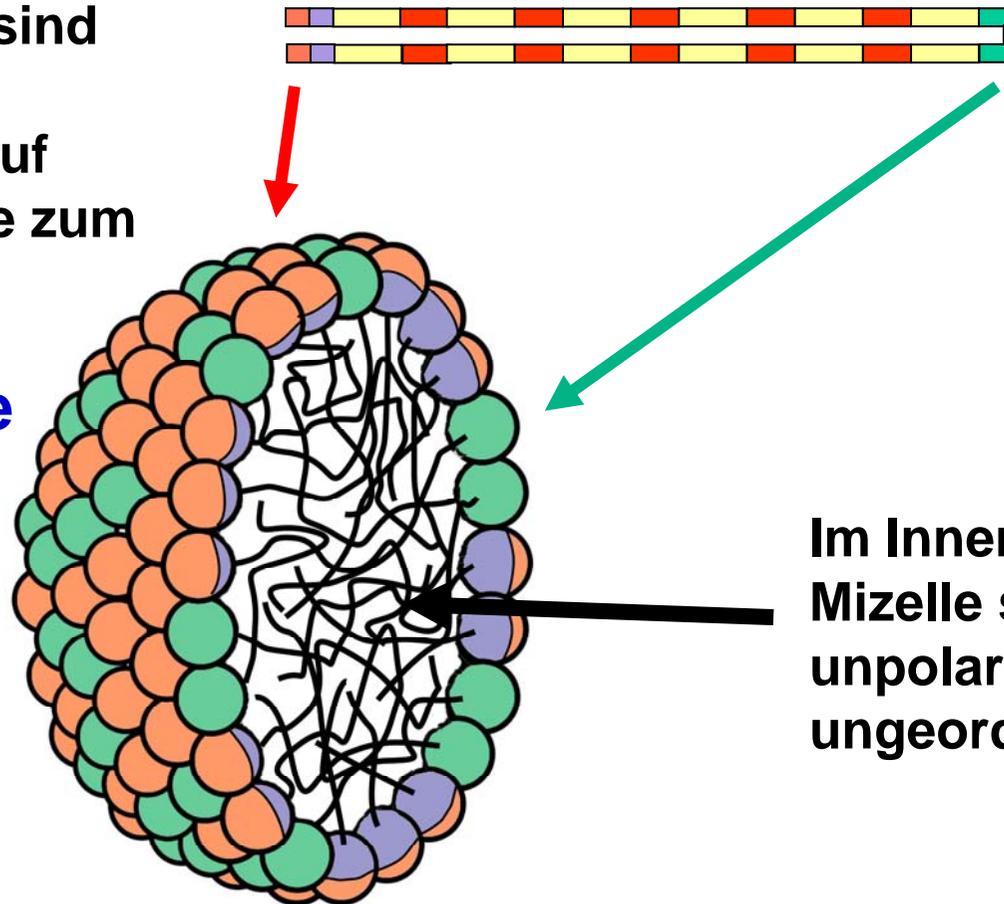
**wasserabstoßende  
ungeordnete Struktur im  
Inneren der Mizelle**

# Speicherung in hoher Konzentration in Mizellen



In der Mizelle sind die polaren Endgruppen auf der Oberfläche zum Wasser

**Wasserphase**

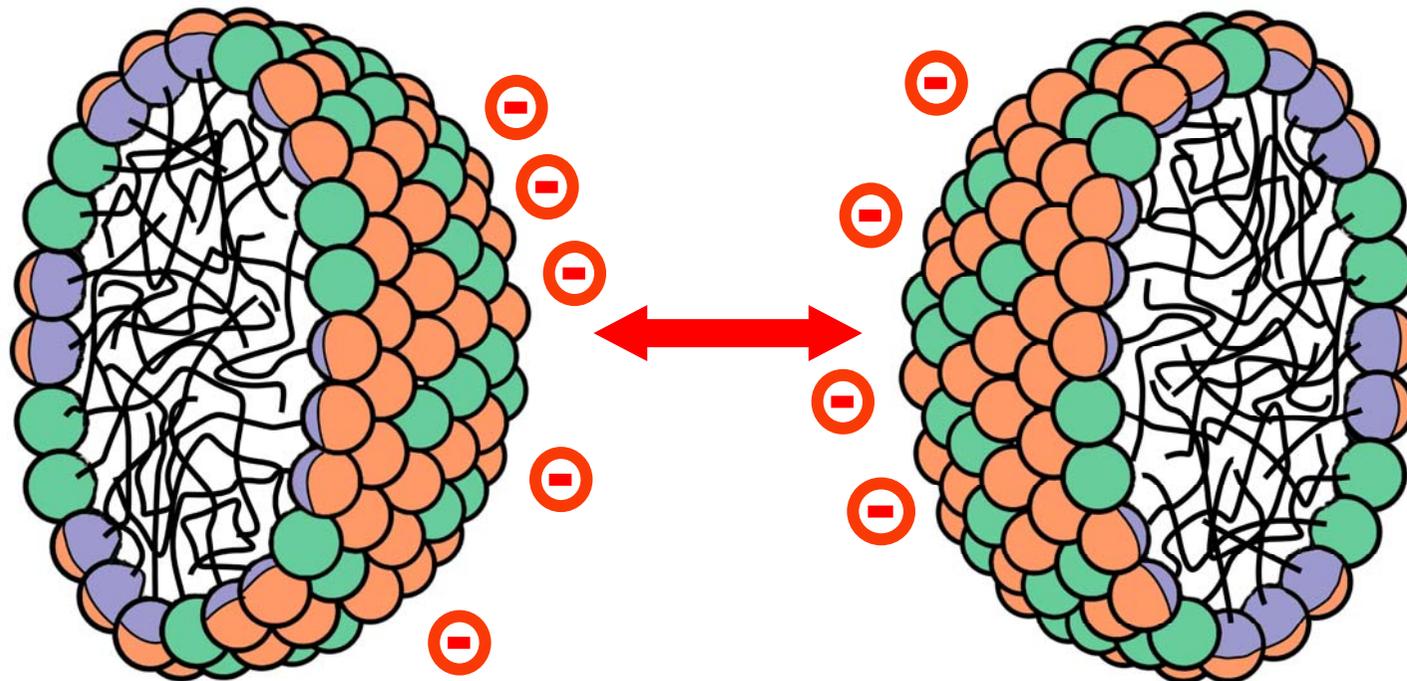


Im Inneren der Mizelle sind die unpolaren Ketten ungeordnet

# Speicherung in hoher Konzentration in Mizellen

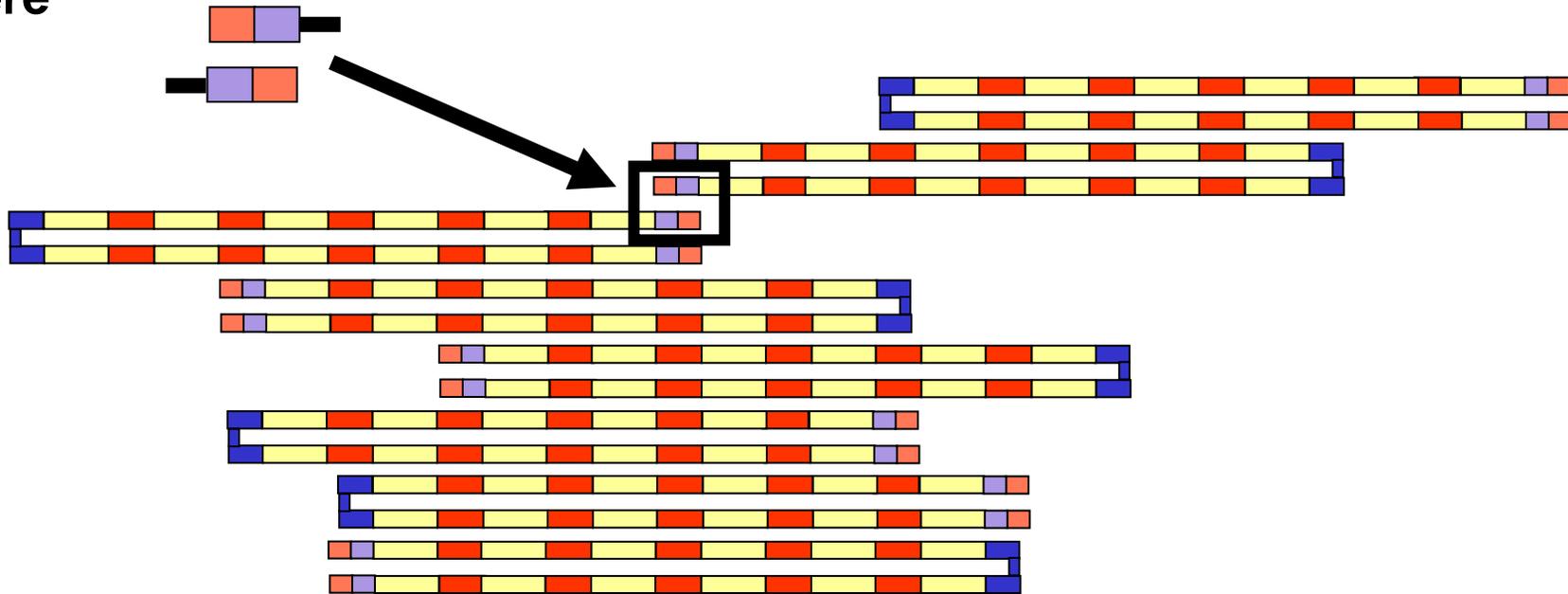


Die N-terminalen Domänen sind ausgerichtet und zeigen die negativ geladene Seite nach außen. Die Abstoßung verhindert die Aggregation der Mizellen.



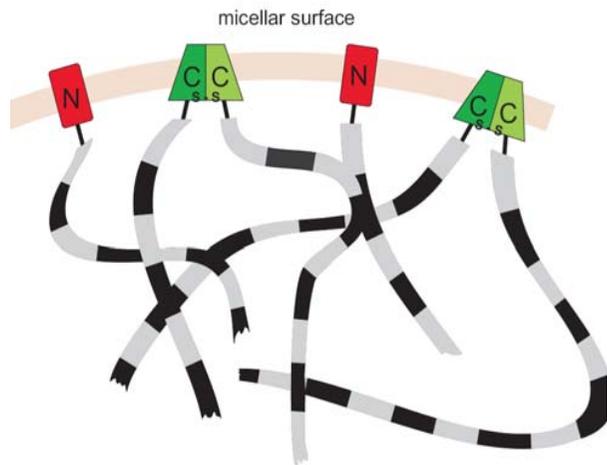
# Schematischer Aufbau des Spinnenfadens

Die freien N-terminalen Domänen dimerisieren als Kopf-Schwanz-Dimere



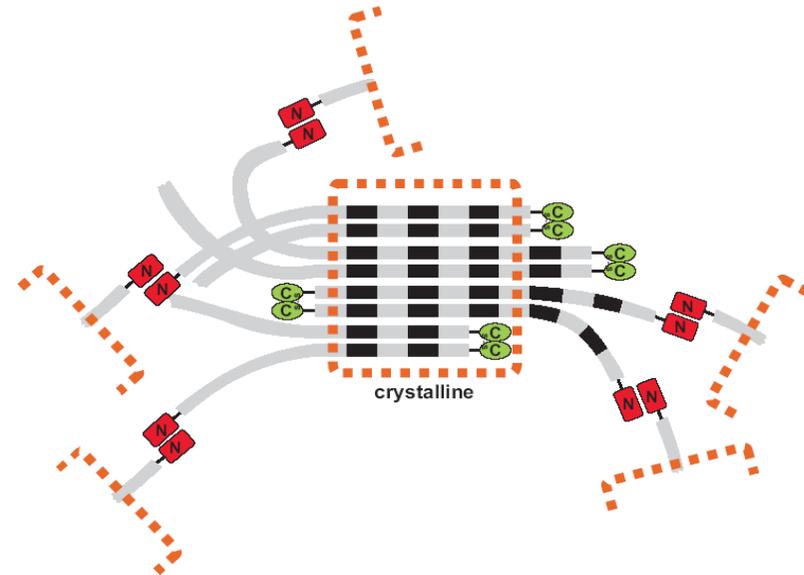
# Multivalente Verankerung verursacht die extreme Festigkeit der Spinnenseide

pH etwa 7.0  
hohe Salzkonzentration



Speicherung in  
der Spinndrüse

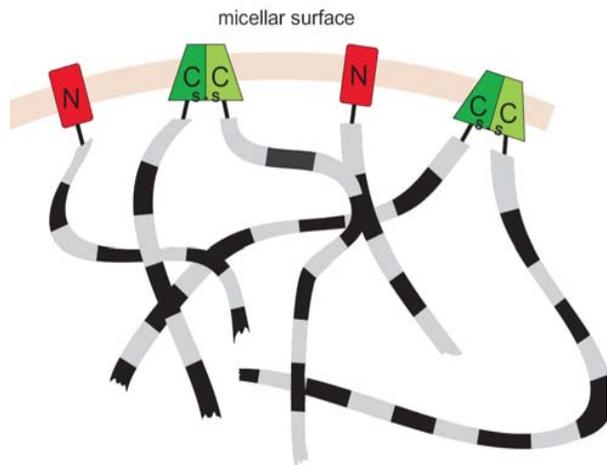
pH sinkt auf 6.0  
niedrige Salzkonzentration



Im Kanal wird der Faden  
gebildet

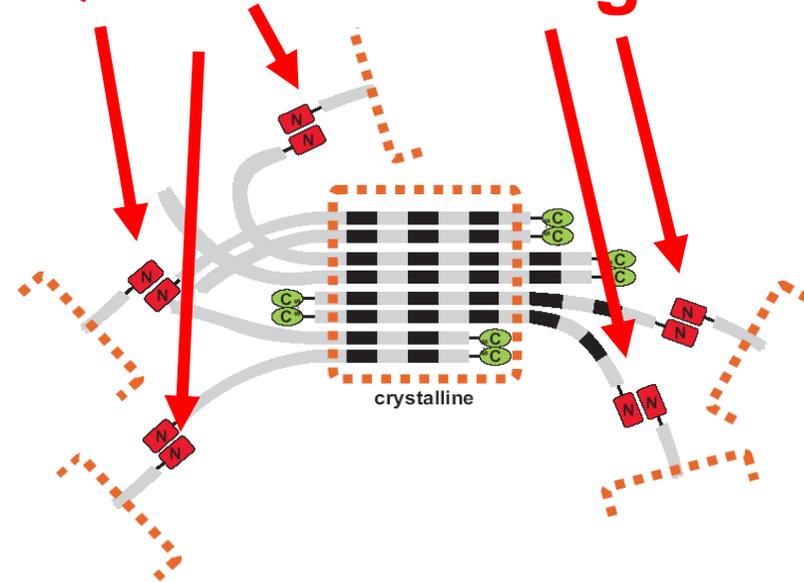
# Multivalente Verankerung verursacht die extreme Festigkeit der Spinnenseide

pH etwa 7.0  
hohe Salzkonzentration



Speicherung in der Spinndrüse

multivalente  
Quervernetzung



Im Kanal wird der Faden gebildet

*Die Spinnerinnen (Die Fabel der Arachne)* (Diego Velázquez, 1644-1648).

# Arachnes Geheimnis



*Die Spinnerinnen (Die Fabel der Arachne) (Diego Velázquez, 1644-1648).*

# Arachnes Geheimnis

1. Speicherung in Mizellen:  
verhindert Aggregation

2. Von der Drüse in den Kanal:  
Scher- und Zugkräfte orientieren die Stränge

3. Änderung der Salzkonzentration:  
teilweise Entfaltung der CTD erlaubt die  
Ausrichtung

4. Bei niedrigem pH dimerisiert die NTD:  
multivalente Quervernetzung

# Application of Artificial Spider Silk

## Firma Amsilk

Ausgründung der TUM



### Thomas Scheibel

Doktorarbeit bei J. Buchner  
(TUM)

Habilitation 2007 (TUM)

ab 2007 Lehrstuhl  
Biotechnologie in Bayreuth

"Biosteel", also biologischen Stahl, nennt die Firma AMSilk ihr neues Produkt: Es ist eine Faser aus künstlich hergestellter Spinnenseide, und sie ist 25-mal so belastbar wie ein vergleichbarer Stahldraht.

Thomas Scheibel setzte es sich in den Kopf, die chemischen und mechanischen Prozesse, die beim Erzeugen der Seidenfäden ablaufen, aufs Genaueste zu erforschen und dann technisch nachzuahmen. Scheibels Team zusammen mit Arbeitsgruppen von Andreas Bausch und Horst Kessler gelang es im Jahr 2008 erstmals, einen künstlichen Spinnkanal zu bauen.

**2010 entschlüsselten die Wissenschaftler dann die molekularen Grundlagen der Fadenproduktion in der Spinndrüse.**

**Und 2011 konnten sie schließlich zeigen, auf welchen Mechanismen die enorme Festigkeit des Spinnenseidenfadens beruht.**

Die Welt, 29.5.2013

**"Derzeit ist eine Pilot-Spinnanlage im Bau", berichtet Axel Leimer. Das Rohmaterial wird mithilfe gentechnisch veränderter Kolibakterien biotechnologisch hergestellt. "Wir produzieren es heute im 100-Kilogramm-Maßstab in einer kleinen Pilotanlage im Technikum des Forschungszentrums für Weiße Biotechnologie auf dem TUM-Campus in Garching, demnächst weiten wir das aus, dann haben wir Tonnen des Ausgangsmaterials zur Verfügung."**

**Die Welt, 29.5.2013**

## **Biomaterialien aus Spinneseide**

**z.B. zur Abdeckung von Wunden  
(nicht immunogen, stabil, bioabbaubar)**

# Danksagung



## Spider Silk

**Franz Hagn**

Lucas Eisold

Thomas Scheibel

Murray Coles

## Hsp90 + Sti1

**Franz Hagn**

**Stephan Lagleder**

Johannes Buchner

Michael Groll et al.

## p53

Alexander Dehner

**Franz Hagn**

Christian Klein

Johannes Buchner

Ute Moll

## Hsp12

**Franz Hagn**

Johannes Buchner

Linda Hendershot

et al.

## Hsp90

**Franz Hagn**

**Stephan Lagleder**

Johannes Buchner

Linda Hendershot

et al.

# Danksagung



p53

Alexander Dehner

**Franz Hagn**

Christian Klein

Johannes Buchner

Ute Moll

Hsp12

Spider Silk

**Für diese Arbeiten wurde Franz Hagn u.a. mit dem Sommerfeldpreis 2012 der Bayerischen Akademie der Wissenschaften ausgezeichnet**

**Er war als Post-Doktorand an der Harvard Medical School in Boston und ist seit letztem Jahr Professor am Institute for Advanced Study der TU München**

**Michael Groll et al.**

Franz Hagn  
Johannes Buchner  
Linda Hendershot

Hsp90  
Franz Hagn  
Stanban Lagleder  
Johannes Buchner  
Linda Hendershot  
et al.

**Vielen Dank  
für die  
Aufmerksamkeit**

