

**Strukturelle und immunologische
Charakterisierung der Spinnenseide von
*Nephila clavipes***



Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

von Dipl. Biol. Alexander Sponner

geboren am 18.2.1962 in Ludwigsburg

1	EINLEITUNG	1
1.1	SEIDE	1
1.2	SPINNENSEIDE	3
1.3	NOMENKLATUR DER SEIDENPROTEINE	5
1.4	BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE	6
1.5	STRUKTURELLER AUFBAU	11
1.6	FRAGESTELLUNGEN	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	SPINNEN	16
2.2	GEWINNUNG DER SEIDENPROBEN	16
2.3	GEWINNUNG DER DRÜSENEXTRAKTE UND GEWEBE	16
2.4	GEWINNUNG REKOMBINANTER POLYPEPTIDE	18
2.4.1	<i>Klonierung</i>	18
2.4.2	<i>Expression und Reinigung</i>	19
2.4.2.1	Medien.....	19
2.4.2.2	Transfektion	20
2.4.2.3	Expression	20
2.4.2.4	Zellaufschluss.....	20
2.4.2.5	Affinitätschromatographie	21
2.4.3	<i>Charakterisierung der rekombinanten Polypeptide</i>	21
2.4.3.1	Gelelektrophorese.....	21
2.5	GEWINNUNG DER EINGESETZTEN ANTISEREN	22
2.5.1	<i>Antiseren gegen Seide</i>	22
2.5.2	<i>Antiseren gegen rekombinante Polypeptide</i>	22
2.5.2.1	Antiseren aus Kaninchen.....	22
2.5.2.2	Antiseren aus Hühnern	23
2.5.2.2.1	Aufreinigung der IgY-Fraktion aus Eidotter:.....	23
2.5.3	<i>Charakterisierung der Antiseren</i>	24
2.5.4	<i>Nachweis von Spidroinen in gelöster Seide</i>	24
2.6	GELEKTROPHORESEN UND WESTERN BLOTTING	24
2.6.1	<i>Diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli⁶⁹)</i>	25
2.6.2	<i>Färbung mit Coomassie Brilliant Blue</i>	26
2.6.3	<i>Silberfärbung</i>	26
2.6.4	<i>Western Blotting und immunologische Detektion</i>	27
2.6.4.1.1	Western Blotting ⁷⁰	27
2.6.4.1.2	Detektion	28
2.6.5	<i>Isoelektrische Fokussierung</i>	29
2.7	SEQUENZVERGLEICH DER C-TERMINI	29
2.8	MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FADENSTRUKTUR	30
2.8.1	<i>Einfluss von Lösemitteln</i>	30
2.8.2	<i>Säureabdaupversuche</i>	31
2.8.3	<i>Einbettung in EPON</i>	32
2.9	NACHWEIS DER VERTEILUNG VON SPIDROINEN IN FÄDEN UND DRÜSEN.....	33
2.9.1	<i>Einbettung von Fäden in LR-White</i>	33
2.9.2	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	33
2.9.3	<i>Elektronenmikroskopie</i>	34

3	ERGEBNISSE	35
3.1	BIOCHEMISCHE ARBEITEN.....	35
3.1.1	<i>Rekombinante Spidroine</i>	35
3.1.2	<i>Herstellung und Reinigung der Antiseren.....</i>	37
3.1.3	<i>Charakterisierung der Antiseren.....</i>	39
3.1.4	<i>Untersuchungen zum C-Terminus der Spidroine.....</i>	41
3.1.4.1	Nachweis der C-terminalen Peptidsequenzen in Seide und Drüsen	42
3.1.4.2	Sequenzvergleich	44
3.1.4.3	Strukturelle Betrachtungen zur Konservierung der C-Termini	46
3.1.4.4	Phylogenetische Betrachtungen	48
3.1.4.5	Beteiligung des C-Terminus an der Bildung von Disulfidbrücken.....	50
3.1.5	<i>Experimente zur Natur des Drüseninhalts</i>	51
3.1.5.1	N-terminale Degradation.....	51
3.1.5.2	Der hochmolekulare Anteil des Inhalts der Ampulle.....	53
3.1.5.3	Isoelektrische Fokussierung	56
3.1.5.4	Begonnene Untersuchungen zu Proteinmodifikation und Prozessierung	57
3.1.5.4.1	Lektine.....	58
3.2	MIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER SEIDE.....	60
3.2.1	<i>Untersuchung der Fadenproben</i>	60
3.2.2	<i>Untersuchung der mikroskopischen Fadenstruktur</i>	61
3.2.3	<i>Einfluss verschiedener Lösemittel auf den Faden.....</i>	62
3.2.4	<i>Einfluss chaotroper Agenzien und Säuren</i>	65
3.3	HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	68
3.3.1	<i>Histochemische Charakterisierung nativer Seide mittels Lektinen.....</i>	68
3.3.2	<i>Histochemische Charakterisierung der säure-resistenten Hüllschicht.....</i>	69
3.3.3	<i>Verteilung der Spidroine im Faden.....</i>	70
4	DISKUSSION	75
4.1	BIOCHEMISCHE ARBEITEN.....	75
4.1.1	<i>Charakterisierung der Antiseren.....</i>	75
4.1.2	<i>C-Terminus.....</i>	76
4.1.3	<i>Drüseninhalt und Seide</i>	79
4.2	MIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER SEIDE.....	82
4.3	HISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER SEIDE.....	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	LITERATUR.....	6-I
7	ANHANG	7:I
7.1	ABKÜRZUNGSLISTE	7:I
7.2	DANKSAGUNG	7:III

1 Einleitung

1.1 SEIDE

Wenn von Seide gesprochen wird, sind meist das aus den Kokons des Seidenspinners *Bombyx mori* gewonnene Garn und die daraus gewebten Stoffe gemeint. Das ist nicht verwunderlich, denn Seide ist eines der ältesten textilen Luxusgüter, das über Jahrhunderte als Symbol für Wohlstand und Macht galt und noch heute aufgrund des besonderen Gefühls auf der Haut als Synonym für erotisches Fluidum gilt. Der Sage nach soll die chinesische Kaiserin Si-Ling-Chi um 3.000 v. Chr. aus Angst vor einer Schlange auf einen Maulbeerbaum geflüchtet sein und beobachtet haben, wie eine unscheinbare Raupe sich in einen glänzenden Faden einhüllte. Die Kaiserin dachte sich, es sei schön, sich selbst in einen so schönen Faden einzuhüllen. Si-Ling-Chi wurde durch ihre Entdeckung zur Schutzherrin und Göttin der Seidenraupen.

Zwar hat uns die „chemische Revolution“ der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts eine ganze Reihe neuer „Kunstseiden“ beschert, jedoch haben diese Kunstfasern die Eigenschaften ihres natürlichen Vorbilds nur teilweise erreicht. Nichtsdestotrotz hat diese Konkurrenz bewirkt, dass sich die Wissenschaft nicht zuletzt in klassischen Seidenländern wie etwa Japan, China oder Indien der Seide angenommen hat. Die Gewinnung von Seide ist noch heute ein aufwändiges, handarbeitliches Verfahren. Der Marktpreis für Naturseide liegt um das 4-20-fache über dem von Nylon und damit etwa im Bereich von Hochleistungskunstfasern wie z.B. Kevlar oder Twaron¹. Mit 70000 Tonnen erreicht dabei die Jahresproduktion nur einen Bruchteil des Ausstoßes an Kunstfasern. Folglich sind Wege zur Steigerung der Produktion sowie zur Rationalisierung und Automatisierung der Gewinnungsprozesse gefragt. Ein zweiter Gedanke, die Konkurrenzfähigkeit zu verbessern, liegt in der Veredelung des Produkts und damit der Erweiterung der Applikationsmöglichkeiten. Beides scheint heute durch biotechnologische Verfahren erreichbar. Tatsächlich sind mittlerweile bei der Seide von *Bombyx mori* die beteiligten Gene und Proteine sowie Proteinmodifikationen aufgeklärt (siehe hierzu z.B. ^{2,3}) und damit die ersten, großen Schritte in diese Richtung getan.

Seiden werden aber nicht nur vom Seidenspinner *Bombyx mori* gesponnen. Man findet seidenproduzierende Arten bei Insekten, Arachniden und Myriapoden, so dass sich diese Fähigkeit auf die sehr große phylogenetische Gruppe der Arthropoden verteilt. Wahrscheinlich hat sich die Fähigkeit, Seide zu bilden, monophyletisch von einem gemeinsamen onychophorenähnlichen Vorfahren aus entwickelt⁴. Die verschiedenen Spezies verwenden das Material zu recht unterschiedlichen Zwecken und dieses hat dementsprechend auch sehr unterschiedliche Eigenschaften.

Es gab immer schon Bemühungen, auch die Seiden dieser Arten zu nutzen. So berichtete z.B. Nature 1898 über eine französische Firma bei Paris, die sehr leichte und starke Seile aus Spinnenseide herstellte, aber die Kosten der Herstellung überstiegen die von Seide bei weitem⁵. Auch wenn sich die wirtschaftliche Nutzung damals nicht realisieren ließ, sind diese Seiden nicht nur aus rein akademischen Gesichtspunkten wissenschaftlich untersucht worden, denn durch biotechnologische Verfahren ließen sich auch diese Seidenproteine in wirtschaftlichen Maßstäben produzieren. In der Tat sind Bestrebungen im Gange, die Expression von Spinnenseidengen in Ziegen (Nexia Biotechnologies,Url: www.nexiabiotech.com) und in Pflanzen für eine großtechnische Gewinnung zu optimieren⁶.

Da sich die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der Seiden leicht an den Fasern messen lassen, eignen sie sich hervorragend zum Studium der Zusammenhänge zwischen Materialkomposition und Eigenschaften. Trotz der recht beachtlichen Unterschiede in ihren Materialeigenschaften sind sich die meisten Seiden sehr ähnlich. So ist bei allen Seiden eine Dominanz von Aminosäuren mit kurzen Seitenketten festzustellen, aber in ihren Sequenzen werden diese in unterschiedlichen Motiven verwendet, die in größeren, repetitiven Blöcken angeordnet sind. Es wird von vielen Forschungsgruppen vermutet, dass in diesen Motiven die Ursache für die unterschiedlichen Eigenschaften der Fäden begründet liegt (siehe Kap. 1.4 und 1.5). Dies umso mehr, da sich solche in repetitiven Blöcken angeordneten Sequenzmotive auch in ganz anderen Proteinen – beispielsweise im Gluten in Weizenkörnern oder in den Byssusfäden von Muscheln - mit entsprechenden mechanischen Eigenschaften findet⁷⁻⁹. Diese Ähnlichkeit zu anderen strukturellen Proteinen erschwert auch die Abgrenzung des Begriffs Seide. Als Beispiel sei hier die Definition von C.Craig¹⁰ zitiert: „Seiden sind fibrilläre Proteine mit hochrepetitiven Aminosäuresequenzen, die im Tier in flüssiger Form gespeichert sind und sich bei der Sekretion durch Scherung in Fasern anordnen.“

Mit der Verwandtschaft zu diesen Strukturproteinen verbindet sich die Hoffnung, Seide bzw. Fibroin erfolgreich in verschiedenen medizinischen Anwendungsfeldern einzusetzen. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass Filme aus Fibroin die Wundheilung positiv beeinflussen¹¹. Der Einsatz als Matrix in der Zell- oder Organkultur wird untersucht^{12,13} und Sehnen aus Seide oder Implantate, die durch Beschichtung negative Reaktionen des Immunsystems verhindern, wurden angedacht.

Ein weiterer Aspekt, der Seiden für Wissenschaft und Wirtschaft interessant macht, ist die Tatsache, dass Seiden unter physiologischen Bedingungen aus hochkonzentrierten, flüssigkristallinen Proteinlösungen gesponnen werden. Technische Produktionsverfahren für Kunstfasern kommen

nicht ohne harsche Lösemittel oder Fällbäder aus, so dass sich hier vielleicht verfahrenstechnische Verbesserungen finden ließen.

Und schließlich wäre, wenn man die Zusammenhänge zwischen der Anordnung der Sequenzmotive und ihrem Einfluss auf die Eigenschaften des Materials aufklären könnte, nicht nur die Veredelung des Produkts durch den Einsatz verschiedener Seiden möglich, man könnte auch via molekularem Design völlig neue Fasern mit voraussagbaren Eigenschaften kreieren.

1.2 SPINNENSEIDE

Während Insekten – wie beispielsweise der Seidenspinner *Bombyx mori* – nur einen Typ Seide während eines bestimmten Entwicklungsstadiums verwenden, bilden Spinnentiere verschiedene Seiden und in fast allen Entwicklungsstadien. Im Gegensatz zu Insekten, bei denen die Fähigkeit, Seide zu bilden, im Laufe der Evolution immer wieder verloren ging, hat sich diese Fähigkeit bei den Araneae immer weiter verfeinert. Dabei finden sich bei diesen Tieren vom Beutefang über die Verbreitung der Brut bis hin zum Atmen und Fressen unter Wasser so viele unterschiedliche Anwendungen für Seide, dass kaum ein Aspekt im Leben dabei ausgelassen ist. Es ist daher auch nicht erstaunlich, dass die Spinnapparate bei den Spinnen mit innervierten, beweglichen Spinnwarzen, Spinnspulen und Ventilen weitaus komplizierter gebaut sind, als z.B. bei Insekten¹⁴⁻¹⁶. Eine typische Webspinne besitzt 7 verschiedene Drüsentypen, aus denen sie unterschiedliche Seiden und Klebsekrete herstellt (siehe Tabelle 1 und Abbildung 1). Die Materialeigenschaften dieser Seiden sind an den jeweiligen Gebrauch optimal angepasst. So ist z.B. der Hilfsfaden der kleinen Ampullendrüse sehr zugfest und der Faden der großen Ampullendrüse vereint Zugfestigkeit

Drüsen	Gebrauch	Spinnwarze
G. Aciniformes	Fesselfäden	Median, Posterior
G. Aggregateae	Fangfadenkleber	Posterior
G. Tubuliformes	Kokonseide	Median, Posterior
G. Flagelliformes	Fangspirale	Posterior
G. Ampullata Majoris	Sicherungsfaden, Rahmenfaden	Anterior
G. Ampullata Minoris	Hilfsspirale, Sicherungsfaden	Median
G. Piriformes	Haftpunkte	Anterior

Tabelle 1: Zuordnung der verschiedenen Seiden einer Radnetzspinne zu den entsprechenden Drüsen und Spinnwarzen. (G. = Glandula oder Glandulae)

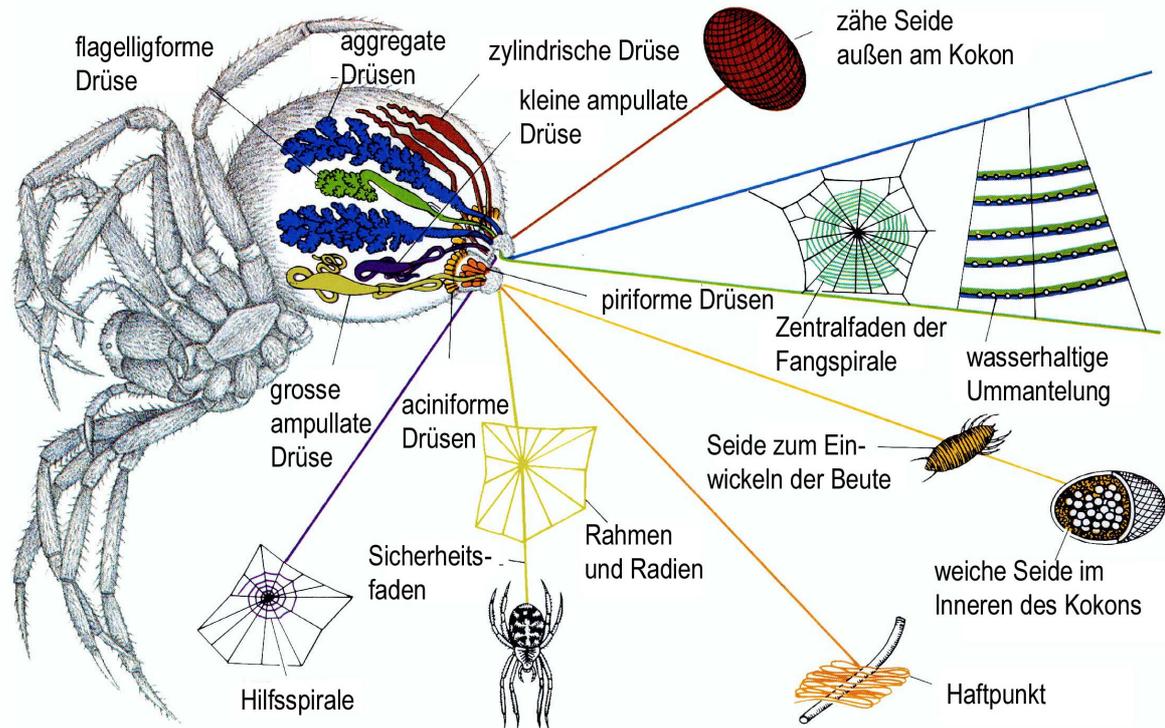


Abbildung 1: Drüsen, Seiden und ihr Gebrauch bei einer Radnetzspinne.

und Elastizität. Die Seide der flagelliformen Drüsen, aus der die Fangspirale des Netzes gebaut wird, kann sich um das Dreifache dehnen, bevor sie reißt¹⁷.

Das älteste Fossil einer Webspinne mit noch segmentiertem Bauplan wird auf etwa 290 Millionen Jahre datiert. Möglicherweise gab es die ersten Spinnen bereits im Devon vor 400 Millionen Jahren. 4 der 16 bekannten Hauptgruppen der Arachniden sind aus dem Karbon nachgewiesen, was auf eine weitgehende Differenzierung im Paläozoikum deutet. Da es Seide vermutlich schon vor mehr als 400 Millionen Jahren bei den meeresbewohnenden Vorfahren der Spinnentiere gegeben hat, ist anzunehmen, dass die Araneae schon in früher Zeit über eine Vielzahl von Anpassungen mit sicherlich erstaunlichen Seiden verfügt haben¹⁸. Die ersten



Abbildung 2: *Nephila clavipes*. Adultes Weibchen beim Beutefang in ihrem Netz.

Material	Zugfestigkeit (N m ⁻²)	Elastizität (%)	Spezifische Bruchenergie (J kg ⁻¹)
Seide der großen Ampullendrüse	4 x 10 ⁹	35	1 x 10 ⁵
Seide der Fangspirale	1 x 10 ⁹	>200	1 x 10 ⁵
Seide der kleinen Ampullendrüse	1 x 10 ⁹	5	3 x 10 ⁴
KEVLAR	4 x 10 ⁹	5	3 x 10 ⁴
Gummi	1 x 10 ⁶	600	8 x 10 ⁴
Sehne	1 x 10 ⁹	5	5 x 10 ³
Nylon, Typ 6	7 x 10 ⁷	200	6 x 10 ⁴

Tabelle 2: Materialeigenschaften verschiedener Fasern (aus: Hinman et al. ¹⁹)

dreidimensionalen Netze zum Fang fliegender Insekten dürften sich im Perm entwickelt haben. Der erste sichere Nachweis durch den Fund einer etwa 160 Millionen Jahre alten fossilen Radnetzspinne stammt aber erst aus dem Jura. An Funden aus der Kreidezeit sind bereits alle typischen Merkmale rezenter Araneidae feststellbar. Selbst mit „nur“ 100-160 Millionen Jahren ist das derzeitige Endergebnis dieser langen Evolutionsperiode erstaunlich.

Manche Spinnenseiden, wie z.B. die Seide aus der großen Ampullendrüse der Radnetzspinne *Nephila clavipes*, müssen den Vergleich mit vom Menschen gemachten Werkstoffen nicht scheuen. Sie ist zugfester als Stahl und kann auch mit DuPonts HighTech Faser Kevlar konkurrieren (siehe Tabelle 2), aus der unter anderem kugelsichere Westen gefertigt werden. Dies hat dazu geführt, dass Spinnenseide in den letzten 15 Jahren großes wissenschaftliches und wirtschaftliches Interesse gefunden hat. Die außerordentlichen physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften verheißen neue innovative Einsatzmöglichkeiten in der Medizin und Technik. Die angesprochene Seide der neotropen Radnetzspinne *Nephila clavipes* (siehe Abbildung 2) stand bei vielen Untersuchungen im Mittelpunkt und kann aufgrund der vielen heute über sie bekannten Daten als Modellsystem angesehen werden. Auch die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden hauptsächlich an *Nephila clavipes* und ihren Seiden – insbesondere an den Seiden des Sicherungsfadens - durchgeführt.

1.3 NOMENKLATUR DER SEIDENPROTEINE

Neben der Bezeichnung „Fibroin“ für die Proteine von Seiden wird bei Spinnen auch der Begriff „Spidroin“ verwendet. Derzeit existieren 2 verschiedene Systeme der Benennung von Spidroinen, die auf die ersten Arbeiten an *Araneus diadematus*²⁰ und *Nephila clavipes*^{21,22} zurückgehen. Im ersten Fall wurde die Spezies, aus der die Spidroinsequenz stammt, durch 2 Grossbuchstaben angezeigt und unabhängig vom Drüsentyp mit dem Kürzel F für Fibroin durchnummeriert. ADF1

steht in diesem System für „*Araneus diadematus* Fibroin 1“. Bei *Nephila clavipes* wurde auf die Kennzeichnung der Spezies verzichtet. Dafür wird der Drüsentyp zur Kennung verwendet. MASp 1 steht in diesem System für „major ampullate spidroin 1“.

Obwohl es immer deutlicher wird, dass die Seidengene verschiedener Spezies aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten in Familien eingeteilt werden können, ist derzeit aufgrund von Ausnahmefällen keine einheitliche, systematische Benennung möglich. So sind heute für die großen Ampullendrüsen der meisten Arten 2 unterschiedliche Spidroine vom Typ MASp1 und MASp2 (*Nephila clavipes*) bekannt, bei *Araneus diadematus* wurden aber 2 Spidroine (ADF-3 und ADF-4) vom Typ MASp2 gefunden. Bei den Sequenzen der kleinen Ampullendrüse der beiden Arten gibt es keine Gemeinsamkeiten, nach denen sie gruppiert werden könnten. Ein System, das die Vorteile beider Systeme vereinigen würde, müsste der Art, dem Ursprungsgewebe, der Klasse und Anzahl der Proteine Rechnung tragen. Also etwa AAMASpII-4 für ein hypothetisches Spidroin der Spinne *Argiope aurantia*, welches als das 4. Spidroin der Klasse MASp2 in der großen Ampullendrüse gefunden wurde. Damit würde es aber zumindest für den sprachlichen Umgangsgebrauch zu kompliziert.

In dieser Arbeit sind die jeweiligen Bezeichnungen der Originalpublikationen verwendet, um Verwirrung bei den mit dem Thema vertrauten Lesern zu vermeiden. Zusätzlich wurden die ebenfalls in einigen Publikationen zu findenden Kürzel für Seide wie z.B. MAS für major ampullate silk verwendet. Die entsprechenden Kürzel sind der Liste der Abkürzungen zu entnehmen.

1.4 BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE

Untersuchungen der biochemischen Komponenten von Spinnenseide haben mittlerweile viele verschiedene Stoffe identifiziert. An der Oberfläche von Spinnenseiden wurden Lipide beschrieben, die u.a. als Lösungsmittel für Pheromone dienen²³. Des Weiteren sind Zucker (Ribose, Mannose), verschiedene Phosphatverbindungen, Calcium, Kalium und Schwefel als Bestandteile gefunden worden²⁴⁻²⁷. Für einige dieser Komponenten wird ein Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften diskutiert. Die Anforderungen an die MAS beschränken sich jedoch nicht nur auf ihre Zugfestigkeit und Elastizität. Sie muss z.B. auch mikrobieller Degradation oder wechselnden Umweltbedingungen widerstehen. Somit sind nicht alle Bestandteile notwendigerweise am Zustandekommen der angesprochenen mechanischen Eigenschaften beteiligt und manche, die im Faden vorhanden sind, mögen ihre Funktion etwa bei der Bildung des flüssigkristallinen Spinneguts oder der Fadenformation haben und im Faden keine Rolle mehr spielen.

Seiden bestehen zum größten Teil aus Proteinen. Dies wurde bereits 1907 durch qualitative Untersuchungen an der Seide (MAS) von *Nephila madagascariensis* gezeigt und 1955 wurden die ersten quantitativen Aminosäureanalysen und Molekulargewichtsdaten für die MAS veröffentlicht²⁸⁻³⁰. Diese zeigten, dass die Seiden von *Bombyx mori* und *Nephila madagascariensis* sehr hohe Gehalte an Glycin und Alanin aufweisen und die durchschnittlichen Molekulargewichte der gelösten Seiden bei etwa 200-300 kDa liegen. Spätere Arbeiten haben die Dominanz von Aminosäuren mit kurzen Seitenketten grundsätzlich bestätigt, haben aber auch gezeigt, dass sich die Zusammensetzung abhängig von äußeren Einflüssen verändern kann³¹⁻³⁴.

Über die Molekulargewichte wurden sowohl für den Drüseninhalt als auch für gelöste Seide sehr unterschiedliche Werte publiziert, die von 30 kDa bis 740 kDa reichen. Aus dem Wert von 30 kDa, der für den Drüseninhalt gemessen wurde, ist geschlussfolgert worden, dass eine Polymerisation von niedermolekularen Vorstufen zu den etwa 300 kDa großen in gelöster Seide gefundenen Molekülen stattfinden müsse²⁹. Dies wurde jedoch durch spätere Arbeiten widerlegt, die durch SDS-PAGE Molekulargewichte von 323,6 kDa bzw. 195 und 220 kDa für den Drüseninhalt ermittelten^{35,36}. Dabei wurde ein unterschiedliches Laufverhalten sowohl für den Drüseninhalt als auch für gelöste Seide unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen gezeigt³⁶. Bei der Seide von *Bombyx mori* findet eine Vernetzung der schweren und der leichten Fibroinketten durch Cysteinbrücken statt³. Eine solche kovalente Verbindung zu höhermolekularen Komplexen ist auch bei Spinnenseide denkbar. Auch das mit Größenausschlusschromatographie gefundene sehr hohe Molekulargewicht von 740 kDa des Drüseninhalts³⁷ wird von den Autoren als das eines allerdings nicht kovalenten Proteinkomplexes interpretiert. Leider sind keine Untersuchungen unternommen worden, welche die Einzelkomponenten eines solchen Komplexes zeigen würden. Aus den bisher veröffentlichten Zahlen lässt sich dieser Komplex und seine Einzelkomponenten nicht errechnen.

Vieles, was heute über Spidroine bekannt ist, stammt aus molekularbiologischen Untersuchungen. Die erste Teilsequenz für ein Spidroin entstammt den Analysen von c-DNA Klonen der großen Ampullendrüse von *Nephila clavipes*²¹. Zur Identifizierung seidenspezifischer Klone wurden Sequenzen von Peptiden aus säurehydrolysiertes Seide verwendet. Im selben Labor wurde ein zweites Spidroin, MaSp2, durch eine Peptidsequenz gefunden, die in der Sequenz von MASp1 nicht enthalten war³⁸. Für beide sind etwa 2 kb vom 3'-Ende sequenziert worden. Da alle Sequenzen der aus dem partiellen Säureverdau stammenden Peptide in den Sequenzen von MASp1 und 2 enthalten sind, glauben die Autoren, dass dies die beiden einzigen Hauptproteine der MAS sind und bei Transkriptgrößen von 5,6 und 3 kb in einem Verhältnis von 3:2 Teilen dem Gehalt der einzelnen in MAS gefundenen Aminosäuren – insbesondere des Prolingehalts – entsprechen. In der Literatur

werden verschiedene, bisher nicht veröffentlichte Werte für die Transkriptgrößen angegeben, die sich deutlich unterscheiden. Die tatsächlichen Größen scheinen noch nicht eindeutig geklärt zu sein. Die größten angegebenen Werte (siehe Tabelle 3) deuten darauf, dass ungefähr 1/4 oder 1/5 der Sequenzen bekannt sind.

Bis dahin gab es nur indirekte Hinweise darauf, dass die MAS aus mehreren Proteinen bestehen könnte, die sich aus den unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzungen von Proben aus einer Spinne zu unterschiedlichen Zeitpunkten ergeben^{32,42}. Candelas et al.³⁵ fanden, dass das radioaktiv markierte, spezifische Produkt stimulierter Drüsen als eine homogene Bande in der SDS-PAGE wandert. Mello et al.^{36,43} beschrieben zwar mehrere Banden für gelöste Seide und Drüseninhalt, fanden jedoch in ihren Untersuchungen an chemisch mit N-Bromosuccinimid gespaltener Seide keine Peptide mit MASp2 spezifischen Sequenzen.

Über die Präsenz des Gens MASp2 dürfte kein Zweifel bestehen, da entsprechende Sequenzen mittlerweile in einer ganzen Reihe von Spinnen nachgewiesen wurden (siehe Kap. „Sequenzvergleich“). Jedoch besteht einige Unsicherheit darüber, ob es im Faden von *Nephila clavipes* überhaupt in größeren Mengen vorkommt. Die Tatsache, dass Mello et al.³⁶ keine Peptide mit Sequenzen von MASp2 finden konnten, spricht zumindest dagegen.

Den ersten biochemischen Hinweis für MASp2 publizierten Fahnestock et al.⁴⁴, die Antiseren gegen synthetische Peptide mit den Sequenzen aus den repetitiven Bereichen einsetzten, um die Präsenz dieser sequenztypischen Motive im Drüseninhalt nachzuweisen. Aus den für die beiden Antiseren unterschiedlichen Mustern hochmolekularer Banden sehen es die Autoren als unwahrscheinlich an, dass die Reaktion mit dem MASp2-spezifischen Antiserum durch entsprechende Motive im noch unbekanntem N-terminalen Bereich von MASp1 verursacht wird.

Drüse	Spezies	Gen	Transkript [kb]*	Ref.
Major ampullate	<i>N. clavipes</i>	MASp1 (NCF-1)	12.0	39
Major ampullate	<i>N. clavipes</i>	MASp2 (NCF-2)	11.5	39
Major ampullate	<i>A. diadematus</i>	ADF-3	9.0*	20
Major ampullate	<i>A. diadematus</i>	ADF-4	7.5	20
Minor ampullate	<i>N. clavipes</i>	MiSp1	9.5	40
Minor ampullate	<i>N. clavipes</i>	MiSp2	7.5	40
Minor ampullate	<i>A. diadematus</i>	ADF-1	9.5*	20
Flagelliform	<i>N. clavipes</i>	Flag	15.5	41
Cylindrical	<i>A. diadematus</i>	ADF-2	14*	20

*nur der größte Wert ist angegeben

Tabelle 3: In der Literatur angegebene Transkriptgrößen für verschiedene Seidengene von Spinnen.

Bei den kleinen Ampullendrüsen wurde in ähnlicher Weise nach seidenspezifischen Sequenzen gesucht und zwei Spidroine – MISp1 und 2 – gefunden⁴⁰. Die meisten nachfolgenden Sequenzinformationen für die großen Ampullendrüsen anderer Spezies stammen aus Analysen von cDNA Klonen oder durch PCR mit Sonden oder Primern aus den bekannten Sequenzen von MASp1 und 2^{20,45}. Dies trifft auch für Flag zu, dem derzeit am besten charakterisierten Spinnenseidengen⁴¹.

Die gefundenen Sequenzen zeigen, dass alle Gene in ihrem Hauptteil hochrepetitiv sind. Der hohe Anteil an Guanin und Cytosin ist durch die Kodons der häufigsten Aminosäuren Alanin und Glycin bedingt, wobei hauptsächlich die Kodons verwendet sind, die wenig Guanin oder Cytosin in der letzten Position enthalten. Dem wird auch auf translationaler Ebene durch Cluster von tRNA Genen mit entsprechendem Antikodon⁴⁶ Rechnung getragen.

Lewis und Mitarbeiter teilen den repetitiven Teil in verschiedene Motive^{39,41}, die sich z.T. in den einzelnen Spidroiden unterscheiden oder in unterschiedlichen Kombinationen gebraucht werden (siehe Abbildung 3). Sie sind die Grundbausteine für größere Module, die in der Sequenz wiederholt auftreten. Aufgrund ihres Vorkommens in Seiden mit bestimmten Eigenschaften und Strukturvorhersagen versuchen die Autoren ihre Funktion zu erklären.

- 1.) **GPGXX** : Dieses Motiv tritt in MASp2 und ADF-4 als GPGGX, in Flag als GPGGX und GPGGX_n und als GPGQQ in MASp2 und ADF-3 auf. Nach den Strukturvorhersagen formen sie eine β -Spirale, die dem Molekül Elastizität verleihen würde. Die hochelastische Seide der Fangspirale (Flag) besteht hauptsächlich aus diesem Motiv.
- 2.) **GPX (X=S,Y,G)**: Das Motiv findet man nur in MASp2-ähnlichen Spidroiden und könnte als Bindeglied zwischen den flexiblen β -Spiralbereichen und den kristallinen (A)_n Regionen fungieren.
- 3.) **Poly-Ala oder Ala-reich**: Dieses Motiv existiert in 2 Formen als (A)_n oder (GA)_n. In diesen Formen wurde es in allen bekannten Sequenzen gefunden mit der Ausnahme von Flag. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Sequenzen in den kristallinen Bereichen in β -Faltblattkonformation vorliegen (siehe hierzu Kap. 1.5).
- 4.) **GGX**: Dieses Motiv ist in allen MISp's, MASp1 und Flag sowie in ADF-3 vorhanden. Mit einer möglichen 3_{10} -Helix könnte es als Bindeglied zwischen den kristallinen Bereichen und den weniger steifen Regionen fungieren.
- 5.) **SPACER**: In manchen Spidroiden finden sich nichtrepetitive Sequenzabschnitte, die in die glycinreichen, repetitiven Bereiche eingestreut sind. Sie sind konserviert innerhalb eines Spidroids,

aber nicht zwischen verschiedenen Spidrintypen. Gefunden wurden solche Spacersequenzen in den MISp's und Flag, aber bisher noch nicht in den MASp's.

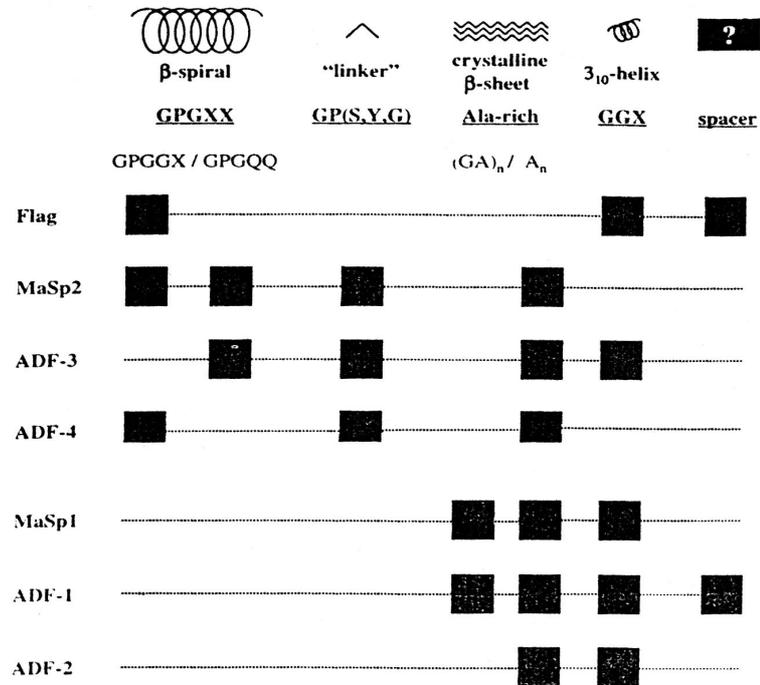


Abbildung 3: Vorkommen struktureller Module in verschiedenen Seiden. Module sind als gleichartige Aminosäuremotive definiert. X zeigt an, dass die Position innerhalb eines Proteins oder zwischen verschiedenen Proteinen durch unterschiedliche Aminosäuren eingenommen wird³⁹.

N-terminale Regionen wurden bisher nur für Proteine aus den flagelliformen Drüsen und den kleinen Ampullendrüsen beschrieben^{40,41,47}. Sie sind nicht repetitiv.

Dem repetitiven Bereich schließt sich ein nichtrepetitiver C-Terminus an, der hochkonserviert zwischen den beiden Spidroinen der großen Ampullendrüse einer Art und sogar zwischen den Spidroinen verschiedener Spezies ist⁴⁵. Dies deutet auf eine wichtige regulatorische oder strukturelle Funktion, die einen hohen Selektionsdruck ausübt und nur wenige Abweichungen in der Sequenz zulässt. Verschiedene Funktionen wurden für diese Sequenz vorgeschlagen. So könnte sie ein zelluläres Signal darstellen oder ein Propeptid, das bei der Sekretion oder Fadenbildung möglicherweise abgespalten wird⁴⁸. Von anderen Autoren wurde es für bedeutend für die Löslichkeit der Proteine im hochkonzentrierten Spinngut erachtet⁴⁹ oder aufgrund der enthaltenen Cysteine könnte sie der Vernetzung der Spidroine durch Disulfidbrücken dienen¹⁰.

Bisher wurden bei den Analysen von gelöster Seide keine Peptide dieser Region gefunden. Es ist daher nicht bekannt, ob die C-Termini der Spidroine in der Spinnenseide enthalten sind³⁹ oder möglicherweise abgespalten werden.

1.5 STRUKTURELLER AUFBAU

Die meisten strukturellen Untersuchungen wurden auf molekularer Ebene mithilfe von Röntgenstrahlbeugung angestellt. Über 100 verschiedene Seiden sind kristallographisch charakterisiert worden¹⁰. Bei den meisten Seiden sind β -Faltblattkonformationen senkrecht zur oder in Richtung der Fadenachse gefunden worden, aber es wurden auch einige Seiden mit hauptsächlich α -helikaler Konformation der Proteine beschrieben. Diese α -helikalen Seiden weisen jedoch einen deutlich geringeren Gehalt an Glycin und sehr viel mehr saure Aminosäuren auf.

Spinnenseiden gehören zu den Seiden, die β -Faltblattkonformationen aufweisen. Entsprechende Versuche an der MAS von *Nephila madagascariensis* ergaben, dass im Faden neben kristallinen Bereichen in antiparalleler β -Faltblattkonformation auch amorphe Bereiche vorkommen⁵⁰. Bei *Nephila clavipes* MAS wird der kristalline Volumenanteil je nach Autor auf etwa 30-50% geschätzt^{26,51,52}.

Die molekulare Organisation und mechanische Funktionsweise von Spinnenseide wurde mit der von Gummi verglichen^{53,54}. Dies wurde aufgrund der thermodynamischen Eigenschaften vermutet, die man bei der Superkontraktion der MAS von *Araneus diadematus* gemessen hat. In Wasser getaucht kontrahiert sich die MAS um etwa 50% der Ausgangslänge und nimmt bei gleichzeitiger Abnahme des elastischen Modulus an Dehnungsfähigkeit zu. Dabei kommt es zu einer Reorientierung der Kristallite, aber die Kristalldimensionen und Gesamtkristallinität ändern sich nicht. Entsprechend schlagen die Autoren vor, dass die amorphen Bereiche als ein ungeordnetes gummiartiges Proteinnetzwerk fungieren, dass allein für die Änderungen in den elastischen Eigenschaften verantwortlich ist. Die kristallinen Regionen sollen zur Vernetzung der Polymerketten dienen.

An Ultradünnschnitten sind helle und dunkle Banden mit etwa 200 nm Breite gefunden worden, die beide Kristallite enthalten²⁶. Die Durchmesser einzelner Kristallite sind mit 70-100 nm und 70-500 nm in einer späteren Publikation⁵² angegeben. Mithilfe von EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy) wurde auch Calcium gemessen⁵⁵, das nur in den kristallinen Bereichen vorkommt und für ihre Konformation von Bedeutung sein könnte.

Die in diesen Untersuchungen durch Elektronenstahlbeugung gemessenen Gitterabstände wurden dahingehend interpretiert, dass eine gemischte Zusammensetzung der kristallinen Bereiche aus Polyalanin und dem Gly-Gly-X-Motiv vorliege. Die Beteiligung glycinreicher Sequenzmotive an den kristallinen Strukturen wird jedoch kontrovers diskutiert.

Durch Simmons et al.⁵⁶ wurde mit Festkörper-NMR an der MAS von *Nephila clavipes* gezeigt, dass etwa 40 % der alaninreichen, kristallinen Bereiche dicht gepackt parallel zur Fadenachse orientiert sind. 60 % bestehen aus weniger orientierten und weniger dichten Bereichen (siehe Abbildung 4). Etwa 78% aller Alanine befinden sich in β -Faltblättern⁵⁷. Der weniger orientierte Teil soll aus GAG-Motiven bestehen, die den hochorientierten Polyalaninteil flankieren. Die sich in der Sequenz anschließenden Glutamine könnten die Faltblattbildung unterbrechen und so die Kristallgröße limitieren. Das den Polyalaninsträngen benachbarte Sequenzmotiv LGXQG (X=G, S, N) könnte nach REDOR (rotational-echo double-resonance) NMR Daten in Typ I β -turn Konformation vorliegen⁵⁸ und damit die Richtung der Kette umkehren.

Aus ihren Daten schließen die Autoren eine β -Faltblattkonformation für GGX Sequenzen aus. β -Faltblätter und α -Helices werden auch von Kümmerlen et al.⁵⁹ für die glycinreichen Bereiche ausgeschlossen.

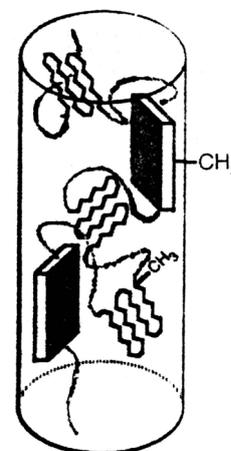
Die Polyalanine in Spidroin 2 sind mit $n=6-10$ etwas länger als die von Spidroin 1, was für eine Formation von β -Faltblättern günstig wäre, aber die regelmäßig in der Sequenz auftretenden Proline würden die strukturelle Integrität unterbrechen. Es wurde daher vorgeschlagen, dass die sogenannte amorphe Matrix hauptsächlich aus Spidroin 2 besteht, während der kristalline Anteil aus nonperiodischen Gitterkristallen (NPL) der in

Spidroin 1 gefundenen Motive besteht⁵². Hijirida et al.⁶⁰ finden jedoch in den Protonenspektren von mit $U-^{13}C$ -D-Glucose markierter Seide keinen Hinweis auf Prolin. Obwohl sie diesen Befund nicht weiter kommentieren, ist es fraglich, ob durch die Methode Aussagen zur Rolle von Spidroin 2 getroffen werden können.

Durch Kümmerlen et al.⁵⁹ wurde an der MAS von *Nephila madagascariensis* gezeigt, dass die glycinreiche amorphe Matrix durchaus geordnet ist und eine 3_1 -helicale Konformation einnimmt.

Abbildung 4:

Modell von Simmons et al.⁵⁶ für die molekulare Anordnung von hochorientierten, alaninreichen Bereichen in β -Faltblattkonformation (Rechtecke) und schwach orientierten, aber kristallinen Bereichen (kantige Linien) in einer amorphen, glycinreichen Matrix (geschwungene Linien). Tatsächlich soll die amorphe Matrix über 70% der Faser ausmachen. Zur besseren Verdeutlichung wurde sie stark verkleinert.



Diese Anordnung könnte zu den starken mechanischen Eigenschaften der Seide beitragen, da sich zwischen den Helices Wasserstoffbrücken bilden können.

Die Eigenschaften eines Materials können nicht nur von seinen chemischen Komponenten und deren Interaktionen auf molekularer Ebene, sondern auch durch eine Organisation in größere strukturelle Einheiten bestimmt sein. Dabei können gleichartige Strukturelemente ähnliche Funktionen übernehmen und Redundanz schaffen oder verschiedenartige Elemente mit unterschiedlichen Funktionen sich in ihrem Zusammenwirken ergänzen. Aus Untersuchungen mit unterschiedlichen mikroskopischen Techniken sind verschiedene Strukturelemente der MAS beschrieben und entsprechende Modelle postuliert worden (siehe Abbildung 5).

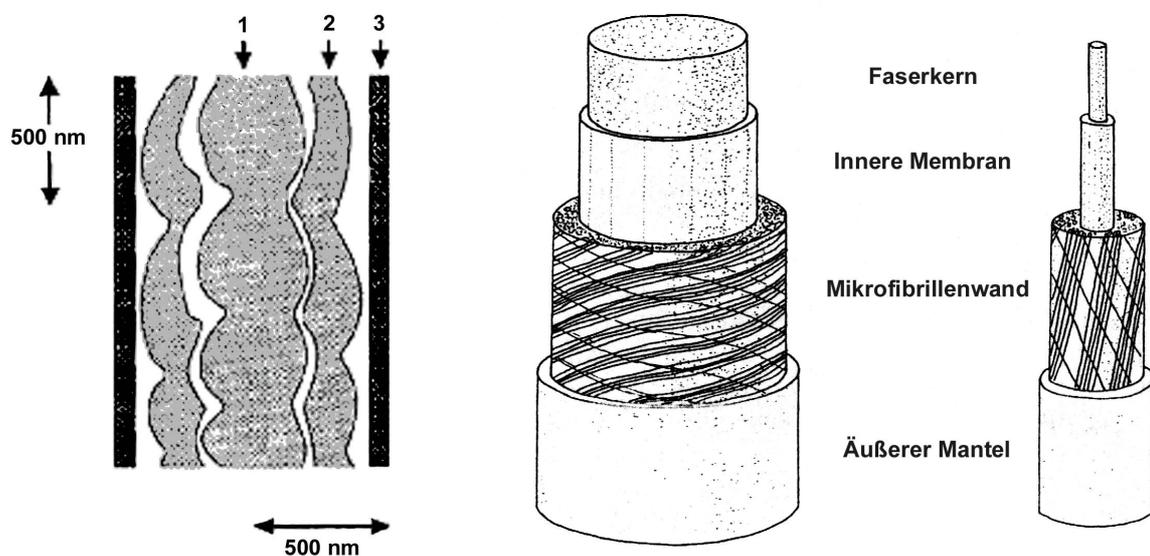


Abbildung 5: Strukturelle Modelle für MAS. Links: Modell von Li et al.⁶¹. 1: innere Kernregion; 2: äußere Kernregion; 3: Mantelregion. Rechts: Modell von Vollrath et al.⁶².

In den Modellen von Li und von Vollrath, die aus den Ergebnissen von AFM beziehungsweise Videokontrastmikroskopie resultieren, wird der Faden in einen Kern und eine Haut unterteilt^{61,62}. Vollrath et al. zeigen in ihrem Modell, dass dieser Mantel aus Schichten gegenläufiger Fibrillen besteht, während Li et al. diesen Bereich als fein und unstrukturiert beschreiben. In einer späteren, elektronenmikroskopischen Arbeit konstatieren Vollrath und Mitarbeiter⁶³, keine Anhaltspunkte für eine Mikrofibrillenwand gefunden zu haben.

Li et al.⁶¹ teilen den Faden in drei Bereiche. Neben der äußeren Ummantelung gehen sie von einem inneren und einem äußeren Kernbereich aus, die beide aus gefalteten, fibrillären Strukturen aufgebaut sind. Die Durchmesser für einzelne Fibrillen liegen bei 100-150 nm. Parallel angeordnete fibrilläre Strukturen haben die Autoren auch in Kevlarfasern gefunden⁶⁴, was für sie ein Indiz dafür ist, dass die Stärke des Materials zumindest teilweise aus einer solchen Anordnung stammt.

Mit AFM wurden auch in den Seiden von *Bombyx mori*⁶⁵ und *Lactrodectrus hesperus*⁶⁶ fibrilläre Strukturen entdeckt. Die Fähigkeit, Fibrillen zu bilden, scheint eine den Molekülen inherente Eigenschaft zu sein, denn sie bilden sich bei Entzug des Lösungsmittels sowohl aus Fibroinlösungen von gelöster Seide von *Bombyx mori* oder *Nephila madagascariensis* als auch aus Lösungen rekombinanter Spidroine^{29,67}.

Sowohl die Unterteilung in Haut und Kern (skin/core) als auch die Organisation in Fibrillen ist nicht unumstritten. Thiel et al.^{26,52} sahen in ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen keinerlei Anhaltspunkte für eine Unterteilung in Kern und Mantel.

Mahoney et al.⁶⁸ haben für den Faden von *Nephila clavipes* mit AFM eine Faserstruktur gezeigt, die beim Schneiden oder Brechen von in flüssigem Stickstoff gefrorenen Proben zutage treten. Da an der Oberfläche keine Fibrillen beobachtbar sind und die Fäden unter Kompression kein für hochorientierte fibrilläre Fasern typisches Knicken ("kinking") zeigen, halten sie die fibrilläre Struktur für das Ergebnis longitudinaler Frakturen im hochorientierten Fadenmaterial.

1.6 FRAGESTELLUNGEN

In den letzten 20 Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um die Voraussetzungen für eine industrielle Verwertung von Spinnenseide zu schaffen. Ein wesentlicher Punkt in diesen Bemühungen besteht darin, das natürliche Vorbild möglichst breit und gut zu charakterisieren und zu verstehen, wie die jeweiligen Eigenschaften der unterschiedlichen Seiden zustande kommen. Trotz aller Fortschritte gibt es viele Punkte, die ungeklärt sind oder kontrovers diskutiert werden. In den vorangestellten Kapiteln wurde versucht, neben einer allgemeinen, zum Verständnis der Thematik notwendigen Beschreibung des Wissensstandes solche Kontroversen und Wissenslücken darzustellen, die das Vorgehen in dieser Arbeit bestimmt haben.

Die meisten Publikationen beschäftigen sich mit molekularbiologischen oder biochemischen Themen. In einer kleineren Zahl von Arbeiten wurde der Aufbau der Spinnenseide mikroskopisch untersucht und von manchen Autoren eine hierarchische Organisation postuliert. Dies wurde verschiedentlich in Frage gestellt. Außerdem weichen die verschiedenen Modelle in einigen Details voneinander ab.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, den Aufbau der Spinnenseide zu untersuchen und gefundene Strukturelemente zu charakterisieren. Da verschiedene Strukturelemente vermutlich unterschiedliche Eigenschaften tragen, sollte auch ihre biochemische Konsistenz untersucht werden. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur die Rolle von Spidroin 2 (siehe Kap.1.4) diskutiert. Während manche Autoren aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenzmotive zur flagelliformen Seide

glauben, dass MASp2 für die Elastizität der MAS verantwortlich ist, zweifeln manche daran, dass es überhaupt in der Seide in größeren Mengen vorhanden ist.

Durch die Generierung spezifischer Antikörper sollten Spidroin 1 und 2 in den Drüsen und in der Seide nachgewiesen werden. Dies sollte zunächst durch biochemische Techniken untersucht werden und dann ggf. durch histochemische Techniken ihre Lokalisation in den Strukturelementen des Fadens aufgeklärt werden.

Um solche spidroinspezifischen Antikörper zu erhalten, sollten ausgewählte Sequenzbereiche als rekombinante Proteine exprimiert und zur Immunisierung verwendet werden. Der Nachweis von Spidroin 2 sollte nicht nur über repetitive Sequenzen sondern auch – wenn möglich - über den C-terminalen Bereich erfolgen, um auszuschließen, dass ein positives Ergebnis von etwaigen ähnlichen repetitiven Sequenzmotiven aus dem unbekanntem N-terminalen Bereich von Spidroin 1 herrührt. Gleichzeitig ermöglicht dieses Vorgehen, die Rolle der hochkonservierten C-Termini näher zu untersuchen. Es ist derzeit nicht bekannt, ob die nicht repetitiven C-terminalen Anteile im Endprodukt enthalten sind oder ob und wo eine eventuelle Prozessierung stattfindet. Durch die Generierung entsprechender spezifischer Antikörper sollte nachgewiesen werden, ob die hochkonservierten, C-terminalen Sequenzen der beiden Spidroine in der Seide vorhanden sind oder ggf. nur in den Drüsen vorkommen.

Des Weiteren bieten die rekombinanten Polypeptide die Möglichkeit, die Struktur und Funktion der entsprechenden Sequenzen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 SPINNEN

Spinnen der Art *Nephila clavipes* wurden von Mascarino Tarantulas (Los Angeles, California) bezogen. Die Tiere wurden nach Auskunft des Händlers in Florida gesammelt. Die Spinnen der Art *Nephila pilipes* wurden von Judy Thompson und John Olive ('judyjohn@ozemail.com.au') aus Australien bezogen. Die Tiere wurden in Käfigen bei Raumtemperatur und 80% Luftfeuchtigkeit gehalten, täglich mit deionisiertem Wasser bespritzt und 2-3 mal pro Woche mit Fliegen oder Fliegenmaden gefüttert.

2.2 GEWINNUNG DER SEIDENPROBEN

Die Spinnen wurden mit CO₂ anästhesiert, mit Klebeband rücklings auf einer Unterlage fixiert und der Faden auf eine motorgetriebene Rolle aufgespult. Dies wurde routinemäßig zur Stimulation der Drüsen durchgeführt. Die dabei gewonnenen Seidenproben wurden lichtmikroskopisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass diese Proben neben den Fäden der großen Ampullendrüse auch zu einem gewissen Anteil Fäden der kleinen Ampullendrüse enthalten, die sich aufgrund des kleineren Durchmessers gut identifizieren lassen. Diese Proben wurden deshalb als Mischproben bezeichnet.

Zur Gewinnung reiner, drüsenspezifischer Proben wurde unter dem Stereomikroskop das entsprechende Fadenpaar identifiziert und voneinander so getrennt, dass die Spinne während des Spulens die beiden Doppelfäden nicht durch Haftpunkte verbinden kann. Außerdem wurde das Abspulen mikroskopisch überwacht.

Für Dot Blot Analysen wurden die Proben in einer Konzentration von 10 mg/ml mit saturierter Lithiumrhodanidlösung gelöst. Für gelelektrophoretische Untersuchungen wurden die Proben auch in Hexafluoroisopropanol (HFIP) oder saturierter Lithiumbromidlösung gelöst. Im Falle der in den Lithiumverbindungen gelösten Proben wurden diese gegen 8M Harnstoff dialysiert, wobei das Probenvolumen sich ungefähr verdoppelt.

2.3 GEWINNUNG DER DRÜSENEXTRAKTE UND GEWEBE

Spinnenringer: 13,03 g/l NaCl, 0,51 g/l KCl, 0,89 g/l CaCl₂, 1,04 g/l MgCl₂ x 6 H₂O mit HCl auf pH 8,2 einstellen.

Präparationspuffer Natriumcitrat 15 mM, Natriumchlorid 100 mM; pH 7,0 (autoklaviert)

Präparationspuffer (mit Inhibitoren)

Natriumcitrat 15 mM, Natriumchlorid 100 mM, Na₂-EDTA 1 mM (Roth), pH 7,0 (autoklaviert)

Zugabe direkt vor Präparation:

Aprotinin (Sigma): Stammlsg. 10 mg/ml; Einsatz 50 µl in 100 ml Präp.puffer

PMSF (Roth): Stammlsg. 17 mg/ml in EtOH; Einsatz 1 ml in 100 ml Präp.puffer

IEF-Probenpuffer: 6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 0,5% CHAPS, 0,5% TritonX-100, 10 mM Tris

Proteaseinhibitoren für Proben:

Inhibitor Set von Böhlinger:

	(mg)/ vial	Auffüllen auf ml	Lösungsmittel	Endkonz.	auf 100 µl
Bestatin	0,5	0,1	Methanol	40 µg/ml	0,8 µl
E-64	3	0,9	50% EtOH	10 µg/ml	1 µl
EDTA	10	0,27	H ₂ O	0,37 mg/ml	1 µl
Pefablock	20	0,2	H ₂ O	0,2 mg/ml	2 µl
Pepstatin	0,5	0,5	EtOH	0,7 µg/ml	0,7 µl

Spinnen wurden mit CO₂ anästhesiert, das Ophistosoma mit einer Schere abgetrennt und in einer Präparierschale mit Minutienstiften fixiert. Zu Beginn der Arbeiten wurde die Schale für die Präparation mit Spinnenringer befüllt. Im Verlauf der weiteren Arbeiten ergab sich jedoch der Verdacht, dass diese Methode möglicherweise anfällig für Degradation von mRNA (Rommerskirch, pers. Mitteilung) und Proteinen während der Präparation sein könnte. Deshalb wurde auf einen von Candelas et al.³⁵ veröffentlichten Zitratpuffer umgestellt, in dem die Drüsen noch mindestens 2h nach der Präparation zur Synthese befähigt sein sollen. Des weiteren wurde die beschriebene Methode dahingehend modifiziert, dass die Präparierlösungen eiskalt und mit Proteaseinhibitoren verwendet wurden.

Durch 2 laterale Schnitte und einen Verbindungsschnitt vor der Spinnwarze wurde der Bauchpanzer entfernt. Mit einer Pinzette wurde das Bindegewebe entfernt und die Drüsen mit einer stumpfen Präpariernadel voneinander getrennt und freigelegt. Zur Erstellung von Präparaten für die Mikroskopie wurden die entsprechenden Organe vorsichtig in geeignete Gefäße mit Fixierlösung (auf Eis) überführt.

Für die Gewinnung von Extrakten für die biochemischen Untersuchungen wurden verschiedene Methoden angewandt und während der Arbeiten entsprechend der erzielten Ergebnisse und Erfahrungen optimiert. Zu Beginn wurde das gesamte Drüsenmaterial der großen Ampullendrüse in

Extraktionspuffer überführt und nach 2, 4 oder 8 h durch Zentrifugation von Zelltrümmern getrennt. Als Extraktionspuffer wurden 8 M Harnstoff und 10% Kaliumcarbonat²⁹⁾ verwendet. Kaliumcarbonat erwies sich als ungeeignet, da sich der Drüseninhalt oft nur zum Teil lösen ließ oder verfestigte.

Im weiteren Verlauf wurde bei den Drüsen mit Vorratsampulle die Drüseninhalte vom Gewebe separiert. Dies gelang bei den großen und kleinen Ampullendrüsen sowie bei den flagelliformen Drüsen. Je nach Ausbeute wurde der Inhalt einer oder beider Drüsen in 100 µl IEF-Puffer ü.N. im Kühlschrank gelöst und ggf. Proteaseinhibitoren zugesetzt. Gewebe wurden sofort nach Entnahme in PE-Reaktionsgefäßen (1,5 ml Eppendorf) auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert. Die Gewebe der a-Zone und b-Zone der Ampullen wurden aus verschiedenen Präparationen gesammelt und in 40 µl IEF-Puffer mechanisch (mit für die 1,5ml Gefäße passenden Plastikkolben) auf Eis aufgeschlossen. Die Anhänge der großen Ampullendrüse einer Spinne wurden in gleicher Weise in 100 µl IEF-Puffer aufgeschlossen.

Aus präparativen Gründen wurden im Falle der aciniformen und piriformen Drüsen die gesamten posterioren oder anterioren Warzen, an denen die jeweiligen Drüsen hängen, entnommen und extrahiert. Dabei wurde das Material von etwa 5 Spinnen in 100 µl IEF-Puffer mechanisch aufgeschlossen. Für die Gesamtextrakte der anderen Spinnendrüsen wurden jeweils das Material von 5 Spinnen in 500 µl IEF-Puffer aufgeschlossen.

Die so gewonnenen Extrakte wurden durch SDS-PAGE (4-15%-ige Gele) analysiert und die Probenauftragsmengen empirisch ermittelt.

2.4 GEWINNUNG REKOMBINANTER POLYPEPTIDE

2.4.1 KLONIERUNG

Die eingesetzten Expressionsvektoren wurden von Dr. K. Weißhart für die Arbeiten zur Verfügung gestellt. Aus geeigneten Klonen einer aus der RNA stimulierter, großer Ampullendrüsen aufgebauten cDNA-Bank wurden die interessierenden Sequenzabschnitte (siehe Abbildung 6) durch PCR amplifiziert.

Durch die Primer wurde am 5' Ende der jeweiligen Spidroinsequenz eine EcoRI- und eine NdeI-Schnittstelle (mit ATG Startkodon) und am 3'-Ende ein Stopkodon und eine BamHI-Schnittstelle eingeführt. Nach Restriktionsschnitten mit EcoRI und BamHI wurden die PCR-Produkte in pBluescript KSII subkloniert und durch Sequenzierung kontrolliert. Die Fragmente wurden mit NdeI und BamHI herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pET15a ligiert. Durch die

Ligation der NdeI Schnittstelle des Fragments mit der des Vektors wird die zu exprimierende Sequenz an einen Leserahmen mit einem Startkodon am 5'-Ende sowie 6 Histidinen zur Aufreinigung angehängt, der unter der Kontrolle eines T7-Promotors steht. (Bemerkung: Der Promotor wird von der T7 RNA Polymerase erkannt. Die Expression der T7 Polymerase ihrerseits ist durch die Anwesenheit des Lac-Repressors gehemmt, der an den Promotorbereich bindet und das Ablesen des T7 Polymerase-Gens durch die bakterielle RNA Polymerase verhindert. Der Lac-Repressor wird durch Bindung von IPTG inaktiviert, so dass dann T7 Polymerase gebildet werden kann. Dies führt wiederum zur Expression der gewünschten, klonierten Gene. Der Vorteil von induzierbaren Systemen besteht darin, dass die Zellen zunächst ohne Interferenz mit z.B. toxischen Proteinen herangezüchtet werden können und dann erst die Expression erfolgt).

Die klonierten Fragmente entsprechen den publizierten Sequenzen von MASp1 und MASp2. Die Fragmente entsprechend den Nucleotiden 1933-2247 und 1693-1935 von MASp1 werden nachfolgend als S1C und S1R, die Fragmente entsprechend den Nucleotiden 1561-1884, 1429-1581 und 1228-1469 von MASp2 als S2C, S2CR und S2R bezeichnet.

2.4.2 EXPRESSION UND REINIGUNG

Zur Expression und Reinigung der rekombinanten Polypeptide H₆-S1C, H₆-S2C, H₆-S2CR, H₆-S1R und H₆-S2R wurden kompetente E.coli Bakterien des Stammes BL21 (DE3) mit pET15a-Plasmiden transfiziert, die das entsprechende Insert tragen. Nach Aufschluss der Bakteriensuspension wurden die Proteinextrakte durch Affinitätschromatographie gereinigt.

2.4.2.1 MEDIEN

TB-Medium (Terrific Broth):

12 g Bacto-Trypton (Serva), 24 g Bacto-Hefe-Extrakt (Serva), 4 ml Glycerol (Sigma) zu 900 ml H₂O; Autoklavieren zur Sterilisation

Phosphatpuffer für TB-Medium:

170 mM KH₂PO₄ (Sigma), 720 mM K₂HPO₄ (Sigma); Autoklavieren zur Sterilisation (extra wegen eventuellen Ausfallens von Salzen) und vor dem Beimpfen 100 ml zum Medium geben.

SOC-Medium:

zu 950 ml H₂O:

20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250mM KCl (Sigma)

auf pH 7,0 einstellen mit 5 N NaOH

Auffüllen des Volumens auf 1 Liter und Autoklavieren. Nach Abkühlen auf ~60°C 5 ml 2M MgCl₂ (Sigma) (autoklaviert) und 20 ml 1M Glucose (sterilfiltriert) zugeben.

LB-Medium (Liquid Broth):

10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl; mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

LB-Agarplatten:

15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium aufkochen, auf etwa 60°C abkühlen lassen und 100 µg/ml Ampicillin dazu geben und mischen. In Petrischalen (Greiner) gießen und erkalten lassen.

2.4.2.2 TRANSFEKTION

200 µl kompetente BL21 (DE3) *Escherichia coli* Zellsuspension wurde auf Eis aufgetaut, 1 µl Expressionsvektor (0.1 mg/ml) zugegeben und 1/2 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 42°C für exakt 30 Sekunden inkubiert und dann 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC oder LB -Medium wurde für 30 Min. unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden für 20 Sekunden bei 10 000 U/min abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Der Niederschlag Pellet wurde im Rest resuspendiert und auf eine LB-Platte ausplattiert, die 100 µg/ml Ampicillin enthält (Bemerkung: Das Plasmid trägt als Selektionsmarker ein Resistenzgen für Ampicillin. Es können auf der Platte also nur die Zellen wachsen, die den Vektor erhalten haben). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.2.3 EXPRESSION

Je 1 Liter TB oder LB Medium wurde mit 100 µg/ml Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml in Wasser) versetzt und mit 2-4 Kolonien von der Platte beimpft.

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C unter Schütteln (~100 U/min) wurde am nächsten Morgen nochmals die gleiche Menge frisches Ampicillin zugeben. Im Falle von LB Medium wurde solange heftig geschüttelt, bis eine O.D.600 von 0.6 bis 0.9 erreicht war (ca. 2-4 Stunden). Bei TB Medium wurde eine 1:10 Verdünnung vermessen.

Die Expression wurde durch Zugabe von 1 ml 1M IPTG induziert. Nach 1 Stunde wurden die Zellen bei 6000 U/min 10 Minuten im Sorvall GSA Rotor abzentrifugiert und optional einmal mit 50-100 ml PBS pH 7,2 gewaschen. Das Sediment kann an diesem Schritt bei -70°C aufbewahrt werden.

2.4.2.4 ZELLAUFSCHLUSS

Aufschlusspuffer: 20 mM Tris-HCl pH8; 100 mM NaCl; 10 mM Imidazol (mit und ohne 8M Harnstoff)

Das Zellpellet eines Liters Medium wurde in 15 ml Aufschlusspuffer bei LB-Medium bzw. 100 ml bei TB-Medium suspendiert und mit Ultraschall (Microtip-Limit; 50 % Duty-cycle) für eine Minute auf Eis aufgeschlossen.

Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 15' bei 4°C und 15000-18000 U/min entfernt. Nötigenfalls wurde der Überstand nochmals zentrifugiert.

2.4.2.5 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

<u>Dialysepuffer:</u>	20 mM Hepes-KOH pH 7,8, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 10% Glycerol
<u>Elutionspuffer:</u>	20 mM Tris-HCl pH8; 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 8M Harnstoff
<u>Regenerationspuffer</u>	20 mM Tris-HCl pH8; 100 mM NaCl, 10 mM NiSO ₄ oder CoCl ₂ (je nach Säulentyp)

Der Rohextrakt wurde mittels Gravitation über eine im Aufschlusspuffer equilibrierte 1 ml Säule von Talon Metall-Affinitätsmaterial (Clontech) gegeben. (Bemerkung: Das Insert wird so exprimiert, dass es einen sogenannten His-Tag, das sind 6 aufeinander folgende Histidine, an seinem N-Terminus trägt. Diese Histidine können mit Metallionen wie z.B. Ni²⁺ und Co²⁺ ein Chelat bilden). Die Säule wurde 3x mit 10 ml Aufschlusspuffer gewaschen. Im Falle einer denaturierenden Aufreinigung wurde dabei zunächst mit dem harnstoffhaltigen Aufschlusspuffer gewaschen und danach der Harnstoff durch Aufschlusspuffer ohne Harnstoff ausgewaschen.

Die Säule wurde mit 8 mal 0.5 ml, Elutionspuffer eluiert (Bemerkung: Bei einer Konzentration von 80 mM verdrängt das Imidazol die Histidine von den Metallionen). Von jeder Fraktion wurden je 5 µl in eine Microtiterplatte gegeben und 100 µl BioRad Protein Assay Lösung dazugeben. Die proteinhaltigen Fraktionen, wenn erkennbar durch die Intensität der Blaufärbung, wurden vereinigt. Zusätzlich wurden vor der Vereinigung die Fraktionen ihr Gehalt an rekombinantem Protein mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassiefärbung kontrolliert.

Die vereinigten Fraktionen wurden in Dialysierkapseln mit einer Membran einer Ausschlussgröße von 4000 (MWCO) bei 4°C über Nacht gegen einen Liter Dialysepuffer dialysiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.3 CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN POLYPEPTIDE

2.4.3.1 GELELEKTROPHORESE

Zur Überprüfung der Expression und zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurden die Proben mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (vgl. Kap. 2.6.1) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Zur vergleichenden Abschätzung des Proteingehalts wurden Konzentrationsreihen von 5, 2 und 1 µg eines BSA Standards (Biorad) (10 mg/ml) auf die Gele mit aufgetragen.

2.5 GEWINNUNG DER EINGESETZTEN ANTISEREN

PBS pH 7.2. 8 g/l NaCl; 0.2 g/l KCl; 2.9 g/l Na₂HPO₄; 0.2 g/l KH₂PO₄; hat pH 7.2

TBS/T –Puffer 10x: 100 mM Tris (Sigma) mit HCl auf pH 8 einstellen, 1,5 M NaCl (Sigma), 0,5% Tween20 (Roth)

Trypsinlösung 25% (Gibco BRL); PEG 7000 (Sigma)

2.5.1 ANTISEREN GEGEN SEIDE

Zur Gewinnung von Antiseren gegen Spinnenseide wurde eine Probe abgespulter Seide geteilt und ein Teil in PBS gewaschen. Der zweite Teil wurde zuerst mit einer 25%igen Trypsinlösung (Gibco BRL) behandelt, bevor er in PBS gewaschen wurde. Beide Proben wurden mit einem Polytron Homogenisator mechanisch zerkleinert und nach Standardprotokollen der Fa. Biogenes (Berlin) je zwei Kaninchen subkutan injiziert.

2.5.2 ANTISEREN GEGEN REKOMBINANTE POLYPEPTIDE

2.5.2.1 ANTISEREN AUS KANINCHEN

Rekombinante Proteine H₆-S1C, H₆-S2C, H₆-S2CR, H₆-S1R und H₆-S2R wurden exprimiert, gereinigt und zur Antiserenproduktion in Kaninchen an Fa. Biogenes (Berlin) geschickt. Mit jedem Protein wurden je 2 Tiere immunisiert. Die Spezifität der Seren wurde an Western Blots der gleichen Proteinchargen getestet.

Zur Gewinnung von spezifischen Antikörpern für Spidroin 1 und 2 wurden die speziesspezifischen Anteile der Seren (d.h. die Antikörper, die ausschließlich mit ihrem rekombinanten Antigen reagieren) - wie nachfolgend beschrieben - gewonnen:

Die affinitätsgereinigten rekombinanten Proteine (75µl Probe in 75µl 4x Lämmli Ladepuffer und 150 µl H₂O; ~150-300 µg Protein, je nach Charge) wurden durch SDS-PAGE (Kleingele 15% Acrylamid 300 µl-Kamm) nach ihrem Molekulargewicht getrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Blots wurden mit PonceauS-Lösung gefärbt, mit H₂O gewaschen und zwischen Parafilm gelegt und der Proteinstreifen mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Streifen wurden mit TBS-Tween entfärbt, mit Milchpulver (5g in 25 ml TBS-Tween) abgesättigt und dann 2x 15' mit TBST gewaschen.

Zur Gewinnung monospezifischer Fraktionen wurden Portionen der Antiseren mit den Blotstreifen ihres Antigens ü.N. bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Streifen 6x 5' mit TBS-Tween gewaschen. Die Streifen wurden mit (1 ml) Elutionspuffer 2'30''

bei 4°C inkubiert, der Überstand in Eppendorfgefäße überführt und mit 250 µl Neutralisationspuffer versetzt. Das Eluat wurde ü.N. bei 4°C gegen PBS dialysiert und mit Thimerosal [Endkonz. 0,02 %] versetzt. Zur Reinigung evtl. noch bestehender Kreuzreaktionen wurden die monospezifisch gereinigten Fraktionen in gleicher Weise mit Blotstreifen des kreuzreagierenden rekombinanten Polypeptids inkubiert. Im Falle der Antiseren α -S1R und α -S2R wurden die Kreuzreaktionen auch durch Inkubation des Ausgangsserums (30' bei RT) mit dem kreuzreagierenden rekombinanten Polypeptid in 10-fachem Überschuss (v/v) gereinigt.

2.5.2.2 ANTISEREN AUS HÜHNERN

Die rekombinanten Proteine H6-S1R und H6-S2R wurden in E.coli BL21 DE3 exprimiert und affinitätsgereinigt. Anschließend wurden jeweils ~1 mg der rekombinanten Proteine durch SDS-PAGE (Kleingele 15% Acrylamid 300µl-Kamm) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue wurde die jeweilige Proteinbande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Immunisierung wurde von der Fa. Biosciences (Göttingen) nach deren Standardprotokollen in je 2 Hühnern pro Protein durchgeführt.

2.5.2.2.1 AUFREINIGUNG DER IGY-FRAKTION AUS EIDOTTER:

Im Gegensatz zur Serengewinnung bei Säugern kann bei Vögeln das Antiserum nicht nur aus dem Blut sondern auch aus Eidottern gewonnen werden. Üblicherweise steigen die Titer innerhalb von 10 Tagen nach der Sekundärimmunisierung stark an und bleiben mehrere Wochen auf diesem erhöhten Niveau. Deshalb wurden die vom 10. – 30. Tage nach dem zweiten Boost gelegten Eier wie folgend beschrieben aufgearbeitet:

Die Eidotter wurden vom Eiklar grob getrennt und durch Rollen auf Papiertüchern soweit vom verbliebenen Eiklar gesäubert, bis die Dotterhaut matt glänzend erkennbar ist. Sodann wurde das Papiertuch und die Dotterhaut durchstochen und das Eigelb in einem Messzylinder aufgefangen. Nach der Bestimmung des Dottervolumens wurde das Eigelb mit eiskaltem PBS auf einen Volumenanteil von 2:3 verdünnt, der Messzylinder mit Parafilm verschlossen und durch Stürzen desselben gut gemischt. Die Dotterlösung wurde zu gleichen Teilen auf Zentrifugenbecher verteilt und mit gleichen Volumina einer 7%igen PEG 7000 (Sigma) Lösung (in PBS) gut vermischt. Nach 20' Zentrifugation bei 20.000g und 4°C wurde der Überstand durch ein Faltenfilter filtriert und in einem Messzylinder das Volumen bestimmt.

Das Filtrat wurde zu gleichen Teilen auf Zentrifugenbecher verteilt. Durch Zugabe von festem PEG wurde die Konzentration auf 12% gebracht. Zur Lösung des PEG wurden die Becher für 20' bei

37°C geschüttelt. Nach 30' Zentrifugation bei 20000g und 4°C (Zentrifuge) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Sediment in einem dem ursprünglichen Dottervolumen entsprechenden Volumen an PBS-Puffer gelöst. Nach Zugabe des gleichen Volumens einer 24%igen PEG 7000 (Sigma) Lösung (in PBS) wurde erneut 30' bei 20.000g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Sediment in einem etwa dem halben ursprünglichen Dottervolumen entsprechenden Volumen an PBS-Puffer aufgenommen. (Optional kann an dieser Stelle mit dem gleichen Volumen von auf -20°C gekühltem 50%igem Ethanol gefällt werden, um PEG zu entfernen.). Die Lösung wurde bei 4°C 3x für 12h gegen je 1 l PBS dialysiert.

2.5.3 CHARAKTERISIERUNG DER ANTISEREN

Die Antiseren wurden auf ihre Reaktivität zu ihrem antigenen rekombinanten Protein und auf Kreuzreaktivität zu den anderen rekombinanten Proteinen getestet. Dazu wurden Western Blots der rekombinanten Proteine hergestellt, indem auf 15%-ige Kleingele (15 Taschen) je 2 µg/Spur aufgetragen und mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE getrennt wurden.

2.5.4 NACHWEIS VON SPIDROINEN IN GELÖSTER SEIDE.

Dot Blots:

Es wurden Mischproben (Mix), reine MAS und reine MIS in Lithiumrhodanid gelöst (2 mg/ml) und je 1 µl auf etwa 0,5 cm breite Streifen von Nitrozellulose gespottet.

Western Blots:

Für Western Blots wurden 2 µg von in Hexafluorisopropanol (HFIP) gelöster Seide (10 mg/ml), Drüsenextrakt in 8 M Harnstoff (5 Drüsen in 200 µl) oder die Ampullenextrakte (vgl. 2.3) durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

Dot und Western Blots wurden wie unter 1.2.4.1.1 beschrieben prozessiert.

2.6 GELEKTROPHORESEN UND WESTERN BLOTTING

Alle Gelelektrophoresen und Western Blots wurden im Kleingelformat mit dem Equipment von Biorad (Biorad Protean) durchgeführt. Die präparativen Gele für die Immunisierung wurden mit 1 mm Abstandhaltern gegossen. Ansonsten wurden Abstandhalter einer Stärke von 0,75 mm verwendet.

2.6.1 DISKONTINUIERLICHE SDS-PAGE (LAEMMLI⁶⁹)

- Fertiggele: Tris-Glycin ready gels Gradientengele (Biorad) 4-15%
Lösung A: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (gebrauchsfertige Lösung von Serva)
Lösung B: 1,5 M Tris; 0,4% SDS (Sigma); mit HCl pH 8,8 einstellen
Lösung C: 0,5 M Tris; 0,4% SDS; mit HCl pH 6,8 einstellen
Laufpuffer (10x): 30,33 g Tris, 144 g Glycin (Sigma), 100 ml SDS 10% ad 1l (hat pH 8,3)

Trenngele:

	7,5%	10%	13%	15%
A.dest.	58,3 ml	41,5 ml	31,7 ml	25 ml
Lösung A	16,7 ml	33,5 ml	43,3 ml	50 ml
Lösung B	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml

Lösung entgasen und Portionen à 7,5ml oder 15ml (entspr. 2 oder 4 Gelen) bei -70°C lagern.

Trenngele mit Agarose:

- A: 2 ml Lösung A, 3,75 ml Lösung B, 1,75 ml A.dest.
 B: 7,5 ml 2% Agarose (NuSieve low melt)

Sammelvele:

	3%	4%	5%
A.bidest.	9,75 ml	9,25 ml	8,75 ml
Lösung A	1,5 ml	2,0 ml	2,5 ml
Lösung C	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml

Ladepuffer (4x) (nach Lämmli):

12,5 ml Lsg. C, 5 ml Glycerol, 1 g SDS, 2,5 ml Mercaptoethanol (oder 0,2 M DTT), ~0,5 mg Bromphenolblau, mit A.dest. auf 25 ml auffüllen.

Nichtreduzierender Ladepuffer (4x):

12,5 ml Lsg. C, 5 ml Glycerol, 1 g SDS, ~0,5 mg Bromphenolblau (VWR), mit A.dest. auf 25 ml auffüllen.

Molekulargewichtsmarker

- Prestained Protein Marker, Broad Range (BioLabs Inc.)
 Prestained Protein Marker, 7b (Sigma)
 10kDa step ladder, prestained (Gibco)

Zum Gießen der Gele wurde eine entsprechende Menge an Aliquots der gewünschten Konzentration aufgetaut und mit 0,66 µl TEMED pro 1 ml Gellösung vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 2,53 µl (pro 1 ml) 15%-igem APS wurden die Trenngele gegossen und mit 100 µl 0,1% SDS überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das SDS abgegossen, eine ausreichende Menge Sammelgellösung mit 1 µl TEMED und 8 µl 15%-igem APS pro 1 ml

Gellösung gemischt, möglichst blasenfrei auf das Trenngel aufgebracht und der Kamm eingesetzt. Die Gele wurden z.T. bis zu 2 Wochen feucht bei 4°C gelagert.

Die Elektrophoresen wurden stromlimitiert mit max. 25 mA/ Gel gefahren.

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE mit 4%-igem Trenngel wurde dieses durch 1% Agarose verstärkt. Dazu wurde eine Portion doppelkonzentrierter Trenngellösung (8% Acrylamid, doppelte Pufferkonzentration) aufgetaut und die 2%-ige Agaroselösung in der Mikrowelle geschmolzen. Zunächst wurde ein 15%-iges PA Fußgel gegossen. Wenn die Agaroselösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden gleiche Volumen der beiden Lösungen (A+B) gemischt, mit TEMED und APS (s.o.) versetzt und das Trenngel gegossen.

2.6.2 FÄRBUNG MIT COOMASSIE BRILLIANT BLUE

Färbelösung: 10 % Essigsäure, 40 % Methanol, 50 % A.dest., 1% Farbstoff (Coomassie R und G von VWR, für Western Blots 0,1%)

Entfärber: 10 % Essigsäure, 40 % Methanol, 50 % A.dest.

Die Gele wurden direkt nach der Elektrophorese für (mind.) 1h in Färbelösung und anschließend mit Entfärber unter Schütteln inkubiert.

2.6.3 SILBERFÄRBUNG

Fixierlösung: 10% Essigsäure, 50% Methanol

Inkubationslösung: 30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,2% Natriumthiosulfat, 0,5% Glutardialdehyd

Silberlösung: 0,1 % AgNO₃

Entwickler: 2,5% Natriumcarbonat, 0,02% Formaldehyd, pH 11,3 mit Natriumhydrogencarbonat einstellen

Stopper: 0,05 M EDTA, (zur Lagerung 0,02% Thimerosal zugeben)

Die Gele wurden zunächst ü.N. bei RT in Fixierlösung, dann 2h in Inkubationslösung inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für insges. 1h in A.dest. wurde 30' in Silberlösung inkubiert. Nach dem Abgießen der Silberlösung wurde 2x kurz in A.dest. gespült und Entwickler zugegeben (Es empfiehlt sich, die Gele erst in wenig Entwickler zu schwenken, diesen zu verwerfen und dann in frischem Entwickler weiter zu inkubieren). Die Färbung wird nach etwa 5-8' sichtbar (Färbung beobachten). Sobald eine Färbung des Hintergrunds einsetzte, wurde der Entwickler mit A.dest. ausgespült, das Gel anschließend für 10' in A.dest. gewaschen und 30' in Stopper inkubiert.

2.6.4 WESTERN BLOTTING UND IMMUNOLOGISCHE DETEKTION

Blotpuffer: 10 mM Natriumhydrogencarbonat, 3mM Di-Natriumcarbonat pH 10 (optional mit 10%Methanol)

Ponceau S: 0,5 g PonceauS in 1 ml Eisessig lösen, auf 100 ml verdünnen.

TBS/T –Puffer 10x: 100 mM Tris (Sigma) auf pH 8 einstellen, 1,5 M NaCl (Sigma), 0,5% Tween 20 (Roth)

Blockierungspuffer

0,5% Casein in PBS-Puffer oder in TBST-Puffer

5% Milchpulver in TBST-Puffer

2% BSA(Fraktion V, Sigma) in PBS oder TBST

2% Gelatine in TBST

Lectinpuffer PBS + 1mM MgCl₂

Lectine Concavalin A (ConA), Biotin Konjugat

Wheat Germ Agglutinin (WGA), Biotin Konjugat

Jacalin, Biotin Konjugat

Uleus Europaeus Agglutin I (UEA-I), Biotin Konjugat

Sekundäre Antikörper

Goat Anti-rabbit IgG (Fc); Alkalische Phosphatase Konjugat (Promega)

Goat Anti-rabbit IgG (Fc); Peroxidase Konjugat

Donkey Anti-Hen IgY (H+L); Alkalische Phosphatase Konjugat (Dianova)

Donkey Anti-Hen IgY (H+L); Peroxidase Konjugat (Dianova)

Streptavidin Peroxidase Konjugat (Dianova)

Alkalische Phosphatase Detektionspuffer pH 9.5

0,1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM MgCl₂

Chemoluminiszenzsubstrate

CDP-Star (Böhringer) für alkalische Phosphatase

ECF: AttophosAP Fluoreszent Substrate (Promega)

ECL kit (Amersham) für Peroxidase

Peroxidase Substrate Kit (Biorad)

Kodak BiomaxML Film für Chemoluminiszenz

2.6.4.1.1 WESTERN BLOTTING⁷⁰

Schwämme und Filterpapier wurden in Blotpuffer eingeweicht. Nitrozellulosemembranen wurden vor Gebrauch kurz in A.dest. gewaschen und für 5' in Blotpuffer inkubiert. PVDF-Membranen wurden für 1' in Methanol und anschließend für 5' in Blotpuffer inkubiert. Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 5' in Blotpuffer inkubiert und anschließend mit den Membranen in den Blotgestellen mit je einem Schwamm und Filterpapier auf jeder Seite montiert. Der Transfer wurde in eisgekühltem Puffer bei 150 mA für 1h durchgeführt. Falls nötig wurden die Blots mit PonceauS Lösung 1' gefärbt, zwischen Parafilm gelegt, zerschnitten und mit TBST entfärbt.

Für den Transfer der hochmolekularen Spidroine wurde die Methode optimiert. Dem Blotpuffer wurde 20% Methanol beigegeben und die Transferzeiten auf 2,5 h erhöht. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurden 2 Membranen aufgelegt und Gele sowie Western Blots nachfolgend mit Coomassie gefärbt.

Zur N-terminalen Mikrosequenzierung wurden die Western Blots ebenfalls mit Coomassie (0,1%) gefärbt, zwischen Parafilm gelegt und die zu sequenzierenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Sequenzierung, Deblockierungsversuche mit TFA-Dämpfen und Auswertung der Chromatogrammen wurden freundlicherweise von Frau Willitzer durchgeführt.

2.6.4.1.2 DETEKTION

Folgende Schritte wurden durchgeführt:

- Blot mit Blockierungspuffer (für jedes System ausgetestet, Casein bei AP, Milchpulver bei HRPO, Gelatine für Lektine) 1h auf Schüttler inkubieren (alternativ auch ü.N. im Kühlraum)
- mit primären Antikörpern oder Lektinen inkubieren (entweder ü.N. im Kühlraum oder 1h RT). Verdünnung wie angegeben (bei ungereinigten Antiseren üblicherweise 1:1000, Ausnahme α -S2CR) je nach Intensität des Antiserums in Blockierungspuffer. Zur Wiederverwendung wurden die verdünnten Antiseren mit Thimerosal [Endkonz. 0,02 %] versetzt und bei 4°C gelagert.
- 2x 15' in TBST waschen und 1h bei RT mit sekundärem Antikörper (oder bei Lektinen mit Streptavidinkonjugat) inkubieren. Verdünnung 1:10000 in Blockierungspuffer (Lösung mehrfach verwendbar).
- 2x 15' in TBST waschen.

Ab hier folgen je nach Detektionssystem unterschiedliche, von den Herstellern empfohlene Protokolle, nach denen vorgegangen wurde. Bei den ECL-Systemen mit Peroxidase kann direkt mit dem Substrat inkubiert werden. Für den Nachweis durch alkalische Phosphatase wird 2x 5' in einem Detektionspuffer equilibriert, bevor mit dem jeweiligen Substrat inkubiert wird. Chromogene Färbungen (BCIP/NBT, DAB/NiCl₂) wurden nach Standardprotokollen⁷¹ durchgeführt.

Speziell für ECL Systeme:

- Streifen auf Kopierfolie legen und die überschüssige Flüssigkeit absaugen (nicht trocken!)
- ECL-Substrat auftropfen, so dass der Blot gleichmäßig getränkt wird und inkubieren (nach Angabe des Herstellers)
- Flüssigkeit absaugen (nicht trocken!), Deckfolie schließen. (Bei ECF kann getrocknet werden. Die Blots wurden mit einem Phosphoimager gescannt)
- In Kassette montieren, Film auflegen und belichten.
- Film 1'30'' bis 2' entwickeln, waschen, 1' fixieren, intensiv waschen und trocknen

2.6.5 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG

<u>Fertiggele:</u>	BioRad IEF ready gels, pH 3-10, 15 well (15 µl)
<u>Kathodenpuffer:</u>	20 mM Lysin (freie Base), 20 mM Arginin (freie Base)
<u>Anodenpuffer:</u>	7 mM Phosphorsäure
<u>Färbelösung:</u>	Biorad ready-to-use IEF staining solution

Für die isoelektrische Fokussierung wurde das von Biorad für die Proteankammern entwickelte Fertigsystem nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden auf die gewünschte Auftragsmenge mit IEF-Puffer verdünnt und mit DTT [50mM] oder Tributylphosphin [2mM] versetzt. Nach Inkubation (mind. 30') wurden die Proben 1:2 mit 50% Glycerol verdünnt, dem optional zum besseren Auftrag Bromphenolblau zugesetzt werden kann.

Die Fokussierung wurde 1h bei 100V, 1h bei 250V und 30' bei 500V durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit der Biorad IEF Gel Stain Fertiglösung nach den Angaben des Herstellers.

2.7 SEQUENZVERGLEICH DER C-TERMINI

Für den Sequenzvergleich der C-Termini wurden über PubMed alle verfügbaren Spidroinsequenzen gesucht und diejenigen ausgewählt, die eindeutig als C-terminal bezeichnet sind oder als solche erkennbar waren. Die verwendeten Sequenzen sind mit Referenzen, soweit vorhanden, und Zugangsnummer nachfolgend gelistet:

ABF-1 (U20238); Beckwitt et al.⁷²;

ADF-1 (U47853), ADF-2 (U47854), ADF-3 (U47855) und ADF-4 (U47856); von Guerette et al.²⁰ unter Berücksichtigung der Korrektur für ADF-4 gefunden in Hayashi et al.⁴¹;

AAF-1 (AF350262), AAF-2 (AF350263), ATF-1 (AF350266), ATF-2 (AF350267), GMF-1 (AF350372), LGF-1 (AF350273), LGF-2 (AF350275), NMF-1 (350277), NMF-2 (350278), NSF-1 (AF350279), NSF-2 (AF350280), TKF-1 (AF350285), TVF-1 (AF350286), ECF-1 (AF350271), DTF-1 (AF350269), DTF-2 (AF350270), PTF-1 (AF350281), PTF-2 (AF350282), PTF-3 (AF350383), PTF-4 (AF350384) von Gatesy et al.⁷³;

NTF-1 (AF441245); AVF-1 (AY174110), AVF-2 (177203); NCF-1 (M37317) von Xu et al.²¹ in korrigierter Version (U20329) von Beckwitt et al.⁷⁴;

NCF-2 (M92913) von Hinman et al.⁷⁵; NCF-3 (AF027735) and NCF-4 (AF027736) von Colgin et al.⁷⁶.

Die C-terminalen Peptidsequenzen wurden mit der Subroutine Megalign des Programms DNA-Star (DNA-Star Inc.) nach Identität gruppiert.

2.8 MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FADENSTRUKTUR

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden mit einem neuen stereomikroskopischen (HLSM) Hochleistungsverfahren der Fa. Zeiss durchgeführt. Das Verfahren basiert auf einer Modulation des Beleuchtungsstrahlengangs, wodurch alle Vorzüge und Eigenschaften herkömmlicher Mikroskope erhalten bleiben. Das verwendete Gerät ist ein Axiovert 100, dem vor den Kondensor ein Shutter eingesetzt ist. Die Halbbilder werden mit hoher Frequenz erzeugt, so dass eine stereoskopische Beobachtung in Echtzeit möglich ist.

Es wurden handelsübliche Objektive von Zeiss (Apoplan und Neofluar) mit Vergrößerungen von 5x bis 100x verwendet. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurden die Neofluar Objektive 100x, 1.3 Ph3 und 40x, 0.8 Ph2 eingesetzt. Die mikroskopische Abbildung wurde mit einer CCD-Kamera (Kamera und Steuerung von Kappa) aufgenommen, auf S-VHS aufgezeichnet und später Einzelbilder (Halbbilder) entweder digitalisiert oder mit einem Thermoprinter gedruckt. Die stereoskopischen Aufnahmen in dieser Arbeit ergeben, mit einer Lorgnette betrachtet, ein dreidimensionales Bild (dies ist allerdings vom Betrachter abhängig).

Lichtmikroskopische Färbungen wurden nach den Protokollen von Romeis⁷⁷ durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss EM 902 bei 80 kV durchgeführt.

2.8.1 EINFLUSS VON LÖSEMITLEN

Für die mikroskopische Untersuchung der Einflüsse von Lösemitteln wurde ein Faden (Holzrahmenprobe) auf einem Deckglas positioniert (unbefestigt und mit Leitsilber (Plano) befestigt), mit einem Deckglas abgedeckt und zunächst trocken examiniert. Dann wurden 20µl des Lösungsmittels aufgetropft und der Faden mit hoher Vergrößerung in seiner Länge nach Veränderungen abgesucht. Parallel wurden Mischproben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit je 1 ml des entsprechenden Lösemittels ü.N. auf einem Schüttler inkubiert. Die Fadenproben wurden in Augenschein genommen und dann mikroskopisch untersucht (ggf. wurden Färbungen durchgeführt). Auf diese Weise wurde der Einfluss von Wasser, PBS, 0,05 M, 0,1 M und 0,2 M CaCl₂-Lösungen sowie von den Lösemitteln Aceton und Ethanol untersucht.

Außerdem wurden der Einfluss von 1%-iger TritonX-100 Lösung sowie 8M Harnstofflösung in dieser Weise lichtmikroskopisch examiniert. Zusätzlich wurden Mischproben zunächst 1h bei 95°C in diesen Lösungen gekocht und dann examiniert. Teile der ü.N.-Proben und der 95°C-Proben wurden in EPON eingebettet und elektronenmikroskopisch untersucht.

Der Einfluss von 8M Harnstofflösung wurde auch an geschnittenen Fadenstücken licht- und videokontrastmikroskopisch untersucht, die nach den Angaben von Vollrath et al.⁷⁸ behandelt wurden.

2.8.2 SÄUREABDAUVERSUCHE

In Vorversuchen wurden Mischproben in Eppendorfgläsern mit je 1 ml Eisessig inkubiert. Nachdem keine Auflösung beobachtet wurde, sind zu den Proben verschiedene Volumina einer 37%igen HCl zugegeben worden. Dabei wurde festgestellt, dass bei etwa 300-400 µl die Auflösung beginnt.

Für die mikroskopische Untersuchung des Lösevorgangs wurde ein Faden (Holzrahmenprobe) auf einem Deckglas positioniert (unbefestigt und mit Leitsilber (Plano) befestigt), mit einem Deckglas abgedeckt und zunächst trocken examiniert. Dann wurden 10µl des Säuregemischs aufgetropft und der Faden mit hoher Vergrößerung in seiner Länge nach Veränderungen abgesucht. Die Versuche wurden auf S-VHS aufgezeichnet.

Mischproben wurden mit je 1 ml Essigsäure/Salzsäuregemisch im Verhältnis 20:80, 30:70, 50:50 und 70:30 über Nacht inkubiert und in einer Minischzentrifuge (Beckmann) 10' bei 14.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig bis auf etwa 100 µl abgesaugt. Der Rest wurde mit einer Pasteurpipette auf ein Deckglas transferiert und mikroskopiert. Ggf. wurde die Probe im Anschluss mit Coomassie gefärbt und mit Ethanol entfärbt.

Massenbestimmung:

Zur Massenbestimmung wurden Tara und Einwaagen (~30mg) ausgewogen. Aus Eisessig und 37%iger HCl wurden je 10 ml Gemische in den Verhältnissen 80:20, 70:30 und 50:50 hergestellt und zu allen Proben je 1 ml Gemisch pipettiert. Die Proben wurden mit dem Vortexer durchmischt und dann bei RT auf dem Schüttler ü.N. inkubiert.

Die Proben wurden bei 14 000 U/min 10' zentrifugiert, der Überstand fast trocken abgesaugt und zu den Sedimenten je 300 µl Säuregemisch zupipettiert, mit dem Vortexer durchmischt und ü.N. geschüttelt.

Zur Kontrolle wurden die Überstände nochmals 30' zentrifugiert.

Die Sedimente wurden nochmals 15' zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Sedimente getrocknet, indem Eppendorfgefäße für 45' auf den Kopf gestellt wurden. Die Nassgewichte wurden bestimmt. Die Sedimente wurden 3x mit gefiltertem A.dest. gewaschen, indem auf 1 ml aufgefüllt, mit dem Vortexer durchmischt, bei 14000 U/min 10' zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen wurde.

Die Proben wurden wie oben getrocknet und gewogen, bevor sie ü.N. in der Speedvac vakuumgetrocknet und die Trockengewichte bestimmt wurden.

2.8.3 EINBETTUNG IN EPON

EPON (Plano)

Ansatz in dieser Reihenfolge einwiegen und bei jedem Schritt gut vermischen!

Epon A: 7,1 g Epon 912, 6,5 g DDSA, 2,75 g MNA (ca. 16 g oder ml)

Epon B: 16g Epon A, 0,26 ml DMP30

Die Fadenproben wurden über Nacht bei 4°C in 0,5% Glutardialdehyd in PBS fixiert. Anschließend wurde 3x 10' in PBS gewaschen und für 1h bei 4°C in Osmiumtetroxid (1%ig) inkubiert. Nach 6x 5' Waschen in filtriertem H₂O wurde 30' in Uranylacetat (2%ig) kontrastiert und anschl. 3x 5' in filtriertem H₂O gewaschen.

Die Entwässerung erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe (je 2x 15' 30%, 50%, 70%, 90%, abs. Ethanol) und in Propylenoxid (2x 1h). Nach jeweils 12h Infiltration in 25%, 50%, 75% (v/v) EPON A in Propylenoxid, Infiltration in 100%igem EPON A und Infiltration in 100%igem EPON B wurde für mindestens 24h bei 65°C polymerisiert.

Die polymerisierten Proben wurden zurechtgetrimmt und Ultradünnschnitte mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut S) mit Diamantmesser (Diatome 45°) hergestellt. Die Ultradünnschnitte wurden auf mit Formvar befilmten und kohlebedampften Kupfernetzchen transferiert und adhärirt. Die Schnitte wurden mit Bleizitrat und mit Uranylacetat nachkontrastiert⁷⁹.

2.9 NACHWEIS DER VERTEILUNG VON SPIDROINEN IN FÄDEN UND DRÜSEN

2.9.1 EINBETTUNG VON FÄDEN IN LR-WHITE

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde in das für diesen Zweck entwickelte Kunstharz LR-White eingebettet. Als Proben wurden unbehandelte Fadenmischproben, mit 8M Harnstoff gekochte Mischproben und bei definierten Geschwindigkeiten (3,8 u. 0,6 m/min.) abgespulte MAS verwendet. Außerdem wurden komplette Drüsen mitsamt Dukt und Spinnwarze eingebettet und sowohl Semidünnschnitte für das Fluoreszenzmikroskop als auch Ultradünnschnitte gefertigt.

Einbettungsschema:

- Fixierung über Nacht bei 4°C in 0,5% Glutardialdehyd in PBS, anschl. 3x 15' waschen in PBS
- Fixierung/Kontrastierung in Osmiumtetroxid (1%ig), anschl. 6x 10' waschen PBS
- Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (je 2x 30' in 30%, 50%, 70%, 90%, abs. Ethanol)
- Infiltration jeweils über Nacht bei 4°C in 25%, 50% und 75% LR-White in Ethanol
- Infiltration 24h bei 4°C in 100%ig LR-White
- Proben auf -20°C kühlen, LR-White auf Trockeneis mit Polymerisationsstarter (1 Tropfen auf 10 ml) mischen und Proben mit ¾ dieses Gemisches mischen
- Polymerisation bei -20°C für 2 Tage
- Die polymerisierten Proben wurden zurechtgetrimmt und Semi- oder Ultradünnschnitte mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut S) mit Diamantmesser (Diatome 45°) hergestellt. Semidünnschnitte wurden auf SuperFrost Objektträger, Ultradünnschnitte auf Nickelnetzchen mit kohlebedampften Formvarfilm (Plano) transferiert und adhärirt.

2.9.2 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die Objektträger mit den Semidünnschnitten wurden markiert und in eine feuchte Kammer gelegt, in der alle Inkubationsschritte durchgeführt wurden. Zunächst wurden die Schnitte zur Blockierung mit 2% BSA in PBS überschichtet und 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x 10' waschen in PBS und Trockensaugen wurden Tropfen (etwa 20µl) der verdünnten Primärantikörper auf die Schnitte gesetzt. Verdünnungen (1:10, 1:2 in 2% BSA/PBS), Inkubationszeiten (1h, 2h, 4h) und Inkubationstemperatur (RT, 37°C) wurden zur Optimierung variiert. Für die kreuzgereinigten Seren wurde schließlich eine Inkubationszeit von 4h bei RT und Verdünnungen von 1:2 zur optimalen

Signalausbeute gewählt. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Objektträger mit Lösung ohne Primäantikörper inkubiert und in gleicher Weise behandelt.

Nach 3x 10' waschen in PBS wurde mit dem sekundären Antikörper nach den Empfehlungen des Herstellers (1:50) für 1 h im Dunklen inkubiert. Danach wurde 3 x 5 min. in PBS and 3x 5 min. in filtriertem A.dest. gewaschen, Deckgläser aufgelegt und mikroskopiert mit einem Zeiss Axiovert 135, ausgestattet mit einer HBO 100 UV-Quecksilberdampfampe und entsprechenden Filtersätzen von Zeiss.

2.9.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Ein Stück Parafilm wurde auf einer Glasplatte glatt ausgestrichen. Die Glasplatte wurde in eine feuchte Kammer gelegt und Tropfen der jeweiligen Lösungen, in denen inkubiert werden sollte, aufgebracht. Die Grids wurden mit den Schnitten nach unten vorsichtig mit einer Pinzette auf die Tropfen aufgelegt. Zuerst wurde 1 h in 2% BSA in PBS blockiert, 3x 5' in Puffer gewaschen und zur Optimierung unter verschiedenen Bedingungen mit dem Primäantikörper inkubiert. Für die kreuzgereinigten Antiseren wurden eine Inkubationszeit von 4h bei RT und Verdünnungen von 1:2 gewählt. Zur Kontrolle wurde ein Grid mit Lösung ohne Primäantikörper inkubiert.

Nach 3x 5' waschen in PBS wurde mit dem an 12 nm kolloidales Gold konjugierten sekundären Antiserum nach den Empfehlungen des Herstellers (verdünnt 1:20 in PBS/2%BSA) für 1 h inkubiert. Danach wurde 3 x 5 min. in PBS sowie 3x 5 min. in filtriertem A.dest. gewaschen und die Grids vorsichtig mit Filterpapier getrocknet. Die Untersuchungen der Proben wurden mit einem Zeiss EM 900 oder EM 902 bei 80 kV durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 BIOCHEMISCHE ARBEITEN

3.1.1 REKOMBINANTE SPIDROINE

Um spezifische Antiseren für den Nachweis von MASp1 und MASp2 zu gewinnen, wurden aus beiden Sequenzen geeignete Bereiche ausgewählt, die als rekombinant exprimierte Polypeptide zur Immunisierung verwendet wurden. Die Proteinsequenzen der rekombinanten Polypeptide sind in Abbildung 6 dargestellt. Sie repräsentieren jeweils den nichtrepetitiven C-terminalen Bereich (S1C & S2C) und einen repetitiven Bereich (S1R, S2R) aus den publizierten Sequenzen von MASp1 und MASp2 sowie einen Übergangsbereich der MASp2 Sequenz (S2CR). Die Spidroinsequenzen wurden mittels PCR aus entsprechenden cDNA Klonen amplifiziert und in den Vektor ligiert. Durch den Vektor sind 6 Histidine für die Metallchelataffinitätsreinigung dem jeweiligen Peptid N-terminal angefügt¹. Die Richtigkeit der PCR-Fragmente und ihres Einbaus wurde durch die Sequenzierung der Plasmide überprüft.

Zur Expression wurden die jeweiligen Plasmide in kompetente E.coli BL21(DE3) transfiziert. Für die rekombinanten Polypeptide H₆-S1R, H₆-S2R und H₆-S2CR wurde die Kultur in TB-Medium durchgeführt. Die Expression der rekombinanten C-terminalen Polypeptide gelang effektiver in LB-Medium bei allerdings vergleichsweise geringeren Ausbeuten.

In der PAGE unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen zeigten alle rekombinant exprimierten Polypeptide nach der Affinitätsreinigung eine große Hauptbande, die dem erwarteten Molekulargewicht (~ 10 kDa) entspricht. Neben dieser Hauptbande tritt bei den Aufreinigungen von H₆-S2R ein typisches Muster höhermolekularer Banden auf, deren Molekulargewichte aber kein ganzzahliges Vielfaches der Hauptbande sind. Im Gegensatz zu den anderen rekombinanten Proteinlösungen konnte bei H₆-S2R beobachtet werden, dass in manchen Portionen der konzentrierten Proteinfractionen sich bei längerer Lagerung im Kühlschrank häufig Präzipitate bildeten. Bei einer Fraktion, die mittels Zentrifugation durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 10000 MWCO (Centricon) gereinigt wurden, konnte auch beobachtet werden, dass solche höhermolekularen Banden nach längerer Lagerung wieder auftraten. Möglicherweise handelt es sich um eine Form von spontaner Aggregation, bei der die Aggregate ungewöhnliche

¹ Die Polypeptide mit dem His-Tag werden im folgenden durch den Präfix H₆- (also z.B. H₆-S1R) gekennzeichnet, um sie deutlich von den Antiseren (Präfix α -) zu unterscheiden

Laufeigenschaften aufweisen und den denaturierenden Bedingungen der Probenvorbereitung einer Elektrophorese nach Lämmli zumindest teilweise widerstehen.

Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen der den repetitiven Sequenzteil repräsentierenden Polypeptide H₆-S1R und H₆-S2R zeigten nur eine schwache Färbung mit Proteintests (Biorad), die auf Coomassie R250 basieren. Deshalb wurden die Konzentrationen anhand der Intensität und Größe der Banden gegenüber denen bekannter BSA-Konzentrationen geschätzt, wobei zur Anfärbung der Gele eine Mischung der Farbstoffe Coomassie G250 und R250 verwendet wurde.

A. Spidroin 1 (**RKHYCDE** = geladen, **NCSTYQ** = hydrophil, **AILFWV** = apolar)

QGAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGGQAGQGGYGGI LGGQAGQAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGQAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGI LGGQAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 NQGAGRGGQAAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGI LGGQAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGGQAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGI LGGQAGAAAAAAGGAGQGGI LGGQAGQAGASAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGEGAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGGQAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGI LGGQAGAAAAAGGAGQGGI LGGQAGQAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGI LGGQAGAVAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGQAGAAAAAAGGAGQRYGGI LGG
 NQGAGRGGI LGGQAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 NQGAGRGGQAAAAAGGAGQGGYGGI LGG
 SQGAGRGGQAGAAAAAVGAGQEGIRGQAGQGGYGGI LGG
 SQGSRGGI LGGQAGAAAAAAGGAGQGGI LGGQAGQAGAAAAAGGVRQGGYGGI LGG
SQGAGRGGQAGAAAAAAGGAGQGGYGGI LGGQGVRRGGI LGGQAGAAAAAGGAGQGG
YGGVSGSASASAAARLSSPQASSRLSSAVSNLVATGPTNSAALSSTISNVVVSQIGASNPGLSGCDVLIQALLEVVSAL
IQILGSSSITGVNYGSAGQATQIVGQSVYQALG

B. Spidroin 2

PGGYGPQQGPGGYGPQQGP
 SGPGSAAAAAAGPGGYGPQQGPGGYGPQQGPGRYGPQQGP
 SGPGSAAAAAGSGQQGPGGYGPRQQGPGGYGPQQGP
 SGPGSAAAAASAAASAESGQQGPGGYGPQQGPGGYGPQQGPGGYGPQQGP
 SGPGSAAAAAAGSGPGQQGPGGYGPQQGPGGYGPQQGP
 SGPGSAAAAAAGSGPGQQGPGGYGPQQGPGGYGPQQGL
 SGPGSAAAAAAGPQQGPGGYGPQQGP
 SGPGSAAAAAAGPGGYGPQQGPGGYGPQQGP
 SGAGSAAAAAAGPQQGLGGYGPQQGPGGYGPQQGPGGYGPQSASAAAAAGPQQGPGGYGPQQGP
 SGPGSASAAAAAAGPGGYGPQQGPGGYAPGQQGP
SGPGSASAAAAAAGPGGYGPQQGPGGYAPGQQGP
SGPGSAAAAAAGPGGYGPQQGPGGYAPGQQGP
 SGPGSAAAAAAGPGGYGPQQGP
SGPGIAASASAGPGGYGPQQGPAGYGPQSAVAASAGAGSAGYGPQSQAASAAASRLASPDGARGVASAVSNLVSSGPTS
SAALSSVISNAVVSQIGASNPGLSGCDVLIQALLEIVSACVTILSSSITGVNYGAASQFAQVVGQSVLSAF.

Abbildung 6: Aminosäuresequenzen der publizierten C-terminalen Transkriptbereiche von MASp 1 (A) und MASp 2 (B). Die in Expressionsvektoren klonierten repetitiven Sequenzbereiche sind unterstrichen, die nichtrepetitiven C-terminalen Sequenzbereiche kursiv und der Übergangsbereich von MASp 2 fett dargestellt.

3.1.2 HERSTELLUNG UND REINIGUNG DER ANTISEREN

Zum Nachweis rekombinanter Spinnenseidenproteine wurden Antiseren gegen Seide hergestellt. Dazu wurden Mischproben mit PBS (α -silk/PBS) gewaschen und ein Teil zusätzlich mit Trypsin (α -silk/Try) behandelt. Beide Proben wurden mit einem Polytron-Homogenisator in kleine Fragmente geschert und zur Immunisierung je 2 Kaninchen subkutan injiziert (Fa. Biosciences, Berlin). In den nachfolgenden Arbeiten konnte zwischen den daraus resultierenden 4 Antiseren kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der Vorbehandlung festgestellt werden.

Zur Gewinnung spidroinspezifischer Antiseren wurden die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen affinitätsgereinigten, rekombinanten Polypeptide zur Immunisierung verwendet. Für jeden Typ Polypeptid wurden je 2 Kaninchen immunisiert (Fa. Biosciences, Berlin).

Testblutungen der Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden auf ihre Reaktivität gegen die rekombinanten Polypeptide und gegen gelöste Seide getestet. Anhand der Ergebnisse wurde jeweils entschieden, ob das Immunisierungsprotokoll verlängert (Boost) oder die Antiseren gewonnen werden sollten. Die Antiseren gegen Seide (1007 – 1010) und gegen H₆-S1C sowie H₆-S2C (1811-1814) sind aufgrund einer positiven Testung bereits nach der zweiten Blutung gewonnen worden. Bei den mit H₆-S1R, H₆-S2CR und H₆-S2R immunisierten Tieren musste aufgrund der niedrigen spezifischen Titer das Protokoll bis zur vierten Blutung fortgeführt werden.

Aufgrund der hohen Homologie (siehe Abbildung 6) zwischen den C-terminalen Sequenzen der beiden Spidroine ist eine starke Kreuzreaktivität für die gegen H₆-S1C und H₆-S2C gerichteten Antiseren zu erwarten. In der Tat reagierte jedes dieser Antiseren gegen diese beiden rekombinanten Polypeptide, nicht jedoch gegen H₆-S1R oder H₆-S2R.

Zur Reinigung der Antiseren wurden die rekombinant exprimierten Polypeptide mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die spezifische Bande wurde ausgeschnitten, mit Blockierungspuffer blockiert und die Antiseren damit inkubiert. Im Falle epitopspezifischer Reinigung wurden die Blots gewaschen und die gebundenen Antikörper mit Elutionspuffer sauer eluiert. Die nach epitopspezifischer Reinigung auftretenden Kreuzreaktionen konnten durch eine weitere Inkubation mit Blotstreifen des kreuzreagierenden Proteins eliminiert werden (siehe Abbildung 7). Die Reaktivität der Antiseren reduzierte sich dabei jedoch um etwa zwei Zehnerpotenzen.

Die Antiseren α -S1R und α -S2R reagierten ausschließlich mit den rekombinanten Polypeptiden, welche die repetitiven Teile der beiden Spidroine repräsentieren (fürderhin auch kurz „repetitive Polypeptide“ genannt). Neben der spezifischen Reaktion trat bei beiden Antiseren eine schwache Kreuzreaktion auf, die nach epitopspezifischer Reinigung der Antiseren nicht mehr zu beobachten war (Abbildung 7). Diese konnte ebenfalls durch Präinkubation der Antiseren mit dem kreuzreagierenden Protein im Überschuss eliminiert werden. Durch die Reinigung wurden die spezifischen Titer um etwa das zehnfache reduziert. Die rekombinanten Polypeptide wurden mit aktivierter Cyanbromid-Sepharose gekoppelt und die Antiseren über diese Säulen sowohl epitopspezifisch als auch durch Kreuzabsorption gereinigt. Jedoch war es nicht möglich, die Kreuzreaktionen auf diese Weise vollständig zu eliminieren.

Die Antiseren α -S2CR zeigten keinerlei Kreuzreaktionen zu den anderen rekombinanten Polypeptiden und wären ein ideales spidroin2-spezifisches Antiserum. Das Antiserum reagiert wie α -S2R, wenn auch deutlich schwächer, spezifisch mit der MAS und nicht mit MIS, was die Präsenz entsprechender Epitope von MASp2 in der Seide anzeigt. Versuche, ein Serum gegen S2CR mit hohem Titer zu erzeugen, waren aber erfolglos. Diese Antiseren wurden deshalb nicht weiter verwendet.

Die Antiseren gegen native Seide (1007-1010) zeigten nach der zweiten Blutung eine starke Reaktion gegen gelöste Seide und Drüseninhalte. Erstaunlicherweise reagierten sie nicht mit Western Blots der rekombinanten Proteine (siehe Abbildung 7, untere Paneele). Arbeiten im Labor (K.-H.Gührs, pers. Mitteilung) zeigten aber, dass längere rekombinante Polypeptide mit diesen Antiseren in Western Blots nachweisbar waren. Daher ist es wahrscheinlich, dass die durch Bruchstücke gescherter Seide erzeugten Antiseren

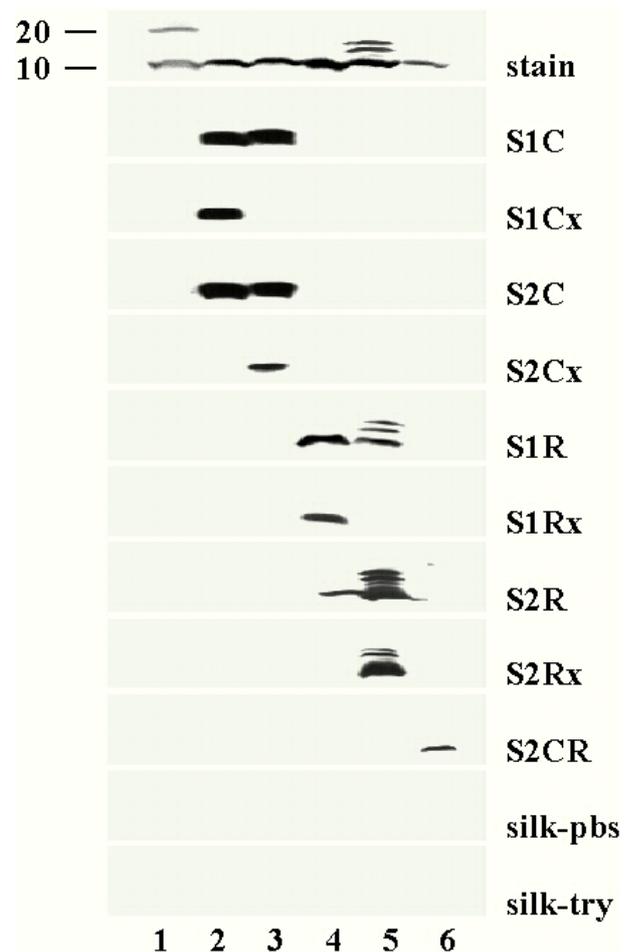


Abbildung 7: Charakterisierung der Antiseren

Die rekombinanten Polypeptide H₆-S1C (2), H₆-S2C (3), H₆-S1R (4), H₆-S2R (5) und H₆-S2CR (6) wurden nebst Marker (1) mittels SDS-PAGE getrennt und entweder mit Coomassie gefärbt (oberste Paneele) oder auf Nitrozellulose geblottet und mit den rechts angeführten Antiseren inkubiert. (Entwicklung mittels ECL)

spezifisch mit konformationalen Epitopen reagieren. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden von den rekombinanten Proteine in nativem und denaturiertem – d.h. in Ladepuffer aufgekochtem - Zustand Dot Blots hergestellt und mit den Antiseren inkubiert. Die Antiseren reagierten mit den nativen, nicht aber mit den denaturierten Proteinen (nicht gezeigt).

Es war geplant, spidroinspezifische Antiseren in zwei verschiedenen Spezies zu erzeugen, um in den histochemischen Untersuchungen auch Doppelfärbungen anzufertigen. Deshalb wurden mit den rekombinanten Polypeptiden S1R und S2R zunächst je zwei Hennen immunisiert, aus deren Eiern die Antiseren gewonnen wurden. Im ersten Versuch gelang es jedoch nicht, aus den Antiseren spidroinspezifische Fraktionen ohne Kreuzreaktion zu reinigen. Erst nach einer weiteren Immunisierung zweier Hühnchen konnten spezifische Antiseren erzeugt werden, die allerdings erst gegen Ende dieser Arbeit zur Verfügung standen und nur noch exemplarisch eingesetzt wurden.

3.1.3 CHARAKTERISIERUNG DER ANTISEREN

Zur Charakterisierung der Antiseren und zum biochemischen Nachweis von repetitiven und C-terminalen Sequenzmotiven von MASp1 und MASp2 im Faden wurden Mischproben, reine MAS und reine MIS in gesättigter Lithiumrhodanidlösung gelöst (2 mg/ml) und nebst dem Lösungsmittel auf Nitrozellulose gespottet. Versuche, dialysierte Lösungen gelelektrophoretisch zu trennen, resultierten in keinen diskreten Banden und im hochmolekularen Bereich über 200 kDa ergab sich keine Anfärbung, weshalb zunächst auf Dot Blots zurückgegriffen werden musste.

Die Antiseren gegen S1R, S2R und S2CR reagierten mehr oder weniger stark mit der Mischprobe (mix) und mit MAS. Das gereinigte Antiserum α -S1Rx reagierte mit der Seide der kleinen Ampullendrüse (MIS), während das gereinigte Antiserum α -S2Rx nur mit der Mischprobe und der MAS reagierte, aber keine Kreuzreaktion zur MIS aufwies. Die Antiseren gegen S1C und S2C reagierten ebenfalls mit allen drei Seidenproben. Nach epitopspezifischer Reinigung und anschließender Kreuzreinigung der Antiseren (α -S1Cx und α -S2Cx) war eine Reaktion zur MIS nicht mehr vorhanden. Die Experimente zeigen, dass in der gelösten MAS nicht nur repetitive Epitope sondern auch C-terminale Peptide der MASp vorhanden sind.

Zur weiteren Charakterisierung der Antiseren gegen die repetitiven Polypeptide wurde ihre Reaktivität zu den Produkten der anderen Seidendrüsen getestet. *Nephila clavipes* besitzt wie alle Radnetzspinnen sieben verschiedene Seidendrüsentypen, von denen Extrakte hergestellt und mittels SDS-PAGE getrennt wurden.

Aufgrund der Größe und Morphologie der verschiedenen Drüsentypen ließen sich nicht von allen die Inhalte rein isolieren und bei manchen musste die Kontamination mit Muskel- oder Bindegewebe in Kauf genommen werden. So wurden beispielsweise die piriformen und acciniformen Drüsen dadurch isoliert, dass die kompletten Spinnwarzen, denen sie anhängen, herausgetrennt wurden. Von den großen Drüsen ließ sich der Inhalt der flagelliformen, der kleinen und der großen Ampullendrüse vom Gewebe der Vorratsampullen trennen und in IEF-Puffer lösen. Bei den tubuliformen Drüsen konnte der isolierte Inhalt nach der Präparation jedoch nicht mehr in Lösung gebracht werden, weshalb diese als Ganzes extrahiert wurden. Nach der Konsistenz der Festbestandteile zu urteilen, schien sich auch der Inhalt durch dieses Vorgehen zu lösen.

Anteile der so gewonnenen Extrakte wurden mittels eines Gradientengels (4-15%) durch PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit den gegen die repetitiven Sequenzen gerichteten Antiseren (α -S1Rx, α -S2Rx) inkubiert. Das Antiserum α -S1Rx reagiert mit den Extrakten der Inhalte der großen und kleinen Ampullendrüse (siehe Abbildung 9). Die Kreuzreaktion zur MIS wurde bereits in den Dot Blots gelöster Seide beobachtet (vgl. Abbildung 8).

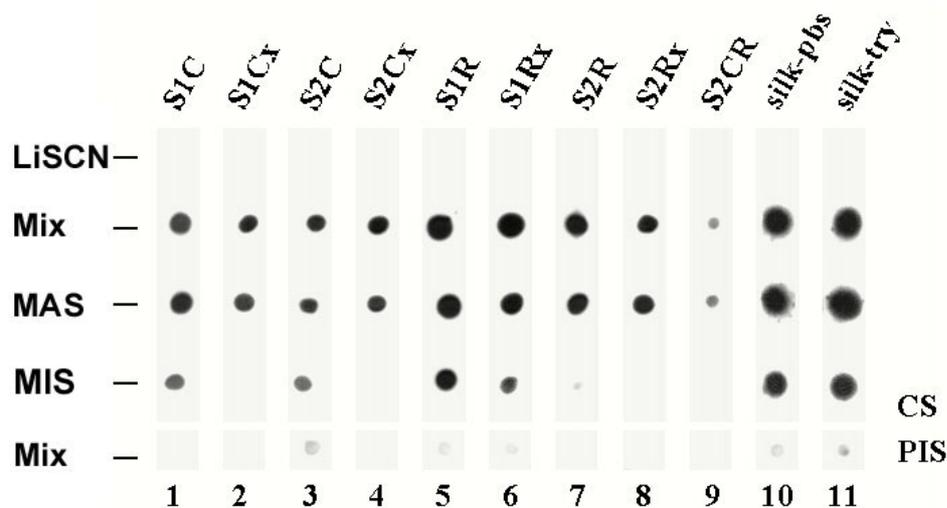


Abbildung 8: Mischproben (mix), reine MAS und reine MIS wurden in gesättigter Lithiumrhodanidlösung gelöst (2mg/ml). Je 1 μ l wurde auf Nitrozellulose aufgetragen und mit den oben angeführten Antiseren inkubiert. Als Kontrolle wurde das reine Lösungsmittel aufgetragen. Die untere Reihe zeigt exemplarisch die Reaktivität der Präimmunsere zu Mischproben (Entwicklung mittels ECL).

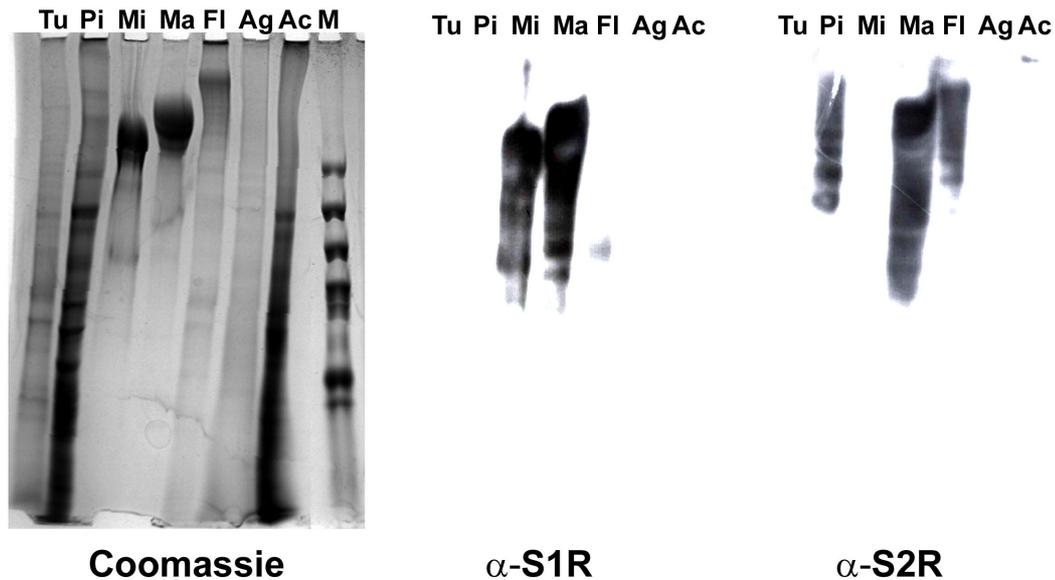


Abbildung 9: Kreuzreaktion der Antiseren zu den Produkten der anderen Seidendrüsen. Von den 7 verschiedenen Seidendrüsen wurden Gesamtextrakte oder wenn möglich Extrakte der Drüseninhalte (in IEF-Puffer, siehe Kap.2.3) gewonnen. Die Extrakte wurden auf einem Gradientengel (4-15%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit den unten angeführten Antiseren inkubiert. (Entwicklung mittels ECL).

AC = *G.aciniformes*; AG = *G.aggregate*; FL = Inhalt *G.flagelliformes*; MA = Inhalt *G. ampullata majoris*.; MI = Inhalt *ampullata minoris*; PI = *G.piriformes*; TU = *G.tubuliformes*.

Da das gereinigte Antiserum nicht mit den rekombinanten S2R-Peptiden reagierte, dürfte die Kreuzreaktion nicht auf die Poly-Ala Motive sondern auf die GXG-Motive zurückzuführen sein, die auch in MISp vorkommen. Das Antiserum α -S2Rx reagierte mit den Extrakten der großen Ampullendrüsen, der flagelliformen Drüsen und den piriformen Drüsen. Die Sequenz von Flag beinhaltet prolinhaltige Motive, die auch in MASp2 vorkommen und ein potenzielles Epitop für das Antiserum darstellen. Die Reaktion mit den Extrakten der piriformen Drüsen deutet auf das Vorhandensein entsprechender Epitope in der Haftpunktseide, jedoch enthalten diese Extrakte Kontaminationen anderer Gewebe sowie das Klebesekret der Drüsen, so dass nicht zu beurteilen war, ob das Antiserum spezifisch mit dem Spidroinanteil der Drüsen reagierte.

3.1.4 UNTERSUCHUNGEN ZUM C-TERMIUS DER SPIDROINE

Die C-terminalen Sequenzen der Spidroine aus den großen Ampullendrüsen sind nicht repetitiv und hochkonserviert^{22,45}. Diese hohe Konservierung der Sequenz legt eine besondere Bedeutung für die MAS und ihre Entstehung nahe. Verschiedene Funktionen wurden für diese Sequenz vorgeschlagen. So könnte sie ein zelluläres Signal darstellen oder ein Propeptid, das bei der

Sekretion oder Fadenbildung möglicherweise abgespalten wird⁴⁸. Von anderen Autoren wurde sie für bedeutend für die Löslichkeit der Proteine im hochkonzentrierten Spinngut erachtet⁴⁹. Bisher war es jedoch nicht bekannt, ob die Sequenz überhaupt im Spinngut oder im Faden vorhanden ist oder bei welchen Produkten der Spinnrüsen sie vorkommt. Diese Fragen sollten experimentell durch die bereits beschriebenen Antiseren beantwortet werden. Da seit den Publikationen von Beckwitt et al.^{22,45} sehr viel mehr Spidroinsequenzen verfügbar sind, wurden diese für eine detaillierte Analyse verwendet, um so die mögliche Bedeutung des C-Terminus weiter einzugrenzen.

3.1.4.1 NACHWEIS DER C-TERMINALEN PEPTIDSEQUENZEN IN SEIDE UND DRÜSEN

Die großen Ampullendrüsen wurden in 8 M Harnstoff extrahiert und Anteile davon mittels SDS-PAGE auf 4-15%-igen Gradientengelen aufgetrennt. Der Hauptteil der Extrakte läuft in einer Bande oberhalb der 200 kDa Markerbande (siehe Abbildung 10) und entspricht dem Inhalt der Ampulle. Daneben ist eine Leiter mit einer Vielzahl kleinerer Banden erkennbar, von denen die meisten aus dem Gewebeanteil der Proben stammen. Dies wird in den nachfolgend beschriebenen Experimenten deutlich, bei denen das Gewebe vom Drüseninhalt getrennt wurde (vgl. dazu Abbildung 9). Sowohl die ungereinigten (nicht gezeigt) als auch die gereinigten gegen die rekombinanten Polypeptide H₆-S1C und H₆-S2C gerichteten Antiseren reagieren mit den hochmolekularen Anteilen des Drüseninhalts und mit niedermolekularen Anteilen. Da auch die gegen Seide gerichteten Antiseren in gleicher Weise reagieren, kann geschlossen werden, dass es sich auch bei den niedermolekularen Bestandteilen tatsächlich um Spidroin handelt.

Bei der Charakterisierung der Antiseren wurde bereits in Dot Blot Experimenten die Reaktion der gegen die Peptidsequenzen der C-Termini gerichteten Antiseren gegen gelöste Seide gezeigt (vgl. Abbildung 8). Um zu überprüfen, ob diese Reaktion nur gegen möglicherweise abgespaltene niedermolekulare Peptide oder auch gegen

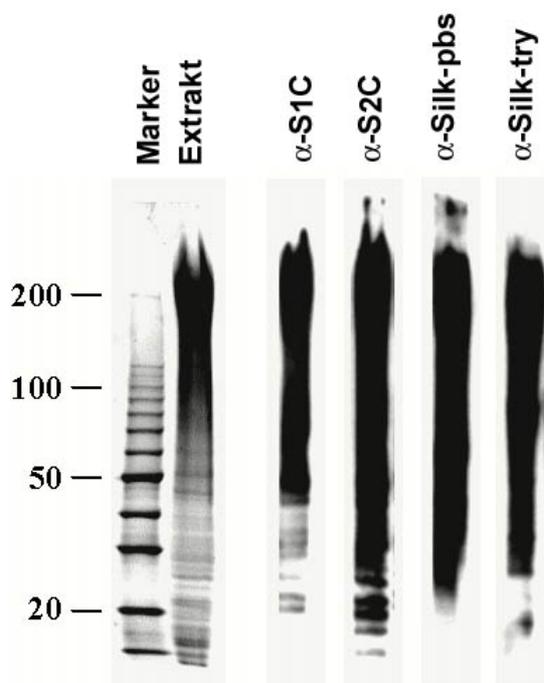


Abbildung 10: Harnstoffextrakte der großen Ampullendrüse wurden nebst Marker (1) mittels SDS-PAGE auf Gradientengelen (4%-15%) getrennt und entweder mit Coomassie gefärbt (links) oder auf Nitrozellulose geblottet und mit den oben angeführten Antiseren inkubiert. (Entwicklung mittels ECL)

hochmolekulares Spidroin gerichtet ist, wurde reine MAS in Hexafluoroisopropanol gelöst (10 mg/ml) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Lösemittel zerstört die Polyacrylamidgele, weshalb die Konzentration durch Verdünnung in geeignetem Puffer oder durch Abdampfen beim Aufkochen der Proben reduziert werden muss. Sowohl die so gelöste Seide als auch die Drüseninhalte zeigen hochmolekulare Banden von etwa dem gleichen Molekulargewicht. In Abbildung 11 sind diese Bereiche im Gel und die Reaktion entsprechender Western Blots mit den gereinigten und ungereinigten Antiseren dargestellt. Jedes der Antiseren reagierte mit den hochmolekularen Anteilen sowohl der Drüseninhalte (b) als auch der gelösten Seide (a).

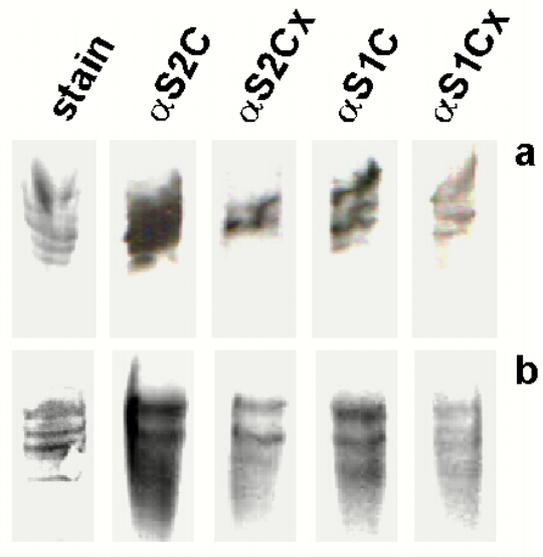


Abbildung 11: In HFIP gelöste Seide (a) und Inhalte der großen Ampullendrüse (b) wurden mittels SDS-PAGE (5%-iges Gel) getrennt und entweder mit Coomassie gefärbt (links) oder auf Nitrozellulose geblottet und mit den angeführten Antiseren inkubiert (Entwicklung mittels ECL). Dargestellt sind Ausschnitte aus den hochmolekularen Bereichen über 200 kDa.

Der nichtrepetitive C-terminale Anteil der Spidroine der großen Ampullendrüse ist hochkonserviert. Wie die Analyse der verfügbaren, publizierten Sequenzen (siehe Einleitung) andeutet, scheint diese Sequenz drüsen- oder spidroinspezifisch zu sein. Jedoch wurden bisher nur von den Spidroinen der flagelliformen und der kleinen Ampullendrüsen entsprechende Sequenzen publiziert. Mit den gegen die C-Termini gerichteten Antiseren wurde deshalb untersucht, ob sich in den Extrakten anderer Seidendrüsen entsprechende, homologe Sequenzen nachweisen lassen. Im Falle der

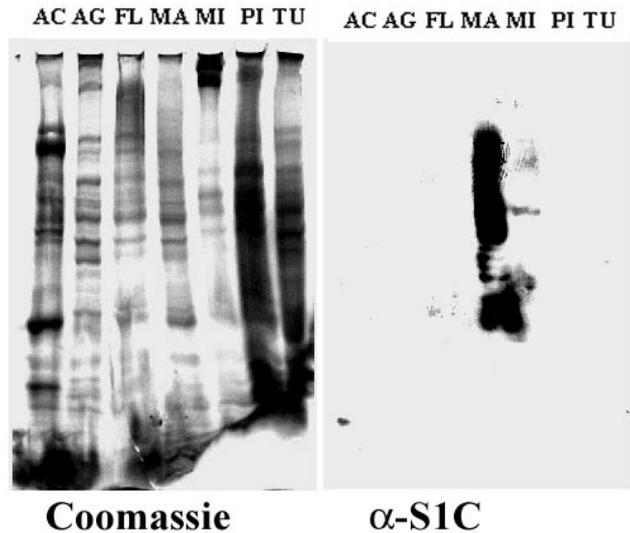


Abbildung 12: Kreuzreaktion der Antiseren zu den Produkten der anderen Seidendrüsen. Von den 7 verschiedenen Seidendrüsen wurden Gesamtextrakte (in IEF-Puffer) gewonnen. Die Extrakte wurden auf einem Gradientengel (4-15%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem ungereinigten, kreuzreaktiven Antiserum α -S1C inkubiert. (Entwicklung mittels ECL). AC = G.aciniformes; AG = G.aggregate; FL = G.flagelliformes; MA = G. ampullata majoris.; MI = ampullata minoris; PI = G.piriformes; TU = G.tubuliformes.

kleinen Ampullendrüse besteht eine Homologie der C-terminalen Sequenzen, die bereits durch die Reaktivität der ungereinigten Antiseren α -S1C und α -S2C zu gelöster MIS experimentell gezeigt ist (siehe Abbildung 8).

Von den 7 verschiedenen Drüsentypen wurden Gesamtextrakte hergestellt, mittels PAGE auf Gradientengelen (4-15%) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Da die kreuzgereinigten Antiseren nicht mit der MIS reagierten, wurde ein ungereinigtes (kreuzreaktives) Antiserum eingesetzt und mit den Blots inkubiert. Neben der Reaktion mit dem Extrakt der großen Ampullendrüse ist eine schwache Reaktion zu den hochmolekularen Anteilen und einigen niedermolekularen Banden des Extrakts der kleinen Ampullendrüsen beobachtbar. Zu den Extrakten der anderen Drüsen ist mit Ausnahme einer niedermolekularen Bande der flagelliformen Drüsenextrakte keine Reaktion zu erkennen.

3.1.4.2 SEQUENZVERGLEICH

Die in Datenbanken verfügbaren C-terminalen Peptidsequenzen der angegebenen Spinnenfibroine wurden mit dem Programm DNA-Star verschiedenen clustralen Gruppierungsanalysen unterzogen. Aus den ersten Analysen wurde offenbar, dass für die meisten Fibroine der Araneoidea der Übergang von den mehr repetitiven in den C-terminalen Sequenzbereich mit der Sequenz SRLSS beginnt. Ähnliche Sequenzen konnten auch bei den Sequenzen der nicht zu den Araneoidea gehörenden Spezies (Abbildung 14) gefunden werden. Für die weiteren Analysen wurde dieses Motiv oder eine entsprechende homologe Sequenz als Startpunkt festgelegt, wodurch sich auch offensichtlich zu kurze Sequenzen in den Konsensus gruppieren. In Abbildung 13 ist die Gruppierung aller Sequenzen nach Identität dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit veröffentlichten Arbeiten zu den repetitiven Sequenzabschnitten⁷³ wurden die Sequenzen der großen (MASp), der kleinen (MISp) Ampullendrüsen und der flagelliformen (Flag) Drüsen der Araneoidea in Blöcken (A, B, C) zusammengefasst. Die Unterstreichungen in der jeweiligen Konsensussequenz markiert absolute Übereinstimmung im entsprechenden Block.

Die Sequenzen AVF-1 und AVF-2 wurden jüngst als Spidroine der großen Ampullendrüse in die Datenbanken eingegeben. Jedoch ergibt sich sowohl aus ihren repetitiven als auch aus den C-terminalen Bereichen eindeutig, dass AVF-2 ein typisches MISp ist und AVF-1 alle Merkmale einer Flag Sequenz trägt. Die Sequenzen wurden deshalb in dieser Studie als solche behandelt.

Innerhalb der Gruppen A-C ist ein hohes Maß an Übereinstimmung ersichtlich. Diese ist auch zwischen den MASps (A) und MISps (B) gegeben. Der auffälligste Unterschied ist etwa in der Mitte der C-terminalen Peptide zu finden, wo bei den MASps ein Cystein- und ein

Asparaginsäurerest als hochkonserviertes Motiv vorkommen. Diese sind bei den MISps durch Serin und Glutaminsäure ersetzt.

Bei den MASps der Nephilinae vom Typ Spidroin 2 findet sich in einem der hochkonservierten Bereiche ein weiteres Cystein gefolgt von einem Valin, wodurch sich diese von den Spidroiden der anderen Gattungen deutlich unterscheiden. Etwa in der Mitte der C-Termini befindet sich bei den MASps der Araneoidea ein ebenfalls zu 100% erhaltener Abschnitt, der sich als Q(A/V)LLE nicht nur in den MISps sondern auch in weitläufiger verwandten Spezies wiederfindet. Die Fibroine von *Plectreurus* zeigen dieses Motiv nur noch bruchstückhaft, während es die phylogenetisch weiter entfernte mygalomorphe Spinne *Euagrus* in voller Übereinstimmung zu den MASps besitzt.

Sequenzvergleich Araneoidea

MASp1

```

Cons.  LVASGGPTNPAALSSSTISNVVSIASASNPGLSGCDVLVQALLEVVSALVHILGSSSIGQVNYGSA--GQAAQIV-----
N.c.   LVASG-PTNSAALSSTISNVVSIIGASNPGLSGCDVLIQALLEVVSALIQILGSSSIGQVNYGSA--GQATQIVGQSVYQALGX
N.m.   LVASG-PTNSAALSSTISNAVSQIGASNPGLSGCDVLIQALLEVVSALIHILGSSSIGQVNYGSA--GQATQ
N.s.   LVSSG-PTNSAALSSTISNVVSIIGASNPGLSGCDVLIQALLEVVSALVHILGSSSIGQVNYGSA--GQATQ
L.g.   LL-SNGPTNPASISNVISNAVSQISSSNPGLSGCDVLVQALLELVLTALLTIIGSSNVGNVNYDSS--GQYQVVSQSVQNAFV
A.t.   LVSSGGPTNSAALSNTISNVVSISSSNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVHILGSANIGQVNSSGV--GRSASIVGQSINQAF-S
ADF-2  LVNNGGPTSPAALSSSISNVVSIASASNPGLSGCDILVQALLEIISALVHILGSANIGPVNSSSA--GQSASIVGQSVYRAL-S
T.k.   L-ASGAASGPGYLSSVISNVVSVSSNSGGLVGCCTLVQALLEAAAAALVHVLASSSGGQVNLNTA--GYTSQL
T.v.   L-ASGGASSPGYLSIIISNVVSVSSNNDGLSGCDTVVQALLEVAAALVHVLASSNIGQVNLNTA--GYTSQL
A.a.   LVSSGGPTNPAALSNTISXVVSQISE
    
```

MASp2

```

Cons.  LVSSG-PTSSAALSNAISSAVSQISASNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVSIILSSSIGQVNYGASSQYQVMG-----A-
N.c.   LVSSG-PTSSAALSSVISNAVSQIGASNPGLSGCDVLIQALLEIVSACVTILSSSIGQVNYGAA--SQPAQVVGQSVLSAF.
N.m.   LVSSG-PTSSAALSSVISNAVSQIGASNPGLSGCDVLIQALLEIVSACVTILSSSIGQVNYGAA
N.s.   LVSSG-PTSSAALSSVIXNAVSQIGASNPGLSGCDVLIXALLEIVSACVTILSSSIGQVNYGAA
N.t.   LVSSG-PTSSAALSSVISNAVSQIG
L.g.   LLSSG-PTNSAALSISNVISNAVSQVVSASNPGLSGCDVLVQALLELITALISIVDSSNIGQVNYGSS--GQYQVMG
A.b.   LVSSG-PTTPAALSNTISSAVSQISASNPGLSGCDVLVQALLEVVSALVHILGSSSVGQINYGAS--AQYQVMV
A.t.   LVSSG-PTNPASLSNAISSVVSQVSSSNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVHILGSSSIGQINYAAS--SQYQLVQSLTQALG
ADF-3  LVSSG-PTKHAALSNTISSVVSQVVSASNPGLSGCDVLVQALLEVVSALVSIILGSSSIGQINYGAS--AQYQVMVGSVAQALA
ADF-4  LVSSG-PTNGAAVSGALNSLVSIASNPGLSGCDALVQALLEIVSALVAILSSASIGQVNVSSV--SQSTQMISQ----ALS
G.m.   LVASG-PTSPAAVSSAISNVASQISASNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVSIILSSASIGQINYGAS--GQYA-----AMI
A.a.   LVSSG-PTNPAALSNAISSVVSQVVSASNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVHILGSSSIGQINYAAS
    
```

MISp

```

ADF1   IASAGA----AALPNVISNIYSGVLSS--GVSSSEALIQALLEVISALIHVLGSASIGNVSSVGV--NSALNAV-QNAVGAAYAG
AVF-2  IASGGA----AALPNVMSNIYSGVLGS--GVSSSEALIQALLEVISALMHVLGSASIGNVSSAGL--DSTLNVV-QNAVSYAG
    
```

Flag

```

Nc. Flag  ----GSGFNYQMFNMLSQYSSGSGTCNPNNV--NVLMDALL---AAL-HCL--SNHGSSSFAPSPTPAAMSAYSNSVGRMFAY
Nm. Flag  ----GSGFNYQMFNMLSQYSSGSGSCNPNNV--NVLMDALL---AAL-HCL--SNHGSSSFAPSPTPAAMSAYSNSVGRMFAY
At. Flag  ----GGGFNYQNFNGLSQTATGSGTCNYDDI--NLLMDALL---AAL-HTL--NYQGASYVPSYSPSEMLSYTENVRRYF
AVF-1     ----GGGFNYQNFNGLSQTATGSGTCNSNDL--NLLMDALL---SAL-HTL--SYQGMGTVPSYSPSAMSAYSQSVRRRCFGY
    
```

Abbildung 13: Peptidsequenzvergleich der in ihrer C-terminalen Sequenz bekannten Spinnenfibroine.

In der Abbildung sind Sequenzen der zu den Araneoidea gehörenden Spezies nach Spidroidtyp geordnet dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind nur die letzten 84 Positionen dargestellt. Etwa 18 Positionen davor beginnt bei den meisten Spidroiden der Übergang zu repetitiven Sequenzbereichen und startet meist mit dem Motiv SRLSS. Dieses Motiv wurde als Start für die berücksichtigten Sequenzen in der Analyse gewählt. Der jeweils angegebene Consensus bezieht sich auf MASp1 bzw. MASp2 (der Consensus aller Sequenzen ist in Abbildung 14 aufgeführt). Die Unterstreichungen zeigen Positionen an, in denen absolute Übereinstimmung besteht.

Vergleich Non-Araneoidea vs. Consensus MASp1 und MASp2

```

C.MASp1  LVASGGPTNPAALSSTISNVVSQISASNPGLSGCDVLVQALLEVVSALVHILGSSSIGQVNYGSA--GQAAQIV-----
C.MASp2  LVSSG-PTSSAALSNAISSAVSQISASNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVSISSSIGQVNYGAS--SQYQVMG-----A-
C.A11    LVSSG-PTNPAALSNVISNVVSQISASNPGLSGCDVLVQALLEIVSALVHILGSSSIGQVNYGSS--GQAAQAVGQS---A---
DTF-1    LVSNGQV-NVDALPSIISNLSSSISASATTASDCEVLVQVLEEVVSALVQIVCS
DTF-2    LVSNGQV-NVAALPSIISLSSSISASSTAASDCEVLVQVLEIVSALVQIVSSANVGYINPEAS--G-SLNAVGSALAAAMG
ECF-1    N----GVNFGVIGSNIASLASQISQSGGGIAASQAFQALLELVAAFIQVLSSAQIGAVSSSSASAGATANAFQSLSSAFAGPTF-
1        VQSAGSGLSFSSLSNTLSQTASAIRSSNPQLSSSDVLIQSLVEIIVGLVQAFQFTG-----SS--AS-AQTFVNSLSQVA-G
PTF-2    LQSAGSGLSPLYTLNLLSQTALAIKSRPELSPNEVLIQSLAEIIVALVQALTKQ-----ASSS--AS-VQYFGRFL
PTF-3    LYS-GDGLDIAEFSDAVSSMVSSIKSSNPGVSASQILTELLFEVIVAFVQALTKS-----KFST--METAESLIAAFAQAF-V
PTF-4    GNS---GFNYGGFARALSSVARAVSQSNAKLSTTDVLIQVLMELVALIELLSGAKIGVVHPVRAQAGASA--FAQHFGSAF-G
    
```

Abbildung 14: Die Consensussequenzen von MASp1 und MASp2 (vgl. Abbildung 13) sind gegen die Sequenzen der Spezies verglichen, die nicht zu den Araneoidea gehören.

Im Falle der Sequenzen der flagelliformen Drüsen (C), die sich ansonsten deutlich unterscheiden, besteht eine allerdings etwas entferntere Beziehung. Das Motiv DALL kann als homolog zu dem vorgenannten Motiv betrachtet werden, da sich auch das daran anschließende Motiv (A/S)ALXHXL in vielen Sequenzen der MASps und MISps - leicht verschoben - wiederfindet.

3.1.4.3 STRUKTURELLE BETRACHTUNGEN ZUR KONSERVATION DER C-TERMINI

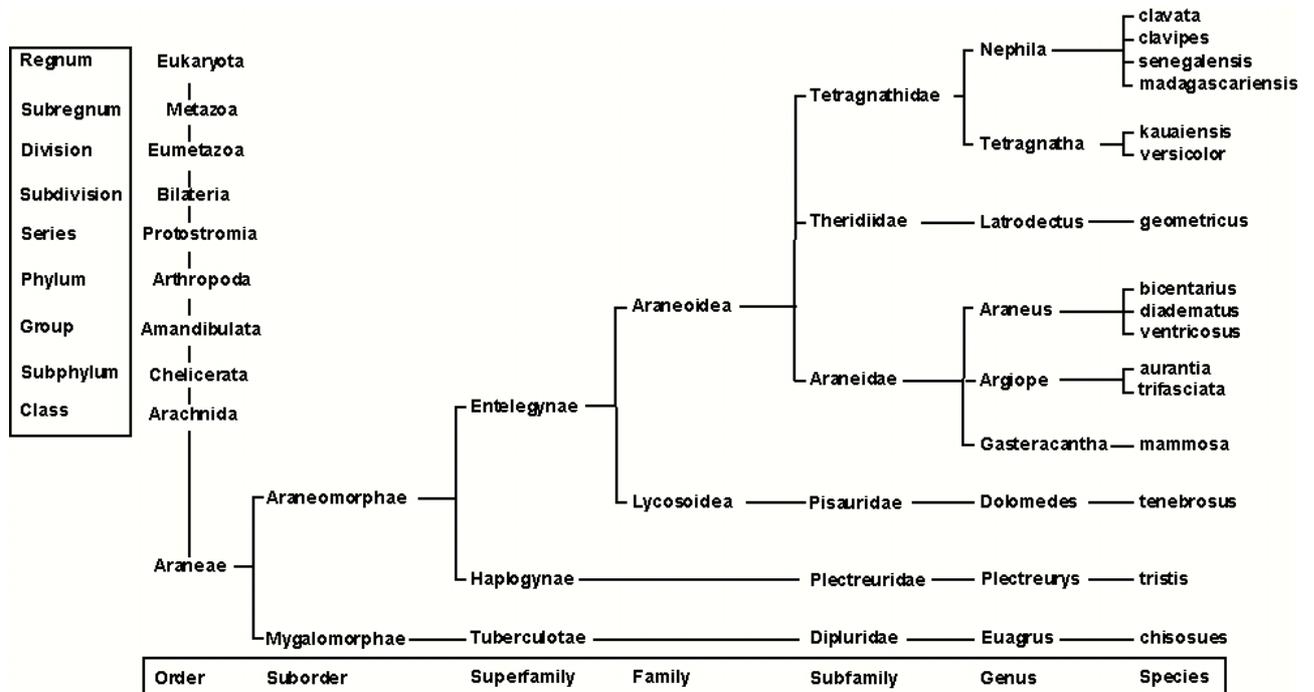


Abbildung 15: Phylogenetischer Stammbaum der in dieser Studie betrachteten Spezies basierend auf morphologischen Kriterien.

Die Homologie der C-terminalen Sequenzen spiegelt sich in den sehr gleichartigen Mustern wider, die sich aus den Kurvenverläufen für die mittlere Hydrophobizität der C-Termini der MASps und MISps ergibt. In Abbildung 16 sind diese beispielhaft für 2 MASp und 3 MISp Sequenzen dargestellt. Im Bereich etwa zwischen Pos. 46 und 74 sind diese nahezu deckungsgleich. Die Spitze höchster Hydrophobizität an Pos. 56 und das sich anschließende Plateau korrespondieren mit dem in allen Sequenzen konservierten Motiv Q(A/V)LLE (Pos.56-60). In 3'-Richtung wird der Bereich durch eine hydrophile Region begrenzt, die aus einer Abfolge mehrerer Serine besteht. Im Anstieg auf der 5'-Seite befindet sich das CD-Motiv an Pos. 51-52. Der Sequenzunterschied der MASps und MISps resultiert in einer leicht erhöhten Hydrophobizität der MASps.

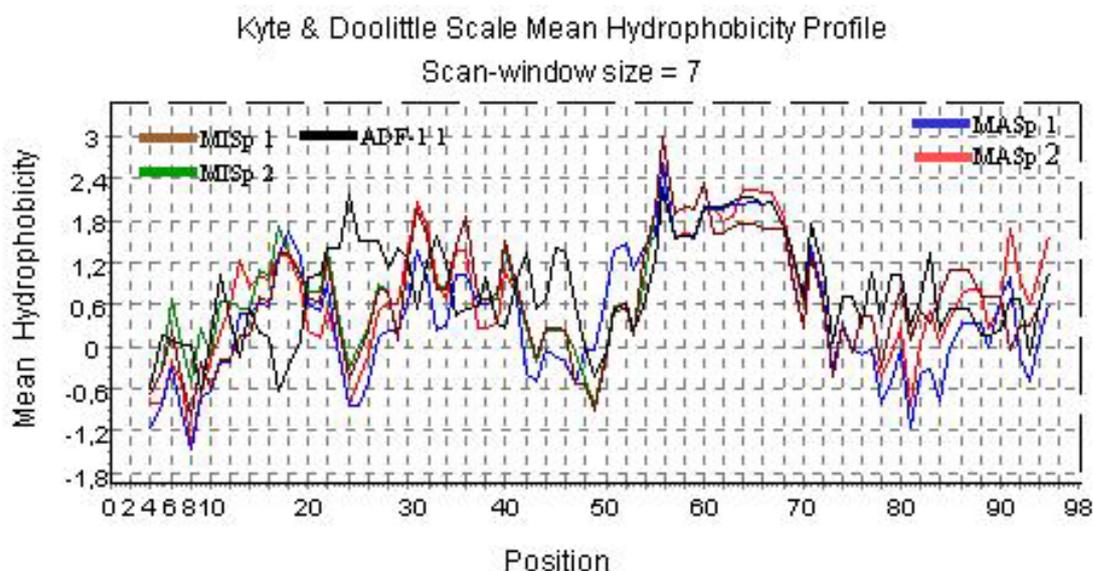


Abbildung 16: Mittlere Hydrophobizitätsprofile (nach Kyte und Doolittle) der C-terminalen Peptidsequenzen von *Nephila clavipes* MASp1, MASp2, MISp1, MISp2 und ADF-1 (MISp). Der nahezu deckungsgleiche Verlauf der Profile zwischen Pos. 46 und 74 fällt in den Bereich höchster Sequenzhomologie und Konservierung.

Am 3'-Ende können sich die Sequenzen deutlich unterscheiden und mit der Einschränkung, dass selten starke Hydrophilizität herrscht, kann keine bevorzugte Affinität ausgemacht werden. Im 5'-Bereich bis zur Pos. 46 finden sich alterierend hydrophobe und hydrophile Bereiche, deren Länge und Position bei den einzelnen Fibroinen unterschiedlich ausgeprägt sein können. Viele der hydrophilen Bereiche bestehen meist aus Serinblöcken. Interessanterweise finden sich solche auch in den C-Termini der Seidenspinnerfibroine, deren Sequenzen ansonsten keinerlei Ähnlichkeit zu den hier untersuchten Spidroinen aufweisen.

Im Vergleich zu den repetitiven Sequenzbereichen sind die C-Termini insgesamt etwas hydrophober, wie dies in Abbildung 17 für MASp 1 und 2 von *Nephila clavipes* gezeigt ist.

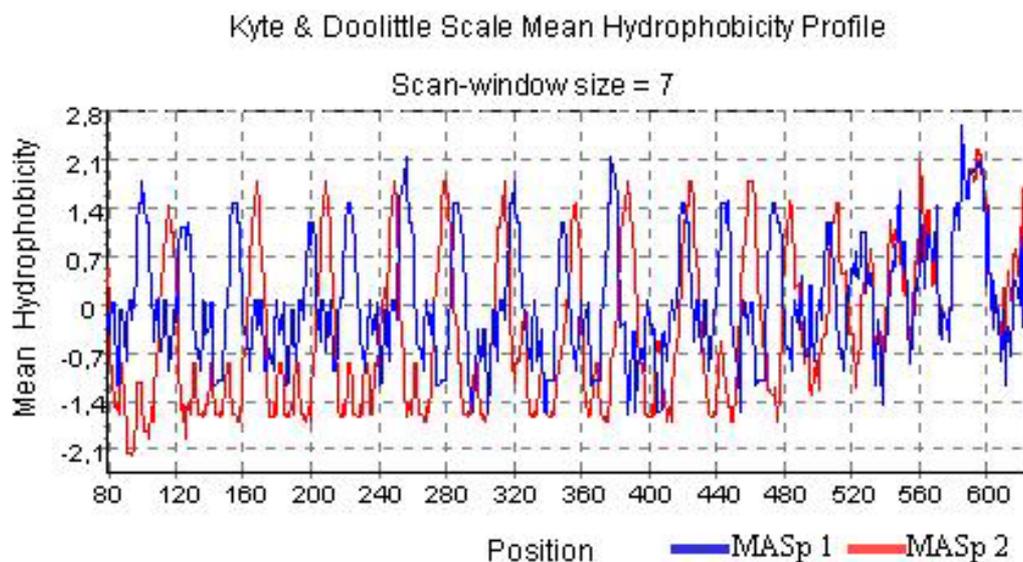


Abbildung 17: Mittlere Hydrophobizitätsprofile (nach Kyte und Doolittle) der Peptidsequenzen von *Nephila clavipes* MASp1 und MASp2. Das alterierende Muster hydrophiler und hydrophober Abschnitte entspricht der Repetition glycinreicher und alaninreicher Sequenzmotive. Am C-terminalen Ende zeigen die Profile einen ansteigenden Trend.

3.1.4.4 PHYLOGENETISCHE BETRACHTUNGEN

Das Kladogramm in Abbildung 18 beruht auf der Peptidsequenzanalyse, die in Kap. 3.1.4.2 beschrieben ist. Die phylogenetischen Beziehungen auf der Basis morphologischer Kriterien nach Coddington et al.⁸⁰ ist für die hier betrachteten Spezies in Abbildung 18 dargestellt.

Aus dem Stammbaum wird ersichtlich, dass sich die den Spezies der Araneoidea zugehörigen C-Termini der Spidroine nach ihrem Drüsenursprung gruppieren (eingerahmt). Durch ihre Position im Stammbaum werden die bereits erwähnten Verwandtschaftsverhältnisse der Spidroine unterschiedlicher Drüsen reflektiert. Vermutlich haben die Flag C-Termini zu einem frühen Zeitpunkt eine divergente Entwicklung genommen, während sich die MASps und MISps erst später teilten. Die Position der Fibroine von *Dolomedes* (DTF-1 und 2) zwischen den MASps und MISps spiegelt eine enge Verwandtschaft der Spidroine innerhalb der Entelegynae wider. Der gemeinsame Ursprung der MASps und MISps wird besonders durch die große Homologie der DTFs zu den *Nephila* MISps unterstrichen. Die Hauptunterschiede zwischen den Sequenzen der DTFs, MASps und *Nephila* MISps liegt zwischen dem sehr ähnlichen Teil am 5'-Ende und dem hochkonservierten Motiv Q(A/V)LLE. In diesem Bereich besitzen die DTF's ein dem CD-Motiv der MASps entsprechendes Motiv DCE.

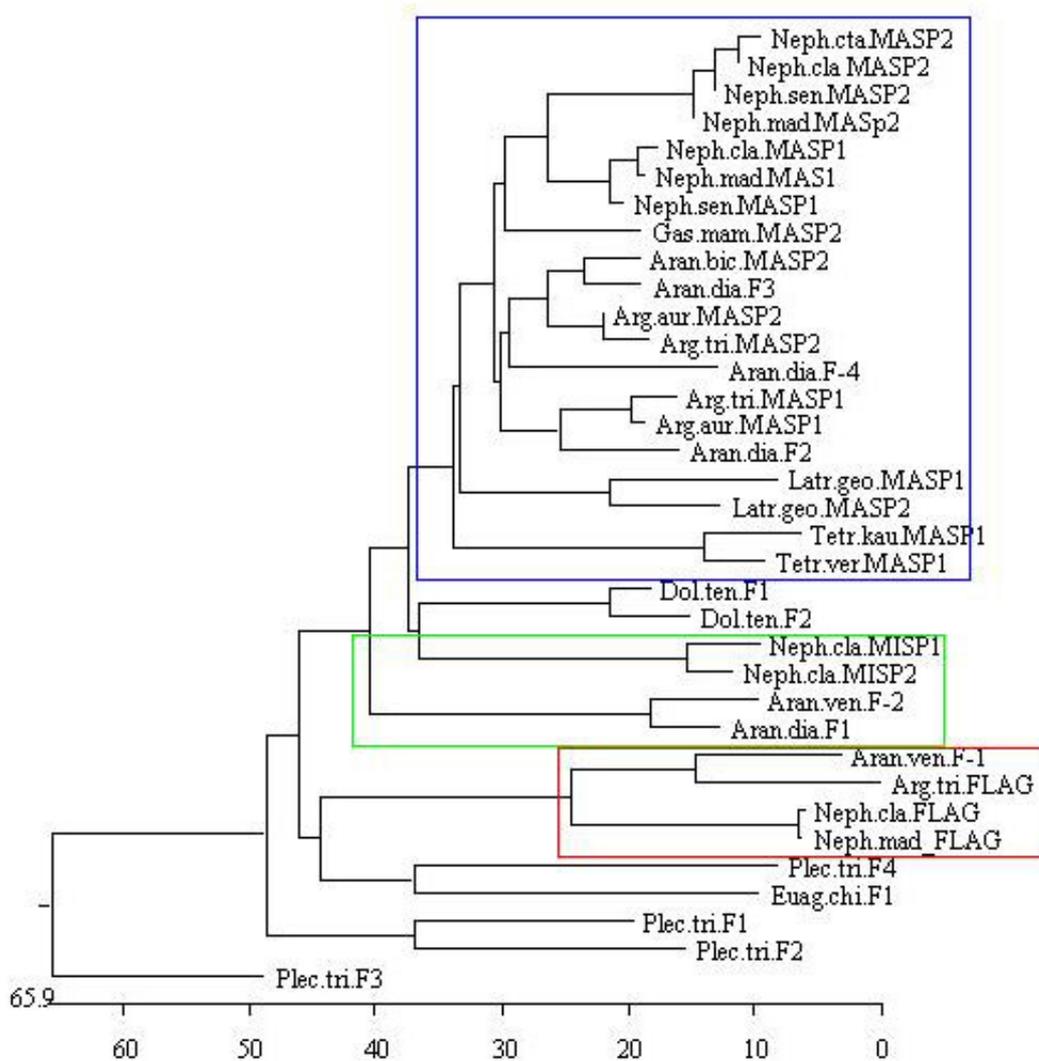


Abbildung 18: Distanz der verglichenen Peptidsequenzen dargestellt in einem Kladogramm. Die C-terminalen Spidroinsequenzen der Araneoidea gruppieren sich nach ihrem Drüsenursprung (große Ampullendrüse blau, kleine Ampullendrüse grün, flagelliforme Drüsen rot).

Innerhalb der Araneoidea gibt es eine gravierende Differenz zu dem morphologischen Stammbaum. Die Gattungen *Nephila* und *Tetragnatha* werden als nahe verwandt angesehen und zur Familie der Tetragnathidae zusammengefasst. In dem auf der Verwandtschaft der C-terminalen Peptidsequenzen basierenden Kladogramm finden sich jedoch andere Verhältnisse. Während die *Nephila* MASps sich in enger Nachbarschaft zu den MASps der Araneidae befinden, stehen die *Tetragnatha* MASps denen von *Latrodectus* näher. Werden die Gruppierungsanalysen mit gewichteten Proteintabellen (z.B. PAM250, Dayhoff et al.⁸¹) durchgeführt, so wird die Verwandtschaft von *Tetragnatha* sogar noch schlechter bewertet, als die von *Dolomedes* und den *Nephila* MISps. In beiden Sequenzen der *Tetragnatha* Spezies findet sich derselbe Bereich fast identisch gegenüber den anderen MASps verändert, was eine divergente Entwicklung der Gattung

zumindest bezüglich der MASp1 C-Termini beweist.

In der Gattung *Nephila* bestehen engere Beziehungen zwischen den Spidroinen gleichen Typs als zu ihrem Pendant der gleichen Spezies. Wie bereits erwähnt besitzen alle MASp2 Sequenzen von *Nephila* ein zweites Cystein, was sie von den anderen Sequenzen unterscheidet und was eine spezifische Entwicklung innerhalb der Gattung ist. Eine genusspezifische Gruppierung könnte auch bei *Latrodectus* vorliegen. Bei den Araneidae gruppieren sich die Sequenzen von Spidroin 1. Dagegen sind die Verhältnisse für die Spidroine vom Typ 2 weniger eindeutig.

3.1.4.5 BETEILIGUNG DES C-TERMIUS AN DER BILDUNG VON DISULFIDBRÜCKEN

Sowohl für gelöste Seide als auch für den Drüseninhalt der großen Ampullendrüse von *Nephila clavipes*⁸² wurde ein unterschiedliches Laufverhalten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen gefunden. Während Mello et al. diese mögliche Ausbildung von Disulfidbrücken aufgrund ihrer Aminosäureanalysen nicht im C-terminalen Bereich der Proteine vermuten, wurde diese Möglichkeit aufgrund der Sequenzdaten jedoch für möglich gehalten¹⁰.

Mit eigenen Proben des Drüseninhalts konnte ebenfalls ein unterschiedliches Laufverhalten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen gefunden werden (Abbildung 19, B). Unter reduzierenden Bedingungen ist keine zusätzliche Bande mit der gleichen Intensität erkennbar, die auf einen zweiten, niedermolekularen Bindungspartner schließen lässt.

Um die mögliche Beteiligung der C-Termini an einer Bildung von Disulfidbrücken zu untersuchen, wurden die rekombinanten Polypeptide auf ihr Laufverhalten unter solchen Bedingungen untersucht. Im Gegensatz zu H₆-S1R und H₆-S2R (nicht gezeigt) zeigte sich bei H₆-S1C und H₆-S2C unter nicht reduzierenden Bedingungen jeweils eine zweite Bande mit ungefähr dem doppelten Molekulargewicht (siehe Abbildung 19), die unter reduzierenden Bedingungen nicht auftrat. Die Zunahme der Intensitäten der rekombinanten Banden durch die Reduktion untermauert, dass es sich hierbei um Dimere handelt.

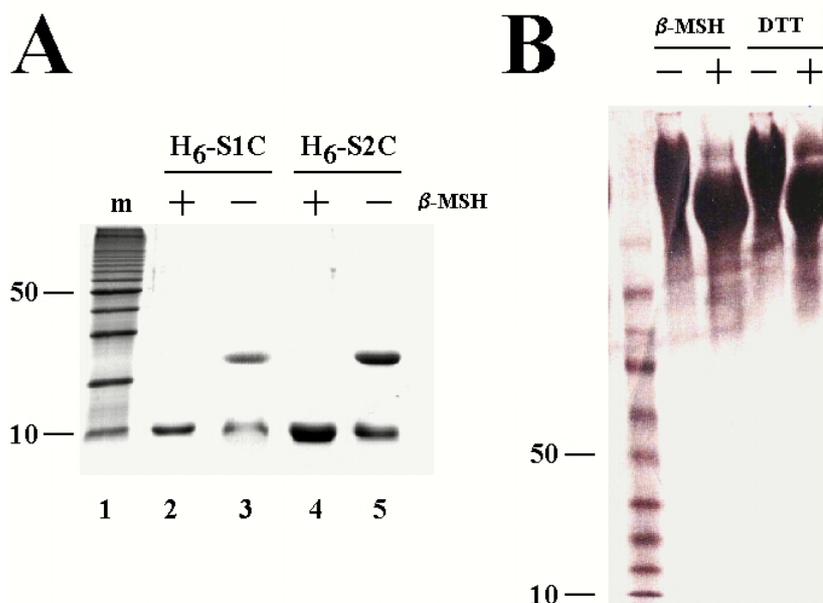


Abbildung 19: Unterschiedliches Laufverhalten der die C-terminalen Sequenzbereiche von MASp1 und MASp2 repräsentierenden rekombinanten Polypeptide H₆-S1C und H₆-S2C (**A**) sowie des Drüseninhalts (**B**) in der PAGE unter reduzierenden (+) und nicht reduzierenden (-) Bedingungen (β-MSH: β-Mercaptoethanol, DTT: Dithiothreitol). Rechts 4-15%-iges Gradientengel, links 15%-iges Gel. Färbung mit Coomassie.

3.1.5 EXPERIMENTE ZUR NATUR DES DRÜSENINHALTS

3.1.5.1 N-TERMINALE DEGRADATION

Sowohl die durch die rekombinanten Polypeptide als auch die mit gescherter Seide gewonnenen Antiseren reagieren nicht nur mit hochmolekularen Produkten sondern auch mit niedermolekularen Bestandteilen der Extrakte (vgl. Abbildung 10). In der Literatur⁸³ werden translationale Pausen für die Spidroinsynthese angenommen, die in unvollständigen Spidroiden resultieren. Dies würde die Reaktion der Antiseren erklären. Da aber die gegen die C-terminalen Spidroidinsequenzen gerichteten Antiseren (α-S1C und α-S2C) ebenfalls mit den niedermolekularen Banden reagieren und eine Leiter von unterschiedlich großen Peptiden anfärben, müssen zumindest diese aus einer Degradation resultieren. In der Tat ließ sich feststellen, dass die Harnstoffextrakte der gesamten Drüse sich nach dem Auftauen von -70°C trotz Lagerung bei 4°C stark zersetzen und der hochmolekulare Anteil bereits nach 3 Tagen fast vollständig abgebaut wird. Da die Degradation bei Extrakten des Ampulleninhalts, die vom Gewebe getrennt wurden, deutlich langsamer vonstatten geht (stabil für einige Wochen) und der Zusatz von Proteaseinhibitoren sowie die in den Methoden beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen bei der Präparation der Spinnen solche Proben offensichtlich

weiter stabilisieren konnte, dürfte der Abbau durch eine proteolytische Aktivität aus dem Gewebe verursacht sein.

Um die Herkunft der kleineren C-terminalen Polypeptide etwas genauer zu untersuchen wurde das Gewebe und der Ampulleninhalt wie nachfolgend beschrieben getrennt.

Das Gewebe der großen Ampullendrüse lässt sich histologisch in 2 verschiedene Bereiche unterteilen⁸⁴. Im Bereich der Ampulle ist eine Einschnürung erkennbar, welche die Grenze der beiden Bereiche darstellt. Die sog. a-Zone umfasst die distalen Gewebe der Ampulle und die Anhänge, in denen der Hauptteil der Spidroinsynthese stattfinden soll^{1,85}. Das Gewebe des proximalen Teils der Ampulle, das sich bis zum trichterförmigen Anschluss des Dukts erstreckt, wird als b-zone bezeichnet (vgl. Abbildung 20). Histochemisch wurde für diesen Gewebebereich eine Peroxidaseaktivität nachgewiesen⁸⁴.

Im Bereich der Ampulle lässt sich das Gewebe gut vom Inhalt trennen. Entsprechend wurde der Inhalt der Ampulle (Spinngut), die Gewebe der beiden Zonen und die dünnen Anhänge, in denen der Hauptanteil der Synthese stattfindet, voneinander getrennt und Extrakte in harnstoffhaltigem Puffer (IEF-Puffer) hergestellt. Anteile der Extrakte wurden auf 4-15%-igen Gradientengelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und zunächst mit den Antiseren α -S1Rx, α -S2Rx, α -S1C und α -Silk inkubiert. Um eine mögliche Reaktion der gewebsspezifischen Peroxidase zu vermeiden, erfolgte der Nachweis durch ein Konjugat des Sekundärantikörpers mit alkalischer Phosphatase und ECF (Abbildung 21, Blots 1-3). Die Blots

wurden danach „gestrippt“ und nochmals mit den Antiseren gegen die repetitiven Polypeptide (4-5) so inkubiert, dass der ursprünglich mit einem Spidroin1-spezifischen Antiserum markierte Blot nun mit einem Spidroin2-spezifischen Antiserum und umgekehrt markiert wurde.

Die Gewebsextrakte der a-Zone und der b-Zone zeigen im mit Coomassie gefärbten Gel (oben links) unterschiedliche Bandenmuster. In allen Gewebeproben sind zu den hochmolekularen Banden des Ampulleninhalts (1) korrespondierende Banden oberhalb der 205 kDa Markerbande vorhanden. Alle

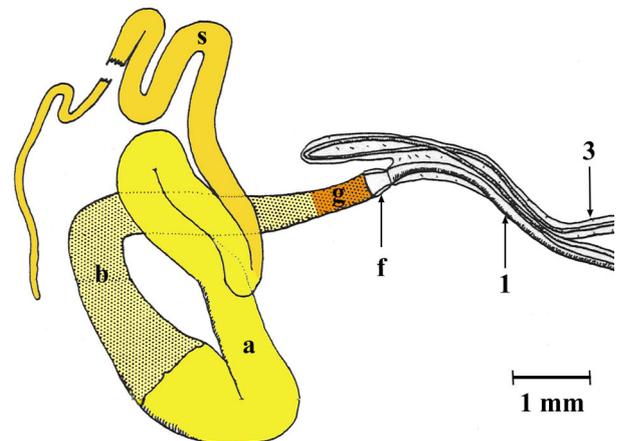


Abbildung 20: Schematische Darstellung der großen Ampullendrüse. Die a-Zone umfasst den hinteren Teil der Ampulle (a) und die stark verkürzt dargestellten Anhänge (s). Die b-Zone besteht aus dem vorderen Bereich der Ampulle (b+g). Das Gewebe (g) am Übergang zum Trichter (f) des Dukts weist bei *Nephila pilipes* eine besonders intensive Färbung auf, deren Bedeutung jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist.

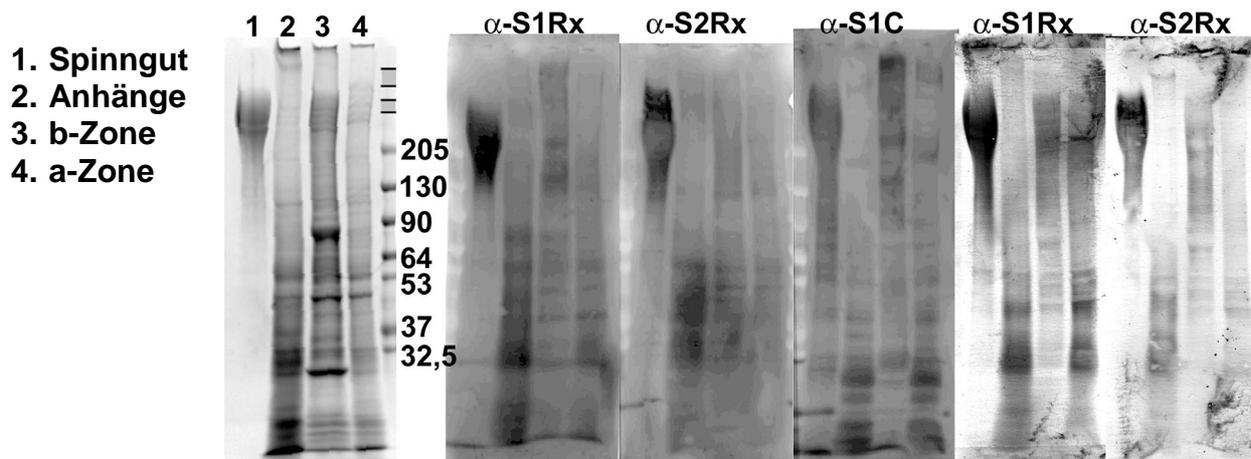


Abbildung 21: Aus verschiedenen Bereichen (siehe Text) der großen Ampullendrüsen wurden Extrakte (in IEF-Puffer) gewonnen. Die Extrakte wurden nebst Marker auf einem 4-15%-igen Gradientengel (links) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit den Antiseren inkubiert. Über dem Marker sind zwei Balken eingezeichnet, die den kalkulierten Bereich von 300 und 400 kDa anzeigen. Die drei ersten Blots wurden durch ein Konjugat des Sekundärantikörpers mit alkalischer Phosphatase (Entwicklung via ECF) markiert. Die 2 Blots rechts wurden gestriipt, mit den Antiseren (α -S1Rx, α -S2Rx) in umgekehrter Reihenfolge inkubiert und durch ein Peroxidasekonjugat (Entwicklung via NiCl_2/DAB) nachgewiesen.

Antiseren reagieren mit dem Ampulleninhalt, wobei sich die Signale von α -S1Rx und α -S2Rx hauptsächlich auf den hochmolekularen Bereich beschränken. Dagegen sind bei α -S1C deutlich auch niedermolekulare Banden angefärbt, die im Gel überhaupt nicht und mit den anderen Antiseren weniger deutlich zu sehen sind.

In allen Gewebeproben werden durch α -S1C niedermolekulare Banden gefärbt, wobei sich die Muster der a-Zone (4) und der benachbarten Anhänge (2) gleichen. Während sich im Drüseninhalt prominente Banden im Bereich von 50-130 kDa befinden, sind diese in den Gewebeproben zwar vorhanden, die stärkste Intensität findet sich aber in den Banden unterhalb dieses Bereichs. Aufgrund des unterschiedlichen Bandenmusters kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um eine Kontamination aus dem Lumen handelt. Daraus lässt sich erkennen, dass sich kurze C-terminale Fragmente in den Geweben bilden. Diese intrazellulären Degradationsprodukte könnten beispielsweise beim Abbau fehlgefalteter Produkte entstehen oder auf die Resorption und Rezyklierung sich degradierender Spidroine aus dem Lumen hinweisen, die im Ampulleninhalt nachweisbar sind.

3.1.5.2 DER HOCHMOLEKULARE ANTEIL DES INHALTS DER AMPULLE

Durch die Präparation in eiskaltem Puffer und den Einsatz von Proteaseinhibitoren wurden Maßnahmen gegen eine Zersetzung des Spinnnguts in der Ampulle getroffen. Bei so präparierten

Ampulleninhalten verschiedener Tiere ist kein Unterschied in den Molekulargewichten feststellbar (Abbildung 22, links). Weiterhin zeigt der Vergleich mit gelöster Seide, dass die hochmolekularen Anteile des Spinnnguts nicht kleiner sind, als die der Seide (rechts). Daraus lässt sich eine präparationsbedingte Veränderung des Drüseninhalts ausschließen.

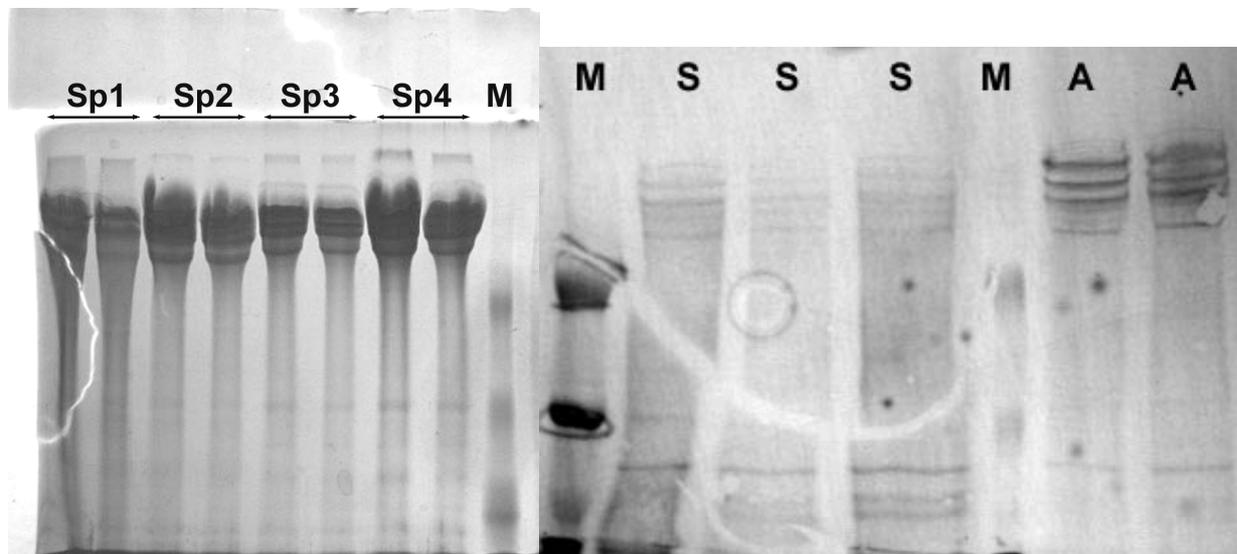


Abbildung 22: Der Inhalt der großen Ampullendrüsen von vier verschiedenen Spinnen wurde vom Gewebe getrennt und in 100 μ l IEF-Puffer gelöst. Je 2,5 und 1 μ l der Extrakte wurden nebst Marker auf einem 5%-igen PA-Gel (links) aufgetrennt. Die Banden des Markers entsprechen 172, 111 und 80 kDa. Rechts: Mit Coomassie gefärbter Western Blot (5% PAGE, PVDF) von in HFIP gelösten Seidenproben (S) und dem Drüseninhalt (A).

Sowohl die Proben gelöster Seide als auch die des Ampulleninhalts weisen im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur^{35,43,86} mehrere hochmolekulare Banden auf, die im Bereich von 220-270 kDa liegen. Nach der Färbung der Gele zu urteilen, befindet sich der Hauptteil des Ampulleninhalts in diesem Bereich. Mindestens 3 Hauptbanden stärkerer Intensität waren in nahezu allen Versuchen erkennbar, wenn auch oft innerhalb eines starken Schmiere. In manchen Elektrophoresen konnten bis zu acht z.T. dicht nebeneinander laufende Banden aufgelöst werden, wobei es nicht gelang, ein verlässlich reproduzierbares Protokoll zur Feinauftrennung zu entwickeln.

Aus Western Blot Experimenten wurde deutlich, dass selbst dann, wenn die Färbung mit Coomassie keinen Hintergrund mehr zeigt oder die Detektionsgrenze² unterschritten war, dieser noch stark zwischen den Banden durch die Antiseren gegen Seide und α -S1Rx angefärbt wird (vgl. Abbildung 23). Die Färbung mit α -S2Rx zeigt eine insgesamt deutlich schwächere Hintergrundfärbung (links). Die durch die beiden spidroinspezifischen Antiseren angefärbten Bandenmuster unterscheiden sich

² Das Färbeverhalten der Spidroine gegenüber Coomassie ist, wie bereits im Zusammenhang mit den rekombinanten Polypeptiden erwähnt, nach eigener Beobachtung schwächer als beispielsweise das von Standardproteinen wie BSA. Gleiches trifft auch auf Silberfärbungen zu, bei denen z.T. sogar negative Färbungen beobachtet wurden.

sowohl in den niedermolekularen (links) als auch in den hochmolekularen (rechts) Bereichen. In letzterem liegen die spezifisch markierten Banden jedoch sehr dicht zusammen (rechts, durch Linien angezeigt). Zusätzlich wird durch α -S2Rx eine Bande oberhalb des Hauptanteils angefärbt (Abb. rechts, Pfeil), die bei entsprechend hoher Proteinkonzentration auch in den 5%-igen Gelen erkennbar ist (vgl. Abbildung 22). Nach der Signalintensität der Antiseren zu urteilen, sind die Epitope von MASp1 deutlich häufiger vertreten. Dies trifft auch bei den histochemischen Färbungen der Querschnitte von Seide sowie der Drüsen zu.

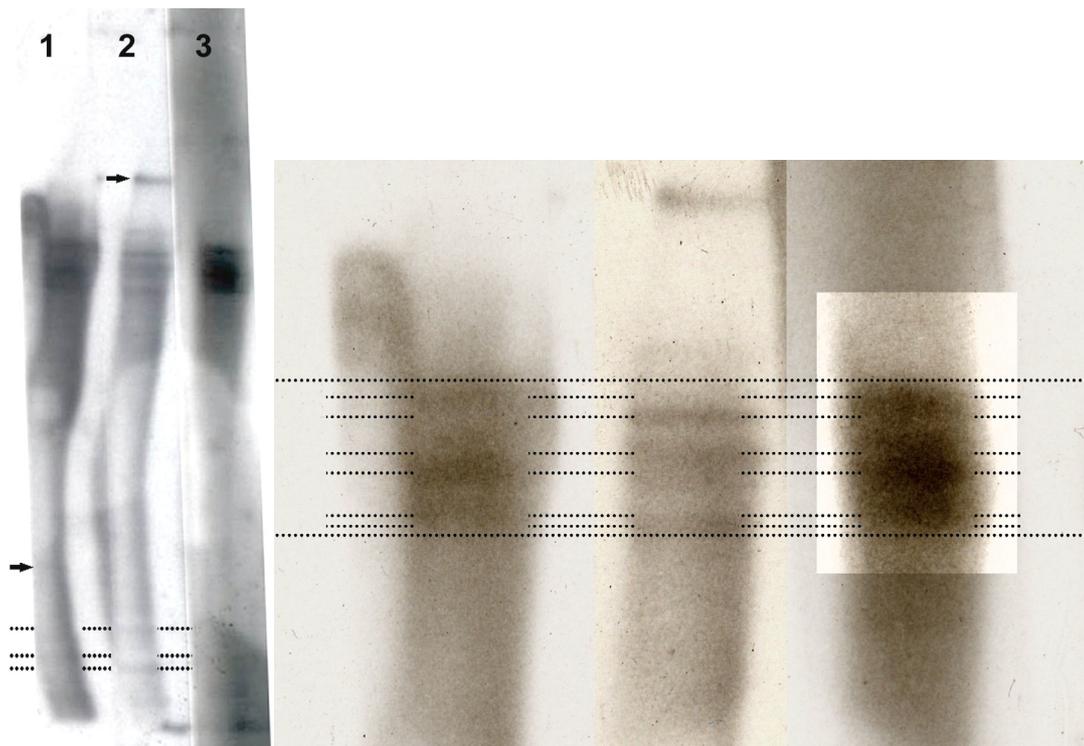


Abbildung 23: Der Inhalt der Ampulle wurde mittels SDS-PAGE auf einem 5%-igen Gel aufgetrennt, geblottet und mit den Antiseren α -S1Rx (1), α -S2Rx (2) und α -silk/pbs (3) inkubiert. Innerhalb der Spuren tritt bei α -S1Rx und α -silk/pbs in den hochmolekularen Bereichen eine starke Hintergrundfärbung auf. Im niedermolekularen Bereich (links unten durch Linien gekennzeichnet) werden unterschiedliche Banden durch α -S1Rx und α -S2Rx angefärbt. Rechts: fotografisch vergrößerter und belichtungsoptimierter Ausschnitt der hochmolekularen Banden.

3.1.5.3 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG

Der isoelektrische Punkt (pI) des bekannten Teils von MASp1 liegt über 10 und jener der meisten repetitiven Module* bei etwa 9. Dagegen liegt der pI des bekannten Teils von MASp2 bei 6,2. Die meisten repetitiven Module von MASp2 haben einen pI von etwa 5,8.

Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine Systeme mit stationären Gradienten über pH 10 hinaus erhältlich waren, wurde ein vertikales Gel gewählt, in dessen Geltaschen mögliche Präzipitate besser erkennbar sind und das den Vergleich mehrerer Proben erlaubte.

Proben des Inhalts der Ampulle, vom Drüsenextrakten und gelöster Seide wurden parallel durch SDS-PAGE auf 4-15%-igen Gradientengelen und durch isoelektrische Fokussierung auf vertikalen Gelen mit stationärem pH-Gradienten getrennt (siehe Abbildung 24). Die in Lithiumbromid gelöste Seide weist in der SDS-PAGE keine gut aufgelösten Banden auf und der Hauptteil des Materials findet sich in den Bereichen mittlerer Molekulargewichte. In der IEF konzentriert sich der Hauptteil des Materials nahe der Geltaschen in zwei Banden oberhalb von pH 8. Eine weitere Fraktion des Materials ist unterhalb von pH 5 in zwei Banden erkennbar.

Auch das Material der Drüsenextrakte und der hochmolekulare Inhalt der Ampulle (vgl. SDS-PAGE links) weist Banden in diesen Bereichen auf. Während jedoch bei den Proben der gelösten Seide kaum Präzipitate in den Geltaschen erkennbar sind, weisen vor allem die Gesamtextrakte eine durchgehende Färbung von der obersten Bande bis zur Geltasche auf. Nach der Färbung zu urteilen, tritt jedoch der größte Teil der Proben ins Gel ein. Bei weiteren Versuchen mit den Drüseninhalten konnten bei höherer Beladung der Geltaschen zusätzliche Banden in den mittleren pH-Bereichen

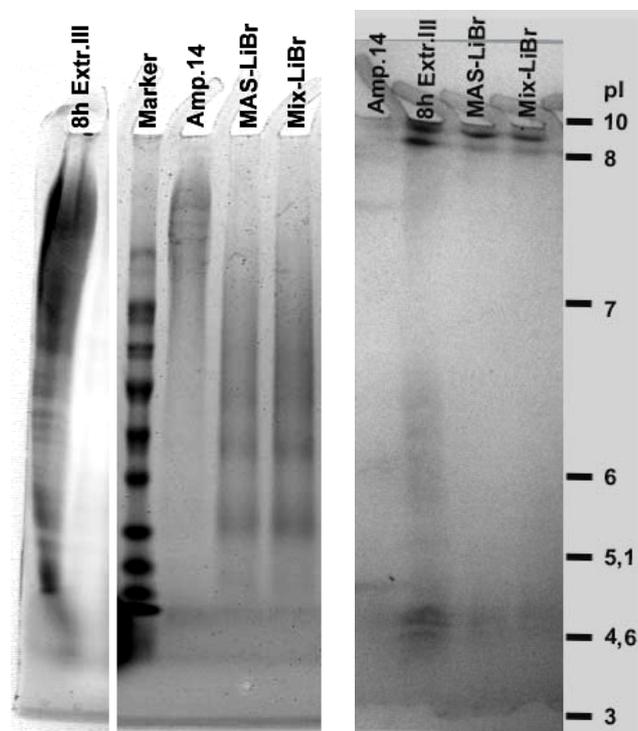


Abbildung 24: Isoelektrische Fokussierung.

Der Ampulleninhalt (Amp.14), Drüsenextrakte (8h Extr.III) und in LiBr gelöste und gegen 8M Harnstoff dialysierte Seidenproben (MAS-LiBr, Mix-LiBr, je etwa 10µg/Spur) wurden parallel durch SDS-PAGE (4-15% Gel, links) und durch isoelektrische Fokussierung auf einem Gel mit stationärem Gradienten (IEF pH3-10, rechts) aufgetrennt. Die ungefähren pH-Bereiche sind rechts nach den Angaben des Herstellers eingezeichnet.

* Als Modul wird hier ein Sequenzbereich bezeichnet, der vom Anfang eines Polyalaninblocks bis zum Anfang des nächsten reicht und die sich dazwischen befindenden glycinreichen Motive einschließt (vgl. Abbildung 6).

beobachtet werden, jedoch waren solche Proben generell schlechter fokussiert und zeigten häufig eine horizontale Präzipitationsbande bei etwa pH 6.

Aus den Versuchen ist zu ersehen, dass das hochmolekulare Spinngut und die Seide aus sehr unterschiedlich geladenen Proteinen besteht. Bestandteile des Materials sind im Bereich der theoretischen pI-Werte für die bekannten Sequenzen der beiden Spidroine zu finden, wobei sich der Hauptteil des Proteins in den für MASp1 erwarteten pH-Bereich fokussiert. Die Hauptbanden der stark fragmentierten Seidenproben im alkalischen Bereich geben einen Hinweis darauf, dass vermutlich auch der unbekannte Teil von MASp1 aus ähnlichen repetitiven Modulen mit identischem pI aufgebaut ist. Jedoch kann ein Einfluss von eventuellen Proteinmodifikationen auf den pI nicht ausgeschlossen werden.

3.1.5.4 BEGONNENE UNTERSUCHUNGEN ZU PROTEINMODIFIKATION UND PROZESSIERUNG

Neben den hochmolekularen Anteilen sind in den Ampulleninhalten (siehe Abbildung 22, links) noch feinere Banden mit kleineren Molekulargewichten beobachtbar, die aus der voran beschriebenen Degradation resultieren. Die Muster sind sich bei den verschiedenen Spinnen sehr ähnlich. An sich degradierenden Proben des Ampulleninhalts (ohne Proteaseinhibitoren, vgl. Kap. 3.1.5.1), die geblottet und mit den gegen den C-Terminus gerichteten Antikörpern gefärbt wurden, lässt sich eine Leiter definierter Banden von C-terminalen Peptiden erkennen, während die Antiseren gegen die repetitiven Motive neben Banden einen undefinierten Schmier anfärben (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf einen schrittweisen, N-terminalen Abbau hin, in dessen Folge definierte C-terminale Fragmente entstehen.

Der definierte Abbau wirft die Frage auf, ob die hochmolekularen Anteile des Spinnzugs in der Vorratsampulle der vollen Länge der Translationsprodukte entsprechen oder ob diese prozessiert werden.

Hinweise auf eine Prozessierung ergaben sich aus Versuchen, die entsprechenden Hauptbanden N-terminal zu sequenzieren. Ohne Vorbehandlung waren in den HPLC-Chromatogrammen der einzelnen Edman-Abbauschritten nur kaum von der „baseline“ zu unterscheidende Spitzen erkennbar. Nach Deblockierung mit TFA-Dämpfen konnten schwache Spitzen in den Chromatogrammen der einzelnen Abbauschritte erreicht werden, die zwar keine eindeutige Ableitung der Sequenz zulassen, die aber in den ersten 10 Positionen keine Aminosäuren aufweisen, die nicht in den repetitiven Sequenzen vertreten sind. In den meisten Fällen kann aus den möglichen Kombinationen das in den repetitiven Bereichen von MASp1 vorkommende Motiv SQGAGRGLG gebildet werden. Aufgrund der schwachen Spitzen in den Chromatogrammen

kann nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um artifiziell durch saure Hydrolyse erzeugte N-Termini eines kleinen Probesteils handelt, während der Hauptteil nach wie vor blockiert ist. Zwar konnten auch bei Proben ohne Vorbehandlung entsprechende Aminosäuren in den ersten Positionen beobachtet werden, was gegen eine artifizielle Veränderung durch TFA spricht, jedoch kann dies die schwachen Spitzen der Chromatogramme nicht erklären.

3.1.5.4.1 LEKTINE

Die beobachtete Vielzahl von Banden im hochmolekularen Bereich und das ungewöhnliche Laufverhalten des Drüseninhalts in der PAGE kann nicht nur durch den N-terminalen Abbau der Spidroine sondern auch durch Proteinmodifikationen verursacht sein. Für die Außenschicht des Fadens wurde eine Glycosylierung beschrieben, die in dieser Arbeit histochemisch charakterisiert wurde. Die dabei verwendeten Lektine wurden auch zur Untersuchung einer möglichen Glycosylierung des Drüseninhalts eingesetzt.

Der Drüseninhalt wurde dazu mittels SDS-PAGE (5%-ige präparative Gele) aufgetrennt, auf PVDF-Membranen gebロットet und in senkrechte Streifen zerschnitten. Nach Absättigung mit gelatinehaltigem Blockierungspuffer wurden die Streifen mit den entsprechenden biotinylierten Lektinen (1:1000 in Lektinpuffer) für 1 h inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Streifen mit einer Biotinlösung entsprechender Konzentration und ein Streifen nur mit Puffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde für 1h

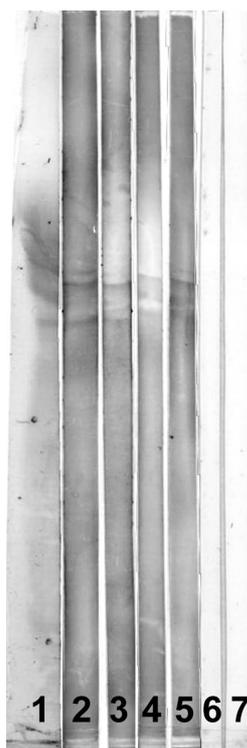


Abbildung 25: Glycosylierung der Spidroine. Der Inhalt der Ampulle wurde auf einem 5%-igen präparativen Gel getrennt und auf eine PVDF-Membran gebロットet. Streifen wurden ausgeschnitten und nach Blockierung mit 2%-iger Gelatine/TBST mit den u.a. biotinylierten Lektinen 1h inkubiert. (Nachweis über Streptavidin-AP und BCIP/NBT)

1. Blot Coomassie gefärbt;
2. ConA (α -D-Man, α -D-Glc);
3. Jacalin (α -D-Gal, O-glycosylierte Proteine);
4. WGA ((D-GlcNAc)_n);
5. UEA (α -L-Fuc);
6. Kontrolle Biotin;
7. Kontrolle Streptavidin-AP

mit einer verdünnten Lösung (1:10000) von Streptavidin-AP inkubiert und analog zu dem Vorgehen bei den Nachweisverfahren der Antiseren die Blotstreifen via ECL und chromogen durch BCIP/NBT entwickelt.

Alle eingesetzten Lektine (siehe Abbildung 25) reagieren mit den hochmolekularen Anteilen des Drüseninhalts. Daneben ist eine starke Anfärbung des Hintergrunds beobachtbar. Aufgrund der negativen Kontrollen kann eine unspezifische Reaktion des chromogenen Substrats ebenso wie von

Biotin oder dem sekundären Streptavidinkonjugat ausgeschlossen werden. Die Intensität der Färbung ist bei den einzelnen Lektinen unterschiedlich und entspricht etwa den Verhältnissen, die bei der Außenschicht des Fadens gefunden wurde (vgl. Abbildung 34).

Die Zuordnung der Banden ist durch den ungleichmäßigen Lauf des Drüseninhalts (Smilie-Effekt) erschwert, es scheint jedoch feine Unterschiede zwischen den Färbungen der verschiedenen Lektine zu geben. So ist z.B. bei ConA (2) und UEA(5) oberhalb der Hauptbanden eine weitere feine Bande gefärbt, die bei den anderen Lektinen nicht oder nur schwach erkennbar ist. UEA zeigt auch 3 deutlich gefärbte Banden, während beispielsweise bei ConA nur 2 starke Banden erkennbar sind.

Die Reaktion von Jacalin (3) weist auf eine O-Glycosylierung der entsprechenden Banden hin. Da Threonin in der MAS selten ist, dürfte es sich um eine Glycosylierung von Serinresten handeln, die in allen Seiden häufig sind und sich in den Sequenzen der MASps regelmäßig in den Motiven vor den Polyalaninblöcken finden.

3.2 MIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER SEIDE

3.2.1 UNTERSUCHUNG DER FADENPROBEN

Der Sicherungsfaden, an dem sich die Spinne gegen Stürze sichert, besteht aus 2 Doppelfäden, die sich mit $\sim 2-3 \mu\text{m}$ gegenüber $4-5 \mu\text{m}$ deutlich in ihren Durchmessern unterscheiden (siehe Abbildung 27). Während beim Abspulen der Fäden nicht immer alle Fäden abgegeben werden (meist fehlen die Fäden der kleinen Ampullendrüse), sind sie bei natürlicher Gewinnung beispielsweise dadurch, dass man die Spinne über einen Holzrahmen klettern lässt, immer vorhanden. Das größere Paar lässt sich zu den anterioren Warzen, das zweite Paar zu den medianen Warzen verfolgen.

Beide Doppelfäden werden von der Spinne an verschiedenen Stellen der Unterlage durch sog. Haftpunkte verankert. Die Spinne drückt den Hinterleib mit gespreizten anterioren Warzen auf die Unterlage, um dann mit Seitwärtsbewegungen und einem gegenläufigen Auf und Ab der Warzen Haftfäden (Durchmesser $< 0,2 \mu\text{m}$) aus den Öffnungen der piriformen Drüsen abzugeben (Abbildung 26). Insbesondere dort, wo diese Fäden Kontakt mit der Unterlage haben, zeigt sich eine "zerlaufene" Schicht aus Klebesekret, in die sie eingebettet sind. Teilweise wurden auch Fäden mit perlschnurartig angeordneten Tropfen gefunden.

Während des Abspulens konnte mehrfach beobachtet werden, wie die Spinne bei nachlassender Betäubung einen Haftpunkt erzeugte und damit die separierten Fäden verband. Die Untersuchung der verschiedenen Fadenproben ergab, dass in den sog. Mischproben neben den Fäden der großen Ampullendrüse auch Haftpunktfäden und Fäden der Kleinen Ampullendrüse enthalten sind. Eine



Abbildung 26: Haftpunkt von *Nephila clavipes*. Er besteht aus einem Geflecht von Fäden ($\varnothing < 0,2 \mu\text{m}$), die mit einem Klebesekret überzogen sind. (Zeiss Neofluar 100x/1.30)

geringe Kontamination mit Haftpunktfäden kann selbst für die Proben nicht ausgeschlossen werden, die mit besonderer Sorgfalt als reine Proben gewonnen wurden.

3.2.2 UNTERSUCHUNG DER MIKROSKOPISCHEN FADENSTRUKTUR

Da der native Faden in Luft stark lichtbrechend wirkt, kann mit dem Lichtmikroskop keine eindeutige Durchstrahlungsabbildung erzielt werden. Bei Erhöhung des Brechungsindex durch Medien wie z.B. Wasser, Glyzerin oder Immersionsöl nehmen die Kontraste und die Streuung gleichermaßen ab. Trotzdem sind feine Linien in der Längsrichtung zu erkennen, die auf eine Struktur im Faden hinweisen. Auch die Anwendung von Farbstoffen führt zu einer Reduktion der Lichtbrechung. Jedoch färbt sich das Fadenäußere stärker als das Innere, was wiederum interne Strukturen überschattet.

An Rissen oder Schnittenden sind oft größere Fasern und feine Fibrillen erkennbar (siehe Abbildung 28). Fasern und Fibrillen sind auch zu finden, wenn Fäden mittels eines Homogenisators zerkleinert werden oder wenn in flüssigem Stickstoff gefrorene Proben gebrochen werden.

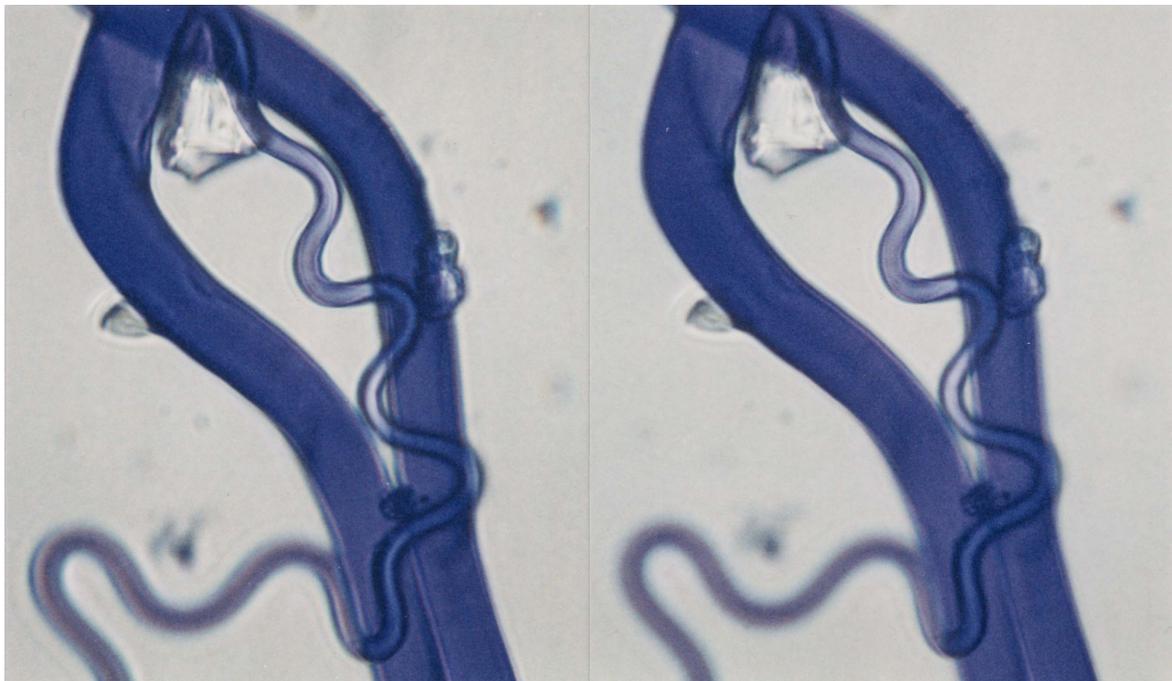


Abbildung 27: 'Dragline' von *Nephila clavipes* (Färbung mit Coomassie Brilliant Blue, Zeiss Neofluar 100x/1.30). Sie besteht aus dem Hauptdoppelfaden (\varnothing ~4-5 μm) aus den großen Ampullendrüsen und einem Hilfsdoppelfaden (\varnothing ~2-3 μm) aus den kleinen Ampullendrüsen.

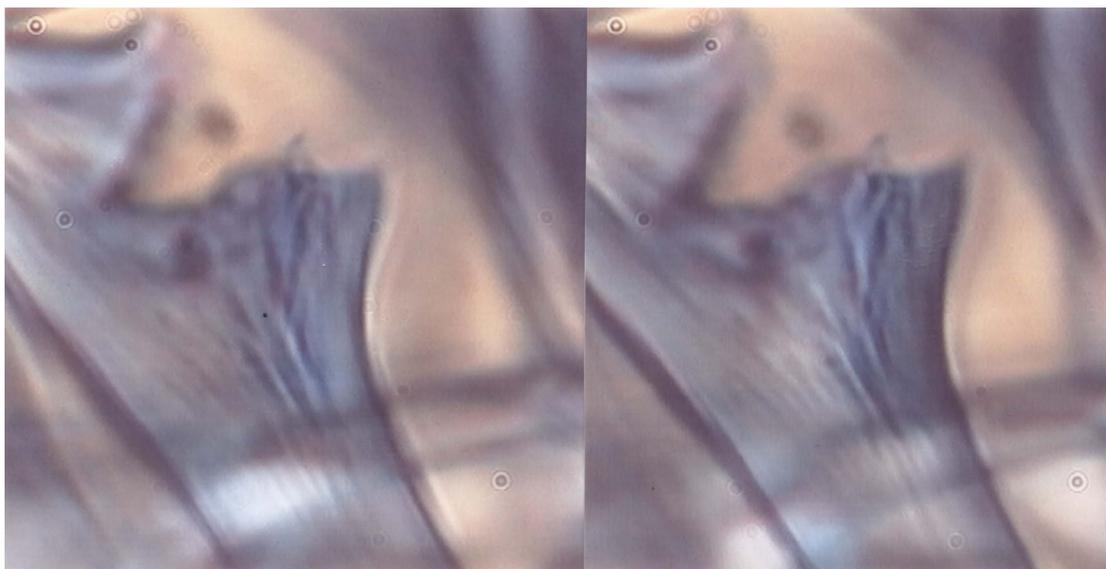


Abbildung 28: Faden der großen Ampullendrüse von *Nephila clavipes*. An der Rissstelle sind feine, z.T. in der Längsachse gedrehte Fibrillen ($\varnothing < 0,2 \mu\text{m}$) zu erkennen (Färbung mit Coomassie Brilliant Blue, Zeiss Neofluar 100x/1.30).

3.2.3 EINFLUSS VERSCHIEDENER LÖSEMittel AUF DEN FADEN

Zur weiteren Charakterisierung des Tragfadens wurde der Einfluss verschiedener Lösemittel und Chaotropica auf die Struktur der Fäden mikroskopisch untersucht.

In Lösemitteln wie Aceton oder Ethanol konnte keine Änderung der Gestalt des Fadens beobachtet werden. Jedoch konnte ein teilweises Auswaschen der goldenen Farbe beobachtet werden. Am stärksten war dies in CaCl_2 -Lösungen (getestet wurden Konzentrationen von 0.05M, 0.1M und 0.2M) der Fall, die den Faden bis zu einer grünlichen Farbe ausbleichten. Der goldenfarbige Überstand war mit Membranfiltern einer Ausschlussgröße von 5000 nicht zu klären, was eher auf eine niedermolekulare organische oder anorganische Substanz schließen lässt.

Bei Behandlung der Fäden mit 1%-iger TritonX-100 Lösung und Harnstofflösungen konnte eine Veränderung der Fadendurchmesser beobachtet werden. In TritonX-100-Lösung schwollen die Durchmesser der MAS auf etwa $6-7 \mu\text{m}$, in 8 M Harnstoff auf $\sim 8 \mu\text{m}$ an. Die Hilfsfäden der kleinen Ampullendrüse zeigten unter diesen Bedingungen keine vergleichbare Veränderung.

Die Inkubation in 8M Harnstoff wurde mit geschnittenen Fäden nach der Versuchsbeschreibung von Vollrath et al.⁶² und mit Seidenproben durchgeführt, die Fäden von mehreren mm bis zu mehreren cm Länge enthielten. Entgegen der Beschreibung von Vollrath et al. fanden sich auch längere Fadenstücke, die gequollen waren. Darunter auch Fäden, bei denen die Quellung unvollständig war. Unvollständige Quellung war nur in Richtung der Fadenachse zu beobachten,



Abbildung 29: Videokontrastaufnahmen von MAS nach Inkubation in 8 M Harnstoff. (Färbung mit Coomassie brilliant blue G250)

aber niemals in Richtung des Durchmessers. Eine vollständige Quellung der Proben kann durch Kochen der Proben erzielt werden. Die Durchmesser sind in solchen Proben nicht signifikant verändert.

Die gequollenen Bereiche sind zylindrisch mit konstantem Durchmesser. Gelegentlich konnten Einschnürungen beobachtet werden. An manchen Schnittstellen ist eine konische Verjüngung mit Wulst erkennbar, die von einem überlappenden Mantel gebildet wird. Das Innere ist nicht leer, aber das Material ist weniger dicht als das des Mantels. Gelegentlich sind feine Fibrillen parallel zur Achse des Fadens beobachtbar. Diese sind sehr deutlich in videokontrastmikroskopischen Aufnahmen erkennbar (Abbildung 29). Durch das Raumbildverfahren sind diese im Fadeninneren lokalisierbar (Abbildung 30).

Parallel zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden Teilproben (Fadenmischproben, die mit 1%iger TritonX-100-Lösung gewaschen oder in 8 M Harnstofflösung gekocht wurden) für die elektronenmikroskopische Untersuchung in Epon eingebettet.

Das augenfälligste Merkmal an den Querschnitten in allen Proben ist eine stark osmiophile äußere Schicht von variabler Dicke, die bei unbehandelten Proben etwa $0,1\mu\text{m}$ erreicht. Durch Harnstoff und durch die Behandlung mit TritonX-100 wird sie teilweise abgewaschen und bei höherer Vergrößerung lässt sich dann sehr gut erkennen, dass sie aus feinen Fibrillen besteht, die in eine amorphe Substanz eingebettet sind (vgl. Abbildung 31). Diese Fibrillen erscheinen an den Stellen verklumpt, wo die amorphe Substanz ausgewaschen ist. In seltenen Fällen konnte eine dünne Schicht beobachtet werden, die der ersten aufliegt, aber wahrscheinlich meistens im

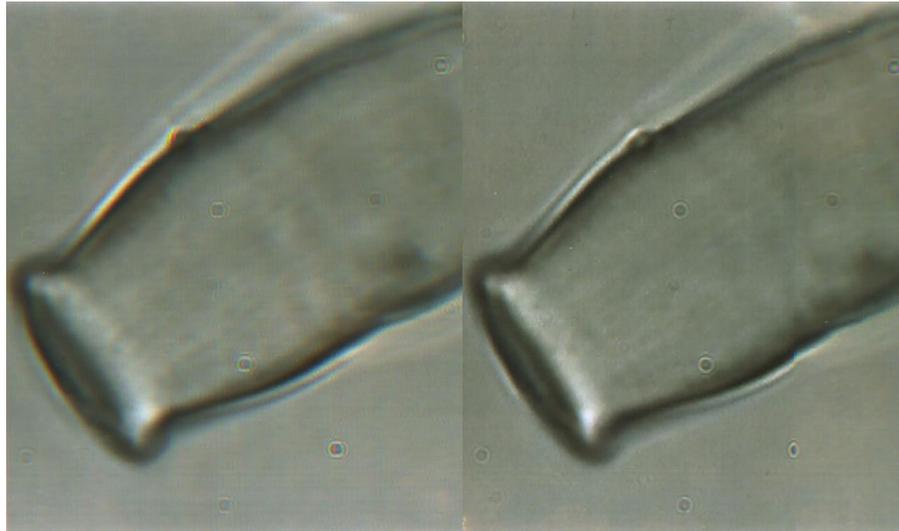


Abbildung 30: Schnittende eines in 8M Harnstoff gequollenen Fadens (MAS, $\varnothing \sim 8 \mu\text{m}$) (Zeiss Neofluar 100x/1.30).

Einbettungsprozess verloren geht. Unter der stark osmiophilen Schicht befindet sich eine weitere Lage von etwa 30-60 nm Stärke, die sich in ihrem Färbeverhalten vom Kernmaterial unterscheidet. Viele kleine Löcher von etwa 30-100nm Durchmesser verteilen sich im Fadenmaterial unregelmäßig über den größten Teil des Querschnitts. Nur in einer etwa 0,3-0,4 μm großen Randzone kommen sie nicht vor. Diese wurden ebenfalls an MAS von *Nephila edulis* gefunden und als sogenannte Canaluli bezeichnet⁶³. Diese wurden jedoch nicht in allen Anschnitten beobachtet und in den für die immunhistochemischen Untersuchungen in LR White eingebetteten Proben fehlen sie ganz.

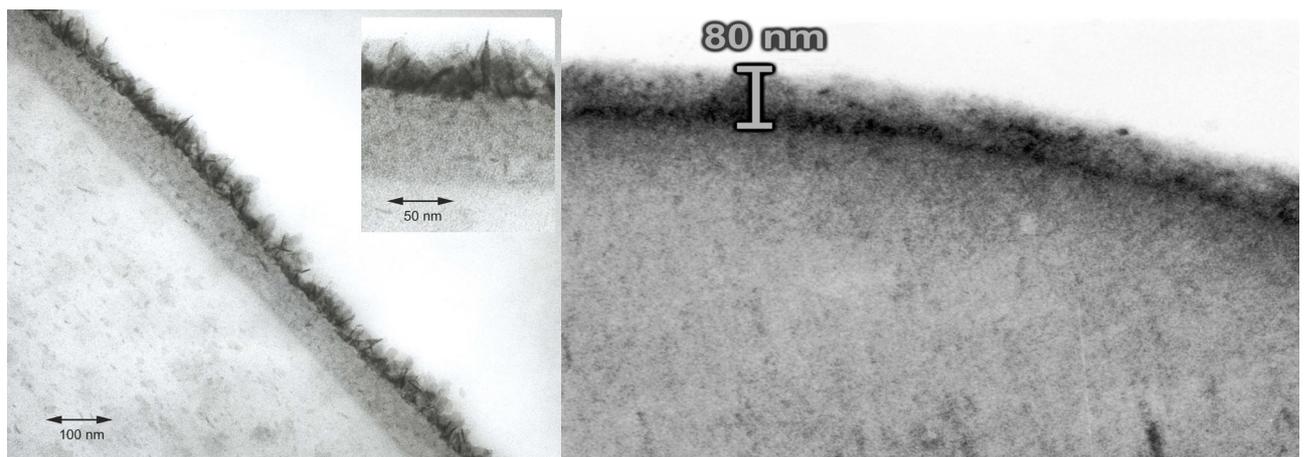


Abbildung 31: Aufbau des Mantels der MAS. Der Kern wird durch zwei deutlich unterscheidbare Schichten eingeschlossen. Die äußere Schicht ist stark durch Osmiumtetroxid gefärbt (links, Einbettung in LR White). Die Ausschnittvergrößerung zeigt, dass sie aus feinen Fibrillen besteht, die in einer amorphen Substanz eingebettet sind welche durch die TritonX100-Lösung (rechts, Einbettung in Epon) teilweise ausgewaschen wurde. (Kontrastierung nach Reynolds und mit 2% Uranylacetat, Zeiss 902, 80 kV)

Randzone kommen sie nicht vor. Diese wurden ebenfalls an MAS von *Nephila edulis* gefunden und als sogenannte Canaluli bezeichnet⁶³. Diese wurden jedoch nicht in allen Anschnitten beobachtet und in den für die immunhistochemischen Untersuchungen in LR White eingebetteten Proben fehlen sie ganz.

3.2.4 EINFLUSS CHAOTROPER AGENZIEN UND SÄUREN

Spinnenseide ist stabil gegenüber vielen chaotropen Agenzien, Laugen und Säuren. In gesättigten Lösungen von Lithiumsalzen oder Lithiumrhodanit sowie in starken Säuren löst sich die Seide auf. Um den Auflösungsprozess zu verlangsamen und mikroskopisch zu untersuchen, wurden Fadenmischproben, die sowohl MAS als auch MIS enthalten, mit verschiedenen Mischungen von 37%-iger Salzsäure und Eisessig oder verschiedenen verdünnten Lösungen von gesättigtem Lithiumrhodanit inkubiert.

In reiner Essigsäure löst sich die Seide nicht. Ab einem Volumenanteil von 20% an 37%iger HCl (in Eisessig) beginnt sich die Seide teilweise zu lösen und bei Anteilen von 70% wird sie

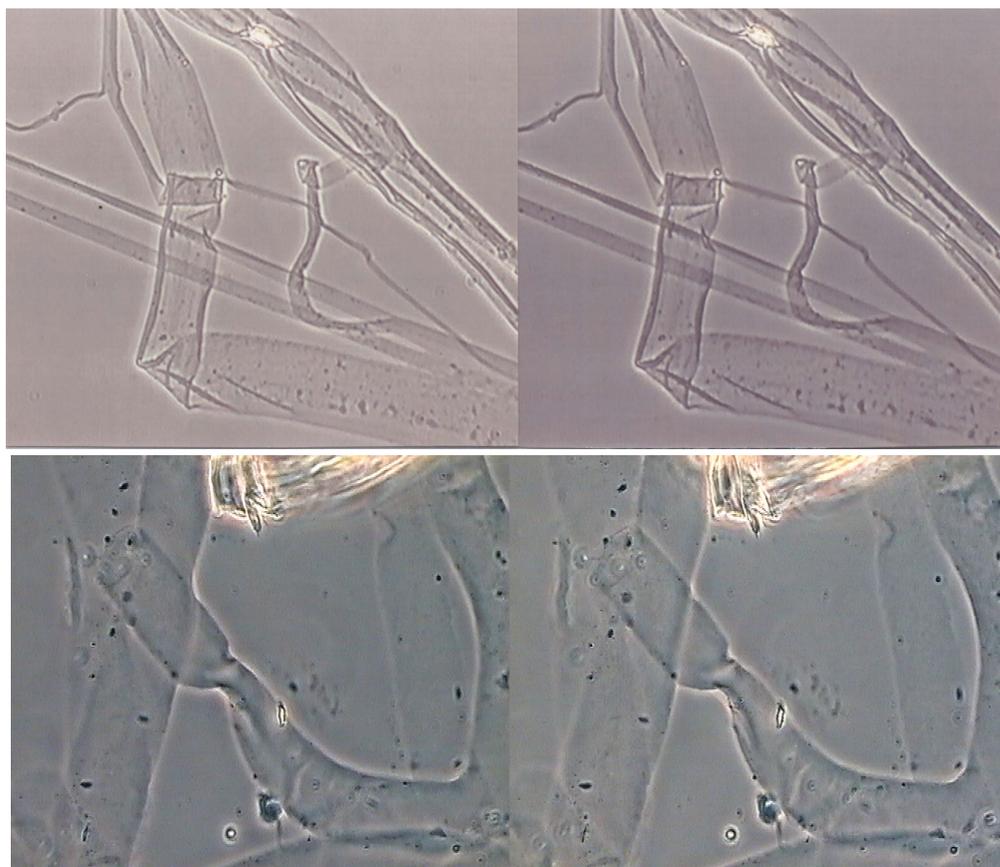


Abbildung 32: Stereomikroskopische Aufnahmen von MAS nach Säurebehandlung. Während sich das Innere des Fadens auflöst, bleiben vom Faden feine, säureresistente Häutchen zurück (oben). Wird die Behandlung in einem Gefäß durchgeführt (unten), behalten sie ihre schlauchförmige Gestalt (Phasenkontrast, Zeiss Neofluar 100x/1.30).

vollständig gelöst. Die Fäden der kleinen Ampullendrüse zeigten eine sehr viel höhere Resistenz gegenüber den verwendeten chaotropen Agenzien und Säuren. Unter Bedingungen, bei denen sich die MAS bereits teilweise auflöst, war auch nach längerer Inkubation keine Veränderung beobachtbar. Erst ab 40% (v/v) HCl sind auch an ihr Veränderungen beobachtbar.

Der Lösungsvorgang wurde direkt im Mikroskop bei höchster Auflösung beobachtet, indem ein Faden zwischen Deckgläsern eingespannt wurde und das Säuregemisch zwischen die Deckgläser gesogen wurde. Bei einem Gemisch von 20:80 beginnt der Lösevorgang erst nach einigen Minuten an wenigen Startpunkten in einem Faden – beobachtet wurden maximal zwei. An diesen Stellen beginnt sich der Faden langsam über mehrere Minuten zu einer kugelförmigen Blase aufzuweiten, die etwa das Doppelte des ursprünglichen Durchmessers erreicht. Die Aufweitung setzt sich dann in beiden Richtungen entlang des Fadens fort, so dass sie eine ovale Form einnimmt. Im Inneren der Blase kondensiert das Material des Kerns zu durchgängigen, stark lichtbrechenden Fasern in der Fadenachse, die aus Fibrillen bestehen.

Sobald ein bestimmter Punkt erreicht ist, beschleunigt sich der ganze Vorgang und die Aufweitung wandert sehr schnell entlang des Fadens. Die Beschleunigung wird durch das Reißen der Fasern im Kern am Startpunkt ausgelöst, die dann in einem räumlichen Zickzack umknicken. Das Zickzackband wird durch das immer schnellere Umknicken hinter der Front hergezogen und löst sich dabei vom hinteren Ende auf. Die Auflösung am Ende des Zickzackbandes und die Wanderungsgeschwindigkeit der Aufweitung entlang des Fadens scheinen im wesentlichen synchron zu verlaufen, jedoch kommt es an manchen Stellen zu einer Verlangsamung der Wanderung der Aufweitung, bei der das Ende des Zickzackbandes etwas aufholt. Die Auflösung der freien Enden setzt sich fort, bis entweder der Widerstand gebrochen ist und der Vorgang wieder mit hoher Geschwindigkeit fortgesetzt wird oder die Reaktion erstickt.

Nach der Auflösung des Kernmaterials bleibt eine sehr feine, transparente Haut zurück, die vom Fadenäußeren stammt. Wird die Reaktion in Gefäßen durchgeführt und dadurch der Kontakt zu Oberflächen verringert, so behalten sie ihre schlauchförmige Gestalt (siehe Abbildung 32).

Auch beim Lösen in Lithiumrhodanid ist eine Aufweitung des Fadens und das typische Zickzackband beobachtbar (siehe Abbildung 33). Der Auflösungsprozess verläuft im Wesentlichen genauso wie in Säure.

Eine grobe Abschätzung des Trockengewichts des ungelösten Materials ergab einen Anteil von ~7% (Trockengewicht/Nassgewicht). Der Wasseranteil nativer Seide bewegt sich üblicherweise um etwa 6% bei Raumtemperatur und wurde daher nicht näher bestimmt.

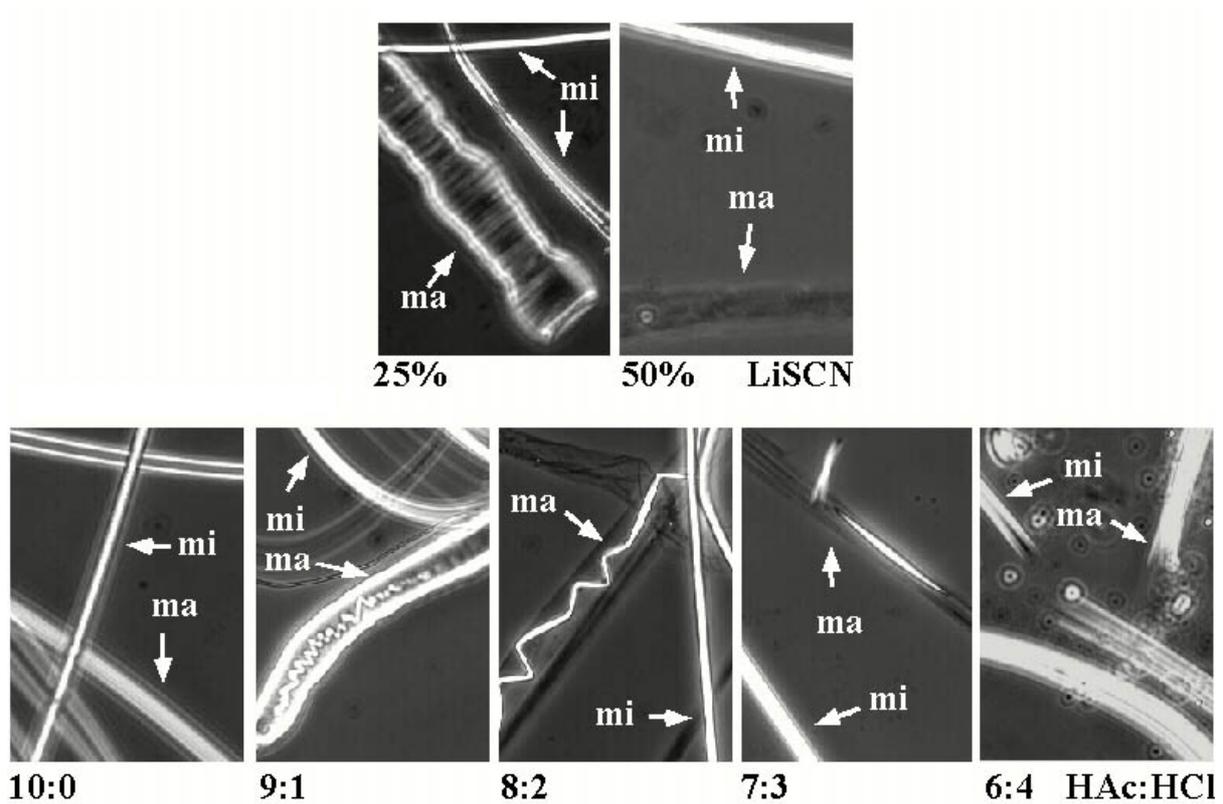


Abbildung 33: Mischproben wurden mit verschiedenen Verdünnungen von LiSCN (oben) oder mit Säuregemischen (unten) aus Eisessig (HAc) und 37%-iger Salzsäure (HCl) inkubiert. Anhand der Durchmesser und der Reaktion lässt sich die Seide der großen Ampullendrüse (ma) von der Seide der kleinen Ampullendrüse (mi) unterscheiden.

3.3 HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.1 HISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG NATIVER SEIDE MITTELS LEKTINEN

Aus den elektronenmikroskopischen Befunden an geschnittener Seide geht hervor, dass die Oberfläche des Fadens aus einer zum Teil abwaschbaren Substanz besteht, die in einer Schicht von feinen Fibrillen gehalten wird (siehe Kap. 3.2.3). Zur Charakterisierung dieser Schicht wurden native Fäden mit biotinmarkierten Lektinen inkubiert und mit FITC-markiertem Streptavidin nachgewiesen. In Abbildung 34 ist für das Lektin ConA exemplarisch gezeigt, dass die Fadenproben positiv mit den Lektinen reagieren. Die Diagramme zeigen die colorimetrische Quantifizierung für die eingesetzten Lektine ConA (a-D-Man, a-D-Glc), Jacalin (a-D-Gal, O-glycosylierte Proteine), WGA ((D-GlcNAc)_n) und UEA (a-L-Fuc), die alle mit der Fadenoberfläche reagieren.

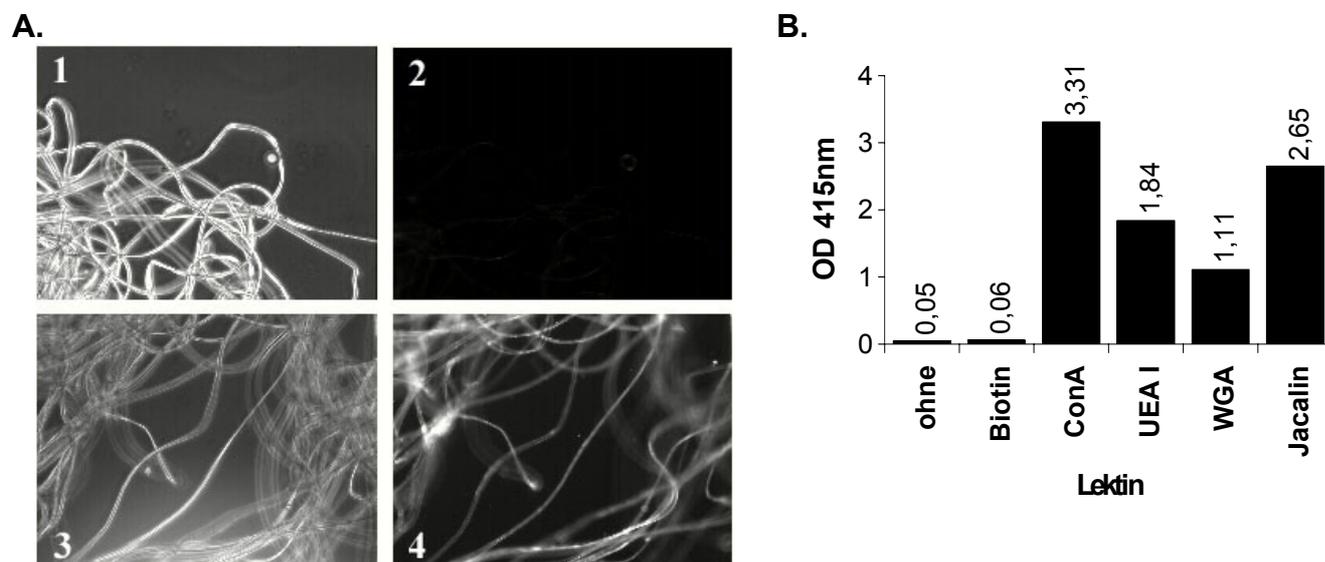


Abbildung 34: Nachweis von Glycokomponenten an der Oberfläche der Seide mittels biotinylierter Lektine.

Fluoreszenzfärbung der Oberfläche über biotinyliertes ConA (4); Bild 2 zeigt die Kontrolle mit ConA und methyl-D-mannosid, 1 + 3 die Phasenkontrastbilder der Proben (Färbung mit Streptavidin-FITC).

B: Colorimetrische Bestimmung. Gleiche Mengen an Seide wurden zunächst mit dem jeweiligen biotinylierten Lektin und dann mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert. Die Aktivität des gebundenen Enzymkomplexes wurde durch eine Farbreaktion beim Umsatz eines Substrats (Biorad Peroxidase Substrat ABTS) bei 415nm im Photometer gemessen.

3.3.2 HISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER SÄURE-RESISTENTEN HÜLLSCHICHT

In Kap. 3.2.3 und 3.2.4 wurde gezeigt, dass der Faden aus einem Kern und mehreren Hüllschichten besteht. Dabei wurde durch chaotrope Agenzien und Säuren eine resistente Schicht isoliert, die etwa 7% des Fadengewichts ausmacht. Das unterschiedliche Verhalten von Kern und Hülle in den o.g. Experimenten legt eine unterschiedliche Zusammensetzung des Materials nahe. Mithilfe der spidroinspezifischen Antiseren wurde deshalb überprüft, ob und welches der beiden bekannten Spidroine in dieser Schicht enthalten ist. Dazu wurden Seidenproben (Mix) mit Säure behandelt und die resistenten Rückstände fluoreszenzmikroskopisch mit den Antiseren gegen gescherte Seide (α -silk) sowie den Antiseren α -S1Rx und α -S2Rx untersucht.

Die als Kontrolle eingesetzten Präimmunsereen (PIS) ergaben keine Signale (siehe Abbildung 35). Von den eingesetzten Antiseren ergab sich für das gegen gescherte Seide gerichtete Antiserum (α -silk) eine deutliche Fluoreszenzmarkierung der Proben. Dabei sind sowohl die Fäden der großen als auch der kleinen Ampullendrüse markiert. Dagegen konnte mit den spidroinspezifischen Antiseren keinerlei Signal beobachtet werden, selbst wenn diese unverdünnt eingesetzt wurden. Dies war auch in gleicher Weise an unbehandelten Seidenproben beobachtbar, wo allenfalls ein schwaches Signal an den Schnittenden auftrat. Ein artifizierlicher Einfluss der Säurebehandlung auf die Reaktivität ist unwahrscheinlich, da die säurelöslichen Bestandteile des Fadeninneren in Dot Blot Experimenten (Daten nicht gezeigt)

positiv reagierten. Deshalb ist davon auszugehen, dass die entsprechenden, durch die spidroinspezifischen Antiseren erkannten Epitope in den säureresistenten Häutchen nicht zugänglich, höchstwahrscheinlich weil nicht vorhanden sind.

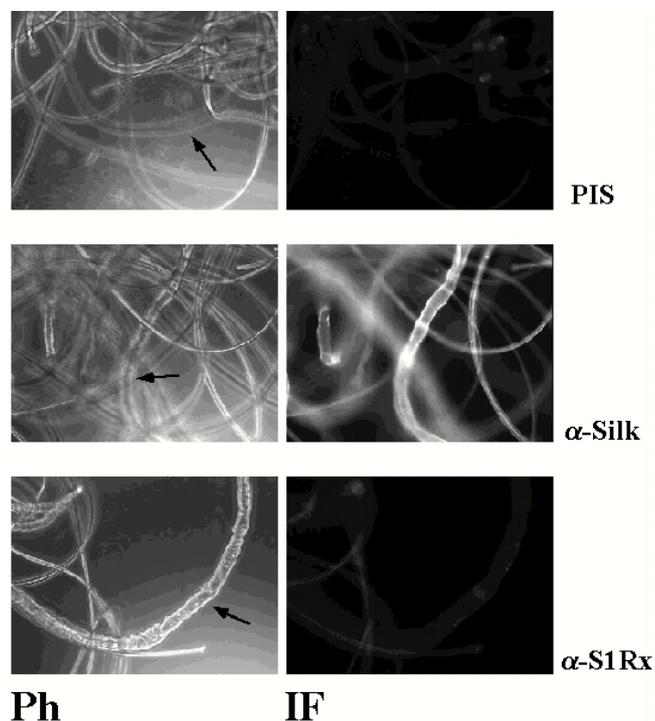


Abbildung 35: Die säureresistenten Häutchen der Seide wurden mit den seidenspezifischen und den spidroinspezifischen Antiseren inkubiert. Nur erstere reagieren. Ph: Phasenkontrast, IF: Immunfluoreszenz (Nachweis mit Anti-rabbit IgG-FITC)

3.3.3 VERTEILUNG DER SPIDROINE IM FADEN

Mit den gereinigten, spidroinspezifischen Antiseren sollte die bereits biochemisch festgestellte Präsenz beider Spidroine nachgewiesen und ihre Verteilung im Faden untersucht werden.

Dazu wurden Mischproben des Sicherungsfadens in Kunstharz eingebettet, Ultradünnschnitte gefertigt und mit verschiedenen Verdünnungen der kreuzgereinigten Antiseren unterschiedlich lang bei Raumtemperatur und bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Schnitte ausschließlich mit der entsprechenden Verdünnung des sekundären, mit kolloidalem Gold markierten Antiserums inkubiert. Die Kontrollen des sekundären Antiserums, die bei jeder Färbung parallel durchgeführt wurde, ergab in keinem Fall eine unspezifische Markierung der Fäden oder des Hintergrunds.

Die Markierung mit kolloidalem Gold war bei den gereinigten Antiseren α -S1Cx und α -S2Cx selbst bei unverdünnter Applikation und 5h Inkubationszeit bei 37°C nur schwach. Gleichzeitig trat eine unspezifische Markierung des Hintergrunds auf. Da die Anzahl der Markierungen innerhalb der Fadenanschnitte nur gering über denen des Hintergrunds lag, sind diese Ergebnisse bezüglich der Verteilung der Spidroine nicht aussagekräftig. Mit ungereinigten, gegen die C-Termini gerichteten Antiseren werden die Anschnitte jedoch deutlich markiert.

Bei den Inkubationen mit den gereinigten Antiseren α -S1R und α -S2R traten bei einer Verdünnung von 1:10 Hintergrundmarkierungen nur in wenigen Fällen und in sehr geringer Zahl auf, die vernachlässigt werden können. Bei geringerer Verdünnung (1:2) kommt es lokal zu einer erhöhten Markierung des Hintergrunds. Solche Stellen, die sich häufig an Stegrändern befanden, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Wie aus der Abbildung 36 ersichtlich, ist bei α -S1R die Markierung gleichmäßig über den Faden verteilt. Die Intensität variierte kaum zwischen den Anschnitten innerhalb der Probe oder zwischen denen von verschiedenen Proben. Die Signalintensität stieg bei geringerer Verdünnung des Serums nur unwesentlich an. Wie auch bei den biochemischen Analysen gelöster Seide zeigt sich eine Kreuzreaktion mit den Anschnitten der Fäden der kleinen Ampullendrüse, die anhand der kleineren Durchmesser leicht zu identifizieren sind. Ebenfalls analog zu den biochemischen Ergebnissen traten an diesen bei den Inkubationen mit α -S2R so gut wie keine Markierungen auf.

Im Vergleich zur Intensität der Markierung mit α -S1R war die Markierung der meisten Anschnitte der MAS bei α -S2R deutlich schwächer. Außerdem war sie innerhalb einer Probe nie homogen, was eine deutlich geringere Präsenz entsprechender Epitope anzeigt. Auch die Verteilung innerhalb des Fadens – gleichgültig ob längs oder quer geschnitten – ist nicht homogen. Das kolloidale Gold tritt im Zentrum der Fäden oft in kleinen Grüppchen auf. In einem Bereich von etwa 0.5 μ m bis zur Oberfläche wurde nur selten eine Markierung beobachtet – egal wie stark die Markierung im Zentrum auch war. Abbildung 37 zeigt den Querschnitt eines stark gefärbten Fadens, an dem dies besonders gut ersichtlich wird.

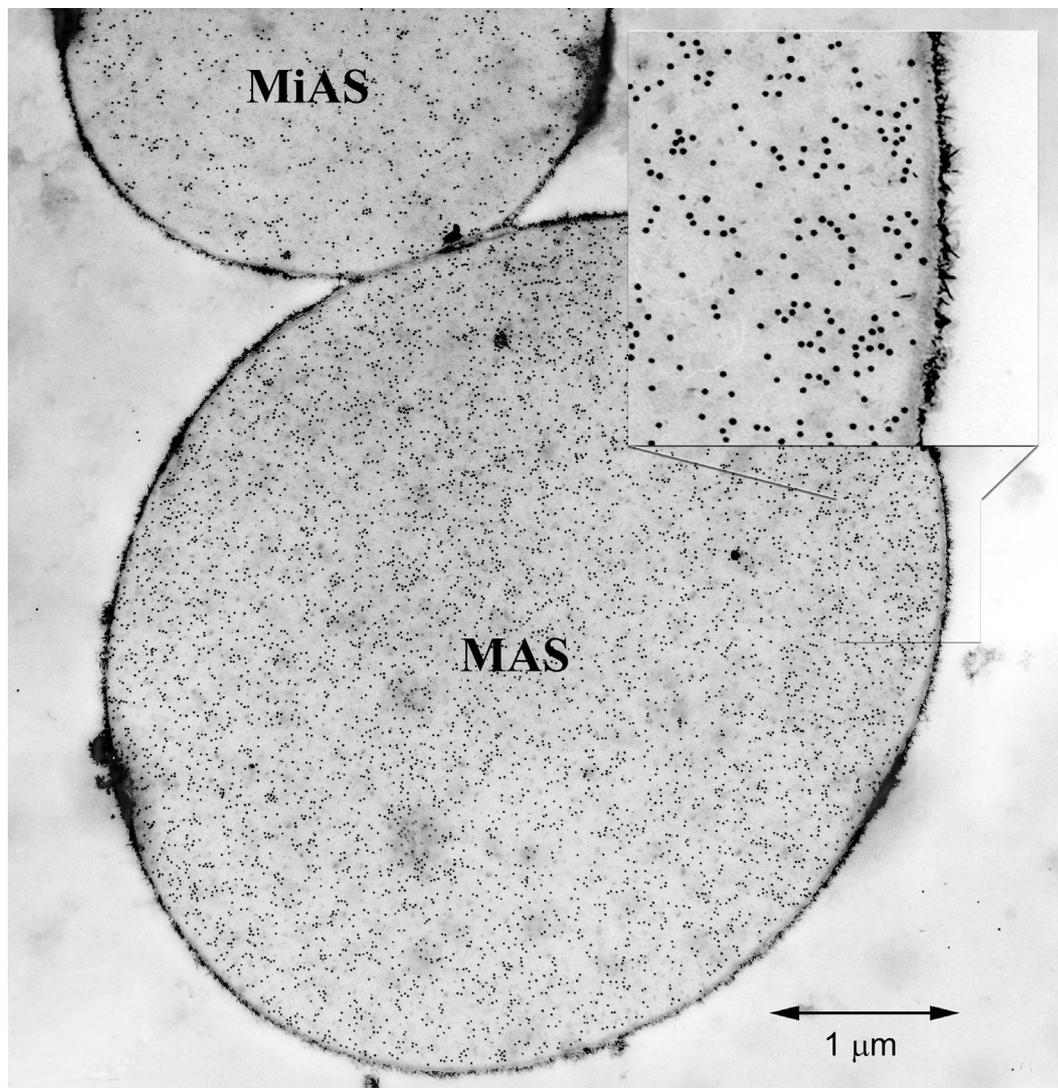


Abbildung 36: Verteilung von Spidroin 1 im Querschnitt eines Fadens aus der großen Ampullendrüse (MAS), nachgewiesen durch Inkubation mit α -S1Rx. Oben ist ein Fadenanschnitt der MIS zu erkennen, der etwas schwächer mit dem Antiserum reagiert. Die Ausschnittvergrößerung zeigt, dass die Markierung bis an die Haut des Fadens heranreicht (Pfeil). (Einbettung in LR-White, Markierung mit Anti-rabbit IgG an 12 nm kolloidalem Gold)

Da es sich bei den untersuchten Mischproben bezüglich der Abspulgeschwindigkeiten um relativ schlecht definierte Proben handelt, könnte die gefundene Verteilung von Spidroin 2 durch unnatürliche Bedingungen verursacht sein. Um dies zu prüfen, wurden Proben in der gleichen Weise untersucht, die bei definierten Geschwindigkeiten (3,8 u. 0,6 m/min.) gewonnen wurden. Die Intensität der Markierung variierte in der gleichen Weise wie für die Mischproben beschrieben und es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben erkennbar. Die Abspulgeschwindigkeit von 0,6 m/min entspricht etwa der Geschwindigkeit, mit der sich eine Spinne natürlicherweise beim Klettern bewegt. Daher dürfte das heterogene Verteilungsmuster von MASp2 Epitopen der natürlichen Situation entsprechen.

Um der Frage nachzugehen, durch was diese Verteilung zustande kommt, wurde die Verteilung von MASp1 und 2 im Spinnapparat untersucht. Eine morphologische Besonderheit der großen und kleinen Ampullendrüsen stellt der extrem lange Duktus dar, der sich wie ein Nephron von der Ampulle weg und in einer Schleife zurück wieder hin zur Spinnwarze windet (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39). Es wird gemeinhin vermutet, dass diese besondere Anordnung eine Rolle bei der Fadenbildung spielt. Histochemische Untersuchungen weisen auf physiologische Prozesse wie Entwässerung⁸⁷, Ansäuerung⁸⁸ und Ionenaustausch⁸⁹.

Es wurden Querschnitte von verschiedenen Bereichen (siehe Skizze Abbildung 38) der Schleife des

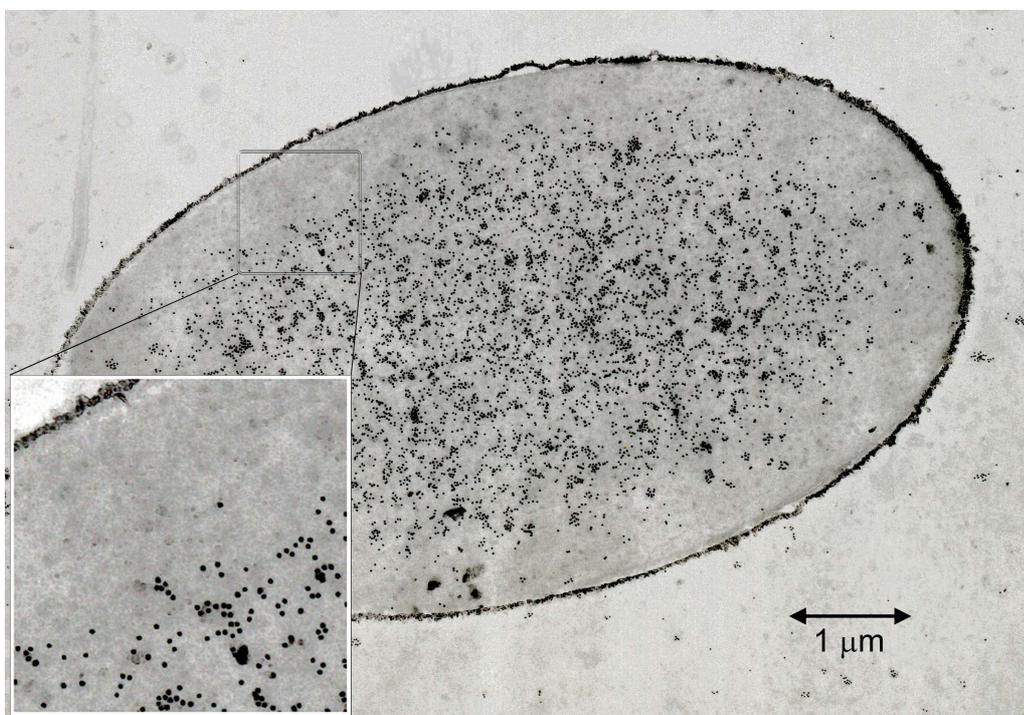


Abbildung 37: Verteilung von Spidroin 2 im Anschnitt eines Fadens aus der großen Ampullendrüse (MAS), nachgewiesen durch Inkubation mit α -S2Rx. Die Ausschnittvergrößerung zeigt, dass die Markierung nicht bis an die Haut des Fadens heranreicht. (Einbettung in LR-White, Markierung mit α -rabbit IgG an 12 nm kolloidalem Gold)

Dukts und am Ausgang der Ampulle gefertigt und sowohl fluoreszenz- als auch elektronenmikroskopisch auf die Verteilung von MASp1 und 2 untersucht. Die Schnittebenen liegen so, dass jeweils 3 verschiedene Bereiche der auf- und absteigenden Schleife getroffen sind. Die Durchmesser nehmen mit der Entfernung zur Ampulle deutlich ab. Die 4. Schnittebene trifft die zweite Schleife, die an dieser Stelle hinter den Ausgangstrichter der Ampulle zurückreicht. In den Querschnitten ist erkennbar, dass die Schleifen des Duktes durch ein feines Gewebe zusammengehalten werden, welches bei der Präparation leicht zu beschädigen ist.

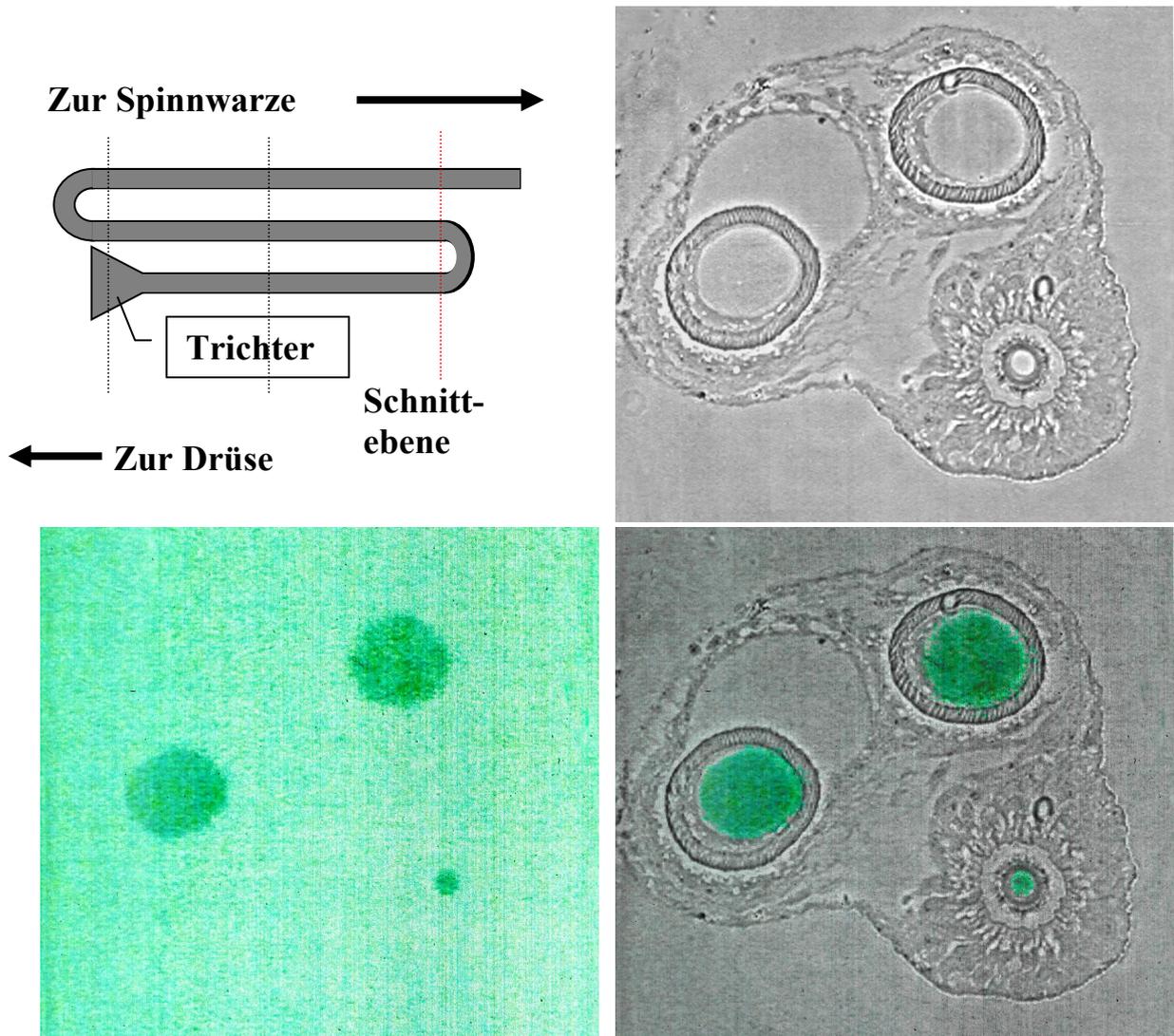


Abbildung 38: Verteilung von MASp1 im Dukt. Ganze Drüsen mit Dukt und Spinnwarze wurden in LR White eingebettet und Semidünnschnitte in den in der Skizze (links oben) durch Strichlinien markierten Bereichen angefertigt. Die rote Strichlinie bezeichnet den Bereich, der in den Aufnahmen gezeigt ist. Die Durchmesser des Lumens nehmen mit der Distanz von der Ampulle ab. Die Schnitte wurden mit den Antiseren α -S1R und α -S2R (nächste Abbildung) inkubiert (Nachweis mit Anti-rabbit IgG-FITC). Oben rechts: Phasenkontrast (Zeiss Neofluar 40x/0,75); unten links: Fluoreszenz; unten rechts: Überlagerung.

Wie im Faden ist die Intensität der Markierung durch α -S1R in allen untersuchten Bereichen deutlich stärker als durch α -S2R. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Epitope von Spidroin 2 in sehr viel geringerer Menge vorhanden sind. Die Verteilung beider Spidroine ist sowohl in den Anschnitten der Ampulle als auch in denen der verschiedenen Bereiche des Dukts über den luminalen Anteil homogen (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39). In den Dukt ist die Markierung ausschließlich auf das Lumen begrenzt, was eine Sekretion von Spidroin 1 oder 2 ausschließt. Durch die Lage der Schnittebenen sind etwa 95% der Gesamtlänge des Duktes erfasst. Innerhalb dieses Bereichs, in dem die Spidroine noch flüssig sind, ist keine Entmischung von Spidroin 2 zu beobachten. Dies muss im letzten Abschnitt des Duktes stattfinden, der sich noch etwa 5-10 mm zur Spinnspule an der anterioren Spinnwarze erstreckt. Etwa 4 mm vor der Spinnspule¹ liegt der Bereich, in dem sich der feste Faden bildet. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass das gefundene Verteilungsmuster durch die Fadenformation erzeugt wird.

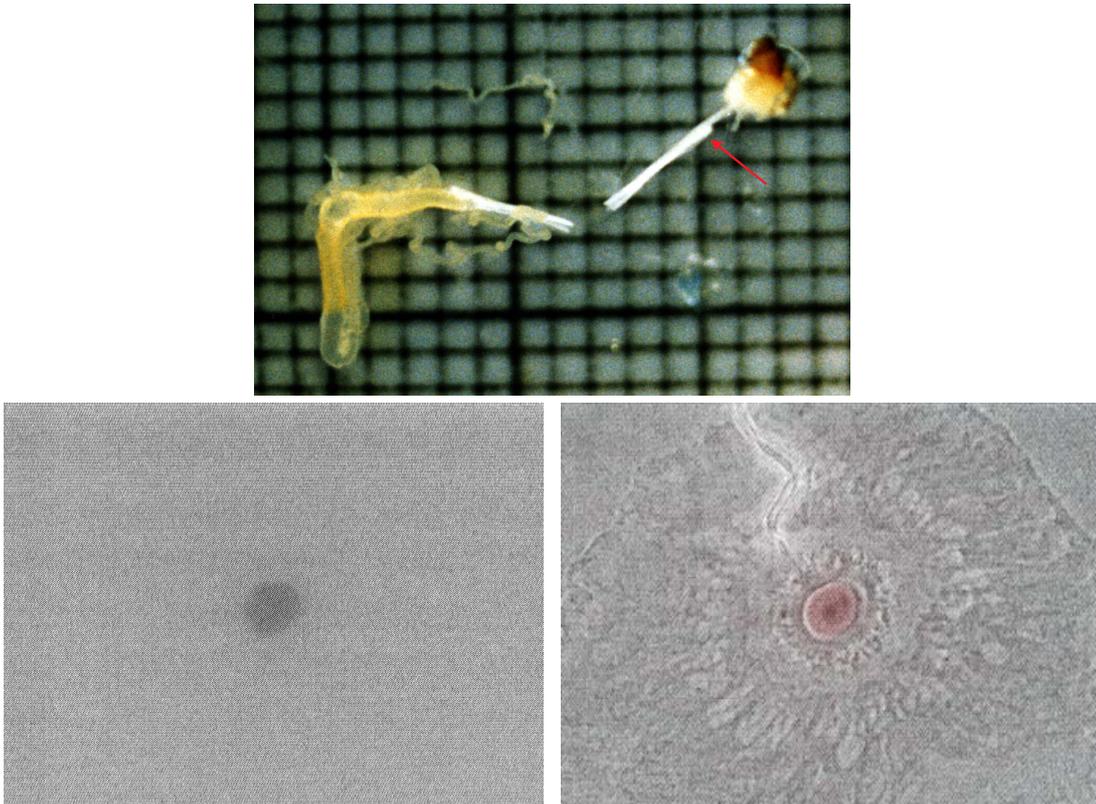


Abbildung 39: Verteilung von MASp2 im Dukt. Ganze Drüsen mit Dukt und Spinnwarze wurden in LR White eingebettet und Semidünnschnitte (siehe Abbildung 38) angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem Antiserum α -S2R inkubiert (Nachweis mit Anti-rabbit IgG-FITC). Oben: große Ampullendrüse mit Dukt und Spinnwarze aufgenommen vor Millimeterpapier. Der Pfeil zeigt auf die erste (distale) Schleife des Dukts, vor der die Schnittebene der gezeigten Präparate liegt. Rechts: Fluoreszenzsignal; Links: Überlagerung (eingefärbt) mit dem Phasenkontrastbild (Zeiss Neofluar, oil 100x/1,3)

4 Diskussion

4.1 BIOCHEMISCHE ARBEITEN

4.1.1 CHARAKTERISIERUNG DER ANTISEREN

Es wurden polyklonale Antiseren gegen rekombinant exprimierte Polypeptide gewonnen, die jeweils einen ausgewählten repetitiven und den C-terminalen Bereich von MASp1 (S1R, S1C) und MASp2 (S2R, S2C) repräsentieren (vgl. Abbildung 6). Trotz der Ähnlichkeit der repetitiven Sequenzen und der Homologie der C-Termini gelang es, spezifische Fraktionen aus diesen Antiseren zu reinigen, wie dies durch die fehlenden Kreuzreaktionen zu den jeweils nicht zur Immunisierung eingesetzten, rekombinanten Polypeptiden gezeigt wurde (vgl. Abbildung 7).

Die gereinigten Antiseren (α -S1Rx und α -S2Rx) gegen die repetitiven Teile reagierten nicht nur spezifisch mit den Extrakten des Drüseninhalts der großen Ampullendrüse sondern auch in charakteristischer Weise mit Extrakten anderer Drüsen (vgl. Abbildung 9). Eine Reaktion der gereinigten Antiseren mit Polyalanin oder dem Histidin Tag kann ausgeschlossen werden, da die zur Reinigung und zum Test der Spezifität verwendeten rekombinanten Polypeptide S1R und S2R einen Polyalaninblock und den Histidin Tag enthalten. Die Kreuzreaktion von α -S1Rx zu den Drüseninhalten der kleinen Ampullendrüse und die von α -S2Rx zu den Inhalten der flagelliformen Drüse können über die Ähnlichkeiten der Sequenzmotive der Spidroine dieser Drüsen zu dem glycinreichen Teil des jeweiligen Spidroins erklärt werden. Die Sequenz von MaSp1 und die der Spidroine der kleinen Ampullendrüse enthalten ähnliche Variationen des Motivs GXG, welche vermutlich von α -S1Rx erkannt werden. Das Motiv GPGXX kommt sowohl in den Sequenzen von MaSp2 als auch in denen des Gens Flag sehr häufig vor und erklärt die Kreuzreaktion des Antiserums α -S2Rx. Diese Kreuzreaktionen wurden auch von Fahnestock et al.⁴⁸ mit spidroinspezifischen Antiseren beobachtet, die gegen synthetische Peptide mit diesen typischen Sequenzen der repetitiven Glycinmotive von MaSp1 und MaSp2 gewonnen wurden.

Die von Fahnestock et al.⁴⁸ als schwach beschriebene Reaktion des MaSp2-spezifischen Serums mit den Aufschlüssen der aggregaten Drüsen konnte nicht gefunden werden. Dagegen reagierten die Aufschlüsse der piriformen Drüsen, welche von Fahnestock et al. nicht untersucht wurden, deutlich mit diesem. Diese Reaktion kann nicht eindeutig den Spidroinen dieser Drüsen zugeordnet werden, aber ein Vorhandensein des GPGXX-Motivs, das im Verdacht steht, den Seiden Elastizität zu verleihen^{39,90}, erscheint im Hinblick auf die Struktur und Funktion der Haftpunkte sinnvoll. In

einem Gewirr von vielen feinen Fäden (siehe Abbildung 26) muss der einzelne Faden über eine gewisse Elastizität verfügen, um kooperativ die von den Sicherungsfäden übertragenen Belastungen halten zu können. Für diese Seide liegen jedoch derzeit keine Daten über mechanische Eigenschaften oder Sequenzen vor, die dies bestätigen könnten.

4.1.2 C-TERMINUS

Die C-terminalen Sequenzen aller bekannten Spidroine der großen Ampullendrüse sind nicht repetitiv und hochkonserviert zwischen den verschiedenen Spinnenarten^{22,45}. Diese hohe Konservierung der Sequenz legt eine besondere Bedeutung für die MAS und ihre Entstehung nahe. Verschiedene Funktionen wurden für diese Sequenz vorgeschlagen. So könnte sie ein zelluläres Signal darstellen oder ein Propeptid, das bei der Sekretion oder Fadenbildung möglicherweise abgespalten wird⁴⁸. Von anderen Autoren wurde es für bedeutend für die Löslichkeit der Proteine im hochkonzentrierten Spinnut erachtet⁴⁹. Bisher war es jedoch nicht bekannt, ob die Sequenz überhaupt im Spinnut oder im Faden vorhanden ist.

Mit den spezifischen Antiseren gegen die C-terminalen Bereiche der beiden Spidroine konnte die Präsenz der entsprechenden Epitope in den Drüseninhalten und gelöster Seide nachgewiesen werden (vgl. Abbildungen 9-11). Von der Reaktion der Antiseren mit den hochmolekularen Anteilen des Drüseninhalts kann ausgeschlossen werden, dass diese Domänen in den Zellen abgespalten werden, wie dies häufig bei Signalpeptiden der Fall ist. Ebenso werden sie nicht bei der Fadenbildung abgespalten, wie aus der Reaktion der Antiseren zu dem hochmolekularen Material gelöster Seide zu ersehen ist.

Ein Vergleich der in allgemein zugänglichen Datenbanken enthaltenen Spidroinsequenzen zeigt, dass die C-Termini der Spidroine der großen Ampullendrüse größere Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen Spezies haben, als zu denen der Proteine der flagelliformen oder kleinen Ampullendrüse derselben Spezies. Tatsächlich kreuzreagieren die ungereinigten Antiseren gegen die C-Termini nur mit den hochmolekularen Proteinen der kleinen Ampullendrüse und einer niedermolekularen Bande der flagelliformen Drüse, aber nicht gegen die Extrakte der anderen Drüsen von *Nephila clavipes* (siehe Abbildung 12), was anzeigt, dass kein anderes Spidroin außer denen der kleinen Ampullendrüse eine homologe Sequenz besitzt. Die Reaktion mit der niedermolekularen Bande im Extrakt der flagelliformen Drüse dürfte unspezifisch sein. Daraus lässt sich schließen, dass die Funktion dieser Domäne spezifisch für die Drüse oder die Spidroine selbst sein muss.

Ein möglicher Grund für die hohe Konservierung der Sequenz könnte darin liegen, dass dieser Teil des Proteins eine bestimmte Konformation für die Erfüllung seiner Funktion einnehmen muss. Die Untersuchungen der rekombinanten Polypeptide, welche die C-terminalen Sequenzen der beiden Spidroine besitzen, geben einen Hinweis auf diese Funktion. Unter nichtreduzierenden Bedingungen bilden sie spontan Dimere über Disulfidbrücken (siehe Abbildung 19). Eine genauere Betrachtung der Konsensussequenz der verglichenen C-Termini zeigt, dass die höchste Homologie etwa in der Mitte der nichtrepetitiven Sequenzen besteht, wo sich mehrere Motive befinden, die zwischen den MASp der verschiedenen Spezies der Aranoidea absolut identisch sind (vgl. Abbildung 13). Innerhalb dieser findet sich ein Motiv mit einem Cystein, welches für die intermolekulare Verbindung der rekombinanten Polypeptide verantwortlich ist und den Spidroidinen die Fähigkeit zu inter- oder intramolekularen Verknüpfungen geben kann.

Für den Drüseninhalt und für gelöste Seide wurde von Mello et al.^{36,43} ein unterschiedliches Laufverhalten in der SDS-PAGE bei reduzierender oder nicht reduzierender Probenbehandlung gezeigt, was exemplarisch für die Drüsenextrakte bestätigt wurde (Abbildung 19). Die Differenz der angegebenen Molekulargewichte unter den beiden Bedingungen entspricht nicht der, die man für ein Dimer erwarten würde. Da keine zusätzlichen niedermolekularen Banden entsprechender Intensität und Größe beobachtbar sind, ist es unwahrscheinlich, dass ein kleineres Molekül an die Spidroine gebunden wird, wie es z.B. bei der Seide von *Bombyx mori* der Fall ist³. Dies würde für eine intramolekulare Bindung sprechen, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Spidroindimere ungewöhnliche Laufeigenschaften besitzen und deren wahre Größe unterschätzt wird. Auf mögliche anormale Laufeigenschaften und die Unterschätzung der Molekulargewichte glycinreicher Proteine haben bereits Jackson et al.³⁷ im Zusammenhang mit der Differenz ihrer ermittelten Molekulargewichtsdaten zu den publizierten Werten aus Elektrophoresen hingewiesen.

Die experimentellen Evidenzen für eine mögliche strukturelle Funktion der C-Termini werden durch die theoretischen Analysen der Sequenzen unterstützt. So ist aus der Berechnung der mittleren Hydrophobizität der Moleküle ersichtlich, dass diese im C-Terminus im Vergleich zu den repetitiven Bereichen insgesamt erhöht ist und der am stärksten konservierte Bereich tatsächlich die höchste Hydrophobizität der gesamten Spidroinsequenz aufweist. Dies zeigt klar, dass die Bedeutung der hochhomologen Sequenzen nicht allein mit der Löslichkeit der Spidroine erklärt werden kann, wie dies vermutet wurde⁴⁹.

Das alterierende Muster hydrophober und hydrophiler Bereiche im C-Terminus ist typisch für die meisten Spidroinsequenzen der großen und kleinen Ampullendrüsen. Selbst in dissonanten Sequenzbereichen des Sequenzvergleichs sind die Unterschiede meist dergestalt, dass ihre

Grundeigenheit und damit das Muster erhalten bleibt. Dies weist auf eine Selektion hin, die auf die Erhaltung einer konformationalen Funktion dieser Proteindomäne gerichtet ist.

Die phylogenetische Analyse der verfügbaren C-terminalen Spidroinsequenzen weist auf einen gemeinsamen Ursprung der Spidroine der großen und kleinen Ampullendrüsen, der sich auch in ihrer morphologischen Ähnlichkeit ausdrückt. Das Sequenzmotiv Q(A/V)LLE etwa in der vorderen Mitte des C-Terminus ist selbst bei der mygalomorphen Spezies *Euagrus chisoseus* und mit Einschränkungen auch in den Fibroinen von *Plectreuris tristis* erhalten. Für die flagelliformen Spidroine besteht vermutlich ebenfalls eine allerdings etwas entferntere Verwandtschaft, die sich durch das Pendant DALL und die Homologie der benachbarten Sequenz (A/S)ALXH(T/C)L zu vielen Sequenzen der MASps und MISps ausdrückt.

In naher Nachbarschaft zu dem Motiv Q(A/V)LLE befindet sich das bei den MASps der Araneoidea hochkonservierte Motiv CD. Die Fibroine von *Plectreurys* und *Euagrus* sowie die MISps enthalten an dieser Stelle kein Cystein, jedoch befinden sich an dieser Stelle geladene oder zumindest polare Aminosäuren. Bezeichnenderweise findet sich in den Spidroinen der nomadisch lebenden Spezies *Dolomedes tenebrosus* aus der den Araneoidea nahe verwandten Familie der Lycosoidea mit den Aminosäuren DCE eine hohe Ähnlichkeit zu den MASps der Araneoidea. In diesem Motiv und dem in N-terminaler Richtung benachbarten Sequenzabschnitt bestehen auch die größten Unterschiede zwischen den MASps, den Dolomedes Fibroinen und den ansonsten sehr ähnlichen *Nephila* MISps. Dies würde bei entsprechender Bestätigung durch weitere Sequenzen darauf hinweisen, dass sich die Etablierung des Cysteinmotivs in den C-Termini der MASps bereits innerhalb der Entelegynae vollzogen hat. Obwohl in ihren repetitiven Bereichen die Sequenz DTF-1 mehr geladene Aminosäuren aufweist und etwas hydrophiler ist als DTF-2, sind sich beide sehr ähnlich und zeigen typische Merkmale von Spidroin 1. Das Fehlen typischer MASp2 Motive könnte darauf hinweisen, dass diese erst innerhalb der Araneoidea entstanden sind. Jedoch fehlen Daten von anderen, nicht zu den Araneoidea gehörenden Arten der Entelegynae und so ist dies spekulativ, da die nomadisch lebende *Dolomedes tenebrosus* solche Merkmale wieder verloren haben könnte.

Da *Juraranaeus*, das älteste gefundene Fossil der Araneoidea, auf etwa 160 Mio. Jahre datiert wird⁹¹, würde die Neuerwerbung des CD-Motivs bei den Araneidae ebenfalls als hochkonserviert anzusehen sein. Dies wiederum kann am besten dadurch erklärt werden, dass der Erwerb dieses Motivs einen Vorteil darstellt, der nachfolgend hochselektiv gewirkt haben muss. Unterstrichen wird dies dadurch, dass sich bisher keine rückgerichtete Mutation gefunden hat. Dieser Vorteil

muss mit der Spezialisierung der kleinen und großen Ampullendrüsen und ihrer Produkte verbunden sein.

Das Cysteinmotiv liegt zwischen einem hydrophilen Sequenzabschnitt in der Flanke zu dem bereits erwähnten hochkonservierten hydrophoben Sequenzbereich. Durch die Abfolge hydrophiler und hydrophober Sequenzabschnitte wird die Zusammenlagerung gleichartiger Bereiche bevorzugt, die im Falle intermolekularer Interaktionen die Cysteine in direkten Kontakt bringen und somit die Ausbildung einer Cystinbrücke ermöglichen würde. Der angesprochene Vorteil könnte also in einer zusätzlich durch eine kovalente Bindung stabilisierten dimeren Interaktion liegen. Dies könnte sich auf die Materialeigenschaften der Seide auswirken. Da jedoch die Disulfidbrücken bereits im flüssigen Spinnut der Ampulle vorliegen, ist auch ein Zusammenhang mit intrazellulären Vorgängen wie Verpackung und Transport denkbar.

4.1.3 DRÜSENINHALT UND SEIDE

Über die Proteinbestandteile der MAS bestehen aufgrund der unterschiedlichen publizierten Ergebnisse einige Widersprüche, die z.T. sehr stark in den Besonderheiten der Spidroine und den daraus resultierenden technischen Schwierigkeiten begründet sind. Auf molekularbiologischer Seite ist es aufgrund der Größe der Transkripte und der repetitiven Natur der Gene bisher nur gelungen, einen C-terminalen Anteil von MASp1⁹² und MASp2³⁸ aufzuklären. Selbst die Angaben über die Größe der Transkripte variieren stark, so dass man den aufgeklärten Anteil der Sequenzen nur grob abschätzen kann³. Es wird zwar vermutet, dass die Gene aus nur einem Exon bestehen, aber ein definitiver Beweis fehlt und so kann nur indirekt auf die Größe der Proteine geschlossen werden. Dementsprechend sind auch Abschätzungen über den Anteil der einzelnen Spidroine am Faden³⁸ ungenau.

Die Charakterisierung der Spidroine selbst ist ebenfalls durch ihre Besonderheiten erschwert. So ist die Sequenzierung des N-Terminus der Proteine via Edman-Abbau bisher nicht gelungen, da dieser offensichtlich blockiert ist. Die publizierten Molekulargewichte variieren stark, ebenso wie die Anzahl der mit elektrophoretischen Techniken beobachteten hochmolekularen Banden^{35,37,86,93}. Der hohe Anteil an den Aminosäuren Glycin und Alanin erschwert nicht nur die Untersuchung der Nukleinsäuren durch den daraus resultierenden hohen G/C-Anteil, er beeinflusst das Färbeverhalten der Proteine und möglicherweise auch ihr Laufverhalten in der Elektrophorese.

³ Der derzeit größte publizierte Wert beträgt 12,5 kb für die Transkripte von MaSp1. Davon wären nur etwa 20% des C-terminalen Anteils bekannt. Arbeiten im Hause ergaben aber für unterschiedliche Präparationen Transkriptgrößen von ~14kb bis hin zu 21kb (A.Chinali et al., in prep.).

Von Fahnestock et al.⁴⁸ wurde mithilfe ihrer spidroinspezifischen Antiseren die Existenz der bereits erwähnten typischen Sequenzmotive von MASp1 und MASp2 in den Drüseninhalten nachgewiesen, was auch mit den gegen die repetitiven Sequenzen gerichteten Antiseren bestätigt werden kann (vgl. Abbildung 9). Die Autoren sehen es als unwahrscheinlich an, dass die beiden Motive im nicht sequenzierten N-terminalen Teil eines Spidroins vermischt vorkommen, da durch die beiden Antiseren unterschiedliche Banden des hochmolekularen Anteils der großen Ampullendrüse angefärbt werden. Letzteres konnte in dieser Arbeit ebenfalls festgestellt werden. Dabei stimmen die gezeigten Bandenmuster mit den in dieser Arbeit gefundenen Mustern (vgl. Abbildung 23) sehr gut überein. Die unterschiedlich starke Anfärbung in den Westernblots und in den histochemischen Untersuchungen deutet darauf hin, dass MASp2-Epitope weit weniger prominent sind, als von Hinman et al.³⁸ angenommen. Dies scheint sich auch in den Experimenten zur Auftrennung gelöster Seide und des Drüseninhalts durch isoelektrische Fokussierung wiederzuspiegeln, wo sich der Hauptteil des Materials im alkalischen Bereich konzentriert. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten für die bekannten Sequenzen von MASp1 und seinen repetitiven Modulen.

Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur^{35,43,86} weisen die Inhalte der Ampulle mehrere hochmolekulare Banden im Bereich von 220-270 kDa in der diskontinuierlichen SDS-PAGE auf (vgl. Abbildung 22), die auch in den Abbildungen von Fahnestock et al.⁴⁸ zu erkennen sind, jedoch unkommentiert blieben. Durch die getroffenen besonderen Vorsichtsmaßnahmen konnte eine artifizielle Degradation bei der Präparation, wie sie in der Literatur⁹⁴ (vgl. hierzu²⁹) diskutiert wird, ausgeschlossen werden. Da sich die Molekulargewichte der gelösten Seide (in HFIP) und des Ampulleninhalts in demselben Bereich bewegen und sich aus mehreren Banden zusammensetzen, scheint das so vorliegende Spinngut der Ampulle ohne größere Veränderung der Molekulargewichte der Spidroine zum festen Faden versponnen zu werden.

Für die Vielzahl der beobachteten Spidroinbanden bieten sich zwei Erklärungen an. Sowohl für eine Proteinmodifikation als auch für eine Degradation oder Proteinprozessierung wurden Anhaltspunkte gefunden. Die positive Reaktion der Lektine mit dem Inhalt der Ampulle weist auf eine Glycosylierung der Spidroinbanden. Durch das Lektin Jacalin wird eine O-Glycosylierung angezeigt. Da Threonin kaum in der Seide vorhanden ist, dürfte es sich dabei vermutlich um eine Serin-O-Glycosylierung handeln. Obwohl die bekannten Spidroinsequenzen kein Muster für eine N-Glycosylierung aufweisen, kann eine solche jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund des für die verschiedenen Lektine unterschiedlich angefärbten Bandenmusters ist zu vermuten, dass es sich um ein komplexes Glycosylierungsmuster handelt.

In den Beobachtungen und Experimenten zur Degradation des Ampulleninhalts konnte festgestellt werden, dass diese durch Kontaminationen aus den Geweben verursacht wird. Die Gewebe selbst enthalten viele nieder- und mittelmolekulare Spidroinfragmente (siehe Abbildung 21). Anhand ihrer Reaktion mit den gegen die C-terminalen Sequenzbereiche gerichteten Antiseren können diese nicht aus translationalen Pausen herrühren, wie dies in der Literatur anhand von Pulse-Chase Experimenten beschrieben wurde⁸³. Diese müssen das Produkt einer intrazellulären Degradation sein und könnten beim Abbau fehlgefalteter Produkte entstehen. Auch der Inhalt der Ampulle enthält neben den hochmolekularen Anteilen geringere Mengen an mittel- und niedermolekularen C-terminalen Spidroinfragmenten, so dass auch eine Resorption sich degradierender Spidroine aus dem Lumen die Quelle dieser Fragmente sein kann. Dies wird dadurch unterstützt, dass die Hauptfraktionen in den Geweben kleiner sind als die des Ampulleninhalts (siehe Abbildung 21). Nach eigener Erfahrung kann man einer adulte Spinne binnen Stunden einige 100 Meter Faden entnehmen, ohne dabei den Vorrat der Ampulle völlig zu verbrauchen. Vermutlich könnte die Spinne über einige Tage (vielleicht Wochen) ohne Neusynthese auskommen. Daraus ist anzunehmen, dass Teile des Spinnnguts über einen langen Zeitraum in der Ampulle verbleiben. Bei derartig langer Lagerung der Spidroine erscheinen entsprechende Vorkehrungen zur Rezyklierung degradierten Proteins sinnvoll. Ein Hinweis auf eine solche Resorption gibt auch das Gewebe der Ampulle, dessen luminale Oberfläche eine starke Vergrößerung durch Mikrovilli aufweist (⁸⁷ und eigene Befunde).

Ob es sich bei den immunologisch als MASp1 und 2 identifizierten hochmolekularen Banden des Ampulleninhalts um Produkte voller Länge handelt, ist fraglich. Die Vielzahl der beobachteten Banden könnte zwar durch extensive Proteinmodifikationen erklärt werden, dies würde jedoch bedeuten, dass der Peptidanteil der Proteine den unteren Molekulargewichten bei etwa 220 kDa entsprechen würde. Selbst bei einem Molekulargewicht von 270 kDa würde dies etwa 8-10 kb Leserahmen auf RNA-Ebene entsprechen, was bei beobachteten Transkriptgrößen von ~14kb⁹⁵ bedeuten würde, dass ein ungewöhnlich großer nichtkodierender Bereich vorhanden sein muss.

In den Versuchen, die N-terminalen Aminosäuresequenzen der hochmolekularen Hauptbanden durch Mikrosequenzierung aufzuklären, konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass sich die N-Termini in ihrer Aminosäurezusammensetzung nicht von den repetitiven Sequenzbereichen unterscheiden. Interessanterweise lässt sich aus den ungenauen Chromatogrammen das den Polyalaninblöcken voranstehende Motiv SQGAGRGLG bilden. Serin wurde auch bei gelöster Seide von *Nephila madagascariensis* zu 60-80% als N-terminale Aminosäure detektiert²⁹, was die unter Vorbehalt (vgl. Kap.3.1.5.3) zu betrachtenden Ergebnisse der Mikrosequenzierung bestärkt.

Die Ampulleninhalte verschiedener Spinnen weisen eine identische Größenverteilung nicht nur der hoch- sondern auch der niedermolekularen Banden auf. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zu translationalen Pausen wurde von den Autoren⁸³ auf die sehr gleichartige Größenverteilung der Spidroinfragmente in verschiedenen Drüsen hingewiesen, was zumindest für den Vergleich innerhalb der Gewebe der a-Zone oder der b-Zone und den Anhängen zutreffend ist (vgl. Abbildung 21). Durch Untersuchungen an sich in Degradation befindlichen Proben der Drüseninhalte mit den gegen die C-Termini gerichteten Antiseren konnten klare Hinweise auf einen definierten, vom N-Terminus ausgehenden Abbau gefunden werden, der diese bei verschiedenen Tieren gefundenen konsistenten Muster erklären kann.

Ein solcher blockweiser Abbau, der in definierten C-terminalen Fragmenten resultiert, könnte die Folge einer sequenzspezifischen Proteaseaktivität sein. Stabile Zwischenprodukte könnten jedoch auch durch die Glycosylierung der Spidroine bedingt sein, welche das Peptidgerüst vor Degradation schützt. Da Serin (und auch Asparagin) in den bekannten repetitiven Sequenzbereichen regelmäßig in einem Motiv vor den Polyalaninblöcken vorhanden ist, würde jeweils ein repetitives Modul bei fehlender (Serin-O-)Glycosylierung bis zum nächsten glycosylierten Serin abgebaut werden und so eine Erklärung für die gefundene Dominanz von Serin als N-terminale Aminosäure bieten.

4.2 MIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER SEIDE

Aus den ersten mikroskopischen Untersuchungen der Seiden (MAS) der großen Ampullendrüse sind verschiedene Modelle entwickelt worden, die eine hierarchische Organisation der Seide postulieren. Eine Gemeinsamkeit in diesen Modellen ist, dass von einer Unterteilung in einen Kern und eine äußere Haut oder Hülle vorgenommen wird^{61,62}. Dies wurde jedoch mehrfach angezweifelt^{26, 52}, da sich in TEM Untersuchungen der MAS von *Nephila clavipes* keine Hinweise auf solche Strukturen finden ließen. Dagegen wurde in einer neueren Arbeit mittels TEM ein mehrschichtiger Aufbau der Hülle an der MAS von *Nephila edulis* gezeigt⁸⁴. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Befunden aus den eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der MAS von *Nephila clavipes*. Nachfolgend werden die Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen mit dieser Arbeit verglichen, deren generelle Einteilung als Grundlage für ein Modell dient, in dem die strukturellen und histochemischen Befunde Eingang finden.

Der stärkste Hinweis für eine Organisation in Kern und Hülle stammt aus den Experimenten mit chaotropen Agenzien und Säuren, die unzweifelhaft die Existenz einer distinkten Außenschicht beweisen (siehe Abbildung 33 ff.). Diese zeigt sich im Vergleich zum Kern der Fäden als sehr viel

resistenter gegenüber chaotropen Agenzien. Aus den Beobachtungen des Auflösungs Vorgangs ist zu schließen, dass das in Reaktion auf die Behandlung sich ausdehnende Kernmaterial gegen den Widerstand der Hülle arbeitet. Diese wird dabei offensichtlich plastisch verformt, da sie sich nach Auflösung des Kerns nicht mehr auf die ursprüngliche Form des Fadens zusammenzieht. Letzteres ist auch von Vollrath et al.⁷⁸ an in Harnstoff gequollenen Fadenstücken beobachtet worden. Ein Anhaltspunkt dafür, dass die Verformung durch eine Kraft aus dem Kern verursacht wird, ist die leicht konische Form der sich nach außen verjüngenden Schnittenden der in Harnstoff gequollenen Fadenstücke, die offensichtlich aufgrund des geringeren Drucks an den offenen Enden dort weniger weit gedehnt werden. Auch der Auflösungs Vorgang in Säure wird nicht an den Schnittenden sondern an nur wenigen Stellen innerhalb des Fadens initiiert, was ebenfalls auf eine Dehnung durch einen sich im Kern aufbauenden Druck hinweist.

Die zeitliche Abfolge des Auflösungs Vorgangs, der in zwei durch die Geschwindigkeit der Reaktionen unterscheidbaren Phasen abläuft, liefert weitere Anhaltspunkte. In der ersten Phase sind langsame Veränderungen beobachtbar. Im Kern kondensiert das Material zu lichtbrechenden Fasern und der Faden weitet sich. Ist ein Schwellenwert der Ausdehnung erreicht, so beginnt diese sich zunächst langsam entlang des Fadens auszubreiten. Durch das Reißen der Fasern im Kern wird eine Beschleunigung des Vorgangs ausgelöst. In dieser zweiten Phase kommt es zur vollständigen Auflösung des Kerns mit dem typischen zickzackförmigen Umknicken des zu Fasern kondensierten Kernmaterials. Diese lösen sich schnell von den Enden her auf und die Aufweitung wird dann schnell entlang des Fadens vorangetrieben. Auflösung und Aufweitung verlaufen quasi synchron, woraus der ursächliche Zusammenhang der beiden Erscheinungen deutlich wird. Die schnellen Ereignisse beim Start der zweiten Phase zeigen im Kern einen kurzen zeitlichen Vorlauf gegenüber der Aufweitung, wogegen beim Auflaufen auf einen Widerstand ein Nachlauf beobachtet werden kann. Daraus kann geschlossen werden, dass die Vorgänge im Kern die treibende Kraft sind. Der Vorgang lässt sich mit einer Druckwelle in einem Schlauch vergleichen. Im Faden wird dieser Druck vermutlich durch die Hydrolyse des Kerns erzeugt.

Aus diesen Beobachtungen ist anzunehmen, dass die äußere Hülle nicht nur als Schutz gegen chemische und mikrobielle Umwelteinflüsse dient, sondern auch eine stützende Funktion hat, die das Kernmaterial zusammenhält und zu den mechanischen Eigenschaften der Fäden beiträgt.

Aus den Untersuchungen der Seide mittels TEM ist ersichtlich, dass die Hülle aus mehreren Schichten besteht (vgl. Modell Abbildung 40). Die auffälligste Struktur ist eine stark osmiophile Schicht, deren Stärke von ungefähr 80 nm je nach Präparation und Anschnitt deutlich variieren kann. Diese Schicht ist offensichtlich instabil und kann durch Inkubation in verschiedenen

Lösungen wie beispielsweise 1% TritonX-100 oder 8M Harnstoff aber auch durch die Behandlungen bei der Einbettung deformiert und teilweise abgelöst werden. An Proben, die mit TritonX-100 inkubiert wurden, erscheint diese Schicht an den Stellen, wo sie erhalten ist, als weniger dicht und aufgelockert. Bei höherer Vergrößerung kann man erkennen, dass sie aus einer amorphen Matrix besteht, in die sehr feine Fibrillen eingebettet sind, welche vermutlich für den Zusammenhalt der Schicht verantwortlich sind (siehe Abbildung 31 und Modell Abbildung 40). In den meisten Proben sind diese feinen Fibrillen meistens zu stark kontrastierten Aggregaten verklumpt. Diese Schicht wird nach innen von einer feinen Linie begrenzt, die vermutlich die Oberfläche des festen Materials darstellt, dem diese Schicht aufliegt.

Unter der osmiophilen Schicht lässt sich eine weitere Schicht von etwa 30-60 nm Stärke ausmachen, die etwas kontrastreicher ist als das sich darunter anschließende Kernmaterial. Sowohl die Kontrastierung als auch die Schichtdicke können unabhängig von der Probenbehandlung variieren. Für die Seide von *Nephila edulis* wird die Schichtdicke mit 250 nm angegeben⁸⁴.

Für *Nephila edulis* werden zwei weitere Schichten beschrieben⁸⁴, die sich oberhalb und unterhalb der beiden bereits erwähnten Lagen befinden. Die äußerste Schicht wird als feine, membranähnliche Lipidschicht⁸⁴ charakterisiert, die der osmiophilen Schicht aufliegt. In manchen Anschnitten der Seide von *Nephila clavipes* konnten Reste dieser Schicht gefunden werden, die jedoch überwiegend nicht erhalten ist. Auch lichtmikroskopisch konnten Anhaltspunkte für diese Schicht gefunden werden, denn die Seide färbt sich schwach mit Ölrot, einem lipophilen Farbstoff.

Die vierte und innerste, etwa 400 nm dicke Schicht wird von Vollrath et al.⁸⁴ vom Kern durch das Fehlen sogenannter Canaluli unterschieden, die den größten Teil im Zentrum des Querschnitts einnehmen. Diese Canaluli wurden von Shao et al.⁶³ an der MAS von *Nephila edulis* beschrieben und sollen aus sphärischen Sekretionströpfchen im Spinngut entstehen, die bei der Fadenbildung zu dünnen Kanälen in Richtung der Fadenachse gestreckt werden. In Arbeiten an der MAS von *Nephila clavipes*²⁶ wurden solche Strukturen nicht beschrieben. Es handelt sich jedoch nicht um einen artspezifischen Unterschied der Seiden, denn bei eigenen Untersuchungen wurden sowohl in mit Harnstoff- oder TritonX-100 behandelten als auch in unbehandelten Seidenproben von *Nephila clavipes* Canaluli in den Querschnitten der MAS, nicht jedoch in denen der MIS beobachtet. Allerdings treten sie nicht in allen Anschnitten derselben Probe zutage und in manchen Proben – z.B. denen für die histochemischen Untersuchungen – waren sie überhaupt nicht erkennbar. Das Fehlen bzw. das Vorhandensein der Canaluli wurde nicht systematisch untersucht. Nach den o.g. Befunden zu beurteilen, scheint ihr Fehlen nicht von den unterschiedlichen Präparationsmethoden abzuhängen.

Das Material im Kern zeigt keine Kontrastunterschiede zu dem der 4. Schicht, so dass manche Anschnitte in diesen Bereichen homogen erscheinen. Deshalb und aufgrund der nachfolgend diskutierten histochemischen Befunde ist die vierte Schicht analog zum Modell von Li et al.⁶¹ als zweite oder äußere Kernschicht anzusehen. Aufgrund der beobachteten Instabilität der beiden äußeren Schichten können die säureresistenten Häutchen der dritten Schicht (vgl. Abbildung 40) zugeordnet werden.

Von Vollrath et al.⁶² (vgl. Modell in Abbildung 5) wurden für die Hülle Schichten kreuzverwobener Fibrillen beschrieben, für die sie allerdings in einer späteren Untersuchung mittels TEM⁶³ keine Anhaltspunkte fanden. Letzteres ist in Übereinstimmung mit den eigenen Befunden. In seltenen Fällen konnten an der Oberfläche harnstoffgequollener Fäden gekreuzte Linien in Biegungen des Fadens gefunden werden, bei denen es sich aber um durch Spannung und Stauchung artifiziell entstandene Falten handeln dürfte. Außerdem hätte sich eine entsprechende fibrilläre Struktur bei der Aufweitung der Fäden in Säure deutlich erkennen lassen müssen, was jedoch nicht der Fall war. Dagegen fanden sich viele Hinweise für Fibrillen im Kern der Fäden. Durch das hochleistungsstereomikroskopische Verfahren lassen sich diese z.B. an in Harnstoff gequollenen Fadenstücken eindeutig im Inneren lokalisieren (siehe Abbildung 30). Fibrillen entstehen auch, wenn in Flüssigstickstoff eingefrorene Fäden gebrochen werden und besonders deutlich sind sie an Rissen unbehandelter Seide erkennbar (Abbildung 28 ff.). Die Fähigkeit, Fibrillen zu bilden, scheint eine inhärente Eigenschaft des Materials zu sein. Fibrilläre Präzipitate entstehen z.B. aus den aufgelösten Seiden von *Bombyx mori* und *Nephila madagascariensis*²⁹ und auch aus rekombinanten Spidroinen⁶⁷, an denen mit Einzelmolekülkraftmessungen (single molecule force spectroscopy) gezeigt werden konnte, dass sich dabei intermolekulare Polyalaninstapel bilden.

Fibrilläre Strukturen in den Fäden wurden auch von anderen Arbeitsgruppen an den Seiden verschiedener Spinnen und Seidenspinner^{96,96-101} und auch an Kevlar⁶⁴ beschrieben, jedoch wurde von Mahoney et al.^{97,102} argumentiert, es müsse sich um artifizielle Strukturen handeln, die erst durch die Probenbehandlung in dem hochorientierten Material entstehen. Als Beweis gegen eine fibrilläre Organisation wurde das Verhalten von Spinnenseide unter Kompression angeführt und mit dem von Kunstfasern verglichen. Ein typisches Merkmal zugfester Kunstfasern ist, dass sie unter Kompression weitaus schwächer sind. Eine Stauchung führt zu einer kooperativen lateralen Ausweichbewegung und zu Knicken im Material, die in der Stauchungszone als Bandenmuster erkennbar sind¹⁰³. In der Stauchungszone eines zu einer engen Schleife zusammengezogenen Fadens konnte von Mahoney et al.⁹⁷ im REM kein entsprechendes Muster noch sonstige Hinweise auf Fibrillen gefunden werden. Die Oberfläche, Form und der Durchmesser sind unverändert, was

die Stabilität des Materials in lateraler Richtung anzeigt. Theoretisch kann dies durch ein molekulares Netzwerk ähnlich wie z.B. bei Gummi oder die Quervernetzung paralleler Molekülketten zustande kommen, wogegen jedoch sowohl die beim Bruch der Fäden beobachtete Fibrillation (vgl. ¹⁰³) als auch die mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide sprechen. Wie in den Säureexperimenten gezeigt, wird den Fäden diese Stabilität gegen laterale Deformation durch die äußere Haut verliehen. Die Existenz einer mehrschichtigen Umhüllung macht den von Mahoney et al. gezogenen Schluss obsolet, denn Kompressionsbanden wären durch sie verdeckt – wenn nicht gar verhindert.

Gegen die Existenz von Fibrillen scheint auch zu sprechen, dass es aus der TEM keine eindeutigen Hinweise auf solche Strukturen gibt, und dass alle Methoden, mit denen sie nachgewiesen worden sind, äußere Einflüsse – seien sie chemischer oder mechanischer Natur – nicht ausschließen können. Umgekehrt muss man aber davon ausgehen, dass Spinnenseide natürlicherweise verschiedensten Kraftwirkungen nicht nur in der Normalen der Fäden ausgesetzt ist und es damit nicht unwahrscheinlich ist, dass diese in gleicher Weise auf das Material einwirken.

Außerdem gibt es bei der Fadenbildung Indizien dafür, dass eine homogene Faser vermieden wird. So stellen die sphärischen Tröpfchen, aus denen die Canaluli entstehen¹⁰⁴, eine Störung im Spinngut dar, die dies verhindern. In diesem Zusammenhang sei auf die von Shao et al.¹⁰⁵ diskutierten Konsequenzen für die mechanischen Eigenschaften der Seide durch Canaluli hingewiesen. Auch die Rolle von Spidroin 2 kann, wie nachfolgend diskutiert, als Störgröße in diesem Sinne interpretiert werden. Einen Anhaltspunkt dafür liefert die bevorzugt auftretende inselförmige Gruppierung der Goldmarkierung an elektronendichten Bereichen im Faden, die durch die Quantität und/oder die Zugänglichkeit des entsprechenden Epitops in diesen Bereichen zustande kommen muss und in beiden Fällen auf die Heterogenität des Materials schließen lässt (vgl. Abbildung 37). Es ist sehr wahrscheinlich, dass in einem heterogenen Material unter Zug Fibrillen entstehen.

4.3 HISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER SEIDE

Die Strukturen der MAS, die in den mikroskopischen Untersuchungen gefunden wurden, sind mit histochemischen Techniken weiter charakterisiert worden. Neben den Antiseren wurden dazu auch die parallel in den biochemischen Arbeiten verwendeten Lektine eingesetzt.

Mit dem Lektin ConA ist gezeigt worden, dass die Oberfläche der Spinnenseide Glycokomponenten (Mannose) enthält¹⁰⁶. Für das in der B-Zone der Drüsen sekretierte Produkt wurde bereits von Kovoov¹⁰⁷ histochemisch eine positive Reaktion mit Schiff'schem Reagenz nachgewiesen. Von

diesem Produkt nehmen Vollrath et al.¹ an, dass es sich um einen Bestandteil der Hülle handelt. An intakten Sicherungsfäden der Spinne wurde sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch colorimetrisch nachgewiesen, dass sie mit den Lektinen ConA, UEA, WGA und Jacalin reagieren. Aufgrund der Kompaktheit der Fäden reagiert hauptsächlich die Fadenoberfläche. Da es aus den Untersuchungen der Lipide¹⁰⁸⁻¹¹⁰ kein Hinweis auf glycosylierte Verbindungen gibt, muss sich das glycosylierte Material in der zweiten Schicht der Fadenhülle befinden (siehe Abbildung 37).

Die biochemischen Untersuchungen der Proteine des Drüseninhalts ergaben ebenfalls eine positive Reaktion der hochmolekularen Banden mit diesen Lektinen, was auf eine komplexe Glycosylierung des Kernmaterials hindeutet. Tatsächlich wurde im Hause auch eine homogene Verteilung von ConA über die Fadenquerschnitte gefunden (W.Vater, pers. Mitteilung). Sowohl für die Fadenoberfläche als auch für das Kernmaterial muss davon ausgegangen werden, dass das Material glycosyliert ist und es sich um ein komplexes Glycosylierungsmuster handelt. Mit den verwendeten Lektinen konnte kein Unterschied gefunden werden, der es erlaubt hätte, die Herkunft der Materialien des Kerns und der Hülle darüber zu ermitteln.

Mit den bereits beschriebenen Antiseren wurden histochemische Untersuchungen der Spinnenseide durchgeführt. Mit diesen Experimenten sollte die Konsistenz der mikroskopisch gefundenen unterschiedlichen Strukturen weiter charakterisiert werden, wobei besonderes Augenmerk auf die Rolle von Spidroin2 gelegt worden ist.

Zunächst wurden die säureresistenten Häutchen der Hülle untersucht. Diese wären nach einer Arbeitshypothese eine mögliche Quelle für MASp2, denn dies würde erklären, warum Mello et al.^{43,86} in ihren chemischen Verdauen keine MASp2 spezifischen Peptide gefunden haben. Jedoch reagierten die säureresistenten Teile der Seide zwar mit den gegen gescherte Seide gerichteten Antiseren, nicht jedoch mit den MASp1- und MASp2-spezifischen Antiseren – selbst wenn diese unverdünnt eingesetzt wurden (siehe Abbildung 35). Für MASp2 ist dieses Ergebnis durch die in den Querschnitten der Seide gefundene, bevorzugte Markierung im Kern der Fäden bestätigt (vgl. Abbildung 37). Die Markierung von MASp1 ist homogen über den Durchmesser der Fäden verteilt. Sie reicht bis an die Haut und in manchen Fällen überlappt sie (siehe Abbildung 36). Letzteres kann jedoch ein falsch positives Resultat darstellen, denn Elemente im Inneren des Schnitts können in der Projektion mit der antigenen Oberflächenstruktur überlappen¹¹¹. Dies ist wahrscheinlich der Fall, denn einerseits reagieren die Antiseren gegen Seide mit den säurebehandelten Häutchen und andererseits reagieren die α -S1R- und α -S2R-Seren zwar nicht mit den Häutchen, wohl aber mit den Überständen aus der Säurebehandlung in Dot Blots und Western Blots (nicht gezeigt). Aufgrund

dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die säureresistente Schicht von keinem der beiden bekannten Spidroine gebildet wird.

Um zu untersuchen, wovon die besondere Verteilung von MaSp2 abhängt, wurden zwei Fadenproben verglichen, die mit einer hohen und einer niedrigen Abspulgeschwindigkeit gewonnen wurden. Sie entsprechen ungefähr der Geschwindigkeit beim Sturz einer Spinne und der einer laufenden Spinne. In beiden Fadenproben ist keine Markierung in der Peripherie beobachtet worden. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Dimensionen der markierten und unmarkierten Zonen graduell mit der Geschwindigkeit verändern, aber dies ist auch bei Schnitten innerhalb derselben Probe der Fall. Das generelle Muster der zentralen Verteilung von MASp2 ist jedoch nicht verändert.

Die biochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Spidroine im Drüseninhalt präsent sind. Das beobachtete, unterschiedliche Verteilungsmuster der beiden Spidroine könnte in der Ampulle bereits dadurch vorgeformt sein, dass, wie es von Knight et al.¹¹² vermutet wird, die Sekretion in unterschiedlichen Bereichen der Drüse den Inhalt schichtet. Dies ist aber für die beiden Spidroine nicht der Fall, denn diese sind in der Ampulle homogen verteilt. Die Goldmarkierung reicht bei beiden Antiseren bis an die von Mikrovilli gebildete basale Gewebsgrenze und setzt sich z.T. in den Geweben fort. Auch in den biochemischen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Gewebe der Ampulle Spidroine enthalten. Dabei wurde bereits darauf hingewiesen, dass ein Gutteil der Spidroine aufgrund der positiven Reaktion der gegen die C-Termini gerichteten Antiseren mit niedermolekularen Banden degradiert sein muss. Dies könnten fehlgefaltete Moleküle sein, die gleich in den Zellen wieder abgebaut werden oder aber degradierte Proteine, die aus der Ampulle resorbiert und abgebaut werden. Letzteres wird durch die Morphologie des Gewebes nahegelegt, das die für viele resorptive Gewebe typischen Mikrovilli⁸⁷ zeigt.

Da beide Spidroine in der Ampulle homogen verteilt vorliegen, muss sich die im Faden beobachtete Verteilung von MASp2 innerhalb des Duktes einstellen. Der Dukt ist etwa dreimal so lang, wie es eine direkte Verbindung zur Spinnwarze erfordern würde¹¹³. In zwei engen Schleifen liegen, durch ein Bindegewebe dicht zusammengehalten, drei gegenläufige Abschnitte, so dass die Form an ein Nephron erinnert. Diese morphologische Besonderheit der großen und kleinen Ampullendrüsen wird allgemein als bedeutsam für den Spinnvorgang erachtet. Als Funktionen wurden Wasserresorption^{114,115}, Azidifikation¹¹⁶ und Ionenaustausch⁸⁹ identifiziert, wodurch das Spinngut für die Fadenbildung konditioniert wird. Um zu sehen, ob die Verteilung der Spidroine während der Passage durch den Dukt verändert wird, sind Querschnitte im Bereich der Schleifen und der Mitte des Bündels mit den spezifischen Antiseren untersucht worden. In allen Bereichen wurde aber eine

homogene Verteilung beider Spidroine im Lumen detektiert (siehe Abbildung 38 ff), woraus ersichtlich ist, dass das Verteilungsmuster nicht durch die Konditionierungsprozesse in dem extrem verlängerten Teil des Duktes geformt wird. Es muss in den letzten etwa 5 mm erzeugt werden, die zwischen der Stelle des letzten Querschnitts und dem Austritt an der Spinnspule verbleiben. Etwa 4 mm vor der Spinnspule befindet sich die Zone, in der aus dem flüssigkristallinen Spinnut der feste Faden entsteht¹. Aufgrund dieser Nähe ist es sehr wahrscheinlich, dass die Verteilung von MASp2 unmittelbar mit den Prozessen des Übergangs von flüssig nach fest zusammenhängen.

Tatsächlich gibt es eine sehr überzeugende Kongruenz zu den Beobachtungen von Knight et al.¹¹⁷, die diesen Prozess untersucht haben. Die Bildung des festen Fadens ereignet sich in einer Übergangszone, wo sich das flüssige Spinnut durch Zug des festen Materials von der Wand des Dukts löst und einen Kegel bildet, in dem die Verfestigung des Materials durch Scherkräfte ausgelöst wird. In diesem Kegel wurde die Bildung von β -Faltblättern nachgewiesen, die in der Peripherie der Fäden in höherer Konzentration vorliegen.

Die Dimension der Zone erhöhter Fluoreszenz bei der optischen Transsektion der Fäden mit LSM stimmen gut mit denen der MASp2-freien Zone überein, ebenso wie die Beobachtung, dass beide nicht von der Spinnengeschwindigkeit abhängen. Der Zusammenhang des Verteilungsmusters von MASp2 mit der Verteilung von β -Faltblättern wird durch theoretische Überlegungen unterstützt, dass die in der Sequenz von MASp2 auftretenden Proline für die Bildung von β -Faltblättern abträglich sind⁵². Interessanterweise haben bereits Li et al.¹⁰⁰ im Zusammenhang mit den von ihnen beschriebenen zwei unterschiedliche Kernzonen im Faden darauf hingewiesen, dass diese Zonen möglicherweise aus unterschiedlichen Proteinen – nämlich MASp1 und MASp2 – bestehen könnten. In der flüssigen Phase wurden von Knight et al.¹¹⁷ keine β -Faltblätter beobachtet und für den flüssigen Inhalt der Ampulle ist mit NMR eine helikale Orientierung gemessen worden⁶⁰. Dies deckt sich mit der homogenen Verteilung von MASp2 in den flüssigen Inhalten der Ampulle und des Dukts.

Die Entstehung des Verteilungsmusters von Spidroin2 lässt sich aus den Vorgängen in der kegelförmigen Fadenbildungszone erklären. Im flüssigen Spinnut kann von einem laminaren Geschwindigkeitsprofil ausgegangen werden, bei dem die Fließgeschwindigkeit am Rand kleiner als die im Zentrum ist. Im Faden ist die Geschwindigkeit über den Durchmesser konstant, weshalb sich im Kegel der Fadenbildungszone die Fließgeschwindigkeit und die Scherkräfte in der Peripherie erhöhen muß¹¹⁷. Damit einher geht die Verfestigung des Materials. Bestandteile, die nicht in die entstehenden Strukturen inkorporiert werden können, werden in die flüssige Phase verdrängt. Unter der Annahme, dass MASp2 aufgrund der Proline in seiner Sequenz störend für die

Bildung größerer kristalliner Bereiche wirkt, wird es nicht in die entstehenden hochkristallinen Strukturen in der Peripherie eingebaut und in den Kern verdrängt.

Die besondere Anordnung der MASp2-spezifischen Markierung in kleinen Inseln im Kern der Fäden wurde bereits im Zusammenhang mit den beobachteten Fibrillen erwähnt. Diese Anordnung im Kern lässt sich in der gleichen Weise erklären. Im Kern entstehende kristalline Bereiche würden MASp2 ebensowenig inkorporieren und damit verdrängen. Die Funktion von Spidroin2 könnte demnach darin bestehen, als Störgröße den Grad der Kristallinität zu regulieren.

Aus dem Vergleich von Materialeigenschaften zu den Daten der NMR und Röntgenkristallographie hat Jelinski¹¹⁸ die Schlussfolgerung gezogen, dass die Natur mit einem Gutteil an Zufälligkeit arbeitet. Dies scheint nicht nur auf molekularer Ebene in den Sequenzen der Spidroine zuzutreffen, sondern auch in den hierarchisch höheren Ebenen ihrer Organisation.

Spidroin2 ist möglicherweise auch aktiv in den Prozess der Fadenbildung involviert. Im flüssigen Spinngut könnte die homogene Verteilung von MASp2 eine vorzeitige Kristallisation verhindern. Durch die Entmischung könnte es den Auslöser für die Fadenbildung darstellen. Für die molekularen Vorgänge bei der Formation des Fadens wurde vorgeschlagen, dass es zu verstärkten Interaktionen und zur Ausrichtung durch die Entfaltung der Spidroinmoleküle kommt. Dies soll durch die Azidifikation des Spinnguts ausgelöst oder zumindest unterstützt werden¹¹⁶, welche durch die Reduktion abstoßender Ladungen die Interaktionen der Moleküle verstärkt. Der pH Wert verändert sich von 6.9 in der Ampulle auf 6.3 am Ende des Duktus²⁷. Die aus den bekannten Proteinsequenzen berechneten Titrationskurven zeigen im Bereich zwischen pH 6 und 7 einen sigmoidalen Verlauf, so dass die absoluten Ladungsveränderungen nur relativ gering sein dürften. Jedoch wurde in einer jüngst veröffentlichten Arbeit gezeigt, dass sich die rheologischen Eigenschaften des Drüseninhalts von *Nephila edulis* in Abhängigkeit des pH in diesem Bereich verändern¹¹⁹.

Der isoelektrische Punkt (pI) des bekannten Teils von MASp1 liegt über 10 und jener der meisten repetitiven Module* bei etwa 9. Die Ladung müsste sich infolge der Verringerung des pH sogar erhöhen und der Effekt wäre genau gegenteilig. Dagegen liegt der pI des bekannten Teils von MASp2 bei 6,2. Geladene Aminosäuren, wie etwa Arginin, das in der Sequenz von MASp1 regelmäßig in den Modulen vorkommt, sind in der Sequenz von MASp2 nur selten und

* Dies ist nicht mit den in der Literatur gebräuchlichen Motiven zu verwechseln. Als Modul wird hier ein Sequenzbereich bezeichnet, der vom Anfang eines Polyalaninblocks bis zum Anfang des nächsten reicht und die sich dazwischen befindenden glycinreichen Motive einschließt (vgl. Abbildung 6).

unregelmäßig eingestreut zu finden. Die meisten repetitiven Module von MASp2 haben einen pI von etwa 5.8. Die Veränderung des pH-Werts im distalen Bereich des Duktus müsste zu einer Entladung von Spidroin2 führen und sich damit sehr viel wahrscheinlicher auf die Interaktionseigenschaften dieses Proteins auswirken. Versuche zur isoelektrischen Fokussierung (siehe Kap.3.1.5.3) des Drüseninhalts von *Nephila clavipes* ergaben, dass Bestandteile des Materials im Bereich der theoretischen pI-Werte für die bekannten Sequenzen der beiden Spidroine zu finden sind, woraus zu erkennen ist, dass das Spinngut tatsächlich aus sehr unterschiedlich geladenen Proteinen besteht.

Aus dem Vergleich der bekannten Spidroinsequenzen anderer Arten lässt sich jedoch kein klares, allgemeingültiges Muster erkennen, das diese Hypothese erhärten könnte. Die pI-Werte für die verschiedenen Spidroine vom Typ MASp2 weichen z.T. erheblich ab. Bei *Araneus diadematus* liegen sie z.B. bei ~9. Die Ladungsverteilung innerhalb der repetitiven Bereiche entspricht aber der bei *Nephila clavipes*. Dies ist wiederum bei *Nephila madagascariensis* nicht der Fall, wo Arginin regelmäßig in den repetitiven Modulen der Sequenz vorkommt. Umgekehrt gibt es Spidroine vom Typ MASp1, bei denen Arginin oder andere geladene Aminosäuren relativ selten in der repetitiven Sequenz vorkommen. Nicht nur in den repetitiven Bereichen sind solche Unterschiede beobachtbar. Die pI-Werte der hochkonservierten C-terminalen Sequenzen liegen bei ~4, aber im Übergang zu den repetitiven Sequenzbereichen unterscheiden sich die einzelnen Spidroine.

Die tatsächlichen isoelektrischen Punkte der Moleküle können natürlich auch durch Proteinmodifikationen bestimmt sein. Hinweise auf ein komplexes Glycosylierungsmuster wurden in dieser Arbeit präsentiert, aber auch Phosphor oder Schwefel wurden im Faden nachgewiesen⁸⁹ und könnten in organischer Verbindung vorliegen²⁵. Solche Proteinmodifikationen erscheinen vor allem auch im Hinblick auf die sich in Abhängigkeit vieler Faktoren verändernden Eigenschaften der Seide interessant¹²⁰. Es liegt nahe, dass die Spinnen aktiv und z.T. sehr schnell diese Eigenschaften modulieren können. Bei Veränderung des Beutespektrums verändert sich der Seringehalt der Seide³⁴, woraus auf ein verändertes Expressionsmuster geschlossen werden muss, das möglicherweise nicht nur MASp1 und MASp2 betrifft⁴. Da das gespeicherte Material in der Ampulle als Vorrat für viele Tage⁵ ausreicht, erscheint dies allein als Erklärung für die beobachteten kurzfristigen Änderungen nicht befriedigend. Den Einfluss der verschiedenen

⁴ In manchen Arten sind sich die Seringehalte in den bekannten Sequenzen der beiden Spidroine so ähnlich, dass sich die beobachteten, umweltbedingten Unterschiede nur dann ergeben können, wenn sich eines der Spidroine im unbekanntem N-terminalen Bereich erheblich unterscheidet. Das immunologische Verhalten der Hülle des Fadens legt nahe, dass weitere (Serin-O-glycosylierte) Proteine am Aufbau des Fadens beteiligt sind, die hier einen Beitrag geben könnten.

⁵ Bei Stimulierung der Drüsen durch Abspulen der Seide wurden in 2h den Tieren etwa 400-500m Seide entnommen. Trotzdem waren die Drüsen nach vergleichender Schätzung nur etwa halb entleert.

Spidroine auf die Materialeigenschaften wird man erst dann genauer kennen, wenn man alle beteiligten Proteine, ihre Sequenzen und ihre Modifikationen kennt und ihre Variation in Abhängigkeit solcher Umwelteinflüsse studieren kann.

Nach Ansicht von Fritz Vollrath¹²¹⁻¹²³ haben die Spinnbedingungen einen sehr viel größeren Einfluss auf die Fasereigenschaften und die Unterschiede in den Sequenzen der Spidroine sind möglicherweise weitaus weniger bedeutend für diese, als bisher angenommen¹²⁴⁻¹²⁷. Dies würde tatsächlich bedeuten, dass die Ursache dafür, dass Spinnen mehr als ein Protein für ihren „Lebensfaden“ verwenden, weniger in den mechanischen Eigenschaften, als vielmehr in der Evolution der Spidroine und im Herstellungsprozess zu suchen ist. Die Hypothese von Vollrath scheint durch die Verhältnisse bei *Araneus diadematus* unterstützt zu werden.

So wurde durch die Analysen der Transkripte von *Araneus diadematus*^{20,128} gezeigt, dass diese Spinne zwei verschiedene Spidroine (ADF-3 und ADF-4)⁶ mit den charakteristischen Prolinmotiven vom Typ MASp2 benutzt. Ein Spidroin vom Typ MASp1 wurde über Sequenzhomologien identifiziert⁷³ (siehe auch den Vergleich der C-Termini Abbildung 13), aber es scheint aufgrund von Northern Analysen kaum exprimiert zu sein²⁰. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die *Araneus diadematus* eine hochkristalline Seide ohne dieses Spidroin herzustellen vermag. Rekombinantes ADF-3 scheint zumindest ausreichend dafür zu sein, eine Faser mit mechanischen Eigenschaften zu bilden, die denen der natürlichen Fasern vergleichbar sind. Diese artifiziellen Fasern zeigen durch Streckung verbesserte Materialeigenschaften und eine erhöhte Doppelbrechung, was eine kristalline Anordnung in β -Faltblättern anzeigt. Lazaris et al.⁴⁹ stellen denn auch die Frage, welchen Beitrag ein zweites Protein, sei es ADF-4 oder MASp1, zu den Eigenschaften der Spinnenseiden gibt.

Aber auch der Zusammenhang zwischen mechanischen Eigenschaften und den beiden Spidrintypen ist nicht vorschnell abzutun. Zunächst ist festzustellen, dass die gezeigten Faserquerschnitte der rekombinanten Fasern eine homogene Struktur aufweisen, wie sie bei den bisher untersuchten Spinnenseiden nicht zu beobachten sind. Dies ist ein guter Hinweis darauf, dass die bei der MAS gefundenen Strukturen in der Heterogenität des Materials begründet sind, wie dies in dieser Arbeit für die Seide von *Nephila clavipes* gezeigt wurde. Die künstlichen Fasern wurden auf Zugfestigkeit und Elastizität getestet, nicht jedoch auf ihre Eigenschaften bei Torsion oder

⁶. Die meisten Sequenzen wurden durch PCR mit Primern aus den bekannten Sequenzen von *N.clavipes* gefunden. Mit den Sequenzen von *A.diadematus* wurde nie nach entsprechenden Produkten in den anderen Spinnen gesucht, weshalb die tatsächliche Anzahl der Spidroine wie auch andere sekretierte Proteine nicht unbedingt erfasst wurden. In welchem Verhältnis diese exprimiert werden ist ebenfalls nie systematisch untersucht worden. Im Falle von *N.clavipes* geht man jedoch davon aus, dass MASp1 prädominant ist, was sich so auch durch die immunologischen Daten dargestellt hat.

Stauchung. Unter solchen Bedingungen kann der gezeigte Aufbau der MAS von Vorteil gegenüber einer homogenen Faser sein (siehe Kap. 4.2).

Die heterogene Verteilung von MASp2 in den Fäden ist eine Folge der Prozesse bei seiner Bildung und ist vielleicht hauptsächlich für diese relevant. Dies wurde bereits als mögliche zweite Rolle von MASp2 beleuchtet. Welche Auswirkungen aber hat die heterogene Verteilung von MASp2 auf die mechanischen Eigenschaften oder besser gesagt, sind die bereits diskutierten möglichen Auswirkungen nicht gegeben? Der Vergleich von *Araneus diadematus* und *Nephila* ist in diesem Sinne nicht durchführbar. Für die Seide von *Araneus diadematus* existieren keine vergleichbaren Daten zum strukturellen Aufbau und sie stellt auch im Bezug auf die beteiligten Spidroine zumindest nach dem heutigen Kenntnisstand einen Sonderfall dar. Die Materialeigenschaften der MAS der Arten der Gattung *Nephila* übertreffen die Eigenschaften derer von *Araneus* und somit bleibt abzuwarten, ob auch diese mit nur einem (beliebigen) Spidroin erreicht werden können. Die Beutespektren der in warmen Klimaten vorkommenden Gattung *Nephila* unterscheiden sich deutlich von denen der sehr viel kleineren Verwandten der gemäßigten Zonen. Möglicherweise hat der dadurch auf die mechanischen Eigenschaften der Seiden ausgeübte geringere Selektionsdruck es den kleineren Arten ermöglicht, mit schwächeren Seiden auszukommen. Die Konsequenz müsste sozusagen eine „Minimalseide“ sein, bei welcher der Material- und Energieaufwand zu ihrer Bildung auf das Nötige reduziert ist. Gleichzeitig gibt der geringere Selektionsdruck mehr Freiheiten, Veränderungen in das System zu integrieren. Dadurch mögen sich die Seiden grundsätzlich unterscheiden.

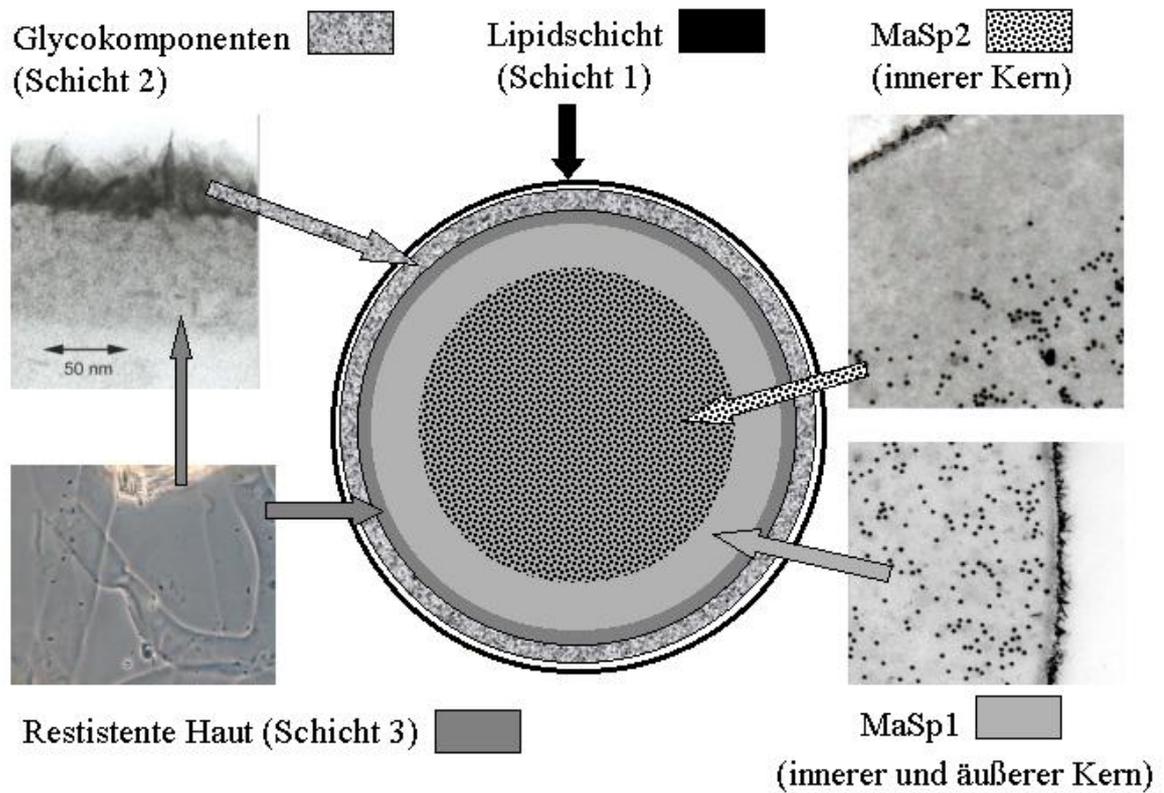


Abbildung 40: Modell zum schichtweisen Aufbau eines Fadens (MAS) der großen Ampullendrüse im Querschnitt. Der Faden der großen Ampullendrüse besteht aus 3 Hüllschichten und zwei Kernzonen, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Im inneren Kern wurden beide Spidroine nachgewiesen, während in der hochkristallinen, äußeren Kernzone kein Spidroin 2 vorkommt. Der Kern wird von einer stabilen (säureresistenten) Haut umgeben (Schicht 3), die vermutlich nicht aus den bekannten Spidroinen besteht. Darauf aufgelagert befinden sich 2 instabile Schichten. Schicht 2 besteht aus einer amorphen Substanz, die zwischen feine Fibrillen eingebettet ist. Das Material dieser Schicht ist glycosyliert. Nach außen wird der Faden durch eine Lipidschicht (Schicht 1) abgeschlossen, die u.a. als Träger für Pheromone dient.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den mikroskopischen Aufbau der Spinnenseide zu untersuchen und gefundene Strukturelemente zu charakterisieren. Da verschiedene Strukturelemente vermutlich unterschiedliche Eigenschaften tragen, die durch unterschiedliche Stofflichkeit vermittelt sein können, sollte ihre Konsistenz histochemisch untersucht werden. In diesem Zusammenhang war vor allem die Rolle der beiden bekannten Spidroine MASp1 und MASp2 von vorrangigem Interesse, weshalb ausgewählte Bereiche der beiden Gene kloniert, als Polypeptide exprimiert und affinitätsgereinigt zur Produktion polyklonaler Antiseren ihrer Reinigung und Charakterisierung verwendet wurden.

Beide Gene bestehen aus repetitiven Sequenzabschnitten und einem konservierten, C-terminalen Bereich. Da es derzeit nicht bekannt ist, ob die nicht repetitiven C-terminalen Anteile im Endprodukt enthalten sind oder ob und wo eine eventuelle Prozessierung stattfindet, wurden Antiseren gegen entsprechende rekombinante Polypeptide aus beiden Bereichen der beiden Gene hergestellt, um die Rolle der hochkonservierten C-Termini näher zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde das flüssige Spinngut der Drüsen und gelöste Seide biochemisch charakterisiert.

Charakterisierung der Antiseren

Trotz der auftretenden Kreuzreaktivitäten der Antiseren gelang es, durch Kreuzabsorption spezifische Antiseren zu gewinnen, die keine Kreuzreaktion zu den rekombinanten Polypeptiden mit der Sequenz des jeweils anderen Spidroins aufwiesen.

Das gereinigte Antiserum α -S1Rx reagierte mit gelöster Seide der großen (MAS) und der kleinen Ampullendrüse (MIS), während das gereinigte Antiserum α -S2Rx nur mit gelöster MAS reagierte. Die Antiseren gegen S1C und S2C reagierten ebenfalls mit beiden Seidentypen. Nach epitopspezifischer Reinigung und anschließender Kreuzreinigung der Antiseren (α -S1Cx und α -S2Cx) war eine Reaktion zur MIS, die auch beim Vergleich aller Drüsentypen beobachtet wurde, nicht mehr vorhanden.

Anhand der spezifischen Kreuzreaktionen der gegen die repetitiven Bereich gerichteten Antiseren α -S1Rx und α -S2Rx zu den Extrakten der anderen Drüsentypen ist erkennbar, dass sie gegen die glycinhaltigen Peptidsequenzmotive gerichtet sind, die im Falle von MASp1 als GXG-Motiv auch in MISp Sequenzen und im Falle von MASp2 als prolinhaltige Motive in den Sequenzen von Flag vorkommen.

Der C-Terminus

Die C-Termini der Spidroine aus den großen Ampullendrüsen von Radnetzspinnen sind hochkonserviert. Diese Konservierung manifestiert sich auf sowohl auf der Ebene der Sequenzen der RNA als auch der DNA. Trotz der Kenntnisse über die Sequenzen der Nukleinsäuren wurden bislang keine entsprechenden Peptide in der Seide oder dem flüssigen Spinnut identifiziert. Mithilfe der Antiseren, die gegen rekombinante Polypeptide mit den C-terminalen Sequenzen von MASp1 und MASp2 erzeugt wurden, konnte gezeigt werden, dass die C-Termini ein Bestandteil der hochmolekularen Fraktionen sowohl des Spinnutts als auch der gesponnenen Seide sind. Dies zeigt, dass sie weder bei der Fadenbildung noch bei der Sekretion der Spidroine abgespalten werden. Sowohl die rekombinanten Polypeptide H₆-S1C und H₆-S2C als auch der Drüseninhalt zeigten unter reduzierenden Bedingungen ein vermindertes Molekulargewicht gegenüber nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE, was die Formation von Disulfidbrücken anzeigt und nahe legt, dass die C-terminalen Domänen daran beteiligt sind. Dies wird auch durch die theoretischen Analysen der Sequenzen unterstützt. Durch die wechselnde Abfolge hydrophiler und hydrophober Bereiche bei Zusammenlagerung zweier C-terminaler Domänen ist die räumliche Nähe der Cysteine wahrscheinlich. Durch phylogenetische Analysen der mittlerweile zahlreichen Sequenzen verschiedener Spidroine wird in dieser Arbeit gezeigt, dass besonders die Nachbarschaft des Cysteinmotivs hochkonserviert ist und Sequenzhomologien nicht nur zu den Spidroiden von weitläufig verwandten Arten bestehen, sondern auch zu den Spidroiden der kleinen Ampullendrüse. Dagegen scheint die Etablierung eines Cysteins eine spezifische Entwicklung der Araneoidea und nahe verwandter Gruppen zu sein, die den Radnetzspinnen einen evolutionären Vorteil verliehen hat, welcher zur Konservierung dieser neuen Sequenz ebenfalls über einen langen Zeitraum geführt hat.

Experimente zur Natur des Drüseninhalts

Die Extrakte der großen Ampullendrüse enthalten nicht nur hochmolekulare Produkte sondern auch niedermolekulare Bestandteile, die mit den Antiseren reagieren. Mithilfe der Antiseren α -S1C und α -S2C konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Spidroidenfragmenten nicht um Produkte aus translationalen Pausen handelt, die in der Literatur beschrieben wurden.

Die Untersuchung verschiedener Gewebereiche der Drüsen und der Ampulleninhalte mit den Antiseren zeigen, dass vor allem in den Geweben niedermolekulare C-terminale Fragmente vorkommen, die aus einer N-terminalen Degradation stammen müssen. Zusammen mit der beobachteten Instabilität der Drüsenextrakte und der Stabilisierung der Extrakte von

Ampulleninhalten durch Proteaseinhibitoren lässt sich auf eine vermutlich durch Proteasen vermittelte degradierende Wirkung aus dem Gewebe schließen.

Die intrazellulären Degradationsprodukte könnten beispielsweise beim Abbau fehlgefalteter Produkte entstehen oder auf die Resorption und Rezyklierung sich degradierender Spidroine aus dem Lumen hinweisen, die im Ampulleninhalt nachweisbar sind.

Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur weisen die Inhalte der Ampulle mehrere hochmolekulare Banden im Bereich von 220-270 kDa in der diskontinuierlichen SDS-PAGE auf. In manchen Elektrophoresen konnten bis zu acht z.T. dicht nebeneinander laufende Banden aufgelöst werden. Da sich die Molekulargewichte der gelösten Seide (in HFIP) und des Ampulleninhalts in demselben Bereich bewegen und sich aus mehreren Banden zusammensetzen, scheint das so vorliegende Spinngut der Ampulle ohne größere Veränderung der Molekulargewichte der Spidroine zum festen Faden versponnen zu werden. Die durch die beiden spidroinspezifischen Antiseren gegen die repetitiven Bereiche angefärbten Bandenmuster unterscheiden sich sowohl in den niedermolekularen als auch in den hochmolekularen Bereichen.

Für die Vielzahl der hochmolekularen Banden beider Spidroine wurden zwei mögliche Ursachen gefunden. Durch Untersuchungen des Ampulleninhalts mit Lektinen wurden einerseits komplexe Glycosylierungsmuster nachgewiesen, andererseits gibt es durch N-terminale Mikrosequenzierung der Banden Hinweise darauf, dass die hochmolekularen Banden das repetitive Sequenzmotiv SQGAGRGLG tragen und somit prozessiert sein könnten. Da durch die Lektine eine Serin-O-Glycosylierung angezeigt wird, ist es denkbar, dass tatsächlich in den meisten Banden kein unikärer N-Terminus vorhanden ist, sondern diese bis zur Glycosylierungsstelle abgebaut werden.

Strukturelle Untersuchungen des Fadens

Spinnenseide zeichnet sich durch ungewöhnliche Materialeigenschaften wie beispielsweise extremer Zugfestigkeit und hoher Elastizität aus. Diese besonderen Eigenschaften werden nicht allein durch ihre Bestandteile bestimmt, sondern hängen wesentlich von der strukturellen Organisation desselben ab. Eine hierarchische Organisation wird nicht nur auf molekularer Ebene, sondern auch auf höherer, mikroskopischer Ebene diskutiert.

Mithilfe von mikroskopischen Techniken wurde der Faden auf solche Strukturelemente hin untersucht. Durch die Untersuchung der Einflüsse verschiedener Lösemittel, Chaotropica und Säuren sollte eine partielle Auflösung der kompakten Fadenstruktur die unterschiedlichen Strukturelemente freilegen und dem mikroskopischen Nachweis zugänglich machen.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen tritt zutage, dass die MAS der Spinne *Nephila clavipes* sehr komplex organisiert ist. Neben einer Kernzone besitzt sie eine aus mehreren Schichten bestehende Hülle, die dem Faden nicht nur Schutz vor Umwelteinflüssen bietet, sondern ihm auch Stabilität verleiht. Bemerkenswert ist die hohe Resistenz einer dieser Hüllschichten gegen Laugen, Säuren und chaotrope Agenzien, von denen das Kernmaterial vollständig gelöst und zersetzt wird. Die Untersuchungen zeigten auch, dass die Seide der kleinen Ampullendrüsen im Vergleich zur MAS weitaus stabiler gegen solche Einflüsse ist.

Anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von mit Lösemitteln behandelte und nativer Seide sind insgesamt drei Hüllschichten erkennbar, von denen die beiden äußeren Schichten instabil sind. Daraus lässt sich die säureresistente Schicht der dritten, inneren Schicht zuordnen.

Für das Kernmaterial der MAS wurden Hinweise auf eine fibrilläre Organisation gefunden. Ihr Zustandekommen und die daraus resultierende mögliche Bedeutung für die Fadeneigenschaften wird im Zusammenhang mit der histochemisch detektierten Verteilung der Spidroine diskutiert.

Histochemische Charakterisierung

Als Hauptbestandteile des Hauptfadens der Sicherungsleine der Radnetzspinne *Nephila clavipes* werden die zwei Proteine MASp1 und MASp2 angesehen, deren bekannte Sequenzen im wesentlichen aus repetitiven Einheiten bestehen. Obwohl beide Spidroingene in den meisten Spinnen nachgewiesen worden sind und ihre Produkte als Bestandteile der Seide bestätigt sind, gibt es bisher nur Vermutungen darüber, warum die MAS aus 2 Spidroiden gebildet wird und welchen Beitrag jedes einzelne Spidroid zu den Eigenschaften der Seide beisteuert.

Mit den spidroinspezifischen Antiseren, die gegen repetitive Sequenzabschnitte der beiden Spidroine erzeugt und gereinigt wurden, ist die säureresistente Hüllschicht und die Verteilung der beiden Spidroine im Faden histochemisch untersucht worden. Die Hüllschicht reagierte nicht mit diesen Antiseren, wohl aber mit Antiseren gegen gescherte Seide, woraus anzunehmen ist, dass MASp1 oder MASp2 in ihr nicht enthalten ist.

Während die entsprechenden Epitope von MASp1 gleichmäßig im Fadeninneren verteilt vorkommen, wurden die von MASp2 im Zentrum der Fäden gefunden. Die MASp2-spezifische Markierung, die im Vergleich zur MASp1-spezifischen Markierung ebenso wie in allen anderen Experimenten deutlich schwächer ist, trat vorzugsweise an elektronendichtem Material in kleinen Gruppen auf. In einer peripheren Zone von mindestens 400 nm konnte keine MASp2-spezifische Markierung beobachtet werden. Diese heterogene Verteilung von MASp2 konnte nicht im flüssigen Spinnut in den Vorratsampullen der Drüsen oder im Lumen des Dukts beobachtet werden,

weshalb diese Separation kurz vor dem Austritt aus den Spinndüsen erfolgen muss und höchstwahrscheinlich während der Konversion der flüssigen Phase in den festen Zustand erfolgt.

Modell für den Aufbau der MAS

Aus den strukturellen und histochemischen Daten wurde ein Modell für den Aufbau der MAS entworfen, das eine generelle Unterteilung in Kern und Mantel vornimmt, die wiederum in unterschiedliche Schichten gegliedert sind.

Demnach besteht der Mantel aus drei Schichten. Bei der äußersten sehr dünnen und labilen Schicht dürfte es sich um eine Lipidschicht handeln. Die zweite Schicht besteht aus einer amorphen Substanz, die in ein Netz feinsten Fibrillen eingebettet ist und aus Glycokomponenten besteht. Die dritte Schicht ist sehr resistent gegen Säuren, Laugen und Chaotropica und umschließt fest das Fadeninnere. Sie besteht nicht aus MASp2 oder MASp1.

Der Kern besteht aus zwei Schichten. Im Zentrum sind beide Spidroine vertreten, während in der peripheren Schicht kein MASp2 vorkommt. Für die periphere Schicht ist ein höherer Grad an Kristallinität beschrieben worden, woraus sich für die Funktion Spidroin2 vermuten lässt, dass es als eine Störgröße für die Bildung kristalliner Bereiche regulierend fungieren könnte. Die Gruppierung der MASp2-spezifischen Markierung in kleinen Inseln deutet darauf, dass dieses Spidroin auf in der inneren Kernzone nicht homogen verteilt ist. Solche Inseln könnten in der Seide als Störgröße wirken und bei Zug nicht nur während der Fadenbildung zur Formation von Fibrillen führen.

6 Literatur

- 1.) Vollrath, F. and Knight, D. P. Liquid Crystalline Spinning of Spider Silk. *Nature* **410**:(6828)541-8; (2001)
- 2.) Nagaraju, J. Recent Advances in Molecular Genetics of the Silk Moth, Bombyx Mori. *Current Science* **78**:(2)151-161; (2000)
- 3.) Tanaka, K., Kajiyama, N., Ishikura, K., Waga, S., Kikuchi, A., Ohtomo, K., Takagi, T., and Mizuno, S. Determination of the Site of Disulfide Linkage Between Heavy and Light Chains of Silk Fibroin Produced by Bombyx Mori. *Biochim.Biophys.Acta-Protein Struct.Molec.Enzym.* **1432**:(1)92-103; (1999)
- 4.) Wheeler, W. C. and Cartwright, P. Hayashi C. Y. Arthropod Phylogeny: a Combined Approach. *Cladistics* **9**:1-93; (1991)
- 5.) „100 Years Ago". *Nature* **310**(26-11-1998)
- 6.) Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F., and Conrad, U. Production of Spider Silk Proteins in Tobacco and Potato. *Nat.Biotechnol.* **19**:(6)573-577; (2001)
- 7.) Van Dijk et al. Structure Characterisation of the Central Repetive Domain of High Molecular Weight Gluten Proteins, I: Model Studies Using Cyclic and Linear Peptides. *Protein Sci.* **6**:637-648; (1997)
- 8.) Van Dijk et al. Structure Characterisation of the Central Repetive Domain of High Molecular Weight Gluten Proteins, II: Characterization in Solution and in the Dry State. *Protein Sci.* **6**:649-656; (1997)
- 9.) Coyne, K. J., Qin, X. X., and Waite, J. H. Extensible Collagen in Mussel Byssus: a Natural Block Copolymer [See Comments]. *Science* **277**:(5333)1830-1832; (1997)
- 10.) Craig, C. L. Evolution of Arthropod Silks. *Annual Review of Entomology* **42**:231-267.; (1997)
- 11.) Sugihara, A., Sugiura, K., Morita, H., Ninagawa, T., Tubouchi, K., Tobe, R., Izumiya, M., Horio, T., Abraham, N. G., and Ikehara, S. Promotive Effects of a Silk Film on Epidermal Recovery From Full-Thickness Skin Wounds. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **225**:(1)58-64; (2000)
- 12.) Higuchi, A., Yoshida, M., Ohno, T., Asakura, T., and Hara, M. Production of Interferon-Beta in a Culture of Fibroblast Cells on Some Polymeric Films. *Cytotechnology* **34**:(1-2)165-173; (2000)
- 13.) Inouye, K., Kurokawa, M., Nishikawa, S., and Tsukada, M. Use of Bombyx Mori Silk Fibroin As a Substratum for Cultivation of Animal Cells. *J.Biochem.Biophys.Methods* **37**:(3)159-164; (1998)
- 14.) Apstein, C. Bau Und Funktion Der Spinndrüsen Der Araneida. *Arch.f.Naturgesch.* **55**:29-74; (1889)
- 15.) Wilson, R. S. The Structure of the Dragline Control Valves in the Garden Spider. *Quart.J.Micr.Sci.* **103**:549(1962)
- 16.) Wilson, R. S. The Control of Dragline Spinning in the Garden Spider. *Quart.J.Micr.Sci.* **104**:(4)557-571; (1962)
- 17.) Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S., and Savage, K. N. The Mechanical Design of Spider Silks: From Fibroin Sequence to Mechanical Function. *Journal of Experimental Biology* **202**:(23)3295-3303; (1999)
- 18.) Decae, A. E. A Theory on the Origin of Spiders and the Primitive Function of Spider Silk. *J.Arachnol.* **12**:21-28; (1984)
- 19.) Hinman, M. B., Jones, J. A., and Lewis, R. V. Synthetic Spider Silk: a Modular Fiber. *Trends Biotechnol.* **18**:(9)374-379; (2000)

- 20.) Guerette, P. A., Ginzinger, D. G., Weber, B. H., and Gosline, J. M. Silk Properties Determined by Gland-Specific Expression of a Spider Fibroin Gene Family. *Science* **272**:(5258)112-115; (1996)
- 21.) Xu, M. and Lewis, R. V. Structure of a Protein Superfiber: Spider Dragline Silk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:(18)7120-7124; (1990)
- 22.) Beckwitt, R., Arcidiacono, S., and Stote, R. Evolution of Repetitive Proteins: Spider Silks From *Nephila Clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus Bicentenarius* (Araneidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**:(3)121-130; (1998)
- 23.) Schulz, S. Neuartige Lipide Aus Spinnen Und Insekten. *Bioforum* **7-8**:294-296; (1996)
- 24.) Augsten, K., Weisshart, K., Sponner, A., and Unger, E. Glycoproteins and Skin-Core Structure in *Nephila Clavipes* Spider Silk Observed by Light- and Electron Microscopy. *Scanning* **21**:(2)77-77; (1999)
- 25.) Michal, C. A., Simmons, A. H., Chew, B. G., Zax, D. B., and Jelinski, L. W. Presence of Phosphorus in *Nephila Clavipes* Dragline Silk. *Biophysical Journal* **70**:(1)489-493; (1996)
- 26.) Thiel, B. L., Kunkel, D. D., and Viney, C. Physical and Chemical Microstructure of Spider Dragline:
A Study by Analytical Transmission Electron Microscopy. *Biopolymers* **34**:1089-1097; (1994)
- 27.) Knight, D. P. and Vollrath, F. Changes in Element Composition Along the Spinning Duct in a *Nephila* Spider. *Naturwissenschaften* **88**:(4)179-82; (2001)
- 28.) Fischer E. *Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.* **53**:126(1907)
- 29.) Braunitzer, G. and Wolff, D. Vergleichende Chemische Untersuchungen Über Die Fibroine Von *Bombyx Mori* Und *Nephila Madagascariensis*. *Z.Naturforschg.* **10b**:404-408; (1955)
- 30.) Lucas, F., Shaw, J. T. B., and mith, S. G. *Shirley Institute Memoirs* **XXVIII**, 77:(1955)
- 31.) Prashad, B., Saund, A. K., and Mathur, N. K. Amino Acid Composition of Spider Silk. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **9**:(4)351-352; (1972)
- 32.) Lombardi, Stephen J. and Kaplan, D. The Amino Acid Composition of Mjor Ampullate Gland Silk (Dragline) of *Nephila Clavipes* (Araneae, Tetragnathidae). *J.Arachnol.* **18**:297-306; (1990)
- 33.) Casem, M. L., Turner, D., and Houchin, K. Protein and Amino Acid Composition of Silks From the Cob Weaver, *Latrodectus Hesperus* (Black Widow). *International Journal of Biological Macromolecules* **24**:(2-3)103-108; (1999)
- 34.) Craig, C. L., Riekel, C., Herberstein, M. E., Weber, R. S., Kaplan, D., and Pierce, N. E. Evidence for Diet Effects on the Composition of Silk Proteins Produced by Spiders. *Molecular Biology and Evolution* **17**:(12)1904-13; (2000)
- 35.) Candelas, G. and Cintrón, I. A Spider Fibroin and Its Synthesis. *Journal of Experimental Zoology* **216**:1-6; (1981)
- 36.) Mello, C. M., Senecal, K., Yeung, R., Vouros, P., and Kaplan, D. Initial Characterisation of *Nephila Clavipes* Dragline Protein.(6)67-79; (1993)
- 37.) Jackson, C. and O'Brien, J. P. Molecular Weight Distribution of *Nephila Clavipes* Dragline Silk. *Macromolecules* **28**:5975-5977; (1995)
- 38.) Hinman, M. B. and Lewis, R. V. Isolation of a Clone Encoding a Second Dragline Silk Fibroin. *Nephila Clavipes* Dragline Silk Is a Two-Protein Fiber. *Journal of Biological Chemistry* **267**:(27)19320-19324; (1992)
- 39.) Hayashi, C. Y., Shipley, N. H., and Lewis, R. V. Hypotheses That Correlate the Sequence, Structure, and Mechanical Properties of Spider Silk Proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* **24**:(2-3)271-275; (1999)

-
- 40.) Colgin, M. A. and Lewis, R. V. Spider Minor Ampullate Silk Proteins Contain New Repetitive Sequences and Highly Conserved Non-Silk-Like "Spacer Regions". *PROTEIN SCIENCE* **7**:(3)667-672; (1998)
 - 41.) Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V. Evidence From Flagelliform Silk CDNA for the Structural Basis of Elasticity and Modular Nature of Spider Silks. *Journal of Molecular Biology* **275**:(5)773-784; (1998)
 - 42.) Work, R. W. and Young, C. T. The Amino Acid Compositions of Major and Minor Ampullate Silks of Certain Orb-Web-Building Spiders (Araneae, Araneidae). *J.Arachnol.* **15**:65-80; (1987)
 - 43.) Mello, C. M., Arcidiacono, S., Beckwitt, R., Prince, J. T., Senecal, K., and Kaplan, D. Nephila Clavipes Dragline Silk: Approaches to a Recombinantly Produced Silk Protein. *Mat.Res.Soc.Symp.Proc.* **330**:37-42; (1994)
 - 44.) Fahnestock, S. R. and Irwin, S. L. Synthetic Spider Dragline Silk Proteins and Their Production in Escherichia Coli. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**:(1)23-32; (1997)
 - 45.) Beckwitt, R. and Arcidiacono, S. Sequence Conservation in the C-Terminal Region of Spider Silk Proteins (Spidroin) From Nephila Clavipes (Tetragnathidae) and Araneus Bicentarius (Araneidae). *Journal of Biological Chemistry* **269**:(9)6661-6663; (1994)
 - 46.) Luciano, E. and Candelas, G. C. An Alanine TRNA Gene Cluster From Nephila Clavipes. *Gene* **171**:(2)301-302; (1-6-1996)
 - 47.) Lewis, R. V. and Colgin, M. Minor ampullate spider silk proteins. Patent, USA. No. 5756677, A61K 038/17, C07k 014/435, 530/353; (1998)
 - 48.) Fahnestock, S. R., Yao, Z., and Bedzyk, L. A. Microbial Production of Spider Silk Proteins. *Reviews in Molecular Biotechnology* **74**:105-119; (2000)
 - 49.) Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J. F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E. A., Soares, J. W., and Karatzas, C. N. Spider Silk Fibers Spun From Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells. *Science* **295**:(5554)472-6; (2002)
 - 50.) Warwicker, J. O. Comparative Studies of Fibroins II. The Crystal Structures of Various Fibroins. *J.Mol.Biol.* **2**:350-362; (1960)
 - 51.) Gosline, J. M., DeMont, E. M., and Denny, M. W. *Endeavour* **10**:37(1986)
 - 52.) Thiel, B. L., Guess, K. B., and Viney, C. Non-Periodic Lattice Crystals in the Hierarchical Microstructure of Spider (Major Ampullate) Silk. *Biopolymers* **41**:(7)703-719; (1997)
 - 53.) Gosline, J. M., Denny, M. W., and DeMont, E. M. Spider Silk As Rubber. *Nature* **309**:551-552; (1984)
 - 54.) Termonia, Y. Molecular Modeling of Spider Silk Elasticity. *Macromolecules* **27**:7378-7381; (1994)
 - 55.) Thiel, B. L., Kunkel, D. D., and Viney, C. Physical and Chemical Microstructure of Spider Dragline: A Study by Analytical Transmission Electron Microscopy. *Biopolymers* **34**:1089-1097; (1994)
 - 56.) Simmons, A. H., Michal, C. A., and Jelinski, L. W. Molecular Orientation and Two-Component Nature of the Crystalline Fraction of Spider Dragline Silk [See Comments]. *Science* **271**:(5245)84-87; (1996)
 - 57.) Jelinski, L. W., Blye, A., Liivak, O., Michal, C., LaVerde, G., Seidel, A., Shah, N., and Yang, Z. T. Orientation, Structure, Wet-Spinning, and Molecular Basis for Supercontraction of Spider Dragline Silk. *International Journal of Biological Macromolecules* **24**:(2-3)197-201; (1999)
 - 58.) Michal, C. A. and Jelinski, L. W. Rotational-Echo Double-Resonance in Complex Biopolymers: a Study of Nephila Clavipes Dragline Silk. *JOURNAL OF BIOMOLECULAR.NMR.* **12**:(2)231-241; (1998)
-

-
- 59.) Kümmerlen, J., van Beek, J. D., Vollrath, F., and Meier, B. H. Local Structure in Spider Dragline Silk Investigated by Two-Dimensional Spin-Diffusion Nuclear Magnetic Resonance. *Macromolecules* **29**:2920-2928; (1996)
 - 60.) Hijirida, D. H., Do, K. G., Michal, C., Wong, S., Zax, D., and Jelinski, L. W. ¹³C NMR of Nephila Clavipes Major Ampullate Silk Gland. *Biophysical Journal* **71**:(6)3442-3447; (1996)
 - 61.) Li, S. F., McGhie, A. J., and Tang, S. L. New Internal Structure of Spider Dragline Silk Revealed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **66**:(4)1209-1212; (1994)
 - 62.) Vollrath, F., Holtet, T., Thogersen, H. C., and Frische, S. Structural Organization of Spider Silk. *The Royal Society London* **263**:147-151; (1996)
 - 63.) Shao, Z. Z., Hu, X. W., Frische, S., and Vollrath, F. Heterogeneous Morphology of Nephila Edulis Spider Silk and Its Significance for Mechanical Properties. *POLYMER* **40**:(16)4709-4711; (1999)
 - 64.) Li, S. F., McGhie, A. J., and Tang, S. L. Comparative Study of the Internal Structure of Kevlar and Spider Silk by Atomic Force Microscopy. *J.Vac.Sci.Technol.A* **12**:(4)1891-1894; (1994)
 - 65.) Miller, L. D., Putthanarat, S., Eby, R. K., and Adams, W. W. Investigation of the Nanofibrillar Morphology in Silk Fibers by Small Angle X-Ray Scattering and Atomic Force Microscopy. *Int J Biol Macromol* **24**:(2-3)159-165; (1999)
 - 66.) Gould, S. A. C., Tran, K. T., Spagna, J. C., Moore, A. M. F., and Shulman, J. B. 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* **24**:(2-3)151-157; (1999)
 - 67.) Oroudjev, E., Soares, J., Arcidiacono, S., Thompson, J. B., Fossey, S. A., and Hansma, H. G. Segmented Nanofibers of Spider Dragline Silk: Atomic Force Microscopy and Single-Molecule Force Spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **16**:16(2002)
 - 68.) Mahoney, D. V., Vezie, D. L., Eby, R. K., Adams, W. W., and Kaplan, D. Aspects of the Morphology of Dragline Silk of Nephila Clavipes. 196-210; (1994)
 - 69.) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During Th Assembly of the Head of Bacteriophage Tλ. *Nature* **227**:680-685; (1970)
 - 70.) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamid Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**:4350-4354; (1979)
 - 71.) Current Protocols in Molecular Biology.(1989)
 - 72.) Beckwitt, R., Arcidiacono, S., and Stote, R. Evolution of Repetitive Proteins: Spider Silks From Nephila Clavipes (Tetragnathidae) and Araneus Bicentenarius (Araneidae). **28**:(3)121-130; (1998)
 - 73.) Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J., and Lewis, R. Extreme Diversity, Conservation, and Convergence of Spider Silk Fibroin Sequences. *Science* **291**:(5513)2603-5; (2001)
 - 74.) Beckwitt, R. and Arcidiacono, S. Sequence Conservation in the C-Terminal Region of Spider Silk Proteins (Spidroin) From Nephila Clavipes (Tetragnathidae) and Araneus Bicentenarius (Araneidae). *Journal of Biological Chemistry* **269**:(9)6661-6663; (1994)
 - 75.) Hinman, M. B. and Lewis, R. V. Isolation of a Clone Encoding a Second Dragline Silk Fibroin. Nephila Clavipes Dragline Silk Is a Two-Protein Fiber. *Journal of Biological Chemistry* **267**:(27)19320-19324; (1992)
 - 76.) Colgin, M. A. and Lewis, R. V. Spider Minor Ampullate Silk Proteins Contain New Repetitive Sequences and Highly Conserved Non-Silk-Like "Spacer Regions". **7**:(3)667-672; (1998)
 - 77.) Romeis. Mikroskopische Technik. **17nd, S.:**-697pp; (1989)
-

- 78.) Vollrath, F., Holtet, T., Thogersen, H. C., and Frische, S. Structural Organization of Spider Silk. *The Royal Society London* **263**:147-151; (1996)
- 79.) Reynolds, E. S. The Use of Lead Citrate at High PH As an Electron-Opaque Stain in Electron Microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**:208-212; (1963)
- 80.) Coddington, J. and Levi, H. Systematics and Evolution of Spiders. *Annu.Rev.Ecol.Sys.* **22**:565(1991)
- 81.) Dayhoff, M. O. A Model of Evolutionary Change in Proteins. Matrices for Detecting Instant Relationships.345-358; (1978)
- 82.) Mello, CM, Senecal, K., Yeung, B., Vourus, P., and Kaplan, D. Initial Characterization of Nephila Clavipes Dragline Protein. *ACS Symp.Ser.* **544**:67-79; (1994)
- 83.) Candelas, G., Candelas, T., Ortiz, A., and Rodriguez, O. Translational Pauses During a Spider Fibroin Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **116**:(3)1033-1038; (1983)
- 84.) Vollrath, F. and Knight, D. P. Structure and Function of the Silk Production Pathway in the Spider Nephila Edulis. *International Journal of Biological Macromolecules* **24**:(2-3)243-249; (1999)
- 85.) Bell, A. L. and Peakall, D. B. Changes in Fine Structure During Silk Protein Production in the Ampullate Gland of the Spider Araneus Sericatus. *Journal of Cell Biology* **42**:(1)284-295; (1969)
- 86.) Mello, C. M., Senecal, K., Yeung, R., Vouros, P., and Kaplan, D. Initial Characterisation of Nephila Clavipes Dragline Protein.(6)67-79; (1993)
- 87.) Kovoov, J. and Zylberberg, L. [Morphology and Ultrastructure of the Ampullate Gland Duct in Araenus Diadematus Clerck (Arachnida, Araneidae)]. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.* **128**:(2)188-211; (1972)
- 88.) Vollrath, F., Knight, D. P., and Hu, X. W. Silk Production in a Spider Involves Acid Bath Treatment. *PROCEEDINGS.OF THE ROYAL.SOCIETY.OF LONDON.SERIES.B.BIOLOGICAL.SCIENCES.* **265**:(1398)817-820; (7-5-1998)
- 89.) Knight, D. P. and Vollrath, F. Changes in Element Composition Along the Spinning Duct in a Nephila Spider. *Naturwissenschaften* **88**:(4)179-82; (2001)
- 90.) Hayashi, C. Y. and Lewis, R. V. Evidence From Flagelliform Silk CDNA for the Structural Basis of Elasticity and Modular Nature of Spider Silks. *Journal of Molecular Biology* **275**:(5)773-784; (1998)
- 91.) Eskov K.. A New Fossil Spider Family From the Jurassic of Transbaikalia (Araneae: Chelicerata). *N.Jb.Geol.Paläont.Abh.* **11**: 645(1984)
- 92.) Xu, M. and Lewis, R. V. Structure of a Protein Superfiber: Spider Dragline Silk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:(18)7120-7124; (1990)
- 93.) Mello, C. M., Arcidiacono, S., Beckwitt, R., Prince, J. T., Senecal, K., and Kaplan, D. Nephila Clavipes Dragline Silk: Approaches to a Recombinantly Produced Silk Protein. *Mat.Res.Soc.Symp.Proc.* **330**:37-42; (1994)
- 94.) Candelas, G. and Cintrón, I. A Spider Fibroin and Its Synthesis. *Journal of Experimental Zoology* **216**:1-6; (1981)
- 95.) Chinali, A., Sponner, A., Grosse, F., and Guehrs, K.-H. Major Ampullate Spidroin 1 (MASp1) Polymorphism in Nephila Clavipes. Possible Implications in the Control of Spider Silk Properties. *in Preparation*
- 96.) Gould, S. A. C., Tran, K. T., Spagna, J. C., Moore, A. M. F., and Shulman, J. B. 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* **24**:(2-3)151-157; (1999)

-
- 97.) Mahoney, D. V., Vezie, D. L., Eby, R. K., Adams, W. W., and Kaplan, D. Aspects of the Morphology of Dragline Silk of *Nephila Clavipes*. 196-210; (1994)
 - 98.) Miller, L. D., Putthanarat, S., Eby, R. K., and Adams, W. W. Investigation of the Nanofibrillar Morphology in Silk Fibers by Small Angle X-Ray Scattering and Atomic Force Microscopy. *Int J Biol Macromol* **24**:(2-3)159-165; (1999)
 - 99.) Putthanarat, S., Stribeck, N., Fossey, S. A., Eby, R. K., and Adams, W. W. Investigation of the Nanofibrils of Silk Fibers. *POLYMER* **41**:(21)7735-7747; (2000)
 - 100.) Li, S. F., McGhie, A. J., and Tang, S. L. New Internal Structure of Spider Dragline Silk Revealed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **66**:(4)1209-1212; (1994)
 - 101.) Shen, Y., Johnson, M. A., and Martin, D. C. Microstructural Characterization of Bombyx Mori Silk Fibers. *Macromolecules* **31**:(25)8857-8864; (1998)
 - 102.) Mahoney, D. V., Vezie, D. L., Eby, R. K., Adams, W. W., and Kaplan, D. Aspects of the Morphology of Dragline Silk of *Nephila Clavipes*. 196-210; (1997)
 - 103.) Donald, A. M. and Windle, A. H. Liquid Crystalline Polymers. (1992)
 - 104.) Vollrath, F. and Knight, D. P. Liquid Crystalline Spinning of Spider Silk. *Nature* **410**:(6828)541-8; (2001)
 - 105.) Shao, Z., Hu, X. W., Frische, S., and Vollrath, F. Heterogeneous Morphology of *Nephila Edulis* Spider Silk and Its Significance for Mechanical Properties. *POLYMER* **40**:(16)4709-4711; (1999)
 - 106.) Augsten, K., Weisshart, K., Sponner, A., and Unger, E. Glycoproteins and Skin-Core Structure in *Nephila Clavipes* Spider Silk Observed by Light- and Electron Microscopy. *Scanning* **21**:(2)77-77; (1999)
 - 107.) Kovoor, J. L'Appareil Séricigène Dans Les Genres *Nephila* Leach Et *Nephilengys* Koch: Anatomie Microscopique, Histochemie, Affinités Avec D'Autres Araneidae. *Revue Arachnologique* **7**:(1)15-34; (1986)
 - 108.) Schulz, S. Neuartige Lipide Aus Spinnen Und Insekten. *Bioforum* **7-8**:294-296; (1996)
 - 109.) Schulz, S. Composition of the Silk Lipids of the Spider *Nephila Clavipes*. *Lipids* **36**:(6)637-47; (2001)
 - 110.) Schulz, S. and Toft, S. Identifikation of a Sex Pheromone From a Spider. *Science* **260**:1635-1637; (1993)
 - 111.) Bendayan, M. Colloidal Gold Post-Embedding Immunocytochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* **29**:(4)(1995)
 - 112.) Knight, D. and Vollrath, F. Hexagonal Columnar Liquid Crystal in the Cells Secreting Spider Silk. *Tissue Cell* **31**:(6)617-620; (1999)
 - 113.) Bell, A. L. and Peakall, D. B. Changes in Fine Structure During Silk Protein Production in the Ampullate Gland of the Spider *Araneus Sericatus*. *Journal of Cell Biology* **42**:(1)284-295; (1969)
 - 114.) Tillinghast, E. K., Chase, S. F., and Townley, M. A. Water Extraction by the Major Ampullate Duct During Silk Formation in the Spider *Agriope Aurantia* Lucas. *J. Insect Physiol.* **30**:(7)591-596; (1984)
 - 115.) Kovoor, J. and Zylberberg, L. [Morphology and Ultrastructure of the Ampullate Gland Duct in *Araenus Diadematus* Clerck (Arachnida, Araneidae)]. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **128**:(2)188-211; (1972)
 - 116.) Vollrath, F., Knight, D. P., and Hu, X. W. Silk Production in a Spider Involves Acid Bath Treatment. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**:(1398)817-820; (7-5-1998)
 - 117.) Knight, D. P., Knight, M. M., and Vollrath, F. Beta Transition and Stress-Induced Phase Separation in the Spinning of Spider Dragline Silk. *International Journal of Biological Macromolecules* **27**:(3)205-10; (2000)
-

- 118.) Jelinski, L. W. Establishing the Relationship Between Structure and Mechanical Function in Silks. *CURRENT.OPINION.IN SOLID.STATE.AND.MATERIALS.SCIENCE* **3**:(3)237-245; (1998)
- 119.) Chen, X., Knight, D. P., and Vollrath, F. Rheological Characterization of Nephila Spidroin Solution. *Biomacromolecules* **3**:(4)644-8; (2002)
- 120.) Madsen, B., Shao, Z. Z., and Vollrath, F. Variability in the Mechanical Properties of Spider Silks on Three Levels: Interspecific, Intraspecific and Intraindividual. *International Journal of Biological Macromolecules* **24**:(2-3)301-306; (1999)
- 121.) Shao, Z. and Vollrath, F. Materials: Surprising Strength of Silkworm Silk. *Nature* **418**:(6899)741.(2002)
- 122.) Vollrath, F., Madsen, B., and Shao, Z. The Effect of Spinning Conditions on the Mechanics of a Spider's Dragline Silk. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **268**:(1483)2339-46; (2001)
- 123.) Vollrath, F. Biology of Spider Silk. *International Journal of Biological Macromolecules* **24**:(2-3)81-88; (1999)
- 124.) Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J., and Lewis, R. Extreme Diversity, Conservation, and Convergence of Spider Silk Fibroin Sequences. *Science* **291**:(5513)2603-5; (2001)
- 125.) Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S., and Savage, K. N. The Mechanical Design of Spider Silks: From Fibroin Sequence to Mechanical Function. *Journal of Experimental Biology* **202**:(23)3295-3303; (1999)
- 126.) Hayashi, C. Y., Shipley, N. H., and Lewis, R. V. Hypotheses That Correlate the Sequence, Structure, and Mechanical Properties of Spider Silk Proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* **24**:(2-3)271-275; (1999)
- 127.) Hayashi, C. Y. Evolution of Spider Silk Proteins: Insight From Phylogenetic Analyses. *Exs* **92**:209-23; (2002)
- 128.) Beckwitt, R., Arcidiacono, S., and Stote, R. Evolution of Repetitive Proteins: Spider Silks From Nephila Clavipes (Tetragnathidae) and Araneus Bicentenarius (Araneidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**:(3)121-130; (1998)

7 Anhang

7.1 ABKÜRZUNGSLISTE

α -S1C	Antiserum gegen rekombinantes Polypeptid S1C
α -S2C	Antiserum gegen rekombinantes Polypeptid S2C
α -S1R	Antiserum gegen rekombinantes Polypeptid S1R
α -S2R	Antiserum gegen rekombinantes Polypeptid S2R
α -S1Cx	kreuzgereinigtes Antiserum gegen rekombinantes Polypeptid S1C
α -S2Cx	kreuzgereinigtes Antiserum gegen rekombinantes Polypeptid S2C
α -S1Rx	kreuzgereinigtes Antiserum gegen rekombinantes Polypeptid S1R
α -S2Rx	kreuzgereinigtes Antiserum gegen rekombinantes Polypeptid S2R
α -Silk/PBS	Antiserum gegen PBS-gewaschene, gescherte Seide
α -Silk/Try	Antiserum gegen PBS-gewaschene und trypsinbehandelte, gescherte Seide
a-D Man	D-Mannose (a-D gebunden)
a-D-Glc	D-Glucose (a-D gebunden)
a-D-Gal	D-Galactose (a-D gebunden)
a-L-Fuc	L-Fucose (a-L gebunden)
A.dest.	destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
Carb	Carbenicillin
ConA	Concavalin A
D-GlcNAc	N-Acetyl D-Glucosamin
ECL	Enhanced chemoluminescence
ECF	Enhanced chemofluorescence
EtOH	Ethanol
FAH	Formaldehyd
Flag	Flagelliformes Spidroin
GAH	Glutardialdehyd
H ₆ -S1C	rekombinantes Polypeptid mit His-Tag (Sequenzbereich S1C)
H ₆ -S2C	rekombinantes Polypeptid mit His-Tag (Sequenzbereich S2C)
H ₆ -S1R	rekombinantes Polypeptid mit His-Tag (Sequenzbereich S1R)
H ₆ -S2R	rekombinantes Polypeptid mit His-Tag (Sequenzbereich S2R)
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HLSM	Hochleistungsstereomikroskopie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
KS	Kühlschrank (entspricht etwa 8°C)
MAG	major ampullate gland
MAS	major ampullate silk
MASp(1, 2)	major ampullate spidroin (1, 2)
MetOH	Methanol
MIS	minor ampullate silk
MISp(1, 2)	minor ampullate spidroin (1, 2)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
RT	Raumtemperatur
S1C	Spidroin 1 C-terminaler Sequenzbereich

S1R	Spidroin 1 repetitiver Sequenzbereich
S2C	Spidroin 2 C-terminaler Sequenzbereich
S2R	Spidroin 2 repetitiver Sequenzbereich
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
Ü.N.	über Nacht
UEA-I	Uleus Europaeus Agglutin
WGA	Wheat germ agglutinin

7.2 DANKSAGUNG

Prof. Dr. Frank Grosse und Dr. Klaus Weißhart möchte ich für die Überlassung des Themas, Betreuung der Arbeit, hilfreiche Korrekturvorschläge sowie für die auch sonstig reichlich gewährte Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Herrn Dr. Weißhart und seiner Assistentin U.Steffan gebührt der Dank für die Konstruktion der Expressionsplasmide, die mir zur Verfügung gestellt wurden, sowie für die Hilfe mit den Antiseren. Ebenso sei den Kollegen der Abteilung molekulare Cytologie/ Elektronenmikroskopie und ihrem Leiter für ihre Kooperation gedankt. Nicht nur durch seine kollegiale Zusammenarbeit und materielle Unterstützung, sondern auch durch viele anregende, fachliche Gespräche und seine besonnenen und teils humorvollen Ratschläge hat Dr. Winfried Rommerskirch mir und meiner Arbeit große Dienste geleistet.

Dr. Karl-Heinz Gührs hat durch seine kompetente Leitung des Projekts, seine technischen Ratschläge und fachliche Kritik mit zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Dank für reichliche Unterstützung gebührt auch meinen Laborkollegen Irmgard Tirocke, Dr. B.Rudakoff und Dr. A.Chinali sowie den Kollegen der Abteilung Biochemie, von denen mir vor allem Frau A.Schneider oft hilfreich zur Hand ging. Für die Durchführung der N-terminalen Mikrosequenzierung schulde ich Dank an Frau A.Willitzer und Dr. B.Schlott.

Außerhalb des Hauses bin ich verschiedenen Mitarbeitern der Universität Jena zu großem Dank verpflichtet. Im Besonderen gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Linz und seiner Assistentin Frau Rother für die Fertigung von Ultra- und Semidünnschnitten, sowie Herrn Dr. Richter und der Abt. Ultrastrukturforschung für die reichlich und freundlich gewährte Kooperation bei meinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Dank für ihre Kooperation bei der Beschaffung von Spinnen gebührt auch den Mitarbeitern des Bundesaußenministeriums sowie zahlreicher deutschen Botschaften – im besonderen jenen der deutschen Botschaft in Australien. Ebenso bin ich in Herrn Dr. Mike Gray vom Australian Museum verpflichtet, ohne dessen Hilfe der Bezug und die Ausfuhr von Spinnen nicht möglich gewesen wäre. In diesem Zusammenhang möchte ich Frau Caroline Uterman-Kessler dafür danken, dass sie einen wesentlichen Anteil der Korrespondenz mit den australischen Behörden übernommen hat.

Dr.Geier von der Fa. Carl Zeiss Jena hat mir freundlicherweise die Verwendung der Ergebnisse gestattet, die von mir im Rahmen des Unterauftrags am Projekt „Biologische Applikationen des Stereomikroskopischen Hochleistungssystems“ erzielt wurden.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Vorhaben wurde in Teilen mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung, Forschung, Wissenschaft und Technologie unter dem Förderkennzeichen 0311130 und mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten unter dem FKZ 2204998 gefördert.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich und nach bestem Wissen und Gewissen, dass mir die Promotionsordnung der biologisch-pharmazeutischen Fakultät bekannt ist, ich die dem Fachbereich vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel „Strukturelle und immunologische Charakterisierung der Spinnenseide von *Nephila clavipes*“ selbstständig verfasst und alle relevanten von mir zu dieser Arbeit benutzten Hilfsmittel, Quellen und persönlichen Mitteilungen angegeben habe. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials wurde ich durch Herrn Prof. Dr. Frank Grosse und Herrn Dr. Klaus Weißhart unterstützt. Des weiteren erkläre ich, dass keine Hilfe im Sinne des §5 Abs. 3.4 der Promotionsordnung in Anspruch genommen wurde und keine wesentlichen Teile dieser Arbeit an anderer Stelle als Prüfungsarbeit im Sinne des Paragraphen eingereicht wurde.

Jena, am 15. März 2003

.....

(Alexander Sponner)

Erklärung zu Promotionsverfahren

Hiermit erkläre ich, dass keine früheren oder laufenden Promotionsverfahren anhängig sind.

Jena, am 15. März 2003

.....

(Alexander Sponner)