

Entwicklung eines Reinigungsverfahrens zur Gewinnung künstlicher Spinnensei- denproteine aus Tabakblättern im Pilot- maßstab

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Dipl.-Ing. René Heppner

geb. am 31.12.1978 in Torgau

Gutachter:

Prof. Dr. Markus Pietzsch

Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h.c. Joachim Ulrich

Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31.05.2018

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, René Heppner, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, dass keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind.

Die Dissertation hat in der gegenwärtigen bzw. in einer anderen Fassung noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Halle, 04.12.2017

Danksagung

Die vorliegende Dissertation basiert auf meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Lehrstuhl für Aufarbeitung biotechnologischer Produkte, Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Institutes für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften.

Zu allererst danke ich selbstverständlich Prof. Dr. Markus Pietzsch für die Überlassung des herausfordernden Themas. Sie haben mir viel Vertrauen und Geduld entgegengebracht und, wenn nötig, mit starkem Fingerzeig die Richtung gewiesen. Vielen Dank auch für Ihre unermüdliche Kreativität bei der Entwicklung von Problemlösungsstrategien.

Dr. Thomas Hertel hat mir mit seiner Erfahrung, seiner wissenschaftlichen Leidenschaft und väterlicher Fürsorge stets den Rücken freigehalten. Herzlichen Dank dafür.

Dr. Franziska Seifert war und ist ein Geschenk. Ihren Enthusiasmus und Ihr Engagement bewundere ich. Vielen Dank für deine Begleitung auf einem Stück meines Weges.

Frau Anwand, Ihnen danke ich vor allem für die Zeit, die Sie mir geschenkt haben, um sich meine Probleme anzuhören und Gedanken zu erörtern.

Mit meiner WüPa-Gruppe durfte ich fulminante Teambuilding-Events erleben. Ich möchte keinen von euch missen.

Die Betreuung meiner Masteranden Thorben und Jan war eine wunderbare Erfahrung. Ihr habt eure Sache gut gemacht, ganz entgegen eurer Zweifel. Tolle Jungs!

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die schöne Zeit. Die permanente Bereitschaft zur fachlichen Diskussion, große Hilfsbereitschaft und der Spaß bei gemeinsamen Aktivitäten fernab des Arbeitsalltags bedeuten mir viel.

PD Dr. Udo Conrad, Dr. Nicola Weichert und Christine Helmold danke ich für die Bereitstellung der enormen Menge Biomasse, aus der ich die Zielproteine gewinnen konnte. Bei der Erarbeitung der gemeinsamen Publikation habe ich noch einmal viel gelernt.

Icon Genetics, *in persona* Dr. Franziska Jarczowski, danke ich vielmals für die tolle Kooperation. Du hast mir viel Zeit gespart, clevere Hinweise gegeben und ein paar gute Gedanken gezündet.

Besonders dankbar bin ich natürlich dir, Maria. Deine bedingungslose Unterstützung, dein tiefes Vertrauen in und dein Verständnis für mich haben mir große Kraft gegeben.

Abkürzungen

A	Alanin
A	Ampere
AC	Affinitätschromatographie
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BFM	Biofeuchtmasse
BiP	Immunglobulin-bindendes Protein (<i>Binding immunoglobulin Protein</i>)
c	komplementär- (<i>complementary</i>)
C	Carboxy-
C	Cystein
c _A	Acetonkonzentration [%] (v/v)
CHO	Eierstockzellen eines chinesischen Zwerghamsters (<i>chinese hamster ovary</i>)
cITC	zentrifugationsbasiertes <i>Inverse Transition Cycling</i>
D	Asparaginsäure
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DSP	Produktisolierung, Aufreinigung (<i>Downstream processing</i>)
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELP	Elastin-artiges Polypeptid (<i>elastin-like polypeptide</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
Flag	Fangspiralenseide (<i>flagelliform silk</i>)
g	Gramm
GMP	<i>good manufacturing practice</i> – gute Herstellungspraxis
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney</i>)
HDH	Hochdruckhomogenisator
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
i	unlöslich (<i>insoluble</i>)
I	Isoleucin
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (Gatersleben)
k	kilo
K	Lysin
k.A.	keine Angabe
KBL	Kraig Biocraft Laboratories
L	Leucin
L	Liter
I.Z.	letzter Zugriff
m	Boten- (<i>messenger</i>)
m	Meter
m	mikrobiell

m	milli
M	molar [mol/L]
MaSp1	Tragfadenseide (<i>Major ampullate spidroin 1</i>)
min	Minuten
n	nano
N	Amino-
N ₂	Stickstoff (molekular)
NaOH	Natriumhydroxid
P	Prolin
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> [-]
pI	isoelektrischer Punkt
POI	Zielprotein (<i>protein of interest</i>)
PPL	vorgefärbte Proteinleiter (<i>prestained protein ladder</i>)
Q	Glutamin
R _m	Zugfestigkeit [GPa]
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
s	löslich (<i>soluble</i>)
s	Sekunde
S	Serin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
Spidroin	Spinnenfibroin (<i>spider fibroin</i>)
TA	Totalacrylamid
TG	Transglutaminase
TP	Zielprotein (<i>Target Protein</i>)
Tt	Transitionstemperatur
V	Valin
V	Volt
V	Volumen [L]
VF	Verdünnungsfaktor
w _{Bruch}	spezifische Bruchenergie [kJ/kg]
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
ZP	Zielprotein
ε	Dehnung [%]
μ	mikro
v/v	Volumenprozent [%]
w/v	Masseprozent [%]

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Danksagung.....	III
Abkürzungen	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Stand der Technik	6
1.1.1 Expressionssysteme.....	6
1.1.2 Spinnenseidenproduktion	12
1.1.3 Produktisolierung	14
1.1.4 Aufbau der Zielproteine.....	17
1.2 Motivation	20
1.3 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Verwendung fremder Daten.....	22
2.2 Chemikalien.....	22
2.3 Geräte	23
2.4 Puffer und Lösungen	24
2.5 Ernte, Präparation und Lagerung.....	25
2.5.1 Probenanlegung für SDS-PAGE	25
2.6 Zellaufschluss.....	25
2.7 Fraktionierende Acetonfällung	26
2.7.1 Probenanlegung für SDS-PAGE	27
2.7.2 Bestimmung der Restfeuchte des Filterkuchens	28
2.8 Waschen	28
2.8.1 Waschen als Vorexperiment	28
2.8.2 Waschen von Q-/K-MaSp1-100xELP-haltigem Pellet	28
2.8.3 Waschen von 1xFlag-100xELP-haltigem Pellet	28
2.9 Reinigung durch zentrifugationsbasiertes <i>Inverse Transition Cycling</i> (cITC).....	29
2.9.1 cITC als Vorexperiment	29
2.9.2 cITC zur Gewinnung von Q-/K-MaSp1-100xELP	29
2.9.3 cITC zur Gewinnung von 1xFlag-100xELP	29
2.10 Polyphenolbestimmung	29
2.11 Vernetzung	30
2.12 Detektierbarkeit des Zielproteins	30
2.13 Analytik.....	31
2.13.1 Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE	31

2.13.2 Färbung von SDS-PA-Gelen mittels Silber.....	33
2.13.2.1 Hintergrund und Nachweisprinzip.....	33
2.13.2.2 Silberfärbung.....	33
2.13.3 Western Blot.....	34
2.13.3.1 Elektroblob.....	34
2.13.3.2 Detektion.....	35
3 Ergebnisse und Diskussion	36
3.1 Präparation der Biomasse	36
3.2 Zellaufschluss – unproblematische Maßstabsvergrößerung	42
3.3 Fraktionierende Acetonfällung – Abtrennung verunreinigender Proteine und Gewinnung des Zielproteins	44
3.3.1 Fällungsexperimente im Mikromaßstab – fraktionierende Acetonfällung möglich	45
3.3.2 Maßstabsvergrößerung in den Pilotmaßstab	49
3.4 Waschen des Pellets – Erhöhung der ZP-Reinheit	52
3.5 Zentrifugationsbasiertes <i>Inverse Transition Cycling</i> (cITC) – erfolgreiche Feinreinigung.....	54
3.6 Reinigung von Q-/K-MaSp1-100xELP im Pilotmaßstab	56
3.7 Weiterführende Untersuchungen	59
3.7.1 Abreicherung löslicher Polyphenole	59
3.7.2 Steigerung des Molekulargewichts künstlicher Spinnenseidenproteine durch Vernetzung	60
3.7.3 Verringerung der Detektierbarkeit des Zielproteins durch Salzionen.....	62
3.7.4 Übertragung der Reinigungsmethode zur Gewinnung von 1xFlag-100xELP	64
3.7.4.1 Fraktionierende Acetonfällung im Mikromaßstab.....	64
3.7.4.2 Fraktionierende Acetonfällung im Pilotmaßstab.....	68
3.7.4.3 Feinreinigung	70
3.8 Fehlerbetrachtung	74
3.8.1 Proteinanalytik	74
3.8.2 <i>Downstream Processing</i>	74
4 Zusammenfassung	76
5 Ausblick.....	78
6 Literatur	79
7 Anhang	87
8 Lebenslauf.....	89
9 Publikationen	90

1 Einleitung

Spinnen! Für die einen der blanke Horror, für Andere hochinteressantes Forschungsobjekt. Aktuell sind weltweit 4.056 Gattungen mit 46.779 Arten bekannt [Natural-History-Museum-Bern, 2017]. Sie ernähren sich teilweise von Pollen und Nektar, vorrangig aber von Beutetieren [Eggs und Sanders, 2013; Foelix, 2011; Jackson et al., 2001; Smith und Mommsen, 1984]. Um diese fangen zu können, haben Spinnen eine Vielzahl von Jagdtechniken entwickelt. Vogelspinnen beispielsweise überfallen ihre Beute aus einem Hinterhalt und injizieren nach einem Biss mit ihren Klauen ein tödliches Gift [Foelix, 2011]. Die Gladiatorspinne wirft ein kleines, selbst gesponnenes Netz über ihr Opfer und fängt es so (siehe Abbildung 1-1, a) [Coddington und Sobrevila, 1987; Stafstrom und Hebets, 2016]. Viele weitere Netzformen wie Baldachinnetze, Trichternetze und Radnetze sind bekannt (siehe Abbildung 1-1).

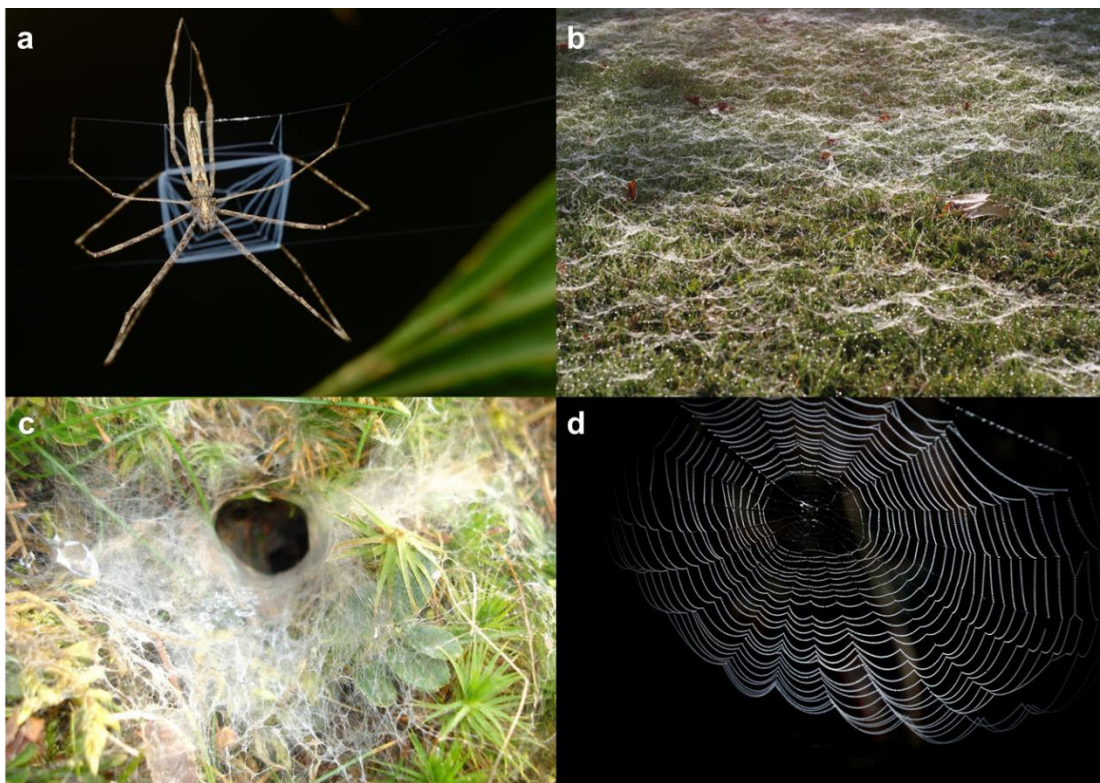


Abbildung 1-1: Verschiedene Arten von Spinnennetzen. (a) Gladiatorspinne mit Fangnetz [Flickr, 2012]; (b) Baldachinnetz [Wikipedia, 2006]; (c) Trichternetz [Wikipedia, 2005]; (d) Radnetz [Pixabay, 2016]

Zum Bau solcher Netze verwenden Spinnen Seide, die sie in ihrem Körper in speziellen Drüsen produzieren und lagern (siehe Abbildung 1-2).

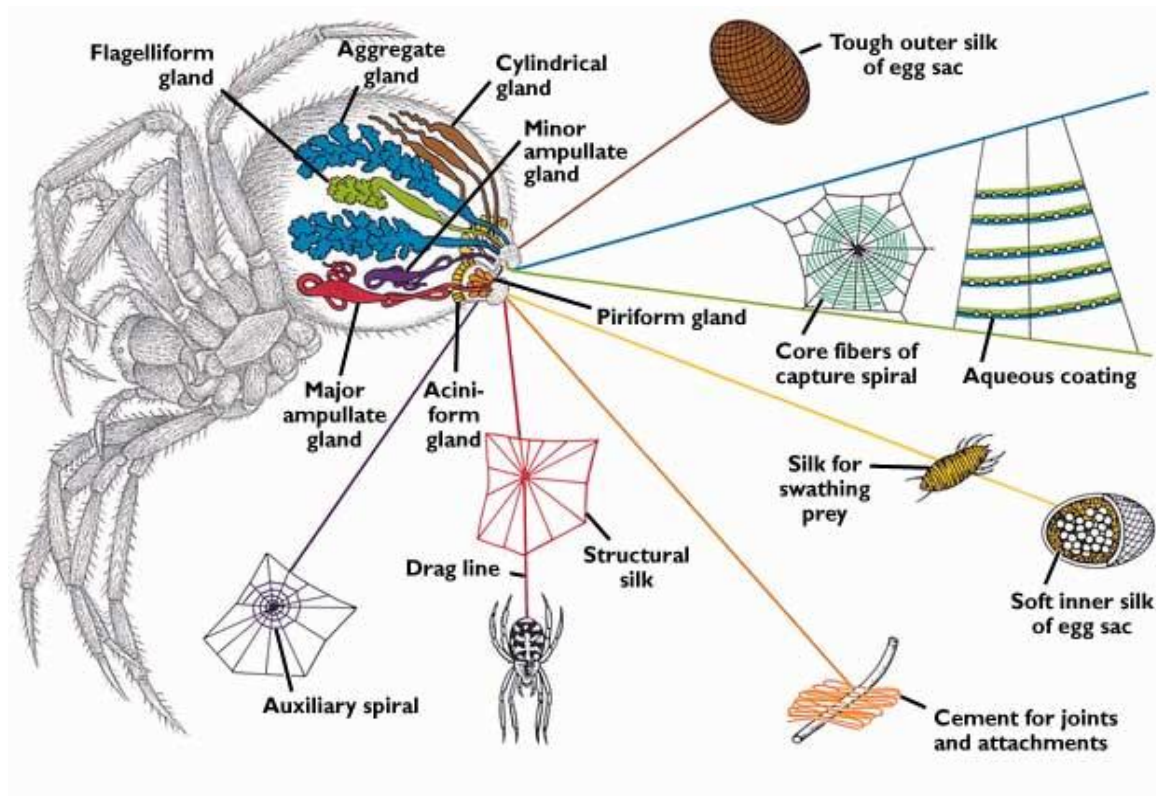


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* mit Fokus auf die Spinnndrüsen und der darin produzierten Seidenarten inklusive Verwendung (nach [Vollrath, 2000]).

Echte Webspinnen wie die Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* oder die goldene Seidenspinne *Nephila clavipes* verwenden im Laufe ihres Lebens bis zu sieben Seidenarten für verschiedene Zwecke (siehe Abbildung 1-2) [Vollrath, 2000]. Dazu zählen neben dem Bau des Netzes auch Anwendungen wie das sichere Verpacken von Beute und Gelege oder die Flucht vor Fressfeinden. Zur Besiedlung neuer Lebensräume können weite Strecken über das so genannte *ballooning* zurückgelegt werden. Dafür erklimmen kleine bzw. Jungspinnen erhöhte Standorte wie z.B. Grashalme, um sich dann mithilfe eines abgelassenen Spinnfadens vom Wind transportieren zu lassen [Freeman, 1946; Greenstone et al., 1987]. Dadurch bilden Spinnen einen Teil des sogenannten Luftplanktons [Drake und Farrow, 1989].

Die in der Forschung gängigen Bezeichnungen und Abkürzungen der verschiedenen Spinnenseiden werden von der Spinnenart und/oder der sie produzierenden Spinnndrüse abgeleitet. Eine der beiden in der *Major ampullate*-Drüse gebildeten Seidenarten beispielsweise, das *Major ampullate spider fibroin 1*, wird in der Regel als MaSp1 abgekürzt. Sp1 steht für das erste nachgewiesene Spidroin, wobei die Bezeichnung eine Zusammenfassung darstellt aus den Worten *spider* und *fibroin*. Fibroin ist der Hauptbestandteil der Seide von Insekten, die eine Kompletmetamorphose durchlaufen wie der Seidenspinner *Bombyx mori*, aber eben auch von Webspinnen [Craig et al., 1999]. Es ist ein den Keratinen zugeordnetes Pro-

tein mit gattungsspezifischen repetitiven Peptidsequenzen, die über antiparallele β -Faltblätter kristalline Bereiche ausbilden [Marsh et al., 1955; Warwicker, 1960]. Die typische Peptidsequenz des Seidenspinner-Fibroins ist Glycin-Serin-Glycin-Alanin-Glycin-Alanin (GSGAGA), bei MaSp1 der *Nephila clavipes* sind es Poly-Alanin-Blöcke (A_n , $n=4-7$) [Xu und Lewis, 1990; Zhou et al., 2000]. Durch die kristallinen Bereiche können diese Seiden hohe Zugkräfte aufnehmen und sind darin vergleichbar mit der stärksten von Menschen gemachten Faser, nämlich Kevlar. Aufgrund höherer Dehnbarkeit übertreffen sie Kevlar® sogar bei der Aufnahmefähigkeit von mechanischer Energie, bevor sie zerreißen (siehe Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Vergleich hoch-zugfester künstlicher und natürlicher Fasern bzgl. ihrer Stärke (Zugfestigkeit- R_m), Bruchdehnung (ϵ) und spezifischer Bruchenergie (w_{Bruch}). ^(a)–[DuPont, 2017]; ^(b)–[Zhou et al., 2000]; ^(c)–[Gosline et al., 1986; Kümmerlen et al., 1996; Stauffer et al., 1994; Xu und Lewis, 1990]; (d)–[Hayashi und Lewis, 2001; Lefevre und Pezolet, 2012]

Material	repetitives Element	Sekundärstruktur	R_m [GPa]	ϵ [%]	w_{Bruch} [kJ/kg]
Kevlar®29 ^(a)	Phenylenterephthalamid	-	3,6	4	30
Textilseide ^(b)	GSGAGA	β -Faltblatt	0,5	15	60
Tragfadenseide (MaSp1) ^(c)	A_n GGX	β -Faltblatt 3_{10} -Helix	4	35	100
Fangspiralenseide (Flag) ^(d)	GPGGX spacer	Typ-II- β -turn Zugfestigkeit	1	200	100

Die Poly-Alanin-Blöcke sind in eine amorphe, elastische Matrix eingebettet, die hauptsächlich aus dem GGX-Motiv ($X=A, L, Q, Y$) besteht und 3_{10} -Helices bildet [Kümmerlen et al., 1996; Xu und Lewis, 1990]. MaSp1 besteht zu 90 % aus diesen beiden Motiven [Eisoldt et al., 2011].

Die in der flagelliformen Drüse produzierte Fangspiralenseide (Flag, siehe Abbildung 1-2) enthält ebenfalls das GGX-Motiv ($X=A, S, T, Y$). Dort ist es, in Kombination mit der iterativen GPGGX-Sequenz ($X=A, S, V, Y$), Ursache der enormen Dehnbarkeit von bis zu 200 % [Hayashi und Lewis, 1998; Hayashi und Lewis, 2000]. Blöcke von $(\text{GPGGX})_m(\text{GGX})_n$ ($m=43-63$; $n=7$) werden von einem *spacer*-Motiv unterbrochen, welches die Zugfestigkeit des Fadens erhöht [Adrianos et al., 2013; Gatesy et al., 2001].

Am N- und C-Terminus werden MaSp1 und Flag von nicht-repetitiven Aminosäuresequenzen flankiert, die maßgeblich wichtig sind für die Speicherung der Proteine und die korrekte Assemblierung des Fadens [Hagn, 2012]. Für sie ist folglich, auch im Vergleich unterschiedlicher Spinnenfamilien, eine hohe Konservierung nachgewiesen [Beckwitt und Arcidiacono, 1994; Hagn, 2012; Sponner et al., 2005b]. Der gesamte modulare Aufbau der beiden Spinnenseidenproteine ist in Abbildung 1-3 dargestellt.

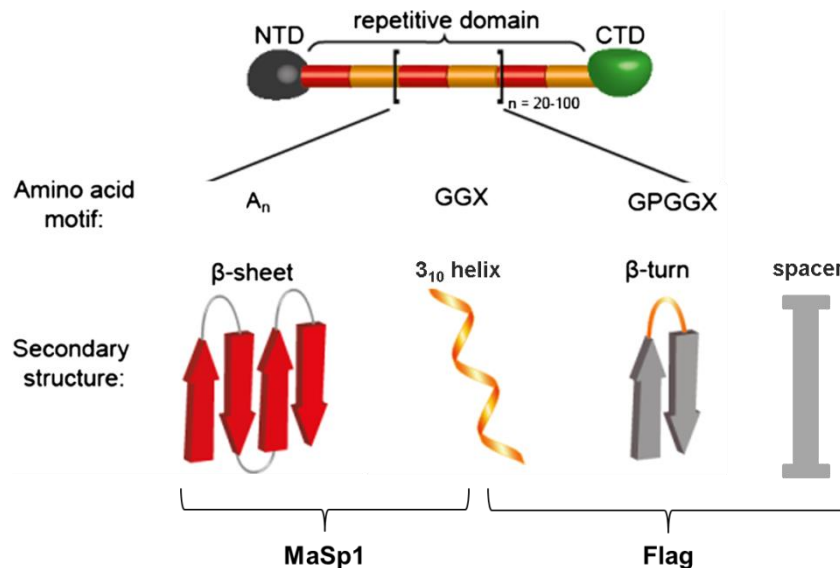


Abbildung 1-3: Schematischer Aufbau der Spinnenseidenproteine MaSp1 und Flag mit den charakteristischen Aminosäuresequenzen und strukturellen Motiven (modifiziert nach [Doblhofer et al., 2015]).

Das Molekulargewicht der resultierenden Proteine beträgt mindestens 250 kDa für MaSp1 und 360 kDa für Flag [Hayashi und Lewis, 1998; Sponner et al., 2005a]. Aus ihnen wird ein an den jeweiligen Verwendungszweck angepasster Faden gesponnen und unter Umständen modifiziert. So z.B. kann die Fangspirale durch das Aufbringen der hygroskopischen *Aggregate*-Seide klebrig gemacht werden [Vollrath und Edmonds, 1989].

Spinnennetze werden von Menschen schon seit langem zweckentfremdet. Im südpazifischen Raum werden Bambusrahmen hergestellt, in die Spinnen ihr Netz einweben. Diese Konstrukte finden dann Verwendung beim Fischfang [Weems und Edwards, 2001]. Bereits im antiken Griechenland wurden Wunden mit Spinnennetzen abgedeckt, um Blutungen zu stoppen [Gerritsen, 2002]. Heute sind aufgrund der Fortschritte in Naturwissenschaften, Medizin und Technik viele weitere mögliche Anwendungen denkbar und zum Teil bereits gezeigt worden. Durch die Verwendung natürlicher Spinnenseide war es beispielsweise möglich, durchtrennte Nerven zu regenerieren [Allmeling et al., 2008; Radtke et al., 2011]. Eine große Schwierigkeit bei der Kommerzialisierung von Produkten aus Spinnenseide liegt darin, überhaupt relevante Mengen der als Ausgangsstoffe dienenden Proteine zu gewinnen. Die Menge an gespeicherter Seide in einer *Nephila clavipes* beträgt etwa 100 ng [Hijirida et al., 1996]. Zusätzlich verhalten sich Spinnen in der Regel kannibalistisch und territorial [Foelix, 2011]. Daher gestaltet sich ihre Zucht schwieriger als die von Seidenspinnerraupe, welche bei der traditionellen Produktion von Texturseide genutzt werden. Die Umgehung der geschilderten Probleme gelang mit biotechnologischen Verfahren, durch die künstliche Spinnenseidenproteine produziert werden können (siehe Kapitel 1.1.2). Diese sind aktueller Gegenstand der Forschung, um Arzneimittel einzukapseln, adhärenente Zellen zu züchten und Im-

plantate so zu ummanteln, dass eine Abstoßungsreaktion des Körpers verringert wird [Blüm et al., 2014; Scheller et al., 2004; Zeplin et al., 2014]. Bei der Entwicklung technischer Anwendungen wird vor allem darauf abgezielt, das Gewicht aktuell bestehender Produkte wie Fallschirme, schusssichere Kleidung und Schuhe zu verringern [Adidas, 2016; KBL, 2017].

1.1 Stand der Technik

1.1.1 Expressionssysteme

Für die Produktion rekombinanter Proteine (im englischen oft abgekürzt als *POI* – *protein of interest*) in Forschung und Industrie stehen diverse sogenannte Expressionssysteme bzw. Plattformen zur Verfügung. Beginnend beim prokaryotischen „Arbeitspferd der Biotechnologie“ *Escherichia coli* (*E. coli*) reicht die Palette über Hefezellen wie *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)¹ hin zu Säugerzellen (z.B. *Chinese Hamster Ovary* – CHO, *Human Embryonic Kidney* – HEK) und Pflanzen (z.B. Tabak, Tomate, Kartoffel). Die kommerzielle Nutzung solcher Expressionssysteme wird unter anderem im hochpreisigen pharmazeutischen Sektor für die Produktion von Enzymen, Impfstoffen und monoklonalen Antikörpern betrieben. Acht der zehn umsatzstärksten Pharmazeutika des Jahres 2016 wurden biotechnologisch mit Hilfe von Mikroorganismen oder CHO-Zellen produziert (siehe Tabelle 1-2). Insgesamt entspricht das 16 % des Gesamtumsatzes der 15 weltweit größten Pharmaunternehmen [FiercePharma, 2017]. Viele weitere Biopharmazeutika sind auf dem Markt, und es ist tendenziell mit einer Erweiterung des Marktsegments zu rechnen. Für großtechnische Anwendungen erfolgt die Auswahl des Systems nach einer Vielzahl von Parametern, wie der Skalierbarkeit des Produktionsprozesses, einer hohen Produktbildungsrate und der Möglichkeit posttranslationaler Modifikationen. Bei Verwendung von z.B. *E. coli* als Produktionsorganismus können in kurzer Zeit hohe biomassebezogene Ausbeuten rekombinanter Proteine erzielt werden. Bis zu 20 % der Biotrockenmasse sind belegt [Khalilzadeh et al., 2003]. Spezifische co- und posttranslationale Modifikationen wie Ausbildung von Disulfidbrücken, korrekte Faltung und Glykosylierung sind in prokaryotischen Systemen, wenn überhaupt, nur eingeschränkt möglich [Berkmen, 2012]. Diese können effizient durch den Einsatz eukaryotischer Expressionssysteme erreicht werden. Hefezellen bieten ebenfalls den Vorteil kurzer Generationszeiten. Das natürliche Glykosylierungsmuster von beispielsweise in *S. cerevisiae* oder *P. pastoris* produzierten therapeutischen Proteinen weicht jedoch deutlich von dem humaner Zellen ab, was Immunreaktionen zur Folge haben kann [Lam et al., 2007]. Die industrielle Produktion von Antikörpern mit humanen posttranslationalen Modifikationen erfolgt daher in der Regel mit Hilfe von CHO-, HEK- oder Hybridomazellen [Sanchez-Garcia et al., 2016]. Doch auch diese Expressionssysteme bieten nicht nur

¹ Mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in der Biotechnologie genutzte *P. pastoris*-Stämme eigentlich *Komagataella phaffii* zuzuordnen sind Kurtzman, C. P. (2009). "Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36**, 1435-1438, Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K. und Mikata, K. (1995). "The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae)." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **59**, 439-444. Die „alte“ Bezeichnung ist jedoch etabliert und wird nach wie vor verwendet.

Vor- sondern auch Nachteile. Die Entwicklung des Produktionsstammes ist sehr zeitaufwendig, die Kulturmedien sind im Vergleich zu Mikroorganismen preisintensiv und eine Skalierung des Produktionsprozesses ist mit enormem finanziellem Aufwand verbunden. Eine Übersicht ausgewählter Parameter der besprochenen Expressionssysteme ist in Tabelle 1-3 gegeben.

Tabelle 1-2: Top ten der umsatzstärksten Arzneimittel weltweit (Stand: 2016; [genengnews, 2017]).

Medikament	Wirkstoffname	Wirkstoffart	Zulassungsinhaber	Umsatz [Mrd. US-\$]	Produktion
Humira®	Adalimumab	rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper	AbbVie Ltd.	16,1	CHO-Zellen
Harvoni®	Ledipasvir/ Sofosbuvir	niedermolekularer Polymeraseinhibitor	Gilead Sciences	9,1	chemisch
Enbrel®	Etanercept	rekombinantes dimeres chimäres Fusionsprotein	Pfizer	8,9	CHO-Zellen
Rituxan®	Rituximab	rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper	Roche/ Biogen	8,6	CHO-Zellen
Remicade®	Infliximab	rekombinanter chimärer monoklonaler Antikörper	MSD	7,8	Hybridoma-Zellen
Revlimid®	Lenalidomid	niedermolekularer Immunmodulator	Celgene	7,0	chemisch
Avastin®	Bevacizumab	rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper	Roche	6,8	CHO-Zellen
Herceptin®	Trastuzumab	rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper	Roche	6,8	CHO-Zellen
Lantus®	Insulin glargin	rekombinantes Peptidhormon	Sanofi	6,1	<i>E. coli</i>
Prenar 13®/ Prevenar 13®	PCV13	Konjugatimpfstoff	Pfizer	5,7	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i>

Tabelle 1-3: Industrielle Expressionssysteme zur Produktion rekombinanter Proteine mit ausgewählten Vor- und Nachteilen (modifiziert nach [Ma et al., 2003]). PTM*–spezifische posttranslationale Modifikationen ohne spezielle Veränderungen des Organismus' *ad hoc*

System	Produktionskosten	Produktionszeit	Skalierbarkeit	PTM*	Kontaminationen
Bakterien	gering	kurz	hoch	keine	Endotoxine
Hefen	mittel	mittel	mittel	abweichend	geringes Risiko
Säugerzellen	hoch	lang	sehr gering	humanisiert/ human	Viren, Prionen, Onkogen-DNA
Pflanzen (transient)	mittel	sehr kurz	sehr hoch	abweichend	Endotoxine
Pflanzen (stabil)	sehr gering	lang	sehr hoch	abweichend	geringes Risiko

Relativ neu ist die Verwendung kompletter Zellsysteme und Organismen für die Produktion rekombinanter Proteine. Die Nutzung von Pflanzen als Expressionssystem wird als *Molecular Pharming* (auch *Molecular Farming*) bezeichnet. Sie ist erstmals durch die Produktion eines rekombinanten funktionalen Antikörpers in Tabak aufgezeigt worden [Hiatt et al., 1989]. Darauf folgte die kommerzielle Herstellung von Avidin und β -Glucuronidase in Mais-samen [Hood et al., 1997; Witcher et al., 1998]. Diese Produkte waren der Beweis, dass hochqualitative Proteine ökonomisch in Pflanzen produziert werden können.

Grundsätzlich wird bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen in Pflanzen zwischen transienten und stabilen Systemen unterschieden. Dies wird im Folgenden am Beispiel von Tabak exemplarisch erklärt, wobei die Einbringung der genetischen Information durch Infektion der Tabakblätter mittels genetisch modifizierter *Agrobacterium tumefaciens*-Erreger erfolgt. Im ersten Fall, der transienten Expression, wird direkt im Anschluss an die Infektion im Zeitraum von maximal zehn Tagen das rekombinante Protein produziert [Gleba et al., 2005]. Dieses Verfahren ist schnell und effizient. Nachteilig wirken sich die eingeschränkte Skalierbarkeit und das Einbringen von Endotoxinen durch das Bakterium aus. Die zweite Möglichkeit ist die Erzeugung stabiler Transformanten z.B. nach der Methode von Horsch [Horsch et al., 1985]. Das Vorgehen ist schematisch in Abbildung 1-4 dargestellt.

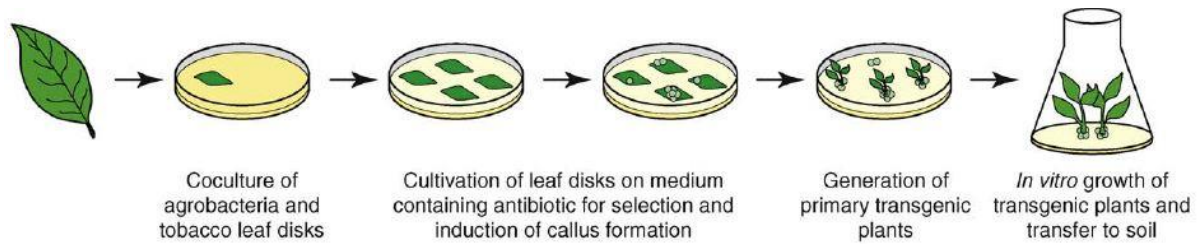


Abbildung 1-4: Erzeugung stabiler Transformanten nach der Methode von Horsch [Horsch et al., 1985] (aus [Floss et al., 2010]).

Von Tabakblättern werden Teile ausgestochen, in einer Nährlösung zusammen mit genetisch modifizierten Erregern (*Agrobacterium tumefaciens*) kultiviert und mittels Antibiotikum selektiert. Dadurch entstehen transgenierte Tabaksprößlinge. Diese können anschließend im Boden heranwachsen und das rekombinante Protein produzieren. Durch Paarung der genetisch transformierten Pflanzen untereinander ist es schließlich möglich, Saatgut einer stabilen Produktionslinie zu erzeugen. Auf diesem Weg war es möglich, eine Linie von Tabakpflanzen zu entwickeln, die stabil rekombinante Spinnenseide produzieren [Weichert et al., 2014].

Die Produkttiter in den Blättern unterscheiden sich bei beiden Varianten deutlich. Durch das Arbeiten mit stabilen Transformanten werden etwa $100 \text{ mg}_{\text{Produkt}}/\text{kg}_{\text{Biofeuchtmasse}}$ erreicht [Matoba et al., 2011]. Bei der transienten Expression sind aktuell bis zu $2 \text{ g}_{\text{Produkt}}/\text{kg}_{\text{Biofeuchtmasse}}$ belegt [Zischewski et al., 2016]. Hier liegt auch der große Vorteil dieses Expressionssystems. Innerhalb sehr kurzer Zeit (<10 Tage nach Infektion) können große Mengen Zielprotein gewonnen werden. Die technische Machbarkeit ist bereits eindrucksvoll gezeigt worden. Die US-amerikanische Firma iBio Biotherapeutics (vorher Caliber Biotherapeutics) betreibt eine Anlage, in der mindestens 3,5 t Tabakpflanzen pro Woche hoch automatisiert kultiviert, infiziert, geerntet und einer Produktisolierung unterzogen werden. Der komplette Aufbau der Anlage ist modular und kann so bedarfsgerecht angepasst werden. Ziel ist, 7 t Tabakpflanzen pro Woche zu verarbeiten und mindestens 150 kg gereinigte Produkte pro Jahr bereitzustellen [Holtz et al., 2015].

Aktuell ist nur ein einziges rekombinantes Pflanzenpharmazeutikum als Medikament im Humanbereich zugelassen. ELEYSO™ mit dem Wirkstoff Taliglucerase α wird von Protalix BioTherapeutics mit Hilfe von Karottenzellen hergestellt und dient der Behandlung des Gaucher-Syndroms [Tekoah et al., 2015]. Dass den Anforderungen der guten Herstellungspraxis (*good manufacturing practice* – GMP) Rechnung getragen werden kann ist in Machbarkeitsstudien für die Produktion von rekombinanten Antikörpern und Vakzinen gezeigt worden [Holtz et al., 2015; Sack et al., 2015; Tusé et al., 2015]. In Kombination mit der Tatsache, dass aktuell zehn verschiedene pflanzenbasierte Biopharmazeutika in klinischen Phasen auf

ihr Wirkpotential untersucht werden, ist daher von einer Etablierung pflanzlicher Expressionssysteme für die Produktion rekombinanter Proteine auszugehen [Clinicaltrials, 2017].

1.1.2 Spinnenseidenproduktion

Die Grundlage zur Produktion rekombinanter Spinnenseide wurde 1990 durch die Arbeit von Min Xu und Randolph Lewis gelegt. Den Forschern war es als ersten gelungen, Tragfadenseide der Goldenen Seidenspinne *Nephila clavipes* partiell zu sequenzieren und ihre mRNA sowie cDNA zu analysieren. Wegen der hohen Repetitivität bestimmter Codons war es ihnen nicht möglich, die komplette Aminosäuresequenz zu entschlüsseln, jedoch konnten die wichtigen Strukturelemente, nämlich Poly-Alanin-Blöcke und ein GGX-Motiv (X=A, L, Q, Y), identifiziert werden [Lewis, 2006; Xu und Lewis, 1990]. In der Folge wurden künstliche Spinnenseidenproteine produziert unter Verwendung mikrobieller Expressionssysteme wie dem Bakterium *E. coli* und der Hefe *P. pastoris*.

Die erzielten Ausbeuten waren eher gering mit einem herausstechenden Maximum von 1 g/L durch das Arbeiten mit *P. pastoris* [Fahnestock und Bedzyk, 1997]. Als mögliche Ursachen dafür wurden ungünstige Sekundärstrukturen der mRNA mit daraus resultierenden Translationspausen und –abbrüchen sowie geringe Löslichkeit der Zielproteine angegeben. Die ebenfalls problematische Erschöpfung der tRNA-Levels für Alanin und Glycin konnte durch genetische Modifizierung des Stoffwechsels unterbunden werden [Xia et al., 2010].

Zur Überwindung der bei der Nutzung von Bakterien und Hefen beobachteten Probleme wurden alternativ weitere eukaryotische Expressionssysteme untersucht. Künstliche Spinnenseidenproteine konnten in Insekten- und Säugerzellen sowie mit transgenen Seidenspinnern (Kokon), Mäusen und Ziegen (Milch) produziert werden [Ittah et al., 2010; Karatzas et al., 1999; Lazaris et al., 2002; Teulé et al., 2012; Xu et al., 2007]. Die großen Nachteile dieser Systeme sind geringe Produktausbeuten sowie zeit- und kostenintensive Entwicklungs- und Produktionsprozesse [Römer und Scheibel, 2008].

Die praktische Anwendbarkeit stabiler pflanzlicher Expressionssysteme für die Produktion künstlicher Spinnenseidenproteine wurde ebenfalls gezeigt. Dabei wurden Kartoffeln und Tabakpflanzen verwendet [Hauptmann et al., 2015; Hauptmann et al., 2013; Scheller et al., 2001; Scheller et al., 2004; Weichert et al., 2014]. Die Ausbeuten von bis zu 80 mg Zielprotein pro Kilogramm Biofeuchtmasse sind in Übereinstimmung mit üblichen Werten für transgene Pflanzen, aber um ein bis zwei Größenordnungen geringer als für mikrobielle Expressionssysteme (siehe Kapitel 1.1.1). Dieser Nachteil kann durch die geringen Produktionskosten und die Herstellung von Proteinen größer als 250 kDa aufgewogen werden [Hauptmann et al., 2013].

Anhand einer Internet-basierten Recherche konnten drei Firmen identifiziert werden, die aktuell die kommerzielle Nutzung von Spinnenseidenanaloga betreiben. Dies sind die japani-

sche Firma Spiber Inc. in Yamagata (Japan), die deutsche Firma AMSilk in Planegg/ München (Deutschland) sowie Kraig Biocraft Laboratories (KBL) in Ann Arbor, Michigan (USA). Spiber nutzt ein nicht näher spezifiziertes mikrobielles Expressionssystem zur Produktion künstlicher Spinnenseidenproteine [Spiber, 2017], AMSilk fermentiert *E. coli* im 50.000 L-Maßstab [AmSilk, 2017]. Bei KBL setzt man dafür auf die Verwendung des Seidenspinners *Bombyx mori* [KBL, 2017].

1.1.3 Produktisolierung

Zellen und Zellsysteme können, wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, genutzt werden, um rekombinante Proteine zu produzieren. Dabei entstehen aufgrund des Stoffwechsels des Expressionsorganismus neben dem eigentlichen Zielprotein (ZP bzw. POI) viele weitere organische Moleküle wie Lipide, Proteine, Zucker oder DNA und RNA. Diese Verbindungen stellen Verunreinigungen bzw. Kontaminationen des Zielproteins dar und müssen von diesem, in der Regel mehrstufig, abgetrennt werden. Die durchgeführten Schritte fasst man mit den Begriffen Aufarbeitung, Produktisolierung, oder dem englischen *Downstream Processing* (DSP) zusammen. Das prinzipielle Vorgehen im technischen bzw. industriellen Maßstab mit starkem Fokus auf pflanzliche Expressionssysteme ist in Abbildung 1-5 schematisch dargestellt.

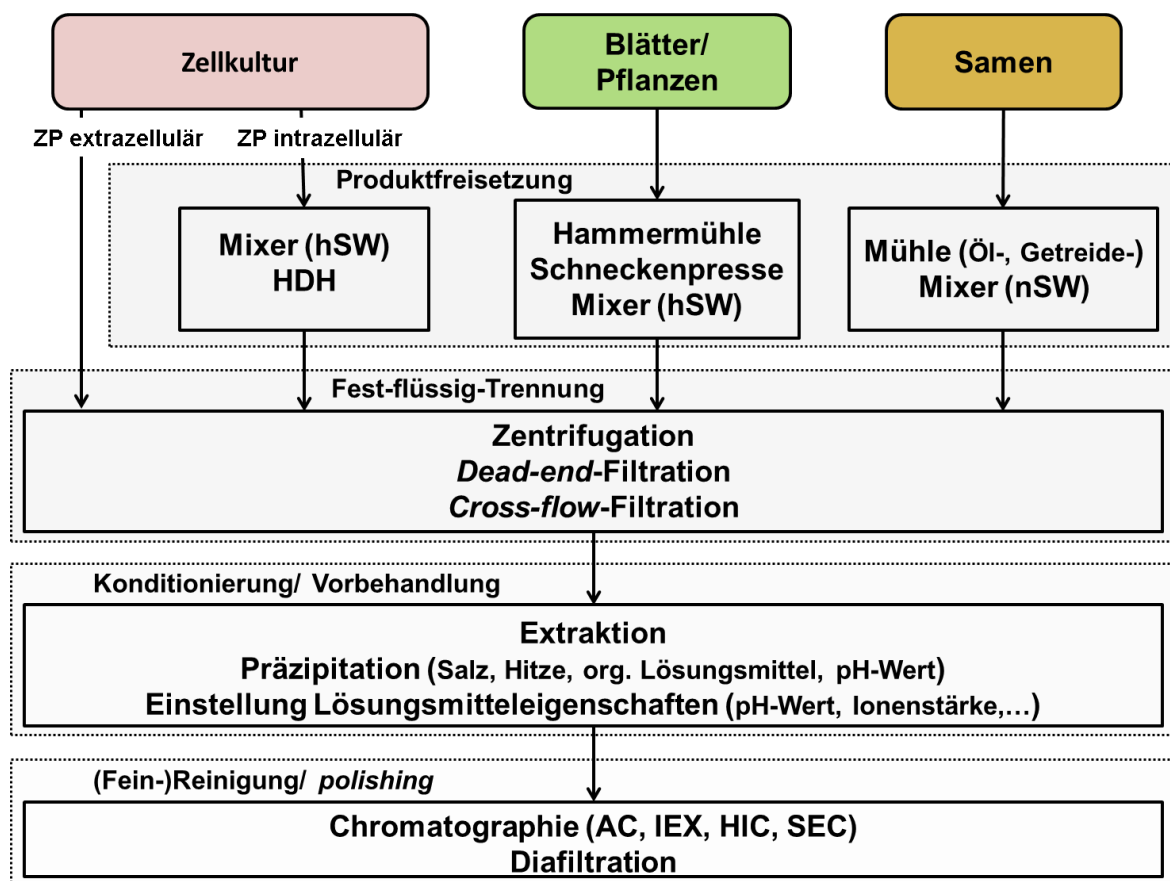


Abbildung 1-5: Technisches *Downstream Processing* für rekombinante Proteine (Schema, in Anlehnung an Wilken & Nikolov [Wilken und Nikolov, 2012]). ZP–Zielprotein; hSW–hohe Scherwirkung; nSW–niedrige Scherwirkung; HDH–Hochdruckhomogenisator; AC–Affinitätschromatographie; IEX–Ionenaustauschchromatographie; HIC–Hydrophobe Interaktionschromatographie; SEC–Größenausschlusschromatographie

Zu Beginn des Reinigungsverfahrens steht die Ernte der Zellen bzw. der Zellsysteme wie Blätter oder Pflanzen. Abhängig davon, ob das Zielprotein extra- oder intrazellulär vorliegt wird ohne oder mit Biomasse weiter gearbeitet. Bei intrazellulärem Vorliegen ist die Freiset-

zung des Zielproteins notwendig. Nicht-mechanische Verfahren wie z.B. ein enzymatischer Zellaufschluss sind grundsätzlich möglich, werden im technischen Maßstab jedoch nicht angewendet. Die Enzyme würden einen Kostenfaktor darstellen, der die ökonomische Skalierbarkeit der Methode verringert. Zusätzlich würden sie eine weitere Kontamination bedeuten. Der Zellaufschluss über Frier-Tau-Schritte wäre energetisch enorm anspruchsvoll und damit ebenso kostenintensiv. Ohne Anwendung zusätzlichen Mahlens gefrorenen Materials führt diese Methode für pflanzliche Systeme zu einer eher unbefriedigenden Freisetzung von Zielproteinen [Hassan et al., 2008].

Aus den vorgenannten Gründen sind daher mechanische Zellaufschlussmethoden die Mittel der Wahl. Pflanzenzellen nach einer Fermentation und Ernte können über Mixer mit hoher Scherwirkung (z.B. Polytron® von Kinematica AG, Schweiz) aufgeschlossen werden. Die gleiche Anwendung ist auch für die Proteinfreisetzung aus Tabakblättern etabliert [Buyel und Fischer, 2014]. Die Biomasse wird in der Regel vor dem Zellaufschluss mit Extraktionspuffer gemischt, weshalb bereits an dieser Stelle ein ausreichendes Verständnis für den folgenden Reinigungsprozess vorteilhaft ist. Je geringer das Volumen des Extraktionspuffers, desto schwieriger ist unter Umständen der Zellaufschluss mit Hilfe der verwendeten Mixer, da die Grundbedingung für ihre Funktionserfüllung das Vorliegen fließfähiger Systeme ist. Ein weiterer Nachteil ist der Verlust an Zielprotein. Die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile mittels Zentrifugation oder Filtration ist nicht vollständig, Pellet bzw. Filterkuchen enthalten eine gewisse Menge des Extraktes. Dieses Verlustvolumen ist unabhängig vom Gesamtvolumen. Bei größerem Gesamtvolumen sinkt folglich der relative Verlust des Zielproteins. Je höher das Volumen des Extraktionspuffers, desto höher ist im weiteren Verlauf das zu prozessierende Volumen und damit auch der Bedarf an Zusatzstoffen während der Konditionierungsphase (siehe Abbildung 1-5). Ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug auf den Extraktionspuffer ist der pH-Wert. Die Vakuolen der Zellen des Tabakblattes machen etwa 90 % seines Volumens aus, ihr Inhalt ist leicht sauer mit einem pH-Wert von etwa 5,5 [Balasubramaniam et al., 2003; Matsuoka et al., 1997; Owens und Poole, 1979]. Bei ungenügender oder falscher Pufferwirkung des Extraktionsmittels kann es passieren, dass bei Zellaufschluss der pH-Wert in der Suspension abfällt. Ein Zielprotein mit einem isoelektrischen Punkt (pI) im sauren Bereich kann dann unter Umständen unlöslich werden und ausfallen [Menzel et al., 2016b].

Aus Abbildung 1-5 wird ersichtlich, dass die Methoden der ersten beiden Schritte der Aufarbeitung plattformabhängig sind. Die Wahl des Verfahrens zum Zellaufschluss richtet sich nach der Art der Wirtszellen und dem Aufbau ihrer Zellmembranen und -wände. Bei der Abtrennung der unlöslichen Bestandteile sind Größe und Anzahl der abzuscheidenden Partikel

maßgeblich. Die weiteren Prozessschritte (Konditionierung und Feinreinigung) sind produktabhängig. Hier werden im Besonderen dessen Löslichkeit in Puffern oder organischen Lösungsmitteln bzw. seine Bindungseigenschaften an Chromatographiematerialien ausgenutzt. Das *Downstream Processing* verursacht bis zu 70 % der gesamten Produktionskosten rekombinanter Proteine [Sommerfeld und Strube, 2005]. Eine intelligente Reinigungsstrategie ist daher unumgänglich, um ein möglichst hohes Maß an Wirtschaftlichkeit zu garantieren. Die finale Reinheit des Zielproteins wird bestimmt durch die Anwendung. Es gilt der Grundsatz: So rein wie nötig, nicht so rein wie möglich.

1.1.4 Aufbau der Zielproteine

Alle vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zielproteine wurden von Wissenschaftlern des Leibniz-Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben zur Verfügung gestellt. Die Proteine wurden im Gewächshaus in Tabakpflanzen (stabile Transformanten) der Gattung *Nicotiana tabacum* produziert [Weichert et al., 2014]. In Abbildung 1-6 ist der modulare Aufbau der Zielproteine skizziert.



Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der untersuchten Zielproteine (nach [Weichert et al., 2014]). Jedes Gesamtprotein besteht aus vier spezifischen Aminosäuresequenzen: ein künstliches Spinnenseidenprotein (Q- bzw. K-MaSp1: künstliche Sicherheitsfadenseide, 1x- bzw. 4x-Flag: künstliche Fangspiralseide), ein Detektionspeptid (c-myc), ein Reinigungspolypeptid (100xELP) und ein Peptid zur Retention im sekretorischen Pfad (KDEL). Angegeben sind zusätzlich die theoretischen Molekulargewichte der Proteine. Q–Glutamin-tag; K–Lysin-tag

Das jeweilige Gesamtprotein bestand aus vier spezifischen Aminosäuresequenzen (siehe Tabelle 7-1). Den aminoterminalen (N-terminalen) Beginn stellte ein künstliches Spinnenseidenprotein dar. In diesem wurden typische Motive der Sicherheitsfaden- bzw. Fangspiralseide abgebildet. Für die MaSp1-Konstrukte waren das Poly-Alanin bzw. Poly-Glycin-Sequenzen, bei den Flag-Konstrukten GPGGX-Sequenzen (X=A, S, V, Y). In allen vier künstlichen Spinnenseidenproteinen war außerdem das GGX-Motiv (X=A, L, Q, Y) enthalten [Weichert et al., 2014].

Den N-Terminus der MaSp1-Proteine bildete ein Glutamin- (Q-) bzw. Lysin-(K-) tag. Diese Peptidsequenzen ermöglichen die Vernetzung der Proteine mit Hilfe einer rekombinanten Transglutaminase [Tanaka et al., 2004; Weichert et al., 2014]. Auf diesem Weg können post-translational Proteine mit (sehr) hohem Molekulargewicht erzeugt werden. Transglutaminasen gehören zur Enzymklasse der Transferasen (EC 2.3.2.13) und katalysieren den Acyltransfer der γ -Carboxamidgruppe eines Glutamins auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysins.

Der nächste Abschnitt der Aminosäuresequenz wurde vom Detektionspeptid c-myc (EQKILSEEDL) gebildet (UniProt: Q6LBK7). Spezifisch an dieses Peptid bindende Antikörper werden genutzt, um im Western Blot Zielproteine nachzuweisen. So kann der Verbleib

der Zielproteine in den jeweiligen Phasen während des Reinigungsverfahrens untersucht werden.

Das anschließende elastinartige Polypeptid (*elastin-like polypeptide* – ELP) besteht aus 500 Aminosäuren und weist ein theoretisches Molekulargewicht von 39 kDa auf. Die sequentielle Abfolge beruht auf der Arbeit von Meyer & Chilkoti und besteht aus der 100-fachen Wiederholung des Pentapeptids VPGXG, wobei $X=V:A:G=5:2:3$ ist [Meyer und Chilkoti, 1999; Weichert et al., 2014]. Das Polypeptid $(VPCXG)_{100}$ zeigt ein spezielles Agglomerationsverhalten. Unterhalb der sogenannten Transitionstemperatur (T_t) liegen die Moleküle ungeordnet vor mit wenigen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen. Eine Erhöhung der Temperatur auf bzw. über T_t führt zur Exposition und verstärkten Interaktion der hydrophoben Aminosäuren. Die Anzahl der die Hydrathülle bildenden Wassermoleküle nimmt ab. Final wird die Löslichkeit der Polypeptidmoleküle herabgesetzt [Li et al., 2001]. Das spezielle Agglomerationsverhalten des Peptids kann für einen reversiblen hitzeinduzierten Reinigungsschritt (*Inverse Transition Cycling* – ITC) genutzt werden (siehe Abbildung 1-7). Die hauptsächlichen Einflussfaktoren für das ITC sind die Länge des ELP's sowie die Ionenstärke und Temperatur der Lösung [Meyer und Chilkoti, 1999]. Durch passende Einstellung der Parameter kann das jeweilige Zielprotein ausgefällt und mittels Zentrifugation oder Filtration abgetrennt werden [Ge et al., 2006; Phan und Conrad, 2011; Weichert et al., 2014].

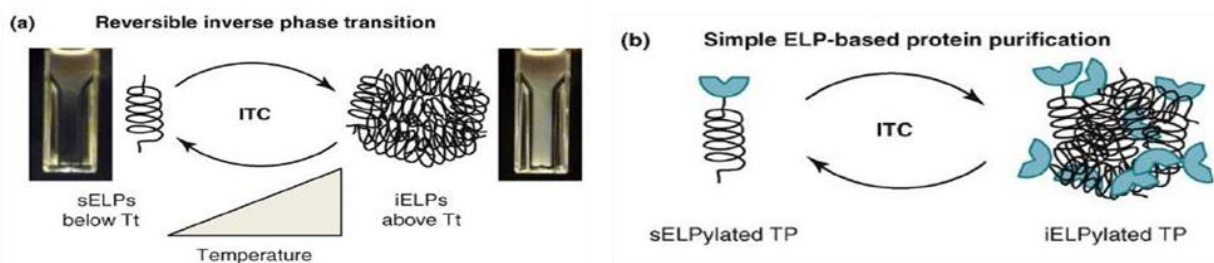


Abbildung 1-7: Hitzeinduziertes Agglomerationsverhalten ELPylierter Zielproteine [Floss et al., 2010]. (a) Elastinartige Polypeptide (ELP) sind in einem Puffer löslich (sELP; linkes Bild, Lösung in Küvette klar). Durch Temperaturerhöhung auf die Transitionstemperatur (T_t) wird die Agglomeration der Polypeptide induziert, diese werden unlöslich (iELP; rechtes Bild, Lösung in Küvette trüb). Dieser Vorgang wird als *Inverse Transition Cycling* (ITC) bezeichnet und ist vollständig reversibel. Die agglomerierten ELP's können z.B. über Zentrifugation oder Filtration abgetrennt werden. (b) ELP's können mit einem Zielprotein (*Target Protein*–TP) kovalent verbunden und *via* ITC gereinigt werden.

Die Kopplung rekombinanter Proteine mit ELP (ELPylierung) bietet neben der Möglichkeit zur Nutzung bei der Reinigung einen weiteren Vorteil. Durch das Polypeptid wird die Ausbildung sogenannter *Protein bodies* hervorgerufen. In diesen, vom endoplasmatischen Retikulum abgeschnürten Organellen, werden Proteine konzentriert gelagert und sind geschützt vor Abbau durch Proteasen [Conley et al., 2009].

Den Abschluss der Zielproteine bildet das Retentionssignal KDEL. Die Aminosäuresequenz Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin (KDEL) am Carboxy-terminalen (C-terminalen) Ende eines Proteins kennzeichnen dessen Zielort im endoplasmatischen Retikulum (ER). Die KDEL-Sequenz bewirkt, dass das gekennzeichnete Protein aus dem *cis*-Golgi-Apparat wieder ins ER zurück transportiert wird. Dieser Mechanismus ist wichtig für Proteine, die hauptsächlich im ER lokalisiert sind, aber aus diesem langsam herausdiffundieren bzw. andere Proteine aus dem ER heraus transportieren, wie z.B. das Immunglobulin-bindende Protein (*binding immunoglobulin protein* – BiP), [Alberts et al., 2004].

Die finalen Molekulargewichte der jeweiligen Zielproteine sind 102 kDa für Q- und K-MaSp1-100xELP und 59 bzw. 106 kDa für 1x-/4xFlag-100xELP. Für die beiden Sicherheitsfaden-Spinnenseidenanaloga Q- bzw. K-MaSp1-100xELP ist bereits eine Reinigungsmethode im Labormaßstab entwickelt worden. Dabei wird das oben beschriebene ITC-Verfahren angewendet. Die Abtrennung der Zielproteine erfolgt über eine Filtermembran, weswegen die Methode als *membrane-based Inverse Transition Cycling* (mITC) bezeichnet wird [Weichert et al., 2014].

1.2 Motivation

Künstliche Spinnenseidenproteine werden bereits im industriellen Maßstab hergestellt und unter anderem als Biosteel® oder Dragonsilk vermarktet. Als relevante Anwendungsbereiche werden schusssichere Kleidung, lange haltbare Schuhe und Arbeitskleidung, aber auch die Verwendung im medizinischen Sektor als Hydrogel, Implantatbeschichtung oder Kapsel angegeben [AmSilk, 2017; KBL, 2017]. Dabei wird eine Konkurrenzsituation zu bereits etablierten Artikeln forciert. Um in diesem Wettbewerb bestehen zu können ist es in der Regel notwendig, bessere Produkte anzubieten. Das ist z.B. durch die Verwendung künstlicher Spinnenseide zur Ummantelung von Brustimplantaten möglich. Dadurch können typische Abstoßungsreaktionen vermieden werden [Zeplin et al., 2014]. Schutzkleidung aus spinnenseidenbasierten Materialien stellt eine weitere vielversprechende Anwendungs idee dar. Spinnenseide nimmt bei gleicher Zugfestigkeit bis zum dreifachen der kinetischen Energie von Kevlar® 29 auf [DuPont, 2017; Stauffer et al., 1994]. Ihr Einsatz kann daher zu einer erhöhten Sicherheit für Polizisten und Soldaten beitragen. Doch unabhängig von der möglichen hohen Wertigkeit eines Produktes ist es unabdingbar, dieses in ökonomischer Weise zu produzieren. Dieser Produktionsprozess umfasst die Proteinsynthese in einem Organismus genau so wie die anschließende Reinigungsprozedur und die Verarbeitung hin zur fertigen Ware.

Der apparative Aufwand bei der Nutzung von Pflanzen als biotechnologische Produktionssysteme ist, z.B. im Vergleich zu Fermentationen von *E. coli* oder auch Säugerzellen, eher gering. Sie bieten daher die Möglichkeit, rekombinante Proteine mit geringem ökonomischen Aufwand zu synthetisieren [Richard et al., 2013]. In der anschließenden Reinigung fallen bis zu 70 % der gesamten Produktionskosten an, auch bedingt durch chromatographische Verfahren [Degerman et al., 2008; Sommerfeld und Strube, 2005]. Um also Produktionsprozesse für künstliche Spinnenseide möglichst wirtschaftlich zu gestalten ist es nötig, diese Kosten zu verringern. Dies kann z.B. durch die Verfolgung alternativer, Chromatographieschritte vermeidender Strategien erzielt werden. In Frage kommende Methoden sind dann unter anderem Filtration und/oder Fällungsverfahren mit anschließender Zentrifugation [Lojewska et al., 2015].

1.3 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines im Maßstab vergrößerbaren Prozesses zur Reinigung künstlicher Spinnenseidenproteine, welche in Tabakpflanzen produziert wurden. Diese können z.B. im medizinischen Sektor als Matrix für adhäsive Zellen Anwendung finden.

Die Pflanzen der Gattung *Nicotiana tabacum* wurde von Wissenschaftlern des Leibniz-Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben zur Verfügung gestellt. Es war zu Beginn notwendig, die Biomasse so zu präparieren, dass sie für den Zeitraum der Experimente ohne nennenswerten Verlust der Zielproteine eingelagert werden konnte.

Im Anschluss wurde die Abtrennung der Zielproteine von einem Großteil kontaminierender Substanzen wie Wirtszellproteine, Polyphenole und unlöslichen Zellbestandteilen untersucht. Ein Ziel bei der Reinigung war die Vermeidung chromatographischer Schritte, um eine kostengünstige Maßstabsvergrößerung des Prozesses zu ermöglichen.

Das Reinigungsverfahren sollte zu Beginn für die zwei Zielproteine Q- und K-MaSp1-100xELP etabliert werden. Anschließend wurde untersucht, inwiefern sich der Prozess für die Gewinnung eines weiteren Zielproteins anwenden lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendung fremder Daten

In dieser Arbeit werden Daten aus der betreuten Masterarbeit von Thorben Schulz gezeigt [Schulz, 2015]. Die Versuche (siehe Kapitel 3.4, 3.7.1 und 3.7.2) wurden gemeinsam geplant und ausgewertet.

2.2 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien („k. A.“ – keine Angabe)

Bezeichnung	Lieferant	Best.-Nr.	Reinheit [%]
Aceton	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	7328.2	99,6
Acrylamid 4K-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt	A0951	30
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	9592.3	≥98
Antikörper, primär	IPK Gatersleben	k. A.	k. A.
Antikörper, sekundär	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland	A3562	k. A.
BCIP®/NBT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland	B565	k. A.
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	A512.1	k. A.
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	4984.1	≥99,8
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	3738.5	100
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	K928.3	≥98
Formaledehyd	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	4979.1	37
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	3783.4	≥99,5
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	T873.2	≥98,5
Harnstoff (Urea)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	X999.3	≥99,5
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe		≥99
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	3904.1	≥99
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	T145.3	k. A.
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	7342.1	≥99,9
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	A135.2	≥99,5
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	3957.1	≥99,5
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland	04269	≥98
Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	1057.1	20
Natriumthiosulfat-pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	P034.2	≥99,5

Bezeichnung	Lieferant	Best.-Nr.	Reinheit [%]
PPL-Marker	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA	SM1819	k. A.
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	4625.2	37
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	6207.1	≥99,9
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	2367	k. A.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	4855.3	≥99,9
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe	4227.2	k. A.

2.3 Geräte

Sämtliche verwendete Geräte sind in Tabelle 2-2 zusammengestellt.

Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Dialysemembran	MWCO 6-8 kDa: Spectra/Por®1; MWCO 15 kDa: Spectra/Por®7	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hamilton-Spritze	Microliter-Spritze 25 µL	Hamilton Bonudaz AG, Bonudaz, Schweiz
Haushaltsmixer	Braun 4184	Braun GmbH, Kronberg, Deutschland
Kartoffelstampfer	Fackelmann 40559	Fackelmann GmbH & Co.KG, Hersbruck, Deutschland
Lyophilisator	Lyovac GT2-E	Steris GmbH, Huerth, Deutschland
Ofen	UFE-500	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Pipette	Eppendorf Research 20, 100, 200, 1000, 5000	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SpeedVac	Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SDS-PAGE-Einheit		Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Table Top Cutter	R10 v.v.	Robot Coupe, Vincennes, Frankreich
Temperaturmessfühler	Ama-digit ad 15th	Amarell GmbH & Co.KG, Kreuzweithem, Deutschland
	testo 826-T2	Testo AG, Lenzkirch, Deutschland
Thermoblock	Thermostat Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage	572-37	Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
	APX-100, APX-153	Denver Instruments, New York, USA
	CP3202P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Western Blot Apparatur	Semi-dry Blotter	Biostep® GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Mikrowelle	NN-SD452W	Panasonic, Hamburg, Deutschland
	NN-SD271S	
Zentrifuge	Mikrozentrifuge 5415 R; Rotor F45-24-11	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Zentrifuge 5810R; Aus- schwingrotor A-4-81	
	Avanti J-30i; Rotor JA- 10; JA-30.50 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
	CEPA Z41G	Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Deutschland

2.4 Puffer und Lösungen

Sämtliche für die Versuche verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2-3 zusammen-
gestellt.

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen (k.A.–keine Angabe)

Bezeichnung	Molarität Stoff	pH	Einwaage für 1 L	Bemerkungen zur Herstellung
Extraktionspuffer	50 mM Tris	8,0	6,06 g Tris	pH-Wert ein- stellt mit 4 M HCl
Reaktionspuffer	50 mM Tris 300 mM NaCl	8,0	6,01 g Tris 17,53 g NaCl	pH-Wert ein- stellt mit 4 M HCl
6 M Urea	6 M Urea	k.A.	360,36 g Urea	-
cITC-Lösung	300 mM NaCl 500 mM NaCl 750 mM NaCl 1.000 mM NaCl 2 M NaCl	k.A.	17,53 g NaCl 29, 22 g NaCl 43,83 g NaCl 58,44 g NaCl 116,88 g NaCl	-
Natriumchlorid- Lösung	4 M NaCl	k.A.	233,76 g NaCl	-
Natriumacetat- Lösung	4 M Na-Ac	k.A.	328,12 g Na-Ac	-
Natriumnitrat- Lösung	4 M Natrium-NO ₃	k.A.	339,96 g NaNO ₃	-
Lithiumchlorid- Lösung	4 M LiCl	k.A.	169,56 g LiCl	-
Kaliumchlorid- Lösung	4 M KCl	k.A.	298,20 g KCl	-
Magnesiumchlorid- Lösung	2 M MgCl ₂ ·6H ₂ O	k.A.	406,6 g MgCl ₂ ·6H ₂ O	-
Calciumchlorid- Lösung	2 M CaCl ₂	k.A.	221,96 g CaCl ₂	-

2.5 Ernte, Präparation und Lagerung

Die das jeweilige Zielprotein (siehe Tabelle 7-1 im Anhang, Seite 87) enthaltenden Tabakpflanzen wurden am IPK in Gatersleben durch Abbrechen bzw. Abschneiden des Stängels knapp über dem Erdboden geerntet. Anschließend erfolgte der Transport für ca. 60 min bei ~ 18 °C nach Halle. Das Entblättern wurde im Verlauf der folgenden 3 h bei 4 °C bzw. 22 °C durchgeführt.

Die hauptsächliche Präparation der Biofeuchtmasse (BFM) erfolgte auf drei Wegen. Für Versuche im Maßstab bis 50 g wurden die frischen Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend mit Hilfe eines Kartoffelstampfers grob zerkleinert. Im Ergebnis wurde auf diesem Wege BFM_{fr} erhalten. Die Biomasse größerer Maßstäbe wurde entweder zu je 300 g in einer Mikrowelle bei 1 kW für 7 min inkubiert und ergab BFM_{MW} oder zu 1,5 kg in 70 L Leitungswasser bei mindestens 80 °C für 5 min inkubiert und ergab BFM_{bl} . Alle Präparationen wurden bis zur weiteren Verwendung bei höchstens -20 °C gelagert.

Ein geringer Anteil der geernteten BFM wurde getrocknet. Dafür wurden die Blätter aufgefädelt und entweder im Ofen für 3,5 h bei 80 °C und 70 % Lüfterleistung oder im Technikum für 35 d bei Umgebungsbedingungen (~ 22 °C) getrocknet.

2.5.1 Probenanlegung für SDS-PAGE

Nach Mörsern in flüssigem Stickstoff wurden jeweils ~ 50 mg Biomasse zur Probenanlegung verwendet. Frische Biomasse (BFM_{fr}) wurde entweder direkt oder nach Inkubation in einer Mikrowelle (1.000 W, 4 min) mit der dreifachen Menge Probenpuffer versetzt und inkubiert (5 min, 99 °C). Biomasse, die vor der Einlagerung thermisch behandelt worden war (BFM_{MW} , BFM_{bl}), wurde in einer Mikrowelle inkubiert (1.000 W, 4 min) und mit der dreifachen Menge Probenpuffer versetzt und inkubiert (5 min, 99 °C). Getrocknete Biomasse wurde in einer Mikrowelle inkubiert (1.000 W, 4 min) und mit der 30-fachen Menge Probenpuffer versetzt und inkubiert (5 min, 99 °C).

2.6 Zellaufschluss

Im kleinsten Maßstab wurden 50 g BWM1 in 150 mL vorgeheiztem (90 °C) Extraktionspuffer resuspendiert und für 1 h bei >90 °C inkubiert [Scheller et al., 2001]. Der Zellaufschluss erfolgte für 10x30 s bei maximaler Leistung mit Hilfe eines Handmixers (Braun 4184).

Im mittleren Maßstab wurden 300 g BFM_{MW} für mindestens 12 h bei 4 °C aufgetaut, mit 450 mL Leitungswasser (4 °C) vermischt und anschließend wie oben beschrieben aufgeschlossen.

Im Pilotmaßstab wurden 5-6 kg BFM_{MW} nach dem Auftauen mit Leitungswasser vermischt (4 °C, BFM:Leitungswasser = 1:1 (w/v)) und für 5 min bei maximaler Geräteleistung mit einem Table Top Cutter (R10, Robot Coupé) aufgeschlossen.

2.7 Fraktionierende Acetonfällung

Die für eine fraktionierende Fällung benötigte Acetonkonzentration wurde in einem Vorversuch ermittelt. Nach Zellaufschluss im 50 g-Maßstab wurden jeweils 250 µL Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt. 1 mL eines Aceton-dH₂O-Gemischs wurde hinzugegeben, um den Acetongehalt (c_A) von 10-70 % (v/v) einzustellen. Für 0 bzw. 80 % (v/v) c_A wurde 1 mL dH₂O bzw. reines Aceton zugegeben (siehe Tabelle 2-4). Nach manuellem Mischen, Inkubation für 30 min bei 4 °C und Zentrifugation (16.100 g, 5 min, 4 °C) wurde 1 mL des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert. Überstände und feuchte Pellets wurden in einer SpeedVac getrocknet (12 h, 45 °C), und jeweils in 50 µL bzw. 440 µL Probenpuffer resuspendiert/resolubilisiert und 5 min bei 99 °C inkubiert.

Tabelle 2-4: Pipettierschema zur Herstellung von 1.500 µL Stammlösung für den Vorversuch zur fraktionierenden Acetonfällung. $c_{A,Ziel}$ –Aceton-Zielkonzentration im Versuchsansatz; $c_{A,SL}$ –Acetonkonzentration in der Stammlösung; $V_{dH_2O,SL}$ –zu pipettierendes Volumen dH₂O; $V_{A,SL}$ –zu pipettierendes Volumen reines Aceton

$c_{A,Ziel}$ [%]	$c_{A,SL}$ [%]	$V_{dH_2O,SL}$ [µL]	$V_{A,SL}$ [µL]
0	0	1.500	0
10	13	1.315	188
20	25	1.125	375
30	38	938	563
35	44	844	656
40	50	750	750
45	56	656	844
50	63	563	938
55	69	469	1.030
60	75	375	1.125
70	88	188	1.315
80	100	0	1.500

Für die Versuche im 50 g- und 300 g-Maßstab erfolgte die Zugabe des Acetons zu den Suspensionen der BFM_{fr} und BFM_{MW} bei 10 °C. Die Acetonkonzentration wurde schrittweise von

0 auf 70 % (v/v) erhöht. Nach Inkubation (30 min, 4 °C) wurden jeweils Proben genommen und zentrifugiert (16.100 g, 5 min, 4 °C). Aufgrund des steigenden Verdünnungsfaktors wurde das Probevolumen wie in Tabelle 2-5 angegeben ebenfalls schrittweise erhöht. Die Probenvorbereitung wird in Kapitel 2.7.1 dargestellt.

Tabelle 2-5: Probevolumina bei fraktionierender Acetonfällung.

c_A [%]	0	30	35	40	45	50	60	70
Probevolumen [μL]	500	714	769	833	909	1.000	1.250	1.670

Im Pilotmaßstab wurde Zellsuspension aus 5-6 kg BFM_{MW} mittels einer Hydropresse filtriert (max. 3 bar, 30 min). Als Filtermembran diente ein Moptuch. Der Filterkuchen wurde mit 1 L Leitungswasser gewaschen, gefolgt von einem zweiten Filtrationsschritt (max. 3 bar, 1 L Filtrat). Die beiden Filtrate wurden vereinigt, 16 h bei 4 °C gelagert, und mittels Zentrifugation in einer Röhrenzentrifuge geklärt (10 % Pumpleistung, 17.000 g). Der Überstand wurde mit Aceton versetzt (40 % c_A (v/v)), inkubiert (4 °C, 30 min) und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Zugabe weiteren Acetons zum Überstand ($c_A=70$ % (v/v)) und Vorgehens wie oben beschrieben wurde das gewonnene Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Probenahme und -vorbereitung der löslichen Fraktionen erfolgte wie in Tabelle 2-5 und Kapitel 2.7.1 angegeben. Die Suspensionsprobe (500 μL) wurde getrocknet (SpeedVac, 12 h, 45 °C), mit 870 μL Probenpuffer versetzt, bei 22 °C mind. 12 h inkubiert, manuell mit Hilfe einer Pipette resuspendiert/resolubilisiert und 5 min bei 99 °C inkubiert.

2.7.1 Probenanlegung für SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE-Analyse wurden alle Proben der fraktionierenden Acetonfällung getrocknet (SpeedVac, 12 h, 45 °C), anschließend in Probenpuffer resuspendiert/resolubilisiert und 5 min bei 99 °C inkubiert. Ziel war es, innerhalb eines Versuches pro löslicher Fraktion das gleiche SDS-PAGE-Probengewicht ($m_{\text{SDS-PAGE-Probe}}$) einzustellen. Um die Vergleichbarkeit der SDS-PAGE-Analyse für alle Versuche gewährleisten zu können, wurde das Probengewicht der löslichen Fraktionen nach dem in Tabelle 2-6 angegebenen Muster angelegt. Die Parameter für den acetonfreien Überstand im Mikromaßstab bildeten die Berechnungsgrundlage. In den größeren Maßstäben (0,3-6 kg BFM_{MW}) wurde das Probevolumen ($V_{\text{Probe},0}$) erhöht und/oder der Verdünnungsfaktor (VF) verringert und davon ausgehend das Probengewicht ($m_{\text{SDS-PAGE-Probe}}$) ermittelt nach

$$m_{\text{SDS-PAGE-Probe,aktuell}} = \frac{VF_{\text{mikro}} \cdot m_{\text{SDS-PAGE-Probe,mikro}}}{V_{\text{Probe},0,\text{mikro}}} \cdot \frac{V_{\text{Probe},0,\text{aktuell}}}{VF_{\text{aktuell}}} \quad \text{Gl. 1}$$

Die Einstellung des Probengewichts erfolgte durch Zugabe von Probenpuffer. Das Probevolumen wurde innerhalb des jeweiligen Versuches wie in Tabelle 2-5 angegeben an die steigender Acetonkonzentration angepasst, das Probengewicht blieb gleich.

Tabelle 2-6: Parameter der SDS-PAGE-Proben der löslichen Fraktionen bei fraktionierender Acetonfällung. Ausgehend vom Mikromaßstab wurde in den größeren Maßstäben das Probevolumen für den acetonfreien Überstand ($V_{\text{Probe},0}$) erhöht und/oder der Verdünnungsfaktor [VF] verringert. Davon ausgehend erfolgte die Bestimmung des Probengewichts ($m_{\text{SDS-PAGE-Probe, fett}}$). Das Probevolumen wurde innerhalb des jeweiligen Versuches wie in Tabelle 2-5 angegeben an die steigender Acetonkonzentration angepasst, das Probengewicht blieb gleich. Die finale Einstellung des Probengewichts erfolgte durch Zugabe von Probenpuffer.

Maßstab	mikro	klein	mittel	Pilot
$V_{\text{Probe},0}$ [μL]	200	500	500	500
$m_{\text{SDS-PAGE-Probe}}$ [mg]	60	150	150-240	300
VF [-]	4	4	4-2,5	2

2.7.2 Bestimmung der Restfeuchte des Filterkuchens

Der nach zweifacher Filtration angefallene Filterkuchen wurde gewogen. Anschließend wurden 3x100 g im Ofen 3 d bei 40 °C und 70 % Lüfterleistung getrocknet. Der ermittelte Masseverlust entsprach der Restfeuchte in [%].

2.8 Waschen

2.8.1 Waschen als Vorexperiment

Das Zielprotein wurde im mittleren Maßstab (300 g BFM_{MW}) via fraktionierender Acetonfällung im Pellet aufkonzentriert und je 1/3 mit Puffer der pH-Werte 4,0 (100 mM Natriumacetat), 7,0 (100 mM Natriumphosphat) und 11,0 (100 mM Natriumcarbonat) vermischt und 1 h bei ~22 °C gerührt.

2.8.2 Waschen von Q-/K-MaSp1-100xELP-haltigem Pellet

Das Zielprotein wurde via fraktionierender Acetonfällung im Pellet aufkonzentriert, mit dem sechsfachen Volumen (v/w) Leitungswasser gewaschen (3 h, 25 °C) und zentrifugiert (17.700 g, 30 min, 4 °C). Anschließend wurde es lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert oder direkt verarbeitet.

2.8.3 Waschen von 1xFlag-100xELP-haltigem Pellet

Das Zielprotein wurde via fraktionierender Acetonfällung im Pellet aufkonzentriert und mit dem vierfachen Volumen (v/w) 2 M NaCl gewaschen (30 min, 4/40 °C). Durch Zentrifugation (3.220 g, 30 min, 4/40 °C) wurde es im Pellet aufkonzentriert.

2.9 Reinigung durch zentrifugationsbasiertes *Inverse Transition Cycling* (cITC)

2.9.1 cITC als Vorexperiment

Das Verfahren basiert auf der Arbeit von [Meyer und Chilkoti, 1999]. Das gewaschene lyophilisierte Pellet wurde im 22-fachen Volumen 6 M Urea, das gewaschene nicht lyophilisierte Pellet im neunfachen Volumen 6 M Urea (40 °C) resolubilisiert. Der Überstand nach Zentrifugation (3.220 g, 15 min, 40 °C) wurde anschließend gegen das 100-fache Volumen Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 300, 500, 750 oder 1.000 mM NaCl) dialysiert (4x2 h, 4 °C; MWCO: 15 kDa). Die Dialyseproben wurden im Wasserbad auf 40 °C erhitzt und zentrifugiert (3.220 g, 30 min, 40 °C). Das gewonnene Pellet wurde nach der Lyophilisation bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.9.2 cITC zur Gewinnung von Q-/K-MaSp1-100xELP

Das gewaschene Pellet wurde im neunfachen Volumen 6 M Urea-Lösung resolubilisiert (40 °C). Der Überstand nach Zentrifugation (3.220 g, 15 min, 40 °C) wurde anschließend gegen das 100-fache Volumen Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 750 mM NaCl) dialysiert (2x2 h, 4 °C; MWCO: 50 kDa). Die Dialyseprobe wurden im Wasserbad auf 40 °C erhitzt und zentrifugiert (3.220 g, 30 min, 40 °C). Das gewonnene Pellet wurde nach der Lyophilisation bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.9.3 cITC zur Gewinnung von 1xFlag-100xELP

Das gewaschene Pellet wurde resolubilisiert im 13-fachen Volumen dH₂O (4 °C). Der Überstand nach Zentrifugation (3.220 g, 15 min, 4 °C) wurde anschließend gegen das 100-fache Volumen 2 M NaCl dialysiert (2x2 h, 4 °C; MWCO: 15 kDa). Die Dialyseprobe wurden im Wasserbad auf 40 °C erhitzt und zentrifugiert (3.220 g, 30 min, 40 °C). Das gewonnene Pellet wurde nach der Lyophilisation bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.10 Polyphenolbestimmung

Die Methode beruht auf einer Arbeit von Gecchele und Kollegen, mit der reduzierende Verbindungen wie Polyphenole nachgewiesen werden können [Gecchele et al., 2014]. Proben der jeweiligen löslichen Fraktion wurden 1:50 verdünnt. 300 µL der Verdünnung wurden mit 150 µL Folin-Ciocalteu-Reagenz versetzt, 1 min bei ~22 °C inkubiert. Nach Zugabe von 600 µL 20 %-iger (w/v) Na₂CO₃-Lösung und 90 minütiger Inkubation bei 22 °C wurde die Absorption bei 725 nm bestimmt.

2.11 Vernetzung

Zur Vernetzung der Zielproteine wurde eine thermostabile Variante einer mikrobiellen Transglutaminase (mTG) mit der Bezeichnung mTG-S2P verwendet [Marx et al., 2008]. Die pro-mTG wurde produziert, mit Proteinase K aktiviert und gereinigt wie in Sommer et al. beschrieben [Sommer et al., 2012; Sommer et al., 2011]. Im Anschluss erfolgte die Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, wobei das Enzym präzipitierte. Nach manueller Homogenisierung, Aliquotierung und Zentrifugation (16.100 g, 5 min, 4 °C) wurde die Überstände verworfen und die Pellets gelagert (-80 °C). Die Resolubilisierung des Enzyms wurde erreicht, indem ein aliquotiertes Pellet mit 1 mL Reaktionspuffer (siehe Tabelle 2-3) versetzt, vorsichtig mit Hilfe einer Pipette vermischt und 2x30 min bei 4 °C inkubiert wurde.

Die Bestimmung der Aktivität des Enzyms erfolgte nach Folk [Folk und Cole, 1966].

Das jeweilige Q- und K-MaSp1-100xELP enthaltende Pellet nach fraktionierender Acetonfällung mit 70 % (v/v) Aceton (siehe Kapitel 2.7, 300 g-Maßstab) wurde gewaschen (siehe Kapitel 2.8) und in 6 M Urea-Lösung resolubilisiert. Nach Dialyse gegen Reaktionspuffer (siehe Tabelle 2-3, Seite 24) wurden je 625 µL Zielprotein-haltige Lösung gemischt, mit 1,56 U mTG-S2P oder mit Dialysepuffer versetzt und bis zu 20 h bei 25 °C inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach 1, 5 und 20 h. Nach fünfständiger Inkubationsdauer wurde im Ansatz mit mTG-S2P durch Zugabe weiterer 1,56 U die theoretisch enthaltene Enzymaktivität verdoppelt. Die Proben wurden 1:2 mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99 °C inkubiert.

2.12 Detektierbarkeit des Zielproteins

10 mg Pellet nach cITC wurden in 1 mL 6 M Urea-Lösung gelöst, gegen dH₂O dialysiert und zentrifugiert (16.100 g, 5 min, 22 °C). Im Überstand wurde durch Vermischen im Verhältnis 1:1 mit dH₂O bzw. Salzlösungen eine Konzentration von 2 M Natrium- oder Chloridionen mit korrespondierenden Gegenionen eingestellt (siehe Tabelle 2-3). Anschließend erfolgte die Probenpräparation für SDS-PAGE durch Verdünnung der Probe 1:2 mit Probenpuffer und Inkubation für 5 min bei 99 °C.

2.13 Analytik

2.13.1 Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE

Eine einfache Methode zum Nachweis von Proteinen ist die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei ist es in der Regel möglich, Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen. Die Methode wurde in Anlehnung an die Arbeit von Lämmli durchgeführt [Laemmli, 1970]. Alle verwendeten Reagenzien und Puffer sind in Tabelle 2-7 und Tabelle 2-8 (Seite 32) aufgeführt.

Alle nicht gesondert aufgeführten Proben (siehe Kapitel 2.7) wurden wie folgt angelegt. Überstände wurden 1:2 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Pelletproben wurden durch Zentrifugation von z µL Probe (16.100 g, 5 min) gewonnen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 2·z (Q-/K-MaSp1-100xELP) bzw. 1·z (1xFlag-100xELP) µL Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert.

Pro Tasche wurden 10 µL Probe aufgetragen. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte über Silberfärbung nach Blum oder über Western Blot [Blum et al., 1987]. Zur Abschätzung des Molekulargewichts aufgetrennter Proteine wurde der Marker „Prestained Protein Ladder“ (PPL) von ThermoFisher (#26616; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Für Silberfärbung bzw. Western Blot wurden 2,5 bzw. 5 µL PPL aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte zweistufig. Für ein Gel: Schritt 1 - 300 V, 100 mA, 6 min; Schritt 2 - 300 V, 30 mA, 40 min. Für zwei Gele: Schritt 1 - 300 V, 100 mA, 6 min; Schritt 2 - 300 V, 60 mA, 40 min.

Tabelle 2-7: Reagenzien für SDS-PAGE nach Lämmlli [Laemmli, 1970].

Reagens / Puffer	Zusammensetzung	Anmerkungen
Trenngelpuffer	181,8 g Tris 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung pH 8,8	pH-Wert eingestellt mit 4 M HCl
Sammelgelpuffer	60,6 g Tris 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung pH 6,8	pH-Wert eingestellt mit 4 M HCl
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %, w/v) Mix 29:1	290,9 g/L Acrylamid 9,1 g/L Bisacrylamid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
APS-Lösung (gesättigt)	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	-
Kathodenpuffer (10x konzentriert)	30,28 g Tris 144 g Glycerin 50 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung	vor Verwendung 1:10 verdünnt mit dH_2O
SDS-Probenpuffer mit 6 M Urea	12,11 g Tris 125 mL 20 % (w/v) SDS 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 10 % (w/v) M Glycerin 360,36 g Urea	-

Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Trenngele und Sammelgele nach Laemmli, 1 mm stark [Laemmli, 1970]. TA-Totalacrylamid

Reagens / Puffer	2 Trenngele 12,5 % TA-Gehalt	2 Sammelgele 4,5 % TA-Gehalt
Gelpuffer	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid/ Bisacrylamid	4,2 mL	0,75 mL
deionisiertes Wasser	3,3 mL	3,0 mL
TEMED	10 μL	10 μL
gesättigtes APS	20 μL	8 μL

2.13.2 Färbung von SDS-PA-Gelen mittels Silber

2.13.2.1 Hintergrund und Nachweisprinzip

Die Färbung von Proteinen mit Hilfe von Silberionen basiert auf der Arbeit von Blum und Kollegen [Blum et al., 1987; Buyel et al., 2015]. Die Silberionen binden an saure und nukleophile Reste der Aminosäurekette und werden anschließend zu elementarem Silber reduziert.

2.13.2.2 Silberfärbung

Im direkten Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde das PA-Gel, wie in Tabelle 2-9 beschrieben, behandelt.

Tabelle 2-9: Ablaufschema der Silberfärbung in Anlehnung an [Blum et al., 1987]. Pro Gel wurden 100 mL der jeweils angegebenen Lösung verwendet. Sensitivier-, Färbe- und Entwicklösung sollten möglichst frisch hergestellt werden.

Schritt	Lösung	Dauer
Fixierung	500 mL Methanol 120 mL Essigsäure (100 %) 0,5 mL Formaldehyd (37 %, w/v) mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt	≥2 h
1. Waschen	50 % (v/v) Ethanol	3 x 20 min
Sensitivierung	0,2 g/L Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	1 min
2. Waschen	dH ₂ O	3 x 20 s
Färbung	0,5 g AgNO ₃ 187,5 µL Formaldehyd (37 %, w/v) mit dH ₂ O auf 250 mL aufgefüllt	≥30 min
3. Waschen	dH ₂ O	2 x 20 s
Entwicklung	15 g NaCO ₃ 5 mL 0,2 g/L Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O-Lösung 125 µL Formaldehyd (37 %, w/v) mit dH ₂ O auf 250 mL aufgefüllt	gewünschte Färbeintensität
Abstoppen	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure (100 %)	10 min
4. Waschen	50 % (v/v) Methanol	1 min

2.13.3 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf eine Membran übertragen. Anschließend erfolgt der Nachweis des Zielproteins mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2-10 gegeben.

Tabelle 2-10: Puffer und Reagenzien für Western Blot [Conrad et al., 1998]. Der primäre Antikörper wurde produziert nach der Methode von Evan [Evan et al., 1985].

Reagens / Puffer	Zusammensetzung	Anmerkungen
Western-Puffer	9,96 g Tris 21,04 g NaCl pH 7,8	Reagenzien in 800 mL dH ₂ O aufgelöst, pH 7,8 mit 4 M HCl eingestellt, im Maßkolben mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
Transferpuffer	3,03 g Tris 14,41 g Glycerin 5 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 200 mL Methanol (100 %)	Reagenzien in 800 mL dH ₂ O aufgelöst, im Maßkolben mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
PBS-Puffer	8,01g NaCl 0,2 g KCl 1,78 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,27 g KH ₂ PO ₄ pH 7,6	Reagenzien in 800 mL dH ₂ O aufgelöst, pH 7,6 mit 4 M NaOH eingestellt, im Maßkolben mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
5 % (w/v) Magermilchlösung	50 g/L Magermilchpulver	Pulver resuspendiert in 800 mL Western-Puffer, im Maßkolben mit Western-Puffer auf 1 L aufgefüllt
0,5 % (w/v) Magermilchlösung	5 g/L Magermilchpulver	5 % (w/v) Magermilchlösung 1:10 mit Western-Puffer verdünnt
primärer Antikörper-Lösung	Anti-c-myc	von IPK Gatersleben
sekundärer Antikörper-Lösung	Anti-Maus IgG-AP	von Sigma-Aldrich
Substratlösung	BCIP®/NBT	Tablette aufgelöst in 10 mL dH ₂ O

2.13.3.1 Elektrobplot

Sechs Zuschnitte des Whatman®-Filterpapiers wurden vor dem Elektrobplot 15 min in Transferpuffer eingeweicht. Im direkten Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proben (siehe Kapitel 2.13.1) erfolgte der Transfer der Proteine vom PA-Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Drei Zuschnitte wurden auf die Anode gelegt und durch Rollen eines Reagenzglas auf dem Stapel von Luftblasen befreit. Nach Auflegen der Nitrocellulosemembran und des PA-Gels wurden die verbliebenen Zuschnitte aufgelegt, gefolgt vom erneuten Ausrollen enthaltener Luftblasen. Der Elektrobplot wurde 1 h bei 30 V und 250 mA durchgeführt.

2.13.3.2 Detektion

Die Detektion des Zielproteins mittels Western Blot erfolgte wie in Tabelle 2-11 dargestellt.

Tabelle 2-11: Ablaufschema der Zielproteindetektion mit Hilfe von Antikörpern.

Schritt	Lösung	Dauer
Blocken	10 mL 5 % Magermilchlösung	≥ 3 h
primäre Antikörperbindung	10 mL 5 % Magermilchlösung 200 µL primäre Antikörper-Lösung	≥ 2 h
1. Waschen	10 mL 0,5 % Magermilchlösung	3 x 10 min
sekundäre Antikörperbindung	10 mL 5 % Magermilchlösung 5 µL sekundäre Antikörper-Lösung	≥ 1 h
2. Waschen	10 mL 0,5 % Magermilchlösung	2 x 5 min
3. Waschen	10 mL Transferpuffer	2 x 5 min
4. Waschen	10 mL PBS-Puffer	2 x 5 min
Detektion	10 mL Substratlösung	gewünschte Intensität
5. Waschen	dH ₂ O	abspülen

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Präparation der Biomasse

Die in dieser Arbeit verwendete *Nicotiana tabacum*-Biomasse wurde im Spätsommer/ Herbst in den Jahren 2013 und 2014 geerntet. Da sie nicht direkt verarbeitet werden konnte war es nötig, geeignete Lagerungsbedingungen zu identifizieren. Besonderes Augenmerk war dabei auf in den geernteten Tabakblättern enthaltene Proteasen zu legen. Diese können bei Lagerung und Verarbeitung der Biomasse einen Abbau des Zielproteins verursachen [Pillay et al., 2014]. Es wurden Möglichkeiten untersucht, diesen enzymatischen Verlust an Zielprotein zu minimieren (siehe Kapitel 2.5). In Abbildung 3-1 ist die Präparation der Biomasse schematisch dargestellt.

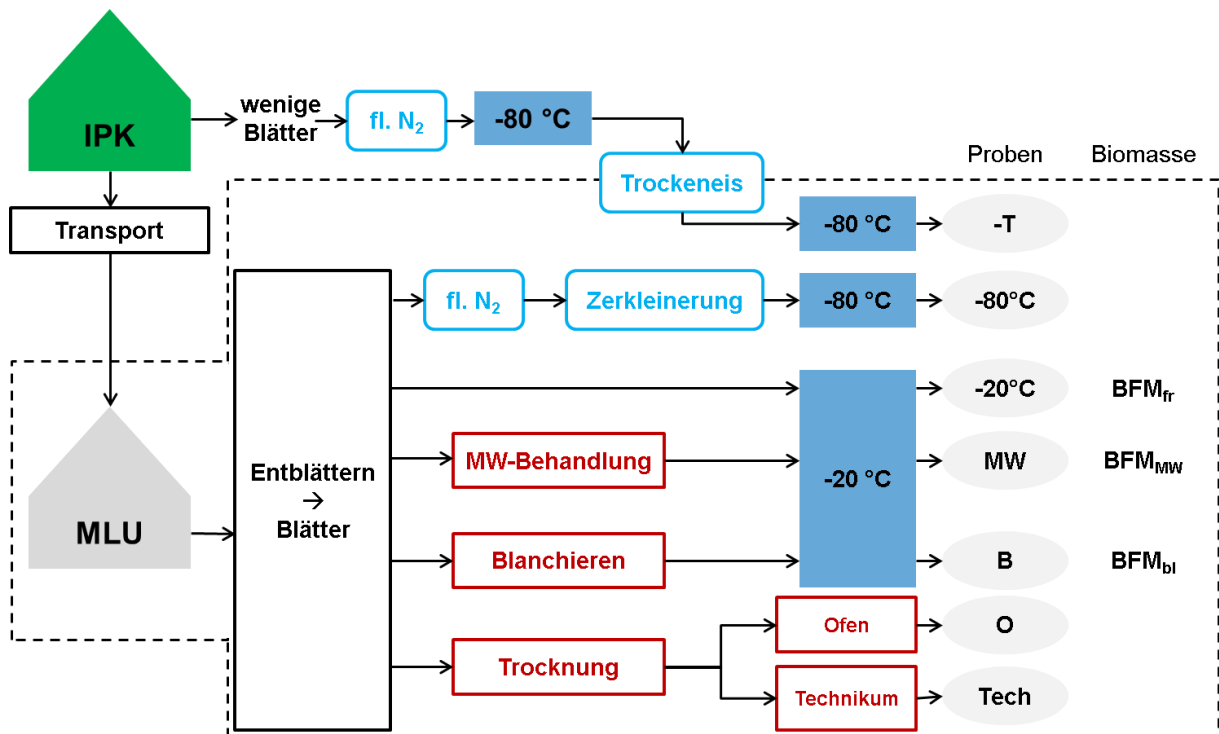


Abbildung 3-1: Schema der Proben- und Biomassepräparation zur Verringerung enzymatischer Proteolyse des Zielproteins. Die Anzucht der Biomasse erfolgte am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben. Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) wurden geerntet, an die Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg transportiert und dort weiter verarbeitet (gestrichelt umrandeter Bereich). Fl. N₂ – flüssiger Stickstoff

Ein geringer Teil der Biomasse wurde direkt nach der Ernte in Gatersleben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Der Transport dieser Referenzprobe von Gatersleben nach Halle (Saale) erfolgte auf Trockeneis. Die restliche Biomasse wurde, wie in Kapitel 2.5 beschrieben (siehe auch Abbildung 3-1), im Anschluss an die Ernte nach Halle (Saale) transportiert und präpariert.

Die Ergebnisse der Proben- und Biomassepräparation sind in Abbildung 3-2 gezeigt. Mit Hilfe des linken Teils (Abbildung 3-2, A) wurde zuerst die korrekte Probenpräparation für die SDS-PAGE ermittelt. Dabei war das Ziel, einen Abbau des Zielproteins während der Inkubation mit Probenpuffer zu verhindern. Im Anschluss wurde der Einfluss von Transport und unterschiedlichen Präparationsmethoden der Biomasse (Biomassepräparation) untersucht (Abbildung 3-2, B).

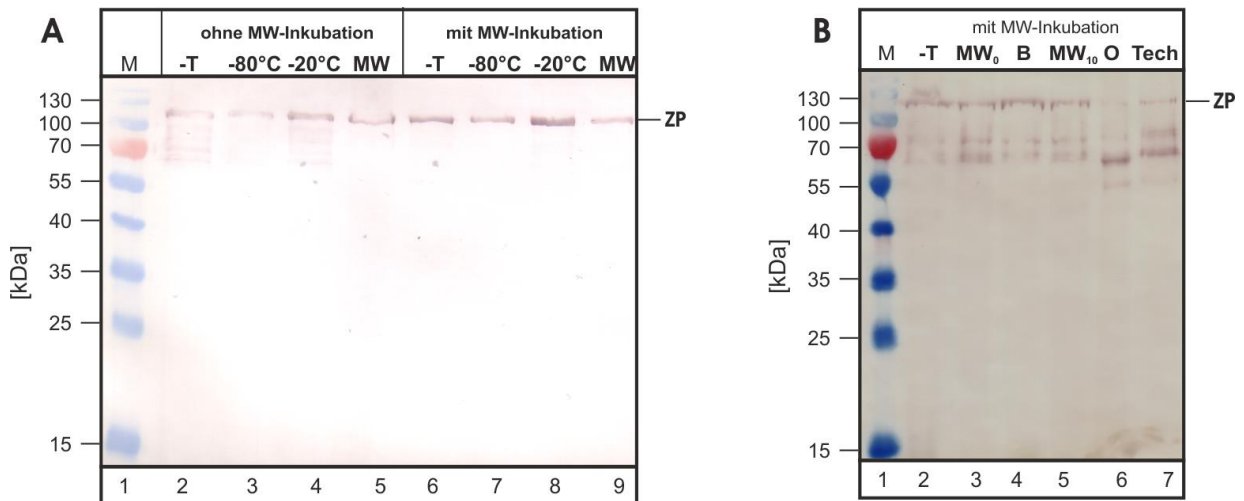


Abbildung 3-2: Proben- und Biomassepräparation zur Verringerung enzymatischer Proteolyse des Zielproteins (ZP). (A) Probenpräparation: „ohne / mit MW-Inkubation“: Proben wurden nach Präparation der Biomasse und anschließender Lagerung vor Inkubation mit Probenpuffer nicht / kurz in einer Mikrowelle (MW) erhitzt; „-T“: Blätter direkt nach Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert; „-80 °C“ / „-20 °C“: Blätter nach Ernte bei -80 °C / -20 °C gelagert; „MW“: Blätter nach Ernte in Mikrowelle inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert; (B) Biomassepräparation: Proben wurden wie unter (A)-„mit MW-Inkubation“ präpariert; „-T“: Blätter direkt nach Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, bei -80 °C gelagert; „MW₀“: Blätter nach Entfernung von Tabakpflanze in Mikrowelle inkubiert, bei -20 °C gelagert; „B“: Blätter nach Entfernung von Tabakpflanze blanchiert, bei -20 °C gelagert; „MW₁₀“: Blätter nach Entfernung von Tabakpflanze 10 h bei 22 °C gelagert, in Mikrowelle inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert; „O“: Blätter nach Entfernung von Tabakpflanze im Ofen getrocknet; „Tech“: Blätter nach Entfernung von Tabakpflanze im Technikum getrocknet. Detektionsmethode: Western Blot; primärer Antikörper anti-c-myc; sekundärer Antikörper Anti-IgG-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase; chromogene Nachweisreaktion

Im Western Blot (Abbildung 3-2, A, „ohne MW-Inkubation“, Bahnen 2-5) wird deutlich, dass Wirtszellproteasen die Integrität des Zielproteins beeinträchtigen können. Alle Proben wurden in Vorbereitung der SDS-PAGE in Probenpuffer 5 min bei 99 °C inkubiert. In Blättern, die unmittelbar nach der Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C (Bahn 2, „-T“) bzw. nach der Ernte bei -20 °C gelagert worden waren (Bahn 4, „-20°C“) sind Abbaubanden des Zielproteins zwischen 70-100 kDa erkennbar. Bei deutlich niedriger Einlagerungstemperatur von -80 °C (Bahn 3, „-80°C“) wurde dieser Verlust nicht beobachtet. Ebenfalls kein Abbau wurde festgestellt, wenn Biomasse vor Inkubation mit Probenpuffer in einer Mikrowelle erhitzt wurde (Bahn 5, „MW“). Die Erklärung dafür ist, dass in dieser Probe offenbar keine für das Zielprotein relevanten aktiven Proteasen mehr enthalten waren. Diese sind während der Biomassepräparation denaturiert worden. In den Proben „-T“ sowie „-20 °C“ waren zu Beginn

der Probenpräparation noch native Tabak-Proteasen enthalten. Während der Inkubation mit Probenpuffer wurde das Zielprotein als Substrat akzeptiert und enzymatisch teilweise hydrolysiert. Der nachgewiesene Unterschied zwischen den Lagerungsbedingungen (-80 °C bzw. -20 °C) könnte durch das Auftragen von weniger (konzentrierter) „-20 °C“-Probe zurückzuführen sein.

Im rechten Teil von Abbildung 3-2 A sind Proben aufgetragen, die vor der Inkubation mit Probenpuffer in einer Mikrowelle erhitzt worden waren. Offensichtlich ist es gelungen, die Proteolyse des Zielproteins vollständig zu unterbinden. Dies bedeutet zudem, dass auch *in planta* kein Abbau des Zielproteins bzw. keine unvollständige Synthese der Zielproteinmoleküle erfolgte.

In der Folge wurde die gewonnene Erkenntnis genutzt, um Tabakblätter vor der Lagerung so zu präparieren, dass für nachfolgende Prozessschritte der Abbau des Zielproteins verringert wird (Abbildung 3-2 B). Dazu wurde die Biomasse nach Ernte ins Labor transportiert, entblättert und sofort (Bahn 3, „MW₀“) oder nach Lagerung bei ~22 °C für 10 h (Bahn 5, „MW₁₀“) in einer Mikrowelle inkubiert, 5 min blanchiert (Bahn 4, „B“) oder im Ofen (Bahn 6, „O“) bzw. im Technikum (Bahn 7, „Tech“) getrocknet. Als Vergleich diente Biomasse, die direkt am Erntort in flüssigem Stickstoff eingefroren worden war (Bahn 2, „-T“).

Es wird deutlich, dass eine Trocknung der Biomasse unter den gewählten Bedingungen nicht erfolgreich war sondern zum Abbau des Zielproteins führte. Eine mögliche Ursache dafür ist eine hitze- und/oder trocknungsinduzierte Blattalterung [Rizhsky et al., 2002]. Das Phänomen dieser Alterung ist z.B. an Laubbäumen im Herbst zu beobachten, an dessen Ende die Blätter nicht mehr grün, sondern in Farbtönen von gelb über orange bis rot leuchten. Dabei werden sequentiell Zellkompartimente bis hin zur Zentralvakuole aufgelöst, Zellbestandteile verdaut und in Speicherkompartimente der Pflanze transportiert, um sie bei günstigen Umweltbedingungen als Substrate wiederzuverwenden [Feller und Fischer, 1994; Himelblau und Amasino, 2001]. Der Vorgang der Blattalterung ist für eine Vielzahl weiterer Faktoren wie Salzstress, Dunkelheit oder Abtrennung der Blätter von der Pflanze nachgewiesen [Allu et al., 2014; Liebsch und Keech, 2016; Martínez et al., 2008]. Das resultierende Abbau-Bandenmuster beider Trocknungsproben ist unterschiedlich. Bei näherer Betrachtung des kleinsten Abbauproduktes zwischen 55 und 70 kDa ist eine geringfügige Abweichung des Molekulargewichts erkennbar. Eine mögliche Ursache liegt in den unterschiedlichen Trocknungsbedingungen. Abhängig davon konnten Unterschiede im Transkriptom von Tabakblättern gezeigt werden [Rizhsky et al., 2002]. Daraus kann die Produktion verschiedener, das Zielprotein hydrolysierender Proteasen resultieren, die voneinander abweichende Zielproteinfragmente erzeugen.

Die Lagerung der Blätter bei Umgebungstemperatur (~22 °C) zeigte im Zeitraum von 10 h keinen negativen Einfluss auf die Integrität des Zielproteins. Das Bandenmuster (Bahn 5) entspricht dem der Probe in Bahn 3 von Blättern, die sofort entblättert und in einer Mikrowelle inkubiert wurde. Beide Proben zeigen keinen Unterschied zur Referenz in Bahn 2. Es war demzufolge möglich, Tabakblätter bis zu 10 h unter „normalen“ Laborbedingungen zu lagern, ohne nachgewiesenen Verlust des Zielproteins. Dieses Ergebnis war hauptsächlich für die Verarbeitung der Biomasse bis zur Hitzeinkubation relevant. In der Folge wurde darauf verzichtet, die geernteten Tabakpflanzen im Kühlraum zu entblättern.

Durch Blanchieren wurde das gleiche Ergebnis wie durch die Hitzebehandlung mit der Mikrowelle erzielt (Bahn 4). Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit einer Arbeit, in der das Blanchieren von Tabakblättern als Methode der Wahl zur Abtrennung von Wirtszellproteinen ohne negativen Einfluss auf die Zielproteine identifiziert werden konnte [Buyel et al., 2014].

Im Vergleich zum in Abbildung 3-2, A, gezeigten Ergebnis für die Proben „-T“ (Bahn 6) und „MW“ (Bahn 7) wurden in Abbildung 3-2, B, für die äquivalenten Proben (Bahnen 2 und 3) abweichende Beobachtungen gemacht. Während in Abbildung 3-2, A, ausschließlich das intakte Zielprotein nachgewiesen worden war, wurden in Abbildung 3-2, B, auch Abbauprodukte des Zielproteins im Bereich von 55-100 kDa detektiert. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass bei den Versuchen unterschiedlich gewachsene Tabakpflanzen verwendet wurden. Die Untersuchungen zur Präparation der Biomasse erstreckten sich über zwei Ernteperioden in den Jahren 2013 (Proben für Abbildung 3-2, A) und 2014 (Proben für Abbildung 3-2, B). Jährlich bedingte Unterschiede in Sonneneinstrahlung, Feuchtigkeitsgehalt der Erde und Wachstumstemperatur sind sehr wahrscheinlich. Eine Aufzeichnung dieser Daten wurde jedoch nicht vorgenommen. Nichtsdestotrotz sind die Zielprotein-Fragmente eher im Bereich von Spuren nachgewiesen worden. Ungenauigkeiten beim Probenauftrag auf das Polyacrylamidgel (PA-Gel) bzw. beim Elektrolot könnten ebenso Ursachen für die detektierten Unterschiede zwischen den Proben sein. Lösung dieses Problems wäre gewesen, die interessierenden Proben auf einem/r Gel/ Membran zu detektieren, da generell die Vergleichbarkeit verschiedener Gel-/ Membrananalysen untereinander schwierig ist. Für den Fortschritt innerhalb der Arbeit war dies jedoch nicht entscheidend und wurde daher nicht durchgeführt.

Das Fazit der gezeigten Ergebnisse ist wie folgt. Um vor der Verarbeitung der Blätter einen Abbau des Zielproteins zu vermeiden, sollten Tabakpflanzen nach Ernte bei ~22 °C entblättert werden. Anschließend ist eine Hitzeinkubation mittels Mikrowelle oder Blanchieren durchzuführen.

Die insgesamt präparierte Biomasse kann aus Abbildung 3-3 ersehen werden.

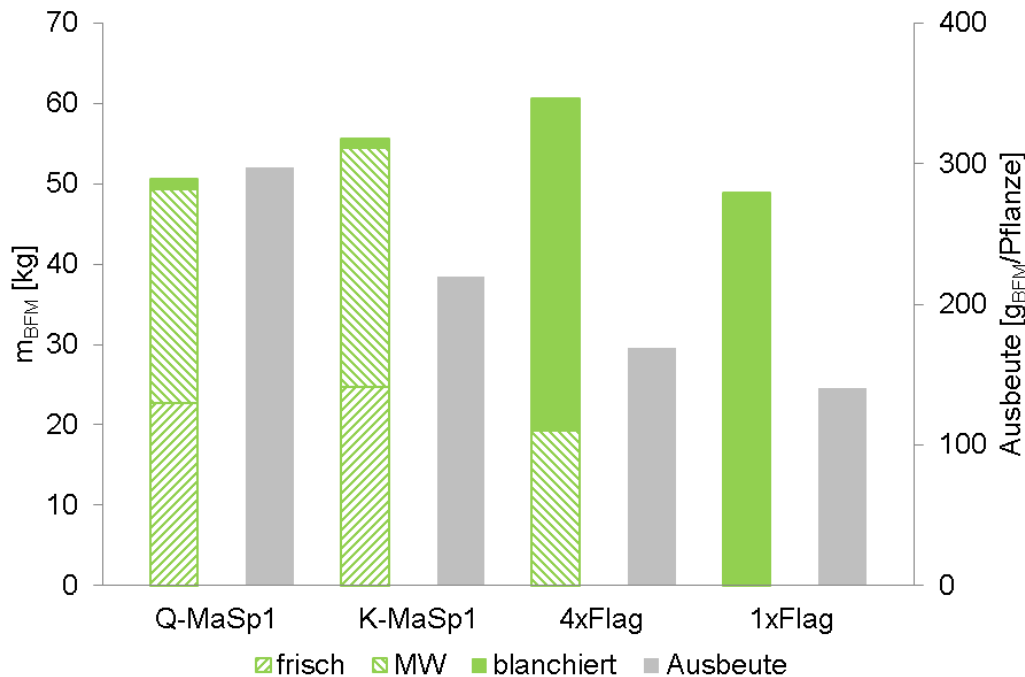


Abbildung 3-3: Präparierte Biomasse und jeweilige pflanzenbezogene Feuchtmasseausbeute. Grüne Säulen zeigen an, wieviel Biofeuchtmasse (BFM) pro Zielkonstrukt präpariert und eingelagert worden ist. Durch „/“ wird ohne weitere Vorbehandlung eingefrorene Biomasse („frisch“-BFM_{fr}) repräsentiert. „/“ bzw. ■ verdeutlicht Biomasse, die vor Einlagerung in einer Mikrowelle („MW“-BFM_{MW}) inkubiert bzw. in Wasser blanchiert („blanchiert“-BFM_{bl}) wurde. Die grauen Säulen repräsentieren die jeweils pro Tabakpflanze gewonnene Biofeuchtmasse. Q-MaSp1–Q-MaSp1-100xELP; K-MaSp1–K-MaSp1-100xELP; 4xFlag–4xFlag-100xELP; 1xFlag–1xFlag-100xELP

Q-/K-MaSp1-100xELP tragender Tabak wurde hauptsächlich in der ersten Ernteperiode (2013) gewonnen, Flag-Konstrukte tragende Biomasse in der Zeiten (2014). Die Aminosäuresequenzen der Zielproteine sind im Anhang in Tabelle 7-1 angegeben. Aufgrund des oben beschriebenen Erkenntniszuwachses sind sukzessive mehr Anteile der jeweiligen Tabakblätter hitzeinkubiert worden. Die jeweils präparierten Biofeuchtmassen tragen im weiteren Verlauf der Arbeit folgende Bezeichnungen: ohne Hitzeinkubation (frisch) eingefroren–BFM_{fr}; nach Mikrowelleninkubation eingefroren–BFM_{MW}; nach Blanchieren eingefroren–BFM_{bl}. Auffällig ist die im Vergleich zum Q-/K-MaSp1-100xELP-Tabak verringerte Ausbeute an jeweiliger Biofeuchtmasse bei den Flag-Proteine tragenden Pflanzen. Da aufgrund der Molekülgröße (60 bzw. 106 kDa für 1x/4xFlag-100xELP) keine erhöhte metabolische Last gegenüber den MaSp1-Proteinen (102 kDa) plausibel scheint, ist die wahrscheinlichste Ursache der Unterschiede in widrigeren Wachstumsbedingungen der Pflanzen zu sehen.

Insgesamt wurden 52,4 und 55,5 kg Q-/K-MaSp1-100xELP bzw. 48,8 und 60,6 kg 1x/4xFlag-100xELP enthaltende Biofeuchtmasse gewonnen und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.2 Zellaufschluss – unproblematische Maßstabsvergrößerung

Um eine hohe Ausbeute des Zielproteins nach der Reinigung erzielen zu können ist nötig, möglichst viel davon aus der Biomasse freizusetzen. Für pflanzliche Expressionssysteme sind zu diesem Zwecke mechanische Zellaufschlussmethoden Mittel der Wahl (siehe Kapitel 1.1.3). Besonders der Einsatz von Homogenisatoren in Form von Stabmixern hat sich bewährt [Buyel et al., 2015; Wilken und Nikolov, 2012]. Im Folgenden wurde untersucht, ob mit den im Labor verfügbaren Mixern (Haushaltsmixer Braun 4184; Table Top Cutter R10 von Robot Coupé) ein ausreichend guter Zellaufschluss erzielt werden kann (Durchführung siehe Kapitel 2.6).

Die Versuchsauswertung mittels SDS-PAGE ist in Abbildung 3-4 gezeigt. Das Zielprotein ist in allen Proben im Versuchszeitraum von zwei bis max. zehn Minuten bei ~110 kDa nachgewiesen worden. Hauptsächliche Verunreinigungen wurden bei ~60 kDa, 35 kDa und im Bereich <25 kDa bis zum Gelende detektiert. Bei Verwendung des Haushaltsmixers (Abbildung 3-4, A) war die maximale Signalintensität des Zielproteins bereits nach einer Aufschlusszeit von zwei Minuten erreicht (Bahn 2). Bei proteinogenen Verunreinigungen <25 kDa konnte ein sukzessiver Anstieg der nachweisbaren Proteinmenge beobachtet werden (Bahnen 2-4). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei Benutzung des Table Top Cutters erzielt (Abbildung 3-4, B). Das grundsätzliche Bandenmuster war identisch. Die höchste Menge des freigesetzten Zielproteins wurde nach dreiminütiger Aufschlusszeit (Bahn 3) nachgewiesen. Geringfügige Veränderungen der Signalintensität der proteinogenen Verunreinigungen konnten beobachtet werden. Für die Freisetzung des Zielproteins aus hitzebehandelten Tabakblättern unter Verwendung des Haushaltsmixers (Braun 4184) ist folglich eine Aufschlussdauer von mindestens zwei Minuten einzuhalten. Bei Verwendung des Table Top Cutters R10 sollte eine Aufschlussdauer von drei Minuten nicht unterschritten werden.

Eine Partikelgrößenverteilung der Suspension wurde mittels dynamischer Laserstreuung bestimmt. Für den Haushaltsmixer bzw. den Table Top Cutter konnte nach fünfminütigem Zellaufschluss der mittlere Partikeldurchmesser von 1,8 bzw. 1,5 μm ermittelt werden. Diese Werte sind in Übereinstimmung mit Ergebnissen einer Arbeitsgruppe, die sich stark mit der Entwicklung von Reinigungsmethoden für rekombinante Proteine aus Tabakblättern beschäftigt. In einer von diesen Wissenschaftlern publizierten Arbeit wurde der Zellaufschluss mit einem Homogenisiergerät von Polytron, ähnlich einem Ultra-Turrax, durchgeführt. Der dort angegebene mittlere Partikeldurchmesser lag im Bereich von 1-10 μm und führte zum Verblocken der im Reinigungsverfahren eingesetzten Filter [Buyel et al., 2014]. Dieses Problem wurde im Verlauf dieser Arbeit (Filtration der Suspension nach Zellaufschluss, siehe Kapitel 2.7) nicht beobachtet.

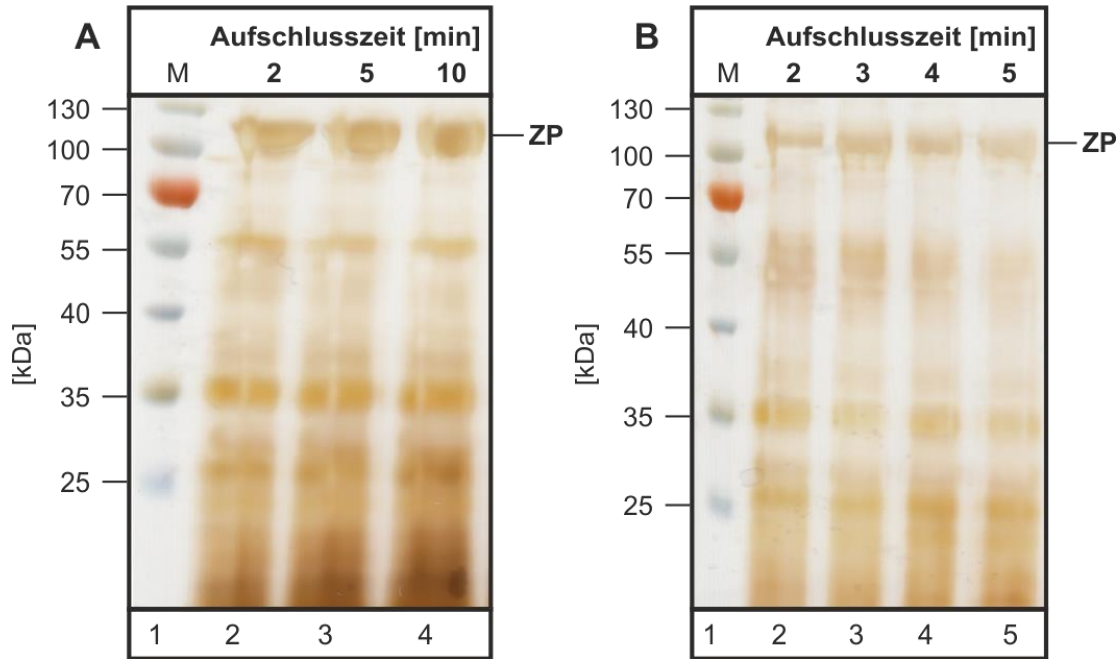


Abbildung 3-4: Freisetzung von K-MaSp1-100xELP (ZP) während des Zellaufschlusses mit (A) einem Haushaltsmixer und (B) einem Table Top Cutter. *Nicotiana tabacum*-Blätter wurden in einer Mikrowelle inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert. (A) 300 g BFM_{MW} wurden aufgetaut (16 h, 4 °C), mit 450 mL Leitungswasser (4 °C) versetzt und im Haushaltsmixer 10 min zerkleinert. (B) 2,5 kg BFM_{MW} wurden aufgetaut (16 h, 4 °C), mit 2,5 L Leitungswasser (4 °C) versetzt und im Table Top Cutter 5 min zerkleinert. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten genommen. Nach Zentrifugation wurden 500 μL Überstand getrocknet und in 200 μL SDS-Probenpuffer resolubilisiert. M–PPL-Marker; Detektionsmethode: Silberfärbung

3.3 Fraktionierende Acetonfällung – Abtrennung verunreinigender Proteine und Gewinnung des Zielproteins

Bei der intrazellulären Produktion rekombinanter Proteine wird durch den Zellaufschluss in der Regel neben dem Zielprotein eine Vielfalt kontaminierender Substanzen freigesetzt. Es ist dann zumeist nötig, diese störenden Begleitstoffe vom eigentlichen Zielprodukt zu trennen. Häufig geschieht dies durch die Anwendung chromatographischer Verfahren. Diese sind jedoch oft teuer, bedingt durch preisintensive stationäre Phasen sowie Regenerationszeiten. Alternativ können Proteine fraktionierend gefällt werden. Ein bekanntes Beispiel stellt die Plasmafraktionierung von Blut dar, auch bekannt unter der Bezeichnung *Cohn-Fraktionierung*. Dabei werden die proteinogenen Bestandteile des Blutes über Kryo-, Ethanol- und Salzfällung sukzessive abgetrennt und pharmazeutisch genutzt [Brodiewicz-Proba, 1991]. Gerade für Proteine ohne enzymatische Aktivität ist eine Reinigung über Fällungsmethoden naheliegend, da für diese kein Verlust katalytischen Potentials minimiert werden muss.

Das Zielprotein Q-/K-MaSp1-100xELP enthält einen *tag*, der auf der Aminosäuresequenz von Elastin basiert. Für dessen Vorstufe, Tropoelastin, existiert ein Reinigungsprotokoll, in dem organische Lösungsmittel zur Fällung genutzt werden [Martin et al., 1995]. Dieses Wissen wurde im Verlauf der Arbeit erfolgreich genutzt, um eine Reinigungsstrategie für Q-/K-MaSp1-100xELP zu entwickeln.

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden in vier Größenordnungen durchgeführt (siehe Kapitel 2.7). Eine Übersicht wesentlicher Parameter ist in Tabelle 3-1 gegeben.

Tabelle 3-1: Bedingungen zur Freisetzung des Zielproteins Q-/K-MaSp1-100xELP aus Tabakblättern. Für das Experiment im Mikro-Maßstab wurden 50 g BFM_{fr} (frisch eingefroren) aufgeschlossen und 250 µL Suspension verwendet, im kleinen Maßstab wurde die komplette Suspension eingesetzt. Die Untersuchungen in den restlichen Größenordnungen wurden mit BFM_{MW} (nach Mikrowelleninkubation eingefroren) durchgeführt. Die Arbeitsvolumina resultieren aus dem anfänglichen Suspensionsvolumen inklusive dem zugegebenen Volumen Aceton. Angegeben sind in Zeile 3-5 die jeweils verwendete Menge Biomasse (50 g-6 kg) und in Zeilen 8-9, in welcher Lösung die Fällungsversuche durchgeführt wurden.

Maßstab	mikro	klein	mittel	Pilot
Arbeitsvolumen [mL]	~1,25	200-600	750-2.000	1·10 ⁴ -3·10 ⁴
50 g BFM _{fr}	x	x	-	-
300 g BFM _{MW}	-	-	x	-
5-6 kg BFM _{MW}	-	-	-	x
Extraktionsmittel	Extraktionspuffer	Extraktionspuffer	Extraktionspuffer; Leitungswasser	Leitungswasser
BFM:Extraktionsmittel	1:3	1:3	1:3-1:1,5	1:1
Suspension	x	x	x	-
Überstand	-	-	-	x

Auf die Bestimmung der Proteinkonzentration bei der Reinigung des Zielproteins wurde verzichtet. Üblich dafür und in der Literatur zu finden sind BRADFORD-Test sowie Lowry-Proteindetektion. Diese Methoden werden jedoch stark durch eine Vielzahl von Substanzen, unter anderem Polyphenole, beeinflusst [Redmile-Gordon et al., 2013; Whiffen et al., 2007]. Tabak enthält einen beträchtlichen Anteil Sekundärmetabolite wie das Alkaloid Nicotin, aber eben auch Polyphenole, welche das Ergebnis der Proteinkonzentrationsbestimmung verfälschen und zu fehlerhafter Interpretation von Untersuchungsergebnissen führen könnten [Xia et al., 2014].

3.3.1 Fällungsexperimente im Mikromaßstab – fraktionierende Acetonfällung möglich

Die Hitzebehandlung der Tabakblätter nach der Ernte wirkte sich positiv auf die Integrität des Zielproteins aus, da so offenbar Proteasen inaktiviert werden konnten. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die Fällung von Wirtszellproteinen, welche dann durch Verfahren wie Filtration und/oder Zentrifugation abgetrennt werden können. Dieser Fakt wird durch Abbildung 3-5 belegt. Für den linken Teil wurden nicht erhitzte Blätter, für den rechten Teil in der Mikrowelle behandelte Blätter aufgeschlossen und zentrifugiert. Aufgetragen wurde jeweils eine Probe des Überstands.

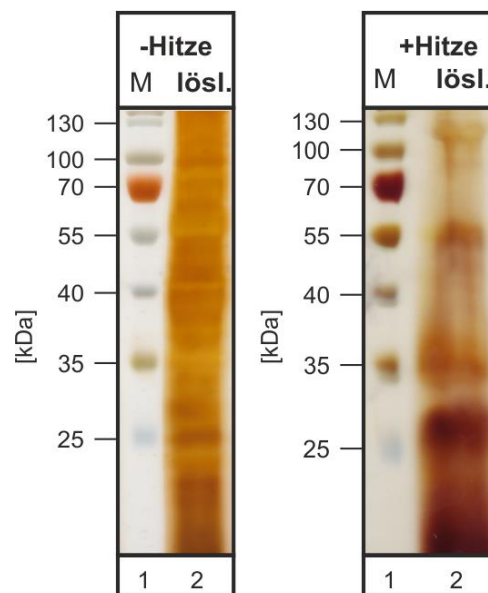


Abbildung 3-5: Hitzefällung von Wirtszellproteinen. (-Hitze): 50 g BFM_{fr} (frisch eingefroren) wurden mit 150 mL Extraktionspuffer und im Haushaltsmixer aufgeschlossen (10x30 s). Nach Zentrifugation wurden 250 µL Überstand 5 min bei 99 °C inkubiert und getrocknet. (+Hitze): 50 g BFM_{fr} (frisch eingefroren) wurden in 150 mL Extraktionspuffer 1 h bei >90 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis, Zellaufschluss im Haushaltsmixer (10x30 s) und Zentrifugation wurden 250 µL Überstand getrocknet. Die getrockneten Rückstände wurden in 50 µL Probenpuffer resolubilisiert und 5 min bei 99 °C inkubiert. M–PPL-Marker; ZP–Zielprotein; Detektionsmethode: Silberfärbung

Es ist zu sehen, dass bei nicht hitzebehandelten Blättern eine große Menge Wirtszellproteine löslich waren (Abbildung 3-5, „-Hitze“, Bahn 2). Über den gesamten Verlauf der Bahn sind Proteine detektiert worden. Eine deutliche Verringerung des Signals wurde durch Hitzebehandlung mit anschließender Zentrifugation erreicht („+Hitze“, Bahn 2). Dominante Banden sind bei 110 kDa, 55 kDa, 35 kDa und 30 kDa zu sehen. Besonders Proteine im Bereich von 35-110 kDa sind nach Hitzeinkubation und Zentrifugation abgetrennt worden.

Trotz Hitzebehandlung bleibt ein Teil der Wirtszellproteine löslich. Im Mikromaßstab wurde daher untersucht, ob diese nach Hitzebehandlung durch den Einsatz von Aceton verstärkt abtrennbar sind. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-6 dargestellt. In Teil A und B wurde das Zielprotein mittels spezifisch an den *c-myc-tag* bindender Antikörper nachgewiesen. Im ersten Teil der Abbildung (A) wird deutlich, dass das Zielprotein (bei ~110 kDa) bis zu einer Acetonkonzentration (c_A) von 45 % (v/v) löslich war (Bahnen 2-8). Eine weitere Erhöhung des Acetongehalts in der Suspension führte zum Ausfällen des Zielproteins, erkennbar durch das Verschwinden der Zielproteinbande. Graue unregelmäßige Flecken sind bedingt durch Restfeuchte während des Scannens der Membran. Eine verkürzte Version des Zielproteins war bis zu einer Acetonkonzentration von 60 % (Bahn 11) löslich und war dementsprechend ab $c_A = 70$ % (v/v) im Pellet zu finden. Dies ist in Abbildung 3-6 B mit den unlöslichen Pelletfraktionen als Gegenstück zur eben besprochenen Abbildung 3-6 A zu sehen. Das Zielprotein war bereits ab $c_A = 35$ % (v/v) (Bahn 6) nachweisbar, und in Einklang mit dem Ergebnis des vorherigen Teils A ab $c_A = 50$ % vollständig unlöslich. Dass es sich bei den nachgewiesenen Proteinen um das Zielprotein sowie verkürzte Versionen davon handelt ist durch einen Western-Blot in einer aktuellen Publikation belegt [Weichert et al., 2014]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Wildtyp-Tabak kein Protein produziert, das durch das angewendete Detektionsverfahren ein positives Signal erzeugt.

Im letzten Teil von Abbildung 3-6 C ist ein mit Silber gefärbtes Gel nach SDS-PAGE zu sehen, auf das die gleichen Proben wie in Abbildung 3-6 A aufgetragen worden sind. In Bahn 2 (bei 0 % Aceton) ist zu sehen, dass auch nach einstündiger Inkubation bei mindestens 90 °C Tabakproteine löslich waren, hauptsächlich eines mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 35 kDa und eines bei 55 kDa. Weitere Proteine wurden als starker „Schmier“ von 55 kDa bis zur Lauffront (unterster Teil des Gels) nachgewiesen. In den Veröffentlichungen einer Aachener Arbeitsgruppe sind ähnliche Beobachtungen gemacht worden [Buyel et al., 2014; Menzel et al., 2016a]. Das Protein mit dem Molekulargewicht von 55 kDa wurde dort als große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) vermutet [Buyel et al., 2014]. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass das theoretische Molekulargewicht der RuBisCO aus *Nicotiana tabacum* 53 kDa beträgt (UniProt: P00876) [Amiri et al., 1984]. Das Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und

35 kDa wurde in den genannten Arbeiten nicht nachgewiesen. Mögliche Ursache dafür ist ein Unterschied in den Nachweismethoden. Buyel und Kollegen verwendeten Coomassie zur Detektion der Proteine im LDS-PA-Gel im Gegensatz zur in dieser Arbeit angewendeten Detektion mittels Silberfärbung, mit welcher in der Regel deutlich sensitiver Proteine nachgewiesen werden können [Rabilloud, 1990]. In den Aachener Arbeiten wurde im Speziellen die Hitzefällung von Tabak-Wirtszellproteinen untersucht. Als finales Ergebnis wurde festgestellt, dass dadurch bis zu 97 % der absoluten Menge löslicher Tabakproteine abgeschieden werden konnten, was eine weitere Reinigungsprozedur erleichtert. Dieses Ergebnis wurde durch fünfminütiges Blanchieren erzielt. Wichtige untersuchte Prozessparameter waren Dauer der Inkubation, die gewählte Temperatur sowie die Art des Blanchiermediums (Wasser bzw. Puffer) [Menzel et al., 2016a].

Mit steigender Acetonkonzentration waren diese proteinogenen Verunreinigungen ab einer Acetonkonzentration von 30 % (v/v) (Bahn 5) immer weniger löslich, um schließlich bei 50 % (v/v) (Bahn 9) nahezu vollständig unlöslich zu sein. Deutlich wird hier auch der Verlust des Zielproteins, der schon bei $c_A = 45$ % (v/v) (Bahn 8) zu beginnen scheint. Im Vergleich zu den vorherigen Proben bei $c_A = 0-30$ % und $c_A = 40$ % (v/v) (Bahnen 2-5, 7) ist eine Verringerung der Bandenintensität erkennbar. Die Bande bei $c_A = 35$ % (v/v) (Bahn 6) scheint etwas schwächer zu sein, als in den Nachbarbahnen. Die möglichen Gründe sind in der Fehlerbetrachtung in Kapitel 3.8 diskutiert.

Das Zielprotein wurde mittels Western Blot bei 110 kDa detektiert. Im korrespondierenden, mit Silber gefärbten Gel, konnte ebenfalls ein Protein dieser Größe nachgewiesen werden. Die Signalstärke war ausreichend zur Bewertung der folgenden Versuche. Daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Nachweis des Zielproteins mittels Silberfärbung des PA-Gels beibehalten und die Bande in Höhe von 110 kDa als Zielprotein (ZP) angesehen.

Zusammenfassend konnte in diesem Experiment festgestellt werden, dass Wirtszellproteine nach Hitzebehandlung mit Hilfe von Aceton ab einer Konzentration von $c_A = 30$ % (v/v) ausgefällt werden können. Bis $c_A = 40$ % (v/v) wurde eine Hauptverunreinigung zwischen 25 und 35 kDa detektiert, die bei weiterer Erhöhung des Acetongehalts um fünf Volumenprozent unlöslich wurde. Deutliches Ausfällen des Zielproteins war ab $c_A = 45$ % (v/v) zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse war die Möglichkeit einer fraktionierenden Acetonfällung zur Reinigung des Zielproteins gegeben und wurde im größeren Maßstab untersucht.

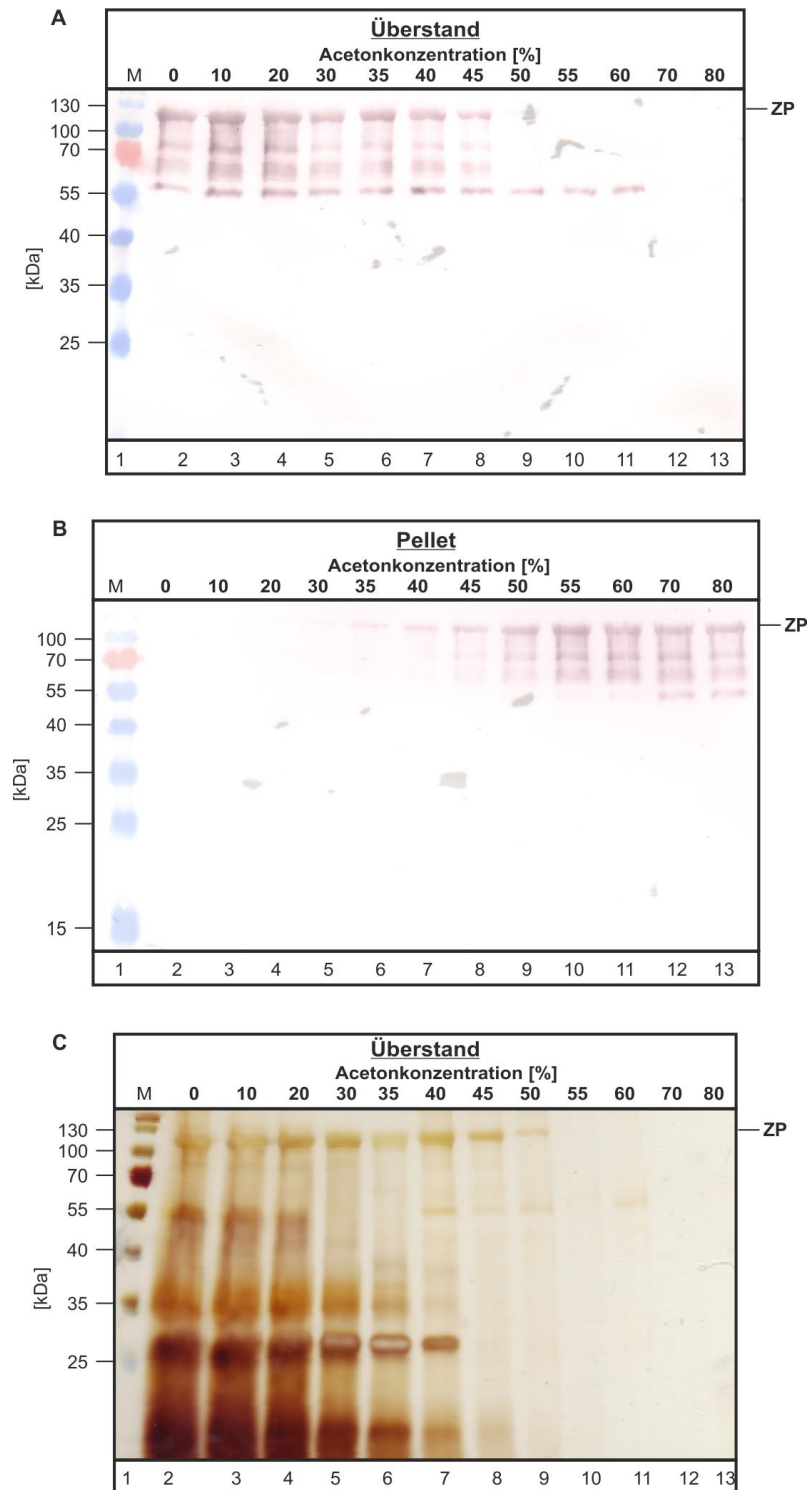


Abbildung 3-6: Acetonfällung von Wirtszellproteinen und Q-MaSp1-100xELP im Mikromaßstab. 50 g BFM_{fr} (frisch eingefroren) wurden in 150 mL Extraktionspuffer 1 h bei >90 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis und Zellaufschluss mittels Haushaltsmixer (10x30 s) wurden 250 µL Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und mit 1 mL dH₂O, dH₂O-Aceton oder Aceton versetzt, um die jeweilige Acetonkonzentration im Versuchsansatz einzustellen. Nach 30-minütiger Inkubation (4 °C) erfolgte die Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (4 °C, 16.100 g, 5 min) mit anschließender Trocknung. Die Überstands- und Pelletproben wurden in 50 bzw. 440 µL Probenpuffer resolubilisiert und 5 min bei 99 °C inkubiert. M-PPL-Marker; ZP-Zielprotein; (A) und (B) mittels Western Blot nachgewiesenes Zielprotein in Überstands- bzw. Pelletproben; primärer Antikörper anti-c-myc; sekundärer Antikörper Anti-IgG-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, chromogene Nachweisreaktion (C) mit Silber gefärbtes Gel der löslichen Fraktionen

3.3.2 Maßstabsvergrößerung in den Pilotmaßstab

Die Übertragung von Ergebnissen von einem Maßstab in den nächsten ist häufig nicht einfach zu realisieren. Mögliche Gründe dafür sind Veränderungen in Stoff- und Wärmetransportprozessen sowie der Austausch von Equipment mit einhergehenden Umstellungen in Arbeitsabläufen. Es ist daher in der Regel nötig, einen Prozess von einer Größenordnung zur nächsten anzupassen und das Ergebnis neu zu bewerten.

Beim Versuch im Mikromaßstab (vgl. Tabelle 3-1) wurde festgestellt, dass Wirtszellproteine nach Hitzebehandlung bei einer Acetonkonzentration von 45 % (v/v) komplett unlöslich waren, das Zielprotein zumindest teilweise. Dieses Phänomen wurde im Maßstab von 50-300 g BFM genauer untersucht und nach Anpassungen im Pilotmaßstab zur Anwendung gebracht. Im kleinen Maßstab (50 g BFM_{fr} + 150 mL Extraktionspuffer) wurde das Fällungsverhalten der nach Hitzeinkubation löslichen Proteine in den Grenzen von $c_A = 35-70$ % (v/v) geprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-7 A gezeigt. Wie im Mikromaßstab blieb ein Teil der Wirtszellproteine trotz Hitzeinkubation löslich (Abbildung 3-7 A, Bahn 2), konnten aber durch den Einsatz von Aceton präzipitiert werden (Bahnen 3-5). Ab einem Acetongehalt von 45 % (v/v) (Bahn 5) wurde die etwa 55 kDa-große Verunreinigung im Vergleich zu $c_A = 35-40$ % (v/v) wieder löslich. Das Zielprotein konnte aufgrund vorheriger Ergebnisse (siehe Kapitel 3.3.1) zwischen 100 und 130 kDa identifiziert werden. Es blieb bis $c_A = 50$ % (v/v) in Lösung und präzipitierte bei $c_A = 70$ % (v/v) (Bahnen 6 und 7). Interessanterweise konnten auch bei dieser hohen Acetonkonzentration Proteine nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist in keinem weiteren Experiment gemacht worden.

Die erzielten Ergebnisse führten zu dem Schluss, die Kapazität des Mixers (Braun 4184) auszunutzen und dabei ökonomische Optimierungen vorzunehmen. Dies war a) die Erhöhung der zu verarbeitenden Biofeuchtmasse, b) die Erhöhung des Verhältnisses von Biofeuchtmasse zu Extraktionspuffer und c) der Ersatz des Extraktionspuffers durch Leitungswasser.

Für die in Abbildung 3-7 B und C dargestellten Versuche im mittleren und Pilotmaßstab wurden 300 g bzw. 5,2 kg BFM_{MW} (mikrowellenbehandelt) mit Leitungswasser versetzt und anschließend aufgeschlossen. Das jeweilige Ergebnis nach Inkubation mit Aceton ($c_A = 40$ %, v/v) war grundsätzlich wie im vorherigen Maßstab (Mikromaßstab). Für das Experiment im Pilotmaßstab erfolgte vor Zusatz des Acetons eine Klärung der Suspension mittels Filtration und Zentrifugation, um für den weiteren Prozess eine Extraktion von Proteinen und sekundären Pflanzenstoffen zu vermeiden [Dai und Mumper, 2010].

Die größte Herausforderung bei der Maßstabsübertragung stellte die Abtrennung unlöslicher Bestandteile dar. Eine Zentrifugation in einer *batch*-Zentrifuge hätte aufgrund stark begrenzt einsetzbaren Volumens hohen zeitlichen Aufwand nach sich gezogen. Darum wurde eine Alternativstrategie durch die sequentielle Klärung der Suspensionen nach Zellaufschluss

mittels a) Hydropresse (häufig genutzt zur Klärung von Obstsaften) und b) Zentrifugation mit einer semi-kontinuierlich betreibbaren Röhrenzentrifuge verfolgt.

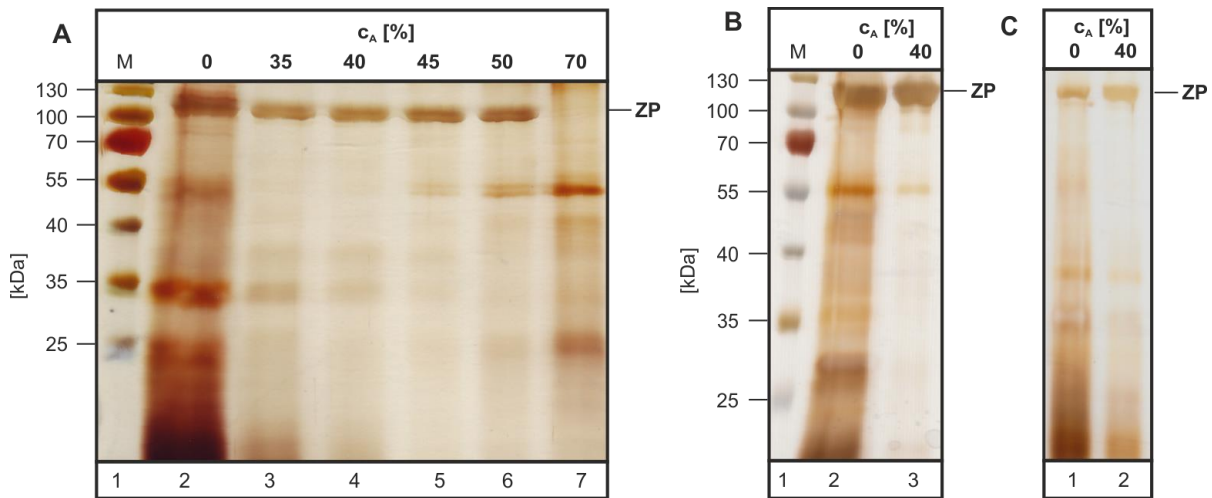


Abbildung 3-7: Reinigung von Q-MaSp1-100xELP durch fraktionierende Acetonfällung im (A) kleinen, (B) mittleren und (C) Pilotmaßstab. (A) 50 g BFM_{fr} wurden mit 150 mL Extraktionspuffer inkubiert (≥ 90 °C, 1 h). Nach Abkühlung auf 4 °C und Zellaufschluss (Haushaltsmischer Braun 4184, 10 x30s) wurde die Acetonkonzentration in der Suspension sukzessive erhöht. (B) 300 g BWM_{MW} wurden aufgetaut (4 °C, 16 h), mit 450 mL Leitungswasser (4 °C) versetzt und aufgeschlossen (Haushaltsmischer Braun 4184, 5 min). In der Suspension wurde durch Zugabe von Aceton (99,6 %) eine finale Acetonkonzentration von $c_A=40$ % (v/v) eingestellt. (C) 5,2 kg BFM_{MW} wurden aufgetaut (4 °C, 16 h), mit 5,2 L Leitungswasser (4 °C) versetzt und mittels Table Top Cutter aufgeschlossen (30.000 rpm, 5 min). Die Suspension wurde geklärt über Filtration und Zentrifugation. Der Überstand („0“) wurde mit Aceton versetzt ($c_A=40$ %, v/v). Die Inkubation mit Aceton dauerte jeweils 30 min bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Probenahme, gefolgt von Zentrifugation und Verwendung des Überstandes. Überstandsproben wurden getrocknet, in Probenpuffer resolubilisiert und 5 min bei 99 °C inkubiert. $c_A=70$ % – Pelletprobe; M–PPL-Marker; Detektionsmethode: Silberfärbung

Das Zielprotein im Überstand nach Inkubation mit 40 % (v/v) Aceton kann durch Inkubation mit 70 % (v/v) Aceton gefällt werden. Diese fraktionierende Acetonfällung wurde zur Reinigung von Q-MaSp1-100xELP entwickelt und konnte unverändert für die Reinigung von K-MaSp1-100xELP verwendet werden. Die erreichte Produktausbeute war ~ 10 g pro kg BFM_{MW}. Das Pellet war grau und wurde bei Kontakt mit Luft relativ schnell braun, was als Hinweis auf das Vorhandensein von Polyphenolen gesehen werden kann [Dai und Mumper, 2010]. Die durch fraktionierende Acetonfällung gewonnene Menge Zielprodukt war im Vergleich mit Werten aus der Literatur erstaunlich hoch. In einer aktuellen Arbeit wurde die aus Tabakblättern extrahierbare Proteinmenge vor und nach Hitzebehandlung mittels BRADFORD-Test bestimmt. Mittels der angegebenen Werte konnte abgeschätzt werden, dass in 1 kg BFM 10 g lösliche Proteine enthalten sind, von denen 95 % durch fünfminütige Hitzeinkubation bei einer Temperatur über 65 °C präzipitieren [Buyel et al., 2014]. Die insgesamt zu erwartende Proteinmenge nach der fraktionierenden Acetonfällung (P_{70}) betrug folglich 500 mg / kg_{BFM} und stand im deutlichen Gegensatz zu den angeführten 10 g_{P70} / kg_{BFM}. In der Arbeit von Weichert und Kollegen wurden 65-75 mg Zielprotein pro kg Biofeuchtmasse ge-

wonnen [Weichert et al., 2014]. Es war folglich davon auszugehen, dass das Produkt nach wie vor stark kontaminiert war. Die proklamierten Verunreinigungen wurden nicht via SDS-PAGE inklusive der zugehörigen Detektionsmethoden nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass zusätzlich zum Zielprotein Salze präzipitierten. Diese sollten in weiteren Schritten abgetrennt werden.

3.4 Waschen des Pellets – Erhöhung der ZP-Reinheit

Die durch fraktionierende Acetonfällung gewonnene Menge Zielprodukt war im Vergleich mit Werten um mehr als zwei Größenordnungen erhöht. Die Verunreinigung des Zielproteins durch gefällte Salze wurde vermutet. Daher wurde eine weitere Reinigung angestrebt (siehe Kapitel 2.8). Die Resolubilisierung des Pellets nach Fällung mit 70 % (v/v) Aceton (P_{70}) war dafür der erste Schritt. Das Zielprotein wurde im mittleren Maßstab via fraktionierender Acetonfällung im Pellet aufkonzentriert, mit Puffer der pH-Werte 4,0, 7,0 und 11,0 vermischt und 1 h bei ~ 22 °C gerührt. Die Auswahl der zu untersuchenden pH-Werte ergab sich aus folgender Idee. Der theoretische isoelektrische Punkt (pI) des Zielproteins beträgt 9,2. Die Resolubilisierung des Zielproteins wurde getestet bei im Vergleich zum Zielprotein alkalischen ($\text{pH} > \text{pI}$, daher $\text{pH} = 11,0$) und sauren Bedingungen ($\text{pH} = 4,0$). Der Puffer mit $\text{pH} = 7,0$ bildet den neutralen pH-Wert von Wasser ab.

Eine Aufkonzentrierung des Zielproteins mittels fraktionierender Acetonfällung ist in Abbildung 3-8 A, Bahnen 2-4, gezeigt. Der Verlauf ist grundsätzlich wie in den bereits beschriebenen Experimenten (siehe Abbildung 3-7). Verunreinigende Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 35 kDa wurden hier im Vergleich stärker detektiert, was auf die Verwendung unterschiedlicher Biomasse zurückzuführen sein könnte.

Die versuchte Resolubilisierung des gefällten Zielproteins ist in den Bahnen 5-10 zu sehen. Unabhängig vom pH-Wert des jeweiligen Puffers wurde das primäre Ziel des Versuchs nicht erreicht. Nach einstündigem Rühren und anschließender Zentrifugation war das Zielprotein nahezu vollständig im Pellet zu finden (Bahnen 6, 8, 10). Interessanterweise konnten Wirtszellproteine wieder in Lösung gebracht werden (Bahnen 5, 7, 9). Beim Vergleich der Pellets war die Abtrennung der kontaminierenden Proteine bei pH 11 am stärksten, bei pH 7 und pH 4 gleich erfolgreich. Die Option, das Pellet statt mit einem pH 7-Puffer mit Leitungswasser zu waschen wurde aus Gründen der Vereinfachung untersucht und ist in Abbildung 3-8 B gezeigt. Nach Waschen des mit 70 % Aceton (v/v) gefällten Pellets (Bahn 1) war das Zielprotein weiterhin unlöslich und konnte via Zentrifugation abgetrennt werden (Bahn 3). Die Abscheidung von Wirtszellproteinen in den Überstand (Bahn 2) war weniger deutlich als in Teil A der Abbildung (Bahnen 5, 7 und 9). Für K- und Q-MaSp1-100xELP wurden aus jeweils 55 bzw. 64 g Pellet nach Fällung mit 70 % Aceton (P_{70}) jeweils 23,5 bzw. 19 g Waschpellet gewonnen. Somit sind vom Lysin-getagten Zielprotein 57 %, vom Glutamin-getagten Zielprotein 70 % verunreinigende Substanzen des P_{70} abgetrennt worden. Die angegebenen Werte entsprechen Feuchtmassen bzw. sind darauf bezogen. Es wird deutlich, dass durch Waschen des P_{70} eine weitere Aufkonzentrierung des Zielproteins erreicht werden konnte. Der Waschschritt wurde daher beibehalten.

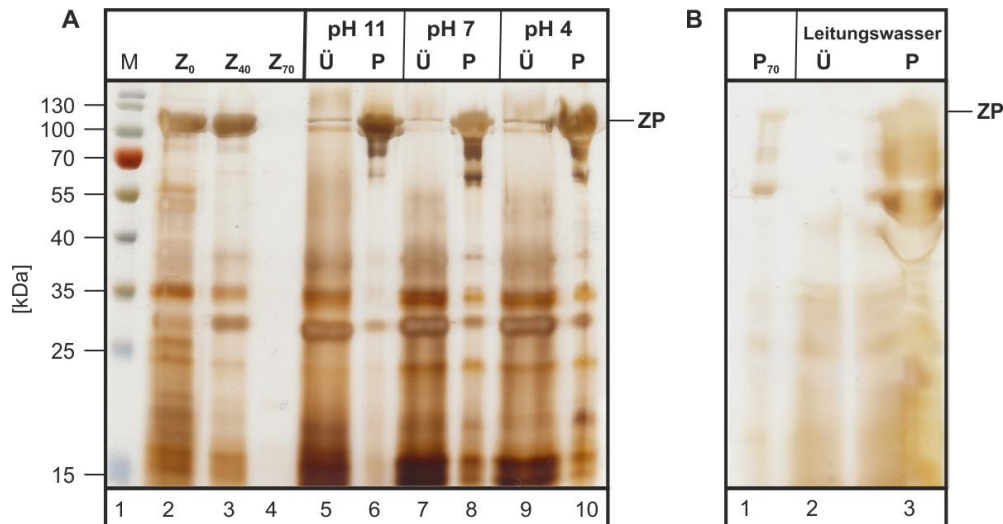


Abbildung 3-8: Reinigung von Q-MaSp1-100xELP durch Waschen des Pellets nach Acetonfällung. (A) 300 g BFM_{MW} wurden aufgetaut (4 °C, 16 h), mit 450 mL Leitungswasser (4 °C) versetzt und aufgeschossen (Haushaltsmixer Braun 4184, 5 min). Die lösliche Fraktion der Suspension ist in Bahn 2 aufgetragen. Fraktionierende Acetonfällung wurde durchgeführt durch Einstellen der Acetonkonzentration auf 40 % (v/v) (Bahn 3) und 70 % (v/v) (Bahn 4). Je 1/3 des Pellets nach Fällung mit 70 % (v/v) Aceton wurde mit Puffer versetzt, der den jeweils angegebenen pH-Wert aufwies (Bahnen 5-10). Nach einstündigem Rühren bei ~22 °C wurden 500 µL der Suspension zentrifugiert und Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Nach Trocknung der Proben wurde der Feststoff in 200 µL Probenpuffer resolubilisiert. (B) 5 kg BFM_{MW} wurden aufgeschossen und mittels fraktionierender Acetonfällung prozessiert. Das resultierende Pellet (Bahn 1) wurde mit Leitungswasser gewaschen. Nach Zentrifugation konnten Wirtszellproteine im Überstand (Bahn 2) und im Pellet nachgewiesen werden (Bahn 3). Das Zielprotein wurde nur im Pellet (Bahn 3) detektiert. M–PPL-Marker; Z–Überstände nach Zentrifugation mit 0 (Z₀), 40 (Z₄₀) und 70 % (v/v) Aceton (Z₇₀); P₇₀–Pellet nach Fällung mit 70 % (v/v) Aceton; ZP–Zielprotein; Detektionsmethode: Silberfärbung

Das grundlegende Ziel, das Zielprotein in einem Puffer mit einem bestimmten pH-Wert zu resolubilisieren, schlug fehl. Es konnte im Gegenzug eine Möglichkeit ermittelt werden, das Zielprotein auf einfachem Wege verstärkt zu reinigen. Bei pH 11 war die Abtrennung proteinogener Verunreinigungen am stärksten. Aus ökonomischen Gründen wurde im weiteren Verlauf der Waschschrift mit Leitungswasser untersucht und beibehalten. Die gewonnene Zielproteinmenge war im Vergleich zu den Ergebnissen von Weichert und Kollegen wie auch nach fraktionierender Acetonfällung um zwei Größenordnungen erhöht [Weichert et al., 2014].

3.5 Zentrifugationsbasiertes *Inverse Transition Cycling* (cITC) – erfolgreiche Feinreinigung

Das Zielprotein konnte durch fraktionierende Acetonfällung aufkonzentriert werden. Die gewonnene Produktmenge war um drei Größenordnungen höher als in der Vergleichsliteratur angegeben [Weichert et al., 2014]. Durch einen nachfolgend durchgeführten Waschschrift konnten 60-70 % verunreinigender Substanzen abgetrennt werden. Die Ausbeute an Produkt erschien dennoch zu hoch. Daher wurde eine Feinreinigung angestrebt (siehe Kapitel 2.9). Zu diesem Zweck wurde die Eigenschaft des gesteuerten reversiblen Agglomerationsverhaltens des ELP-tags ausgenutzt.

Das Produkt wurde in 6 M Urea resolubilisiert und dialysiert. Bei 40 °C erfolgte im Mikromaßstab die Abtrennung des unlöslichen Zielproteins. Die zur hitzeinduzierten Fällung des Zielproteins nötige NaCl-Konzentration wurde bestimmt nach Dialyse von Proben gegen Puffer mit 300, 500, 750 und 1.000 mM NaCl (siehe Abbildung 3-9).

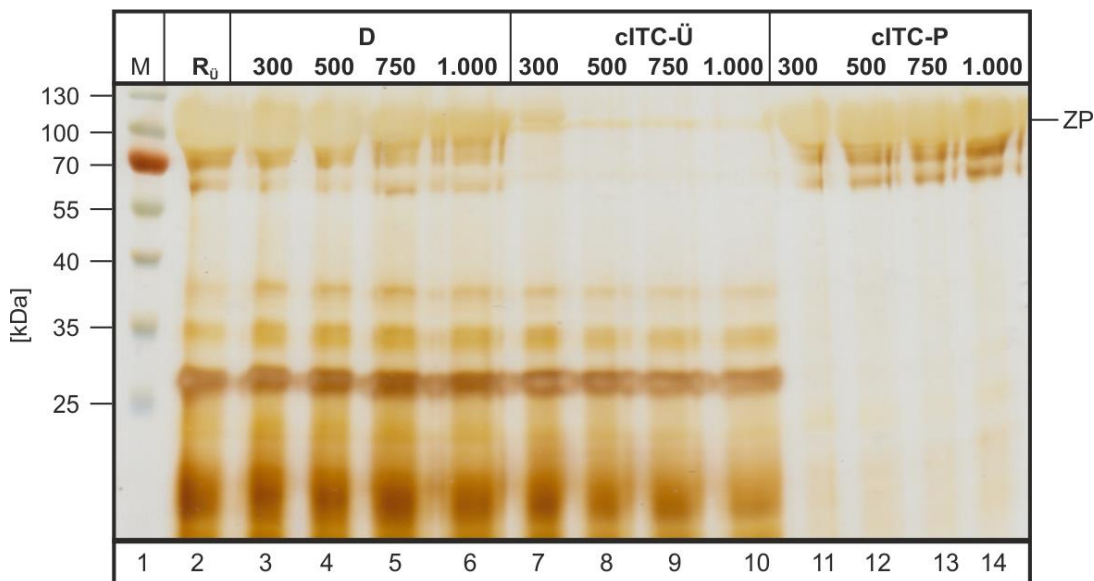


Abbildung 3-9: Feinreinigung von Q-MaSp1-100xELP durch zentrifugationsbasiertes *Inverse Transition Cycling* (cITC). Gewaschenes und lyophilisiertes Pellet aus der fraktionierenden Acetonfällung wurde in 6 M Urea resolubilisiert und zentrifugiert. Der Überstand (Bahn 2) wurde aliquotiert und gegen Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300-1.000 mM NaCl) dialysiert (D). Die Proben wurden auf 40 °C erhitzt und bei dieser Temperatur zentrifugiert. Das Zielprotein (ZP) wurde im Pellet (cITC-P) aufkonzentriert, lösliche Verunreinigungen verblieben im Überstand (cITC-Ü). M-PPL-Marker; R₀ – lösliche Fraktion des resolubilisierten Pellets nach fraktionierender Acetonfällung mit 70 % (v/v) Aceton; Detektionsmethode: Silberfärbung

Nach der Resolubilisierung waren Partikel in der Lösung sichtbar und wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand enthielt einen deutlichen Anteil des Zielproteins (Abbildung 3-9, Bahn 2). Klar erkennbar sind kontaminierende Wirtszellproteine mit einem Molekulargewicht kleiner 40 kDa. Ihr erneutes Auftreten im Vergleich zu Abbildung 3-7 C, Bahn 2, ist dadurch zu erklären, dass die Gesamtprobe um das 85-fache aufkonzentriert worden war.

Durch Dialyse wurde das Zielprotein scheinbar verloren (Abbildung 3-9, Bahnen 3-6). Die Verringerung der Bandenintensität mit steigender NaCl-Konzentration ist jedoch auf die Verbreiterung der Bahn zurückzuführen. Während der Dialyse wurde folglich kein Verlust des Zielproteins nachgewiesen.

Nach cITC wurde das Zielprotein im Pellet („cITC-P“, Bahnen 11-14) detektiert, Wirtszellproteine verblieben vollständig im Überstand (cITC-Ü, Bahnen 7-10). Aufgrund der hohen Proteinkonzentration konnten verkürzte Versionen des Zielproteins nachgewiesen. Bei einer Konzentration von 300 mM NaCl wurde Zielprotein auch im Überstand (Bahn 7) gefunden. Die Pellets wurden getrocknet und gewogen. Die für 300, 500, 750 und 1.000 mM gefundene Produktmenge war jeweils 20,1, 25,2, 27,5 und 27,0 mg. Aufgrund dieser Daten wurde der Entschluss gefasst, die Feinreinigung von Q-/K-MaSp1-100xELP mit 750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8) durchzuführen.

3.6 Reinigung von Q-/K-MaSp1-100xELP im Pilotmaßstab

Bisher konnten die fraktionierende Acetonfällung im Pilotmaßstab sowie die Feinreinigung von Q- und K-MaSp1-100xELP im Mikromaßstab gezeigt werden. Die Reinigungsprozedur ist schematisch in Abbildung 3-10 dargestellt.

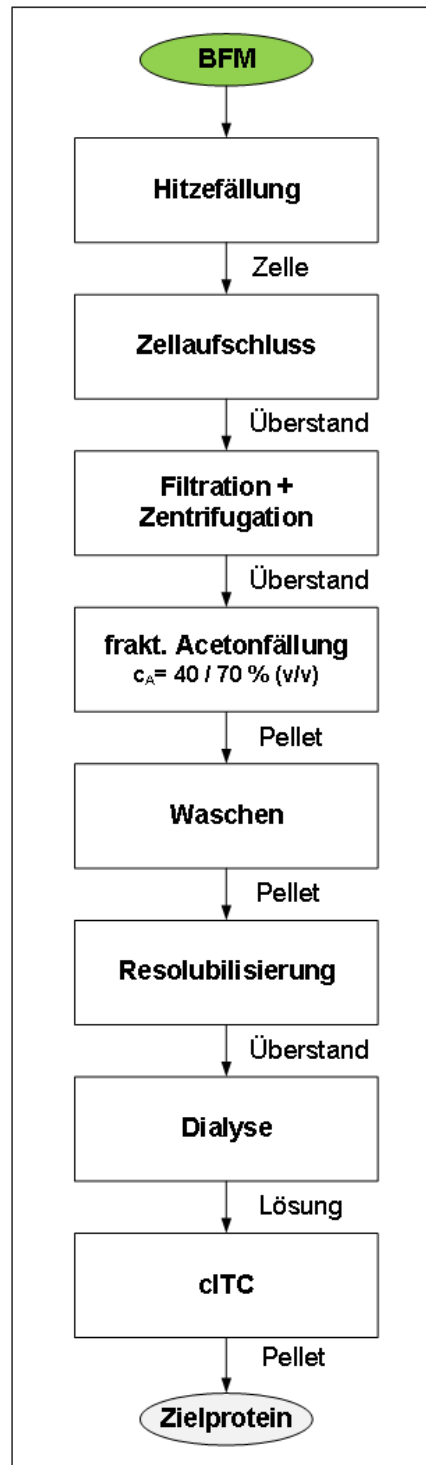


Abbildung 3-10: Schema der Reinigung von Spinnenseidenanaloga aus Tabakblättern im Pilotmaßstab.

Nach problemloser Maßstabsübertragung dieser Methode gestaltete sich die Gesamtreinigung des Zielproteins wie in Abbildung 3-11 gezeigt (siehe Kapitel 2.7 und 2.9).

Nach dem Aufschluss von 6 kg BFM_{MW} wies die Suspension (Abbildung 3-11, Bahn 2) einen hohen Proteingehalt auf, erkennbar an der stark dunklen Färbung der gesamten Bahn. Durch die Filtration (Bahn 3) konnte ein großer Teil der Proteine sowie weitere Kontaminanten abgetrennt werden. Das Signal ist im Vergleich zu Bahn 2 deutlich abgeschwächt. Es ist eine dominante Bande in Höhe von 25 kDa zu sehen. Eine weitere Bande bei 110 kDa repräsentiert, ausgehend von vorherigen Versuchsergebnissen (vgl. Kapitel 3.3.1, Abbildung 3-6), das Zielprotein. Das Filtrat enthielt Trübstoffe und wurde daher zentrifugiert. Im Gel ist der Reinigungserfolg nicht erkennbar. Bei den durchgeführten Versuchen konnten so mindestens 35 g feuchtes Pellet abgetrennt werden. Durch die Inkubation des resultierenden Überstandes mit anschließender Zentrifugation (Bahn 5) konnte ein Teil der verbliebenen Wirtszellproteine abgetrennt werden. In der gesamten Probe ist das Signal schwächer als in Bahn 4. Die dominante Bande bei 25 kDa wurde weniger stark nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den vorher gezeigten Versuchen (Abbildung 3-7).

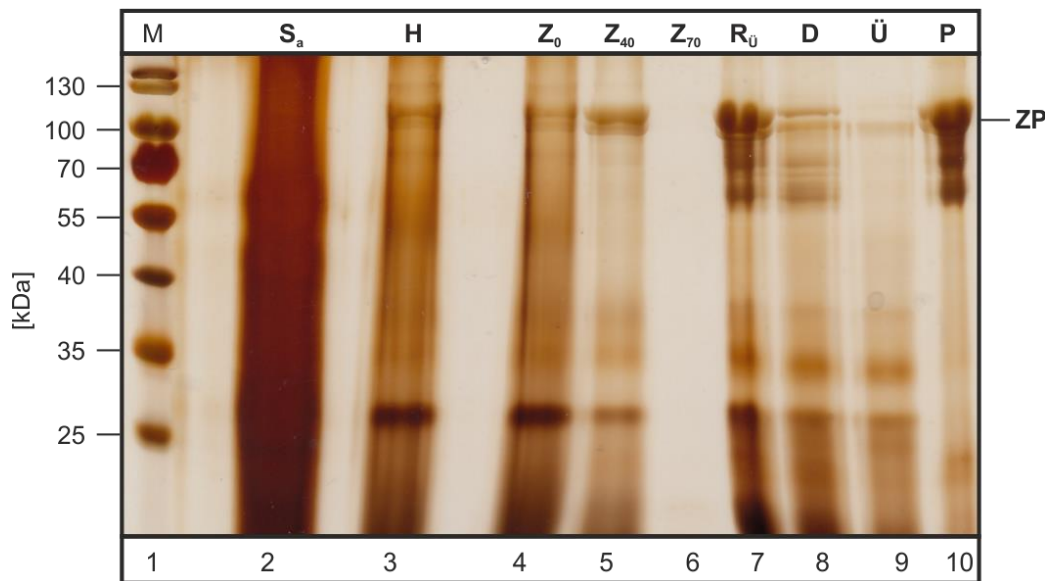


Abbildung 3-11: Reinigung von Q-MaSp1-100xELP im Pilotmaßstab aus *Nicotiana tabacum*-Blättern. 2x3 kg BFM_{MW} (nach Mikrowelleninkubation eingefroren) wurden aufgetaut (16 h, 4 °C), mit Leitungswasser gemischt (je 3 L) und mit einem Table Top Cutter aufgeschlossen. Die Suspension (Bahn 2) wurde mittels Filtration (Bahn 3) und Zentrifugation (Bahn 4) geklärt. Fraktionierende Acetonfällung wurde durch Einstellen der Acetonkonzentration auf 40 % (Bahn 5, Z₄₀-Überstand nach Zentrifugation) und 70 % (v/v) (Bahn 6, Z₇₀-Überstand nach Zentrifugation) durchgeführt. Das resultierende Pellet wurde mit Leitungswasser gewaschen. Nach Resolubilisierung in 6 M Urea und Zentrifugation wurde der Überstand (Bahn 7) dialysiert gegen 750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 (Bahn 8). Das Zielprotein konnte schließlich *via* cITC von löslichen Kontaminationen Bahn 9) separiert und aufkonzentriert (Bahn 10) werden. M–PPL-Marker; S_a–Suspension a; H–Filtrat der Hydropresse; Z–Überstände nach Zentrifugation mit 0 (Z₀), 40 (Z₄₀) und 70 % (v/v) Aceton (Z₇₀); R_Ü–lösliche Fraktion des resolubilisierten und gewaschenen Pellets nach Fällung mit 70 % (v/v) Aceton; D–R_Ü dialysiert gegen 750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; Ü–lösliche Fraktion von D nach cITC; P–Pellet von D nach cITC; Detektionsmethode: Silberfärbung

Durch Inkubation bei $c_A = 70\%$ (v/v) wurde das Zielprotein inklusive kontaminierender Proteine vollständig gefällt (Bahn 6). Nach Waschen (mit Leitungswasser) wurde das Produkt resolubilisiert und zentrifugiert (Bahn 7). Das Zielprotein und kontaminierende Proteine wurden aufgrund der Aufkonzentrierung (Faktor 50) deutlich stärker nachgewiesen als in Bahn 4. Nach Dialyse gegen 750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8 (Bahn 8) wurde ein Verlust des Zielproteins beobachtet. Die korrespondierende Bande war im Vergleich zu Bahn 7 deutlich abgeschwächt. Dieser scheinbare Verlust des Zielproteins ist nicht real, sondern begründet durch mangelnde Detektierbarkeit des Zielproteins bei hohen NaCl-Konzentrationen in der Probe (siehe Kapitel 3.7.3). Nach cITC verblieben proteinogene Verunreinigungen vollständig im Überstand (Bahn 9), das Zielprotein konnte im Pellet mit hoher Reinheit aufkonzentriert werden (Bahn 10).

Der Filterkuchen nach Filtration mit der Hydropresse wies einen Restfeuchtegehalt von $78,0 \pm 1,0\%$ (w/w) auf. In dieser Flüssigkeit ist Zielprotein enthalten, welches verloren geht. Durch erneutes Waschen des Filterkuchens wäre es möglich, die totale Menge an extrahierbarem Zielprotein zu erhöhen. Als nachteilig könnte sich auswirken, dass der Arbeitsaufwand steigt, mehr Aceton eingesetzt und insgesamt mehr Flüssigkeit prozessiert werden muss.

Das beschriebene Reinigungsverfahren wurde für beide Zielproteine angewendet. Aus 5,2 bzw. 6 kg BFM_{MW} wurden jeweils 273 mg K-MaSp1-100xELP bzw. 413 mg Q-MaSp1-100xELP isoliert. Dies entspricht Ausbeuten von 53 bzw. 69 mg für das Lysin- und das Glutamin-getagte MaSp1-100xELP pro kg BFM. Die Werte sind in der gleichen Größenordnung wie bei Weichert und Kollegen, die 65-75 mg Zielprotein pro kg BFM berichten ([Weichert et al., 2014]). Die insgesamt in einem Lauf gereinigte Menge Spinnenseidenprotein aus Tabak ist die höchste, die aktuell in der Literatur belegt ist.

Die in den Kapiteln 3.3-3.6 gezeigten Ergebnisse sind, mit Ausnahme von Abbildung 3-5 inklusive dazugehöriger Diskussion, vollständig publiziert [Heppner et al., 2016].

3.7 Weiterführende Untersuchungen

3.7.1 Abreicherung löslicher Polyphenole

Tabakblätter enthalten neben proteinogenen Kontaminanten Alkaloide und Polyphenole, die die Reinheit des finalen Produktes beeinträchtigen können [Xia et al., 2014]. Im Maßstab von 300 g Biofeuchtmasse wurde untersucht, ob durch fraktionierende Acetonfällung neben Wirtszellproteinen auch lösliche Polyphenole abgetrennt werden können (siehe Kapitel 2.5 und 2.10). Beim dazu verwendeten Folin-Ciocalteu-Test diente Gallsäure als Referenz- und Kalibriersubstanz.

Das erfolgreiche Ergebnis ist in Abbildung 3-12 gezeigt. Wurden zu Beginn des Versuchs 909 $\mu\text{g/mL}$ Gallsäureäquivalente (GSÄ) in der Lösung detektiert, waren es nach Ende der fraktionierenden Acetonfällung noch 866 $\mu\text{g/mL}$. Das bedeutet, dass über das angewandte Verfahren 95 % der polyphenolischen und weitere antioxidative Substanzen abgetrennt werden konnten, da diese im Überstand verblieben. Das Zielprotein wurde als Pellet abgetrennt.

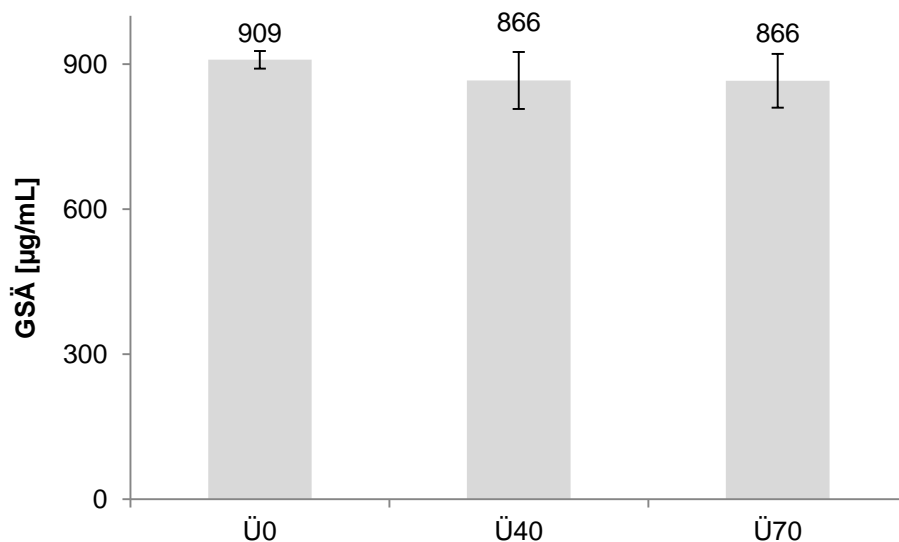


Abbildung 3-12: Abtrennung von Polyphenolen durch fraktionierende Acetonfällung. 300 g BFM_{MW} (nach Mikrowelleninkubation eingefroren) wurden aufgetaut (16 h, 4 °C), mit Leitungswasser gemischt (300 mL) und mit einem Haushaltsmixer aufgeschlossen. Nach jedem Zentrifugationsschritt innerhalb der Fraktionierungen wurde 1 mL Überstand verwendet, um mittels Folin-Ciocalteu-Test den Gehalt an Gallsäureäquivalenten (GSÄ) zu bestimmen ($n=3$). Ü–Überstand; 0, 40, 70–Acetongehalt in % (v/v)

Die Bestimmung des Phenolgehalts einer Probe mittels Folin-Ciocalteu-Test ist nicht spezifisch. Vielmehr werden generell reduzierende Verbindungen detektiert, z.B. Seitenketten von Tyrosin und Tryptophan [Everette et al., 2010; Lowry et al., 1951]. Polyphenole sind jedoch gut löslich in organischen Lösungsmitteln wie Aceton und Aceton-Wasser-Gemischen [Tsao, 2010]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die deutliche Menge nachgewiesener Substanzen am Ende des Verfahrens eine ähnliche Zusammensetzung hatte wie in der ersten Probe („Ü0“). Somit bleibt als Fazit, dass mit der durchgeführten fraktionierenden Aceton-

fällung neben proteinogenen Verunreinigungen weitere organische Substanzen abgetrennt werden können.

3.7.2 Steigerung des Molekulargewichts künstlicher Spinnenseidenproteine durch Vernetzung

Eine grundsätzliche Hypothese in der Spinnenseidenforschung lautet, dass materialwissenschaftliche Kennwerte wie Zugfestigkeit und Elastizität maßgeblich von der Größe der Spinnenseidenmonomere abhängen [Ayoub et al., 2007]. Die Produktion künstlicher Spinnenseidenproteine natürlicher Größe ist daher von maßgeblicher Relevanz. Eine Möglichkeit, dies zu realisieren, besteht in der Quervernetzung gereinigter Monomere z.B. mittels mikrobieller Transglutaminase (mTG). Im folgenden Versuch wurde eine mutierte Variante dieses Enzyms (mTG-S2P) erfolgreich verwendet, um das Molekulargewicht des nach Acetonfällung und Waschen gewonnenen Zielproteins deutlich zu erhöhen.

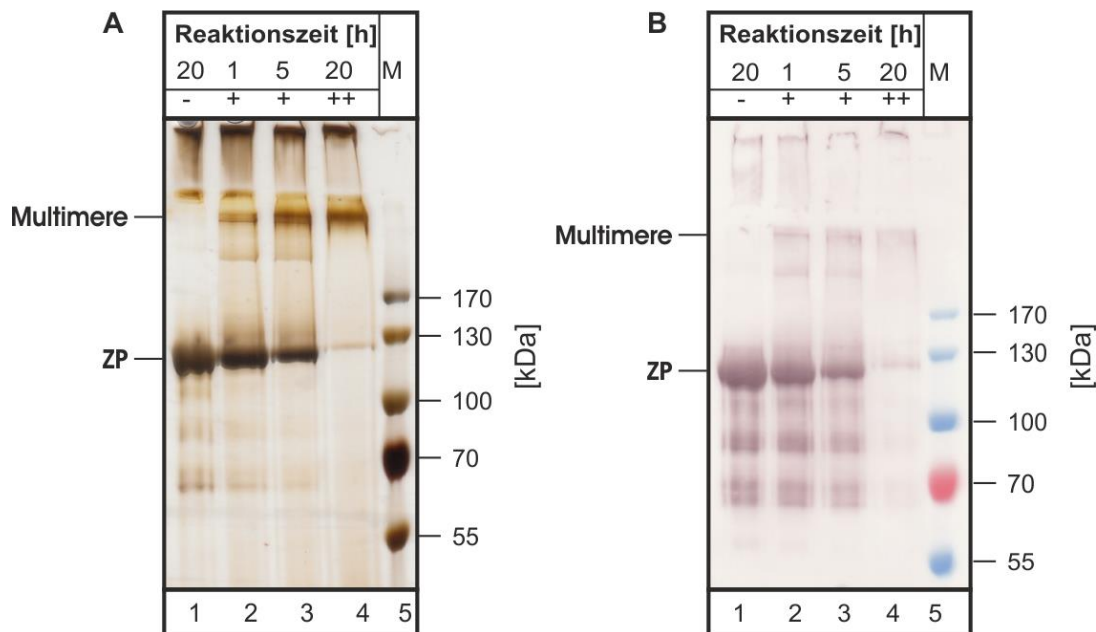


Abbildung 3-13: Quervernetzung von Q- und K-MaSp1-100xELP mittels mTG-S2P. Das jeweilige Pellet von Q- und K-MaSp1-100xELP nach fraktionierender Acetonfällung mit 70 % (v/v) Aceton wurde gewaschen und in 6 M Urea resolubilisiert. Nach Dialyse gegen 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, wurden je 625 μ L Zielprotein-haltiger („ZP“) Lösung gemischt, mit 1,56 U mTG-S2P („+“) oder mit Dialysepuffer („-“) versetzt und bis zu 20 h bei 25 °C inkubiert. Die Probenahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Nach fünfständiger Inkubationsdauer wurde im Ansatz mit mTG-S2P durch Zugabe weiterer 1,56 U die theoretisch enthaltene Aktivität verdoppelt („++“). M – PPL-Marker; (A) mit Silber gefärbtes Gel; (B) Western Blot; primärer Antikörper anti-c-myc; sekundärer Antikörper Anti-IgG-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, chromogene Nachweisreaktion

In Abbildung 3-13 A, Bahn 1, ist zu sehen, dass die beiden Zielproteine Q- und K-MaSp1-100xELP nicht ohne weiteres multimerisieren. Die Zielproteine wurden zwischen 100 und 130 kDa detektiert, über den Reaktionszeitraum von 20 h wurde keine Zunahme des Moleku-

largewichts festgestellt. Weiterhin wurden geringfügige Verunreinigungen durch Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner 100 kDa detektiert. In Bahn 2 ist eine Probe des Reaktionsgemischs nach einstündiger Inkubation mit MTG-S2P aufgetragen. Im oberen Bereich des Gels sind Proteine größer als 170 kDa erkennbar („Multimere“), die bei der Vergleichsprobe in Bahn 1 nicht detektiert wurden. Die Intensität dieser Banden nahm im weiteren Versuchsverlauf zu (Bahnen 3 und 4). Konträr dazu zeigte sich das Verhalten des Zielproteingemischs, das nach 20-stündiger Inkubation nur noch schwach vorhanden war. Die proteino-genen Verunreinigungen waren am Ende des Versuches nicht mehr nachweisbar. Sie wurden sehr wahrscheinlich in die höhermolekularen Banden inkorporiert. Die nachgewiesene Abnahme der Zielproteingemisch-Bande korrelierte nicht direkt mit der Zunahme der höher molekularen „Multimere“-Bande. Am oberen Rand des Gels sind die Geltaschenböden erkennbar. In allen Bahnen, die Quervernetzungs-Proben enthielten, wurde Protein detektiert. Denkbar ist, dass hochmolekulares quervernetztes Zielprotein in den Bahnen 2-4 nicht oder kaum in die Poren des Gels eindringen konnte, sondern schon in den Geltaschen hängen blieb.

Der Western Blot in Abbildung 3-13, B, bestätigt partiell die gemachten Aussagen. In Bahn 1 wird das Zielproteingemisch zwischen 100 und 130 kDa mittels spezifischen Antikörpers detektiert. Unterhalb der Hauptbande sind schwache verkürzte Produkte zu sehen. Das Bandenmuster entspricht 1:1 dem in Abbildung 3-13, A. Zielprotein wurde wie für die restlichen Proben auch am Geltaschen-Boden nachgewiesen. In den Bahnen 2-4 ist erneut der Verlauf der Vernetzungsreaktion dargestellt. Deutlich zu sehen ist die Abnahme der Zielproteinbande über 20 h. Am Ende des Versuchs (Bahn 4) wurde das Zielproteingemisch nur noch schwach detektiert, analog zum Ergebnis im Silbergel. Das darüber liegende Bandenmuster der Multimere entspricht ebenso dem in Abbildung 3-13, A. Die „Multimere“-Bande des Western Blots ist allerdings nur in den Bahnen 2 und 3 schwach zu sehen, in Bahn 4 wurde sie nicht detektiert. Das geschilderte Ergebnis steht damit in scheinbarem Widerspruch zur Erwartungshaltung, dass diese Bande aus quervernetztem Zielprotein besteht. Eine mögliche Erklärung liefert der grundlegende Mechanismus der Multimerisierung. Das Enzym mTG-S2P verknüpft Glutamin- und Lysin-Seitenketten von (Poly-)Peptiden und Proteinen. Die Aminosäuresequenz des zur Detektion verwendeten c-myc-tags lautet im Einbuchstaben-code EQKLISEEDL, wobei Q für die Aminosäure Glutamin und K für die Aminosäure Lysin steht. Es ist anzunehmen, dass das Enzym zumindest eine der beiden in Frage kommenden Aminosäuren(-reste) innerhalb dieses tags zur Quervernetzung mit anderen Molekülen nutzt [Facchiano und Facchiano, 2009; Malešević et al., 2015; Tanaka et al., 2004]. Dies würde mit hoher Wahrscheinlichkeit zu strukturellen Änderungen im und am c-myc-tag führen. Die Bindung des Paratops des primären Antikörpers wäre dann gestört. Der Nachweis, dass die in Abbildung 3-13 A nachgewiesenen Multimere tatsächlich aus Q- und K-MaSp1-100xELP

bestehen wäre über ESI-MS möglich gewesen. Aus Kostengründen wurde jedoch darauf verzichtet.

3.7.3 Verringerung der Detektierbarkeit des Zielproteins durch Salzionen

Während der Untersuchungen zum cITC konnte festgestellt werden, dass die betrachteten Zielproteine Q- und K-MaSp1-100xELP bei „hoher“ NaCl-Konzentration schwach oder gar nicht nachweisbar waren im Vergleich zu Lösungen mit geringeren NaCl-Konzentrationen. Dies ist z.B. in Abbildung 3-11, Bahn 8, zu sehen. Aufgetragen wurde eine Probe der in Bahn 7 dargestellten Probe nach Dialyse gegen 750 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl, pH 8. Deutlich erkennbar ist die Abschwächung des Detektionssignals der enthaltenen Proteine. Das folgende Experiment (siehe Kapitel 2.12) dient der Erklärung dieser Beobachtung. Auf jede Bahn wurde theoretisch die gleiche Proteinmenge aufgetragen. Dafür wurden alle Proben vor Zugabe des Probenpuffers und vor Auftrag auf das Gel zwei Sekunden mittels Vortexer homogenisiert. Der jeweilige Unterschied bestand in der Art und Menge der Salzionen.

In Abbildung 3-14 ist das Versuchsergebnis in Form eines mit Silber gefärbten PA-Gels und eines Western Blots des gleichen Gels dargestellt. Die folgenden Aussagen, das Zielprotein betreffend, gelten, soweit nicht anders angegeben, für A und B. Bahn 2 zeigt eine SDS-PAGE-Probe des Zielproteins in dH₂O. Zwischen 100 und 130 kDa ist die dominante Zielproteinbande zu erkennen (vgl. Kapitel 3.3.1, Abbildung 3-6). Diese ist oval geformt durch die große Menge an aufgetragenem Zielprotein. Proteine im Bereich von 55-70 kDa wurden mit Hilfe des Western Blots als Zielproteinfragmente nachgewiesen.

In allen folgenden Proben war die Ausgangsprobe so verdünnt, dass entweder 2 M Na⁺-Ionen oder 2 M Cl⁻-Ionen in der Lösung vorlagen. Eine leichte Abschwächung der Intensität aller Banden im Vergleich zu Bahn 2 konnte in Bahn 5 bei NaNO₃ beobachtet werden. Das Proteinsignal war weiter verringert in den Bahnen 3 (NaCl), 6 (LiCl) und 8 (MgCl₂). Durch Verwendung von Na-Acetat in Bahn 4 und KCl in Bahn 7 erfolgte eine nochmalige Abnahme der Bandenintensität, in Bahn 9 (CaCl₂) wurden keine Proteine mehr nachgewiesen.

Die Erklärung des kompletten Signalverlustes in Bahn 9 liegt möglicherweise in der Probenbehandlung für die SDS-PAGE. Dabei bindet der unpolare Teil des Detergens Laurylsulfat an das Rückgrat von Proteinen und exponiert Sulfationen ins Lösungsmittel. Diese können sich mit gelösten Calciumionen verbinden und schwer lösliche Proteinkomplexe bilden. Dadurch bleiben sie in der Geltasche hängen und werden nicht aufgetrennt.

Eine Erklärung der Signalabschwächung der weiteren chloridhaltigen Proben in den Bahnen 6-8 für beide Detektionsmethoden ist schwierig. Unter Umständen ist auch hier eine partielle Fällung der Proteine Ursache der Beobachtung. Die Bandenintensität für KCl ist geringer als

für LiCl und MgCl₂. Dieser Fakt korreliert positiv mit dem Aussalzverhalten der jeweiligen Kationen laut der Hofmeister-Reihe [Lottspeich und Engels, 2012]. Im Widerspruch dazu steht scheinbar die NaNO₃-Probe in Bahn 5. Nach der Hofmeister-Reihe wäre für diese Probe ein Fällungsverhalten ähnlich dem von K⁺- bzw. Li⁺-Ionen zu erwarten. Allerdings sind hier NO₃⁻-Ionen als Gegenionen in der Lösung, was den Fällungseffekt theoretisch abschwächt. Zudem ist es schwierig, den Einfluss der unterschiedlichen Bahnbreiten abzuschätzen.

Ursache für die geringe Signalintensität der Probe mit Na-Acetat in Bahn 3 ist wahrscheinlich ebenfalls die Fällung der meisten Proteine in Gegenwart von SDS und großen Mengen Acetat. Dieses Verfahren wird oft angewendet, um Proteine von DNA zu trennen [Sambrook und Russell, 2001].

Die in Abbildung 3-11, Bahn 8, und Abbildung 3-14 A und B, Bahn 3 beobachtete Abschwächung des Zielproteinsignals kann aufgrund der erzielten Ergebnisse wie folgt erklärt werden. Sowohl die Natrium- als auch die Chloridionen wirken sich negativ auf die Löslichkeit des Zielproteins aus. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Chloridionen einen zusätzlichen negativen Effekt auf die Silberfärbung wie die Bildung schwer löslichen Silberchlorids haben. Insgesamt ist es jedoch wahrscheinlich, dass ein Großteil der in der Probe befindlichen Proteine während der SDS-PAGE am Boden der Geltasche hängen geblieben ist. Sollten Proben mit „hohen“ Salzkonzentrationen mittels SDS-PAGE analysiert werden, ist es daher unter Umständen nötig, diese vor Zugabe von und Inkubation mit Probenpuffer zu entsalzen. Dieses kann durch Dialyse oder Fällung erreicht werden.

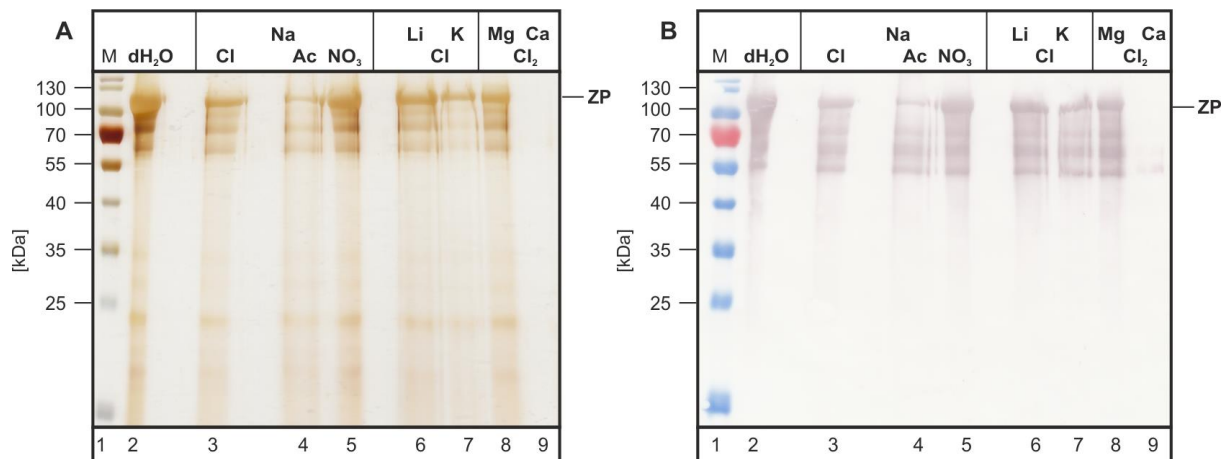


Abbildung 3-14: Einfluss von Salzionen auf die Nachweisbarkeit des Zielproteins. 10 mg/mL Pellet nach cITC wurden in 6 M Urea gelöst, gegen dH₂O dialysiert und zentrifugiert. Im Überstand wurde durch Vermischen mit dH₂O („dH₂O“) bzw. Salzlösungen (im Verhältnis 1:2) eine Konzentration von 2 M Natrium- oder Chloridionen mit korrespondierenden Gegenionen eingestellt. Die Proben wurden 1:2 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. M – PPL-Marker, Na – Natrium, Li – Lithium, K – Kalium, Mg – Magnesium, Ca – Calcium, Cl – Chlorid, Ac – Acetat, NO₃ – Nitrat (A) mit Silber gefärbtes Gel; (B) Western Blot; primärer Antikörper anti-c-myc; sekundärer Antikörper Anti-IgG-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, chromogene Nachweisreaktion

3.7.4 Übertragung der Reinigungsmethode zur Gewinnung von 1xFlag-100xELP

Die Reinigung von Q-/K-MaSp1-100xELP im Pilotmaßstab konnte erfolgreich etabliert werden (siehe Kapitel 3.6). Im Folgenden sollte die Prozedur für die Gewinnung von 1xFlag-100xELP adaptiert werden. Dafür wurde im ersten Teil die Durchführbarkeit der fraktionierenden Acetonfällung verifiziert. Anschließend erfolgte die Anpassung der Wasch- und cITC-Schritte an das Löslichkeitsverhalten des Zielproteins.

3.7.4.1 Fraktionierende Acetonfällung im Mikromaßstab

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, war im Anschluss an die Hitzeinkubation der Biomasse eine fraktionierende Acetonfällung die Methode der Wahl, um i) Wirtszellproteine abzutrennen und ii) das Zielprotein im Pellet zu konzentrieren. Die Übertragbarkeit dieser Methode war der erste Schritt bei der Entwicklung der Reinigungsmethode für 1xFlag-100xELP.

Die fraktionierende Acetonfällung wurde wie in Kapitel 3.3.1 (siehe auch Kapitel 2.7) im Mikromaßstab untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-15 gezeigt. Dunkle Flecken, besonders in Abbildung 3-15 B in den Bahnen 3-5 zwischen 35 und 40 kDa, sind bedingt durch Restfeuchte während des Scannens der Membran.

Die Hauptbande des Zielproteins wurde mittels Western Blot zwischen 70 und 100 kDa detektiert. Ausgehend davon ist ein abgeschwächtes Signal kontinuierlich bis 100 kDa zu sehen. Die nachgewiesene Größe des Zielproteins mit ~90 kDa weicht deutlich vom theoretischen Molekulargewicht (60 kDa) ab. Ursache dafür könnte ein ungewöhnliches Bindungsverhalten von SDS an das Zielprotein während der Präparation der SDS-PAGE-Proben sein. Bei einer Vielzahl von Membranproteinen wird dieses Phänomen als Grund für ein ungewöhnliches Migrationsverhalten in SDS-PA-Gelen angesehen. Der hydrophobe ELP-tag des Zielproteins 1xFlag-100xELP könnte wie bei diesen auch oder gerade durch die Inkubation bei 99 °C Strukturen bilden, an die Laurylsulfat-Ionen nur noch vermindert binden. In der Folge wäre das Grundprinzip der SDS-PAGE, nämlich ein relativ konstantes Verhältnis von Molekülmasse des Proteins zu Ladung, gestört. Bei einer verminderten Bindung von Laurylsulfat-Ionen würde das Zielprotein in der Folge während der Gelelektrophorese langsamer durch das Gel migrieren als Proteine vergleichbarer Größe [Rath et al., 2009]. Eventuell ist die nachgewiesene Abweichung des tatsächlichen vom theoretischen Molekulargewicht auch bedingt durch posttranslationale Modifikationen des Zielproteins, wie z.B. Glykosylierungen und/oder Phosphorylierungen [Nover und Weiler, 2008]. Daraus kann die Steigerung des detektierbaren Molekulargewichts von ~50 % resultieren [Wegener und Jones, 1984]. Eine Erklärung für die Streuung des Signals im Bereich von 90-110 kDa ist der Nachweis von Zielproteinen mit heterogenem Molekulargewicht, z.B. durch O-Glykosylierung [Nguema-Ona et al., 2014].

In der löslichen Fraktion wurde das Zielprotein mit gleichbleibender Signalintensität bis zu einer Acetonkonzentration von 50 % (v/v) nachgewiesen (Abbildung 3-15 A, Bahnen 2-7). In der unlöslichen Fraktion ist das Zielproteinsignal ab $c_A=40$ % (v/v) schwach zu sehen (Abbildung 3-15 B, Bahn 6) mit identischem Ergebnis bei $c_A=50$ % (v/v) (Bahn 7). Bei einer Acetonkonzentration von 60 % (v/v) war ein drastischer Anstieg der Signalintensität zu verzeichnen, die bis $c_A=80$ % konstant blieb (Bahnen 8-10). Das Zielprotein war demzufolge nahezu komplett löslich bis zu $c_A=40$ % (v/v) und komplett unlöslich ab $c_A=60$ % (v/v).

In Abbildung 3-15 C ist das zum Western Blot in Teil A korrespondierende, mit Silber gefärbte Gel der löslichen Fraktionen gezeigt. Trotz der Hitzeinkubation mittels Blanchieren waren bis zu einer Acetonkonzentration von 0-20 % (v/v) (Bahnen 2-4) Wirtszellproteine löslich. Dominante Banden wurden in Höhe von ~110 kDa, 60 kDa, 50 kDa und 35 kDa detektiert. Ab einer Bande bei 30 kDa bis zum Ende des Gels war der Rest der Bahn dunkel gefärbt, einheitliche Banden wurden nicht beobachtet. Bei $c_A=30$ % (v/v) (Bahn 5) war der nahezu vollständige Verlust der Proteine >35 kDa zu beobachten. Eine drastische Abscheidung von Wirtszellproteinen konnte in Bahn 6 bei $c_A=40$ % (v/v) nachgewiesen werden. Die Bande in Höhe von 35 kDa sowie zwei Banden in Höhe von 20 kDa sowie am unteren Gelrand sind noch schwach zu sehen. In den verbliebenen Bahnen 7-10 ($c_A=50-80$ %; v/v) wurde prak-

tisch kein Protein mehr nachgewiesen. Eine klare Zielproteinbande in Höhe des Signals aus den gezeigten Western Blots konnte nicht erkannt werden. Das Gesamtergebnis ist in Übereinstimmung mit den bisher gezeigten Untersuchungen (vgl. Abbildung 3-6 C). Die nach Hitzeinkubation löslichen Wirtszellproteine sind durch Einstellung einer Acetonkonzentration von 40 % (v/v) großteils ausfällbar. Die mangelnde Nachweisbarkeit des Zielproteins trotz hoch sensitiver Silberfärbung ist möglicherweise begründet durch eine geringe Konzentration von 1xFlag-100xELP in den löslichen Fraktionen.

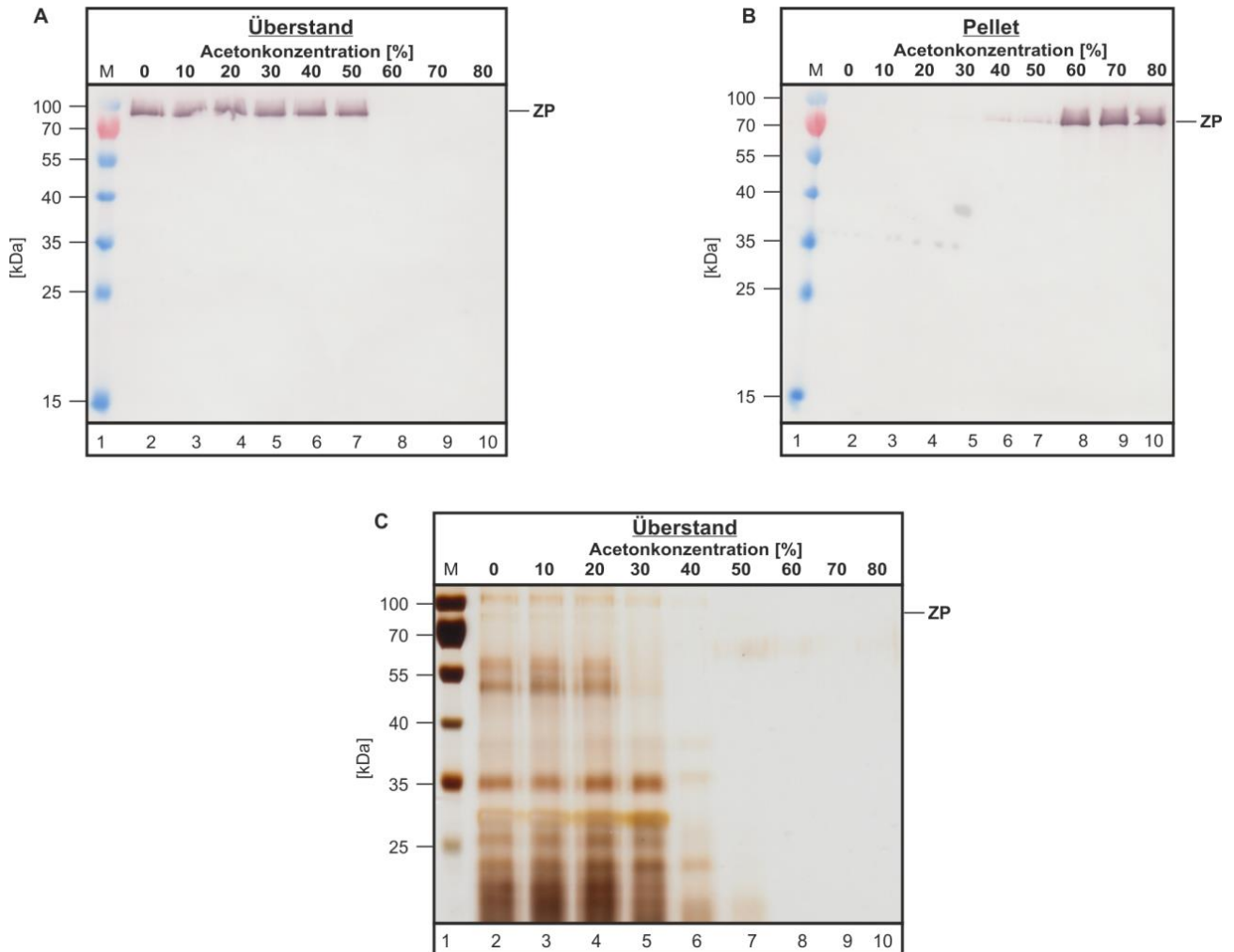


Abbildung 3-15: Acetonfällung von Wirtszellproteinen und 1xFlag-100xELP im Mikromaßstab. 50 g BFM_{bl} (nach Blanchieren eingefroren) wurden aufgetaut (12 h, 4 °C), mit 50 mL Leitungswasser gemischt und im Haushaltsmixer (Braun 4184; 5 min) aufgeschlossen. 250 µL Suspension wurden im Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 mL dH₂O, dH₂O-Aceton oder Aceton versetzt, um die jeweilige Acetonkonzentration im Versuchsansatz einzustellen. Nach 30-minütiger Inkubation (4 °C) erfolgte die Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (4 °C, 16.100 g, 5 min) mit anschließender Trocknung. Die Überstands- und Pelletproben wurden in 50 bzw. 440 µL Probenpuffer resolubilisiert. M–PPL-Marker; ZP–Zielprotein; (A) und (B) mittels Western Blot nachgewiesenes Zielprotein in Überstands- bzw. Pelletproben; primärer Antikörper anti-c-myc; sekundärer Antikörper Anti-IgG-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, chromogene Nachweisreaktion (C) mit Silber gefärbtes Gel der löslichen Fraktionen

Das Löslichkeitsverhalten von 1xFlag-100xELP bei den untersuchten Acetonkonzentrationen war sehr ähnlich dem von Q-/K-MaSp1-100xELP. Dies führte zu dem Entschluss, 1xFlag-100xELP im Pilotmaßstab ebenfalls fraktionierend mit $c_A=40\%$ und $c_A=70\%$ (v/v) zu gewinnen.

3.7.4.2 Fraktionierende Acetonfällung im Pilotmaßstab

Das Löslichkeitsverhalten von 1xFlag-100xELP in Acetongemischen war äquivalent dem von Q-/K-MaSp1-100xELP. Daher wurde im Folgenden die etablierte fraktionierende Acetonfällung im Pilotmaßstab (siehe Kapitel 3.3.2) zur Gewinnung von 1xFlag-100xELP angewandt.

Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 3-16 gezeigt. Im mit Silber gefärbten Gel (A) ist in Bahn 2 eine Suspensionsprobe aufgetragen. Die Bahn ist aufgrund des hohen Proteingehalts sehr dunkel gefärbt mit dominanten Banden in Höhe von 55, 40 und 25 kDa.

Durch den ersten Filtrationsschritt (Bahn 3) konnte eine Abtrennung hauptsächlich von Proteinen mit einem Molekulargewicht <40 kDa erzielt werden. Erkennbar ist dies durch das deutlich hellere Erscheinungsbild der Bahn im Bereich von 40 kDa bis zum unteren Gelrand.

Es wurden die gleichen dominanten Banden wie zuvor nachgewiesen. Durch das Waschen des Filterkuchens mit anschließender Filtration wurden weitere Proteine aus der Suspension extrahiert (Bahn 4). Im Vergleich zum ersten Filtrationsschritt war der Proteingehalt stark herabgesetzt, was die verringerte Signalintensität verdeutlicht. Es konnte kein eindeutig dominantes Protein nachgewiesen werden. Nach dem Vermischen beider Filtrate (Bahn 5) wurde durch die Zentrifugation des Gesamtfiltrats eine deutliche Abtrennung kontaminierender Proteine erreicht (Bahn 6), belegt durch die verringerte Signalintensität im Vergleich zum Gesamtfiltrat in Bahn 5. Dadurch wird verdeutlicht, dass durch Hitzeinkubation gefällte Proteine nur bedingt mittels Filtration abtrennbar waren. Dieser Schritt war notwendig, um „große“ Zellbestandteile abzutrennen und die Partikelbeladung des Rotors bei der Zentrifugation zu verringern. Durch fraktionierende Acetonfällung konnten alle Proteine als unlösliche Bestandteile abgetrennt werden. Nach dem ersten Schritt mit $c_A=40$ % (v/v) (Bahn 7) wurden deutlich weniger lösliche Proteine detektiert als in der Ausgangslösung (Bahn 6), hauptsächlich mit einem Molekulargewicht <20 kDa (Bahn 6). Nach Einstellung von $c_A=70$ % (v/v) mit anschließender Zentrifugation war der Überstand frei von detektierbaren Bestandteilen.

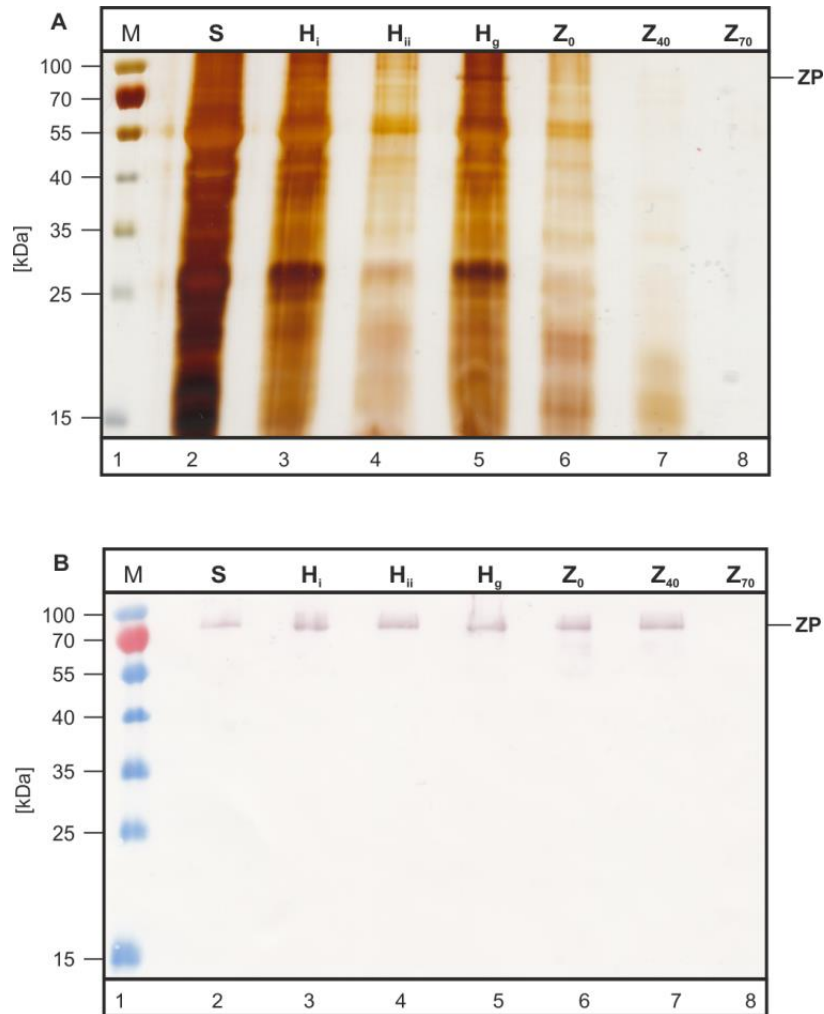


Abbildung 3-16: Fraktionierende Acetonfällung von 1xFlag-100xELP im Pilotmaßstab aus *Nicotiana tabacum*-Blättern. 3,2+3,4 kg BFM_{bl} (nach Blanchieren eingefroren) wurden aufgetaut (16 h, 4 °C), mit Leitungswasser gemischt (3,2 und 3,4 L) und mit einem Table Top Cutter aufgeschlossen. Die Suspension (Bahn 2) wurde mittels Filtration (Bahn 3) geklärt, der Filterkuchen mit 1 L Leitungswasser (4 °C) gemischt und erneut filtriert (Bahn 4). Beide Filtrate (Bahn 5) wurden vereinigt und zentrifugiert (Bahn 6). Fraktionierende Acetonfällung wurde durch Einstellen der Acetonkonzentration auf 40 % (Bahn 7, Z₄₀-Überstand nach Zentrifugation) und 70 % (v/v) (Bahn 8, Z₇₀-Überstand nach Zentrifugation) durchgeführt. M–PPL-Marker; S–Suspension a; H_i, H_{ii}–Filtrate der Hydropresse; H_g–vereinigte Filtrate der Hydropresse Z–Überstände nach Zentrifugation mit 0 (Z₀), 40 (Z₄₀) und 70 % (v/v) Aceton (Z₇₀); (A) mit Silber gefärbtes Gel (B) mittels Western Blot nachgewiesenes Zielprotein in Überstands- bzw. Pelletproben; primärer Antikörper anti-c-myc; sekundärer Antikörper Anti-IgG-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, chromogene Nachweisreaktion

In Abbildung 3-16 B kann der Verbleib des Zielproteins während der fraktionierenden Acetonfällung nachvollzogen werden. Das Zielprotein wurde wie schon im vorherigen Versuch als Hauptbande in Höhe von 90 kDa detektiert. Von der Suspensionsprobe in Bahn 2 zum ersten Filtrat in Bahn 3 ist ein geringfügiger Anstieg der Signalintensität zu beobachten. Bis zum ersten Schritt der fraktionierenden Acetonfällung bei $c_A=40\%$ (v/v) in Bahn 7 bleibt das Signal konstant, bei $c_A=70\%$ (v/v) in Bahn 8 wurde nichts detektiert. Der Intensitätsanstieg von der Suspension (Bahn 2) zum ersten Filtrat (Bahn 3) ist erklärbar durch einen unterschiedlichen Verdünnungsfaktor beider Proben. Die Suspensionsprobe wurde im Vergleich zur Filtrationsprobe mit dem dreifachen Volumen Probenpuffer versetzt, um Resuspendie-

rung/Resolubilisierung des eingetrockneten Pellets zu erreichen. Aufgrund der gleichbleibenden Signalintensität bis zur ersten Stufe der fraktionierenden Acetonfällung wurde kein Verlust des Zielproteins beobachtet (Bahnen 3-7). Am Ende der Prozedur wurde das Zielprotein erfolgreich abgetrennt.

Bei vier durchgeführten Versuchen im Pilotmaßstab wurden zwischen 4,4 und 6,6 kg BFM_{bl} verarbeitet. Im Mittel wurde für den Filterkuchen eine Restfeuchte von $84 \pm 1,1$ % (w/w) ermittelt. Im Vergleich zu den Q-/K-MaSp1-100xELP tragenden Blättern war der Wert demzufolge um 5 % erhöht. Die Feuchtmassen der gewonnenen Pellets waren im Bereich von 50-75 g. Die erzielten Ausbeuten waren $11,8 \pm 0,8$ g_{P70}/kg_{BMF3}. Aufgrund der geringen Streuung der Messwerte war die sogenannte Prozessbeherrschung für die fraktionierende Acetonfällung im Pilotmaßstab gegeben.

3.7.4.3 Feinreinigung

Das Zielprotein 1xFlag-100xELP konnte mittels fraktionierender Acetonfällung im Pellet aufkonzentriert werden. Wie auch bei Q-/K-MaSp1-100xELP wurde die Menge des Produkts als unrealistisch hoch eingeschätzt. Daher wurde erneut eine Feinreinigung durchgeführt. Die für Q-/K-MaSp1-100xELP beschriebenen Verfahren (Ergebnisse siehe Kapitel 3.4-3.5) zum Waschen des Pellets und des anschließenden cITC wurden modifiziert wie in Tabelle 3-2 dargestellt (siehe Kapitel 2.8.3 und 2.9.3). Die Gründe dafür waren wie folgt und wurden in Versuchen in kleineren Maßstäben beobachtet. Das Zielprotein 1xFlag-100xELP war nach der fraktionierenden Acetonfällung in Leitungswasser löslich. Unter Ausnutzung der bekannten Eigenschaften des ELP-tags, nämlich der geringen Löslichkeit bei hoher Ionenstärke in Verbindung mit erhöhter Temperatur, wurde das Pellet daher bei 40 °C mit 2 M NaCl gewaschen. Nach Zentrifugation verblieb das Zielprotein vollständig im Pellet. Der Waschschritt wurde zusätzlich bei 4 °C und bei Raumtemperatur (23 °C) untersucht. Bei 4 °C war das Zielprotein ebenfalls komplett unlöslich, wohingegen es bei 23 °C vollständig löslich war. Die vollständige Resolubilisierung konnte wie auch bei Q-/K-MaSp1-100xELP durch den Einsatz von 6 M Urea erzielt werden. Das gleiche Ergebnis wurde in dH₂O erreicht. Aus ökonomischen Gründen ist die Resolubilisierung des gewaschenen Pellets daher mit dH₂O beibehalten worden. Die Festlegung der Dialyselösung (2 M NaCl) folgte einer rein pragmatischen Überlegung. Es war nötig, das cITC-Verfahren zur Reinigung von 1xFlag-100xELP zeitoptimal zu realisieren. Aus Untersuchungen zum Waschen war bekannt, dass das Zielprotein in Gegenwart von 2 M NaCl bei 40 °C unlöslich war. Daher wurde das resolubilisierte gewaschene Pellet nach Zentrifugation gegen 2 M NaCl dialysiert und 1xFlag-100xELP anschließend mittels cITC im Pellet aufkonzentriert.

Tabelle 3-2: Vergleichende Übersicht der bei der Feinreinigung der Zielproteine verwendeten Lösungen.

Zielprotein	Q-/K-MaSp1-100xELP	1xFlag-100xELP
Waschen	Leitungswasser	2 M NaCl
Resolubilisierung	6 M Urea	dH ₂ O
Dialyse	750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0	2 M NaCl

Die erfolgreiche Feinreinigung ist in Abbildung 3-17 gezeigt. Nach dem Waschen (Bahn 2), der Resolubilisierung (Bahn 3) und der Dialyse (Bahn 4) konnte das Zielprotein via cITC hauptsächlich im Pellet (Bahn 6) konzentriert werden. Lösliche Wirtszellproteine verblieben im Überstand, was eine hohe proteinogene Reinheit des finalen Produktes bedeutet (Abbildung 3-17 A, Bahn 5). Das Zielprotein konnte, im Gegensatz zu Abbildung 3-16 A, mittels Silberfärbung detektiert werden. Mittels Western Blot wurden erstmalig Abbauprodukte des Zielproteins bis zu einem Molekulargewicht von 55 kDa nachgewiesen. Die Erklärung für die beschriebenen Beobachtungen ist, dass das Zielprotein inklusive möglicher Abbauprodukte in den jeweiligen Proben deutlich stärker konzentrierter (Faktor 18) vorliegt als in den Proben der fraktionierenden Acetonfällung.

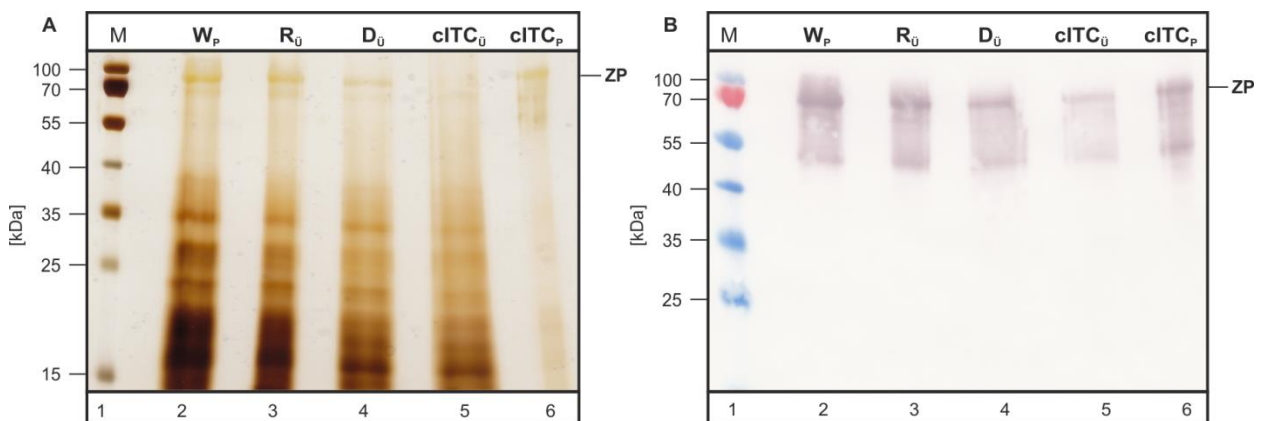


Abbildung 3-17: Feinreinigung von 1xFlag-100xELP durch cITC. Das Pellet nach fraktionierender Acetonfällung wurde mit 2 M NaCl bei 40 °C gewaschen und mittels Zentrifugation im Pellet konzentriert (W_p). Im Anschluss an die Resolubilisierung in dH₂O und Zentrifugation wurde der Überstand (R_0) gegen 2 M NaCl dialysiert. Der Überstand (D_0) wurde auf 40 °C erhitzt und zentrifugiert. Die Wirtszellproteine verblieben im Überstand ($cITC_0$), das Zielprotein 1xFlag-100xELP (ZP) wurde hauptsächlich im Pellet ($cITC_p$) konzentriert. Detektionsmethode: (A) Silberfärbung (B) Western Blot; primärer Antikörper anti-c-myc; sekundärer Antikörper Anti-IgG-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, chromogene Nachweisreaktion

Das kleinste Abbauprodukt des Zielproteins wurde mittels Western Blot in Abbildung 3-17 B, bei 55 kDa detektiert. In den Bahnen 2-5 scheint dieses Protein noch kleiner zu sein. Diese Beobachtung wird durch den sogenannten *smiley*-Effekt hervorgerufen. Dabei migrieren Proteine in der Mitte eines Gels schneller als an den Rändern. Ursache dafür kann eine zu starke Erhitzung des Gels während der Elektrophorese sein. Das kleinste mittels Western Blot

nachgewiesene Abbauprodukt von Q-/K-MaSp1-100xELP hatte ebenfalls ein Molekulargewicht von 55 kDa. Eventuell ist darin ein Hinweis darauf zu sehen, dass die jeweiligen Proteine N-terminal verdaut werden und der ELP-*tag* inklusive des c-myc-*tags* nachgewiesen wird.

Die finale Ausbeute für 1xFlag-100xELP nach der Feinreinigung betrug 4 mg. Das bedeutet eine Ausbeute von 0,6 mg 1xFlag-100xELP pro kg BFM, mit einer deutlichen Diskrepanz der Ausbeute, bezogen auf K-MaSp1-100xELP und Q-MaSp1-100xELP. Von diesen konnten jeweils 53 bzw. 69 mg Produkt pro kg BFM gewonnen werden. Mittels Western Blot sollten eventuelle Verluste von 1xFlag-100xELP während der Feinreinigung ermittelt werden.

Untersucht wurde durch Zentrifugation im Mikromaßstab, ob das Zielprotein beim jeweiligen Schritt löslich oder unlöslich vorlag. In Bahn 2 (Waschen-g) ist die Suspension nach Waschen mit 2 M NaCl zu sehen, in Bahn 6 (Resol.-g) nach Resolubilisierung in dH₂O und in Bahn 12 die Probe nach Dialyse gegen 2 M NaCl. Zur Bewertung der Verteilung des Zielproteins in der löslichen bzw. unlöslichen Fraktion wurde jeweils 400 µL Probe zentrifugiert und das Pellet bzw. der Überstand als SDS-PAGE-Probe angelegt. Der Verdünnungsfaktor für die Überstände war 1:2, für die Pellets 1:1. So wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, Verluste des Zielproteins detektieren zu können. Bahn 5 (Waschen-Ü) und Bahn 9 repräsentieren die Überstände der Wasch- bzw. der Resolubilisierungsfraction nach Zentrifugation im mittleren Maßstab (6x~50 mL), Bahn 12 die gesamte Dialyseprobe. Mit diesen Lösungen ist der Versuch jeweils weiter durchgeführt worden.

Im Western Blot in Abbildung 3-18 ist das Versuchsergebnis zu sehen. Der einzige Schritt in der Vorbereitung des cITC, bei dem ein Verlust des Zielproteins detektiert werden konnte, ist die Resolubilisierung. Im aus der anschließenden Zentrifugation resultierenden Pellet in Bahn 7 wurde 1xFlag-100xELP nachgewiesen. Die Verdünnung im Vergleich zum Überstand in Bahn 8 ist jedoch nur halb so groß, weswegen eine direkte visuelle Korrelation beider Signalintensitäten schwierig ist. Ein Verlust während der Feinreinigung konnte nicht nachgewiesen werden. Mögliche Fehler liegen im Proteinnachweis und sind in der Fehlerbetrachtung diskutiert (siehe Kapitel 1.1).

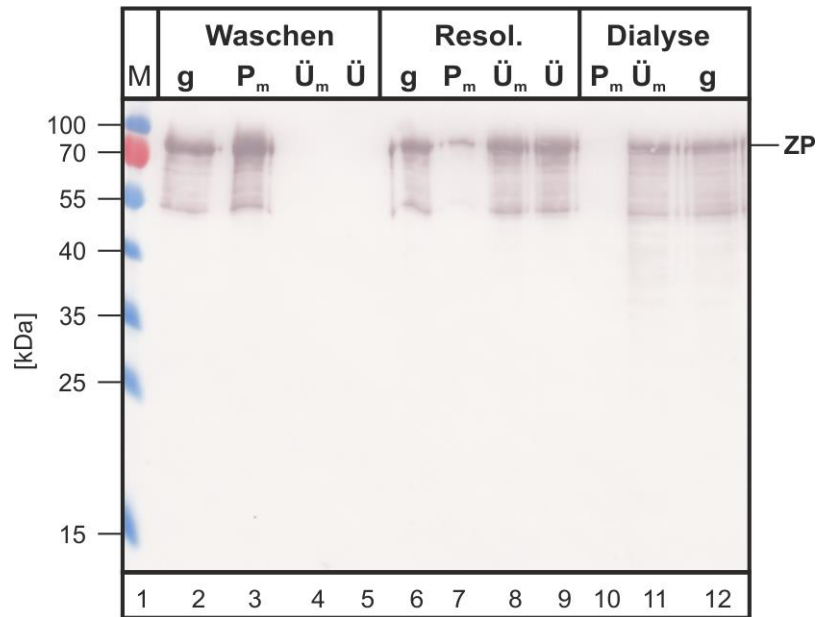


Abbildung 3-18: Verlust des Zielproteins 1xFlag-100xELP (ZP) während der Feinreinigung exklusive cITC. Das Pellet nach fraktionierender Acetonfällung wurde in 2 M NaCl bei 40 °C resuspendiert und dadurch gewaschen. Nach Zentrifugation der Suspension (Bahn 2, Waschen-g) wurde das Pellet in dH₂O resolubilisiert (Bahn 6, Resol.-g) und erneut zentrifugiert. Der Überstand (Bahn 9, Resol.-Ü) wurde gegen 2 M NaCl dialysiert (Bahn 12) und dem cITC-Verfahren unterzogen. Bei jedem Schritt wurden 400 µL Probe separat zentrifugiert, das Pellet mit 400 µL Probenpuffer und 200 µL Überstand mit 200 µL Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Detektionsmethode: Western Blot; primärer Antikörper anti-c-myc; sekundärer Antikörper Anti-IgG-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, chromogene Nachweisreaktion

Das für die Gewinnung von Q-/K-MaSp1-100xELP etablierte Verfahren mit a) fraktionierender Acetonfällung, b) Waschen des Pellets, c) Resolubilisierung des Pellets und d) zentrifugationsbasiertem *Inverse Transition Cycling* (cITC) konnte für die Gewinnung von 1xFlag-100xELP adaptiert werden. Die Ausbeute an Zielprotein im Pilotmaßstab war deutlich geringer, als anhand von Vorversuchen abgeschätzt werden konnte. Die Ursache dafür konnte nicht identifiziert werden. Möglicherweise sind bereits während der fraktionierenden Acetonfällung Verluste aufgetreten, die unerkannt blieben.

3.8 Fehlerbetrachtung

Im Folgenden werden mögliche Fehlerquellen diskutiert, die während des Reinigungsverfahrens oder bei der Probenanalytik aufgetreten sein können. Bei der Maßstabsvergrößerung wurde schrittweise jeweils ein einzelner Versuchsparameter verändert. Darunter zählen die verwendete Biofeuchtmasse, Material und Dimension der Gefäße, Zusammensetzung des Extraktionsmittels sowie die Zusammensetzung der Wasch-, Resolubilisierungs- und cITC-Puffer. Von einer Reproduzierbarkeit wurde ausgegangen, wenn die Ergebnisse des Folgeexperiments die Ergebnisse des vorangegangenen Experiments bestätigten.

3.8.1 Proteinanalytik

Die Bestimmung der Menge an Protein bzw. der Proteinkonzentration ist grundsätzlich fehlerbehaftet, da es nur indirekte Methoden gibt, die z. B. auf der Wechselwirkung von Farbstoffen, Silberionen oder Antikörpern mit dem zu detektierenden Protein beruhen. Bei Enzymen ist der quantitative Nachweis i. d. R. einfacher, da die Aktivität ein Maß für die Reinheit darstellt. Im Falle der Spinnenseidenprotein-Analoga, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, erfolgte die Bewertung des Reinigungsfortschritts hauptsächlich über die Analytik der in der jeweiligen Prozessstufe angelegten Proben mittels SDS-PAGE und anschließender Proteindetektion per Silberfärbung oder Western Blot. Lediglich am Ende der Reinigung im kg-Maßstab konnte eine Quantifizierung durch Auswiegen der Produktmenge erfolgen. Die Auswertung der Bandenintensitäten von gefärbten SDS-Gelen erfolgte visuell qualitativ. Eine quantitative Auswertung der Proteinmenge, etwa mittels Densitometer wäre nur möglich gewesen, wenn reines Zielprotein zur Verfügung gestanden hätte, um damit das Nachweissystem zu kalibrieren.“ Eine unzureichende Resolubilisierung während der Vorbereitung der SDS-PAGE-Proben bzw. unterschiedliche Volumina beim Auftragen dieser Proben auf das PA-Gel könnte zu Fehlern führen.

Grundsätzlich ist es möglich, dass einzelne Proteine in einer Probe von anderen verdeckt werden. Die Wechselwirkung von Silberionen mit unterschiedlichen Proteinen kann unterschiedlich stark ausfallen und hängt u. a. von den Seitenketten der vorhandenen Aminosäuren ab. Bei hoher Proteinkonzentration ist es möglich, dass die angelagerten Silberionen sehr stark komplexiert werden und kaum bis gar nicht mehr reduzierbar sind [Rabilloud et al., 1994]. Bei Verdünnung der Probe oder infolge der Abreicherung der überdeckenden Proteine ist es möglich, ein vorher verdecktes Protein verstärkt zu detektieren.

3.8.2 Downstream Processing

Im Laufe des Reinigungsverfahrens können Verluste der Zielproteine unbemerkt geblieben sein, da die Menge an Zielprotein unbekannt war, die ursprünglich in den Pflanzen vorlag.

Während der Klärung der Suspension nach dem Zellaufschluss beispielsweise könnte das jeweilige Zielprotein sowohl an den Zelltrümmern als auch an der Filtermembran adsorbiert worden sein. Im Falle des mITC wurde eine Adsorption tatsächlich nachgewiesen, die schließlich dazu führte, dass als Alternative die cITC verwendet wurde, die ohne Membran auskommt. Auch die Temperaturbehandlung der Suspension nach Zellaufschluß könnte zu Verlusten geführt haben. Um derartige Verluste zu untersuchen wurden jeweils sämtlich die Pellets und Überstände untersucht. Allerdings sind die Suspensionen / Pellets besonders des Zellaufschlusses so komplex zusammengesetzt, dass nicht sicher ist, ob das Zielprotein tatsächlich komplett nachgewiesen werden kann. Um ein Verfahren zu validieren, wäre es notwendig gewesen, das gereinigte Zielprotein im jeweiligen Hintergrund zu inkubieren und die Wiederfindung zu quantifizieren. Dies war wegen der geringen Mengen an Zielprotein nicht möglich. Im Laufe der Wasch-, Resolubilisierungs-, Dialyse- und cITC-Schritte könnten die Zielproteine ebenfalls an die Oberflächen der Zentrifugationsgefäße und der Dialysemembran gebunden haben. Aufgrund der Porengrößenverteilung der Dialysemembran ist die Diffusion von Zielproteinen während der Dialyse nicht auszuschließen. Während aller Fällungsschritte ist weiterhin eine Copräzipitation von Zielproteinen wahrscheinlich.

Proteasen, die mangels ausreichender Hitzeinkubation der Tabakblätter noch aktiv waren oder in das Reinigungsverfahren als Kontamination eingetragen wurden, könnten ebenfalls zu Zielproteinverlusten geführt haben.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt in der ungenauen Analyse der finalen Produkte. Es wurde mittels Elementaranalyse nachgewiesen, dass Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen im Zwischenprodukt vor der cITC enthalten waren, so dass neben den Zielproteinen auch Salze enthalten sind, die eine vergleichende Bewertung der Ausbeuten an K-MaSp1-100xELP, Q-MaSp1-100xELP und 1xFlag-100xELP erschweren.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung einer Methode zur Reinigung von drei Spinnenseidenanaloga aus Tabakblättern aufgezeigt. Um rekombinant hergestellte Spinnenseide ökonomisch produzieren zu können sollte dabei das Augenmerk auf möglichst kostengünstige und im Maßstab vergrößerbare Verfahrensschritte gelegt werden. Es ist denkbar, ein gereinigtes Produkt z.B. im medizinischen Sektor zu verwenden. Weiterhin ergibt sich die Möglichkeit, das vorgestellte Verfahren auf die Reinigung anderer Strukturproteine zu übertragen.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgte die Ernte von 217 kg Tabakblättern. Von diesen wurden 168 kg thermisch behandelt. Dabei konnten Proteasen inaktiviert und zusätzlich Wirtszellproteine gefällt werden. Es wurden 52,4 und 55,5 kg Q-/K-MaSp1-100xELP bzw. 48,8 und 60,6 kg 1x/4xFlag-100xELP tragende Biofeuchtmasse präpariert und für folgende Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Im Labormaßstab wurde gezeigt, dass ein Großteil der Wirtszellproteine Q-K-MaSp1-100xELP nach der Hitzefällung unlöslich und durch Zentrifugation abtrennbar war. Mit der anschließenden fraktionierenden Acetonfällung mit einem Acetongehalt von 40 und 70 % (v/v) konnte die Reinheit des Produktes weiter erhöht werden. Das gewonnene Pellet wurde in Leitungswasser gewaschen und in 6 M Urea resolubilisiert. Die Feinreinigung des gelösten Zielproteins erfolgte nach Dialyse gegen einen Puffer aus 50 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, pH 8,0 mittels zentrifugationsbasiertem *Inverse Transition Cycling* (iTC). Die finale Abtrennung proteinogener Verunreinigungen gelang dabei unter Ausnutzung einer Besonderheit der Zielproteine. Diese enthielten neben typischen Spinnenseidenmotiven zusätzlich eine Aminosäuresequenz mit außergewöhnlichem Agglomerations-Verhalten. Durch geschickte Wahl von Ionenstärke und Temperatur konnten die Zielproteine ausgefällt werden, während verunreinigende Wirtszellproteine löslich blieben. Dieser Vorgang ist vollständig reversibel, im Gegensatz zum in der Praxis häufig zu beobachtenden Fällungs- und Resolubilisierungsverhalten rekombinanter Proteine.

Nach Maßstabsvergrößerung der genannten Schritte in den Pilotmaßstab ist es gelungen, bis zu 6 kg Biofeuchtmasse nach Aufschluss zu prozessieren. Zur Anwendung kamen einfache und robuste Reinigungsschritte. Die Methoden der Wahl waren Hitze- und Lösungsmittelfällungen in Kombination mit Filtration und/oder Zentrifugation. Bei den durchgeführten Reinigungen konnten 273 bzw. 413 mg Produkt für K- und Q-MaSp1-100xELP gewonnen werden. Dies entsprach einer Ausbeute von 53 bzw. 69 mg Produkt pro Kilogramm Biofeuchtmasse. Die Menge des in einem Ansatz gereinigten Zielproteins ist die höchste, die bis dato in der Literatur zu finden ist.

Das für Q-/K-MaSp1-100xELP entwickelte Reinigungsschema wurde schließlich zur Gewinnung des Spinnenseidenanaloges 1xFlag-100xELP angepasst. Dabei konnte die Methode der fraktionierenden Acetonfällung unverändert übernommen werden. Bei der Feinreinigung des Zielproteins wurden Änderungen vorgenommen. Das Waschen des gefällten Pellets wurde statt in Leitungswasser (23 °C) bei 40 °C in 2 M NaCl durchgeführt. Das unter diesen Bedingungen unlösliche Zielprotein konnte dann in dH₂O resolubilisiert werden und wurde gegen 2 M NaCl dialysiert. Beim anschließenden cITC verblieben, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Q-/K-MaSp1-100xELP, verunreinigende Wirtszellproteine im Überstand. Das Zielprotein konnte sehr rein als Präzipitat abgetrennt werden. Die final aus 6,6 kg BFM gewonnene Produktmenge an 1xFlag-100xELP betrug 4 mg.

5 Ausblick

Im Verlaufe der Arbeiten ergaben sich einige Fragestellungen, deren Klärung in Zukunft von Interesse sein könnte.

Für das angewandte Verfahren sind mehrere Möglichkeiten zur Optimierung denkbar, beginnend bei der Präparation der Biomasse. Nach der Ernte sollten die Tabakblätter möglichst thermisch behandelt werden. Die Verwendung von kommerziellen Mikrowellengeräten war sehr zeitaufwändig, und eine Maßstabsvergrößerung wäre schwierig zu realisieren. Das Blanchieren der Biomasse ist grundsätzlich eher geeignet, in größeren Maßstäben realisierbar zu sein. Eventuell ist denkbar, eine Hitzebehandlung durch Bedampfung, wie bei der Herstellung von Dampfwürsten oder auch Thermoholz, durchzuführen.

Ein kompletter Prozessschritt könnte möglicherweise eingespart werden. Zu Beginn der Etablierung der Reinigungsstrategie wurde bis im mittleren Maßstab (300 g BFM_{MW}) die fraktionierende Acetonfällung in Suspension erfolgreich angewandt. Beim Arbeiten im Pilotmaßstab erfolgte die Aufkonzentrierung des Zielproteins erst nach Klärung der Suspension, um eine Extraktion sekundärer Pflanzenstoffe zu vermeiden. Ob diese Möglichkeit tatsächlich relevant ist wurde nicht untersucht und bietet daher einen Ansatzpunkt zur Prozessoptimierung.

Das durch fraktionierende Acetonfällung gewonnene Pellet wurde gewaschen und resolubiliert, um nach Dialyse mittels cITC final gereinigt zu werden. Möglicherweise kann der Waschschrift eingespart werden. Die Resolubilisierung des Pellets in Verbindung mit der Dialyse und dem cITC ist sehr wahrscheinlich ausreichend, um eine genau so hohe Reinheit der Zielproteine zu erzielen wie in dieser Arbeit präsentiert.

Von Interesse ist weiterhin, ob und wie die mittels der Feinreinigung gewonnenen Proteine weiter verarbeitet werden können. Gerade die Anwendung im medizinischen Sektor, z.B. als Trägermatrix für adhäsive Zellen, könnte eine spannende Perspektive darstellen. Das erfolgreiche Verspinnen der Proteine ist schon gezeigt worden. Die Produktion hochfester leichter Kleidung könnte neues industrielles Potential bieten.

6 Literatur

- Adidas. (2016). "Schuh aus künstlicher Spinnenseide." <https://www.adidas-group.com/de/medien/newsarchiv/pressemitteilungen/2016/adidas-prasentiert-weltweit-ersten-performance-schuh-aus-biostee/>. Zugriffsdatum: 25.08. 2017
- Adrianos, S. L., Teulé, F., Hinman, M. B., Jones, J. A., Weber, W. S., Yarger, J. L. und Lewis, R. V. (2013). "Nephila clavipes Flagelliform Silk-Like GGX Motifs Contribute to Extensibility and Spacer Motifs Contribute to Strength in Synthetic Spider Silk Fibers." *Biomacromolecules*, **14**, 1751-1760.
- Alberts, B., Alexander, J., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2004). "Molecular Biology of the Cell, 4th Edition." Wiley, 2000 pp.
- Allmeling, C., Jokuszies, A., Reimers, K., Kall, S., Choi, C. Y. und Brandes, G. (2008). "Spider silk fibres in artificial nerve constructs promote peripheral nerve regeneration." *Cell Prolif*, **41**, 408-420.
- Allu, A. D., Soja, A. M., Wu, A., Szymanski, J. und Balazadeh, S. (2014). "Salt stress and senescence: identification of cross-talk regulatory components." *Journal of Experimental Botany*, **65**, 3993-4008.
- Amiri, I., Salnikow, J. und Vater, J. (1984). "Amino-acid sequence of the large subunit of d-ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase from *Nicotiana tabacum*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **784**, 116-123.
- AmSilk. (2017). "AmSilk Homepage." <https://www.amsilk.com/home/>. Zugriffsdatum: 03.08. 2017
- Ayoub, N. A., Garb, J. E., Tinghitella, R. M., Collin, M. A. und Hayashi, C. Y. (2007). "Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes." *PLoS ONE*, **2**, 1-13.
- Balasubramaniam, D., Wilkinson, C., Van Cott, K. und Zhang, C. (2003). "Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction." *Journal of Chromatography A*, **989**, 119-129.
- Beckwitt, R. und Arcidiacono, S. (1994). "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**, 6661-6663.
- Berkmen, M. (2012). "Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*." *Protein Expression and Purification*, **82**, 240-251.
- Blüm, C., Nichtl, A. und Scheibel, T. (2014). "Spider Silk Capsules as Protective Reaction Containers for Enzymes." *Advanced Functional Materials*, **24**, 763-768.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *ELECTROPHORESIS*, **8**, 93-99.
- Brodniewicz-Proba, T. (1991). "Human plasma fractionation and the impact of new technologies on the use and quality of plasma-derived products." *Blood Reviews*, **5**, 245-257.
- Buyel, J. F. und Fischer, R. (2014). "Scale-down models to optimize a filter train for the downstream purification of recombinant pharmaceutical proteins produced in tobacco leaves." *Biotechnology Journal*, **9**, 415-425.
- Buyel, J. F., Gruchow, H. M., Boes, A. und Fischer, R. (2014). "Rational design of a host cell protein heat precipitation step simplifies the subsequent purification of recombinant proteins from tobacco." *Biochemical Engineering Journal*, **88**, 162-170.
- Buyel, J. F., Twyman, R. M. und Fischer, R. (2015). "Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins." *Biotechnology Advances*, **33**, 902-913.
- Clinicaltrials. (2017). "Biopharmaceuticals from plants." <https://clinicaltrials.gov/>. Zugriffsdatum: 30.06.2017 2017
- Coddington, J. und Sobrevila, C. (1987). "Web Manipulation and Two Stereotyped Attack Behaviors in the Ogre-Faced Spider *Deinopis spinosus* Marx (Araneae, Deinopidae)." *The Journal of Arachnology*, **15**, 213-225.

- Conley, A. J., Joensuu, J. J., Menassa, R. und Brandle, J. E. (2009). "Induction of protein body formation in plant leaves by elastin-like polypeptide fusions." *BMC Biology*, **7**, 48-48.
- Conrad, U., Fiedler, U., Artsaenko, O. und Phillips, J. (1998). "Single-Chain Fv Antibodies Expressed in Plants." In: *Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds* (Cunningham, C. und Porter, A. J. R., eds.), Humana Press, Totowa, NJ, 103-127.
- Craig, C. L., Hsu, M., Kaplan, D. und Pierce, N. E. (1999). "A comparison of the composition of silk proteins produced by spiders and insects." *International Journal of Biological Macromolecules*, **24**, 109-118.
- Dai, J. und Mumper, R. J. (2010). "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties." *Molecules*, **15**, 7313-7352.
- Degerman, M., Jakobsson, N. und Nilsson, B. (2008). "Designing Robust Preparative Purification Processes with High Performance." *Chemical Engineering & Technology*, **31**, 875-882.
- Doblhofer, E., Heidebrecht, A. und Scheibel, T. (2015). "To spin or not to spin: spider silk fibers and more." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 9361-9380.
- Drake, V. A. und Farrow, R. A. (1989). "The 'aerial plankton' and atmospheric convergence." *Trends in Ecology & Evolution*, **4**, 381-385.
- DuPont. (2017). "Technical Guide - Kevlar." http://www.dupont.com/content/dam/dupont/products-and-services/fabrics-fibers-and-nonwovens/fibers/documents/Kevlar_Technical_Guide.pdf. Zugriffsdatum: 03.08.2017
- Eggs, B. und Sanders, D. (2013). "Herbivory in Spiders: The Importance of Pollen for Orb-Weavers." *PLoS ONE*, **8**, 1-5.
- Eisoldt, L., Smith, A. und Scheibel, T. (2011). "Decoding the secrets of spider silk." *Materials Today*, **14**, 80-86.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. und Bishop, J. M. (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." *Molecular and Cellular Biology*, **5**, 3610-3616.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W. und Walker, R. B. (2010). "a thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 8139-8144.
- Facchiano, A. und Facchiano, F. (2009). "Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing." *Amino Acids*, **36**, 599-614.
- Fahnestock, S. R. und Bedzyk, L. A. (1997). "Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 33-39.
- Feller, U. und Fischer, A. (1994). "Nitrogen Metabolism in Senescing Leaves." *Critical Reviews in Plant Sciences*, **13**, 241-273.
- FiercePharma. (2017). "Top 15 pharma companies by 2016 revenues." <http://www.fiercepharma.com/special-report/top-15-pharma-companies-by-2016-revenues>. Zugriffsdatum: 03.08.2017
- Flickr. (2012). "Net-casting Spider." Flickr https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flickr_-_ggallice_-_Net-casting_spider.jpg. Zugriffsdatum: 29.08.2017 2017
- Floss, D. M., Schallau, K., Rose-John, S., Conrad, U. und Scheller, J. (2010). "Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application." *Trends Biotechnol.*, **28**, 37-45.
- Foelix, R. F. (2011). "Biolog of Spiders." Third ed., Oxford Universit Press, New York, 423.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966). "Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, **122**, 244-264.
- Freeman, J. A. (1946). "The Distribution of Spiders and Mites up to 300 Ft. in the Air." *Journal of Animal Ecology*, **15**, 69-74.
- Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. und Lewis, R. (2001). "Extreme Diversity, Conservation, and Convergence of Spider Silk Fibroin Sequences." *Science*, **291**, 2603-2605.

- Ge, X., Trabbic-Carlson, K., Chilkoti, A. und Filipe, C. D. (2006). "Purification of an elastin-like fusion protein by microfiltration." *Biotechnology and Bioengineering*, **95**, 424-432.
- Gecchele, E., Schillberg, S., Merlin, M., Pezzotti, M. und Avesani, L. (2014). "A downstream process allowing the efficient isolation of a recombinant amphiphilic protein from tobacco leaves." *Journal of Chromatography B*, **960**, 34-42.
- genengnews. (2017). "The Top 15 Best-Selling Drugs of 2016." <http://www.genengnews.com/the-lists/the-top-15-best-selling-drugs-of-2016/77900868>. Zugriffsdatum: 03.08. 2017
- Gerritsen, V. B. (2002). "Gerritsen VB. The tiptoe of an airbus. In: Protein Spotlight. Swiss Prot. 2002. http://web.expasy.org/spotlight/back_issues/024. Accessed 8 Aug 2013."
- Gleba, Y., Klimyuk, V. und Marillonnet, S. (2005). "Magniflection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants." *Vaccine*, **23**, 2042-2048.
- Gosline, J. M., DeMont, M. E. und Denny, M. W. (1986). "The structure and properties of spider silk." *Endeavour*, **10**, 37-43.
- Greenstone, M. H., Morgan, C. E., Hultsch, A.-L., Farrow, R. A. und Dowse, J. E. (1987). "Balloon Spiders in Missouri, USA, and New South Wales, Australia: Family and Mass Distributions." *The Journal of Arachnology*, **15**, 163-170.
- Hagn, F. (2012). "A structural view on spider silk proteins and their role in fiber assembly." *Journal of Peptide Science*, **18**, 357-365.
- Hassan, S., Van Dolleweerd, C. J., Ioakeimidis, F., Keshavarz-Moore, E. und Ma, J. K. C. (2008). "Considerations for extraction of monoclonal antibodies targeted to different subcellular compartments in transgenic tobacco plants." *Plant Biotechnology Journal*, **6**, 733-748.
- Hauptmann, V., Menzel, M., Weichert, N., Reimers, K., Spohn, U. und Conrad, U. (2015). "In planta production of ELPylated spider silk-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers." *BMC Biotechnology*, **15**, 1-14.
- Hauptmann, V., Weichert, N., Menzel, M., Knoch, D., Paeye, N., Scheller, J., Spohn, U., Conrad, U. und Gils, M. (2013). "Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization." *Transgenic Research*, **22**, 369-377.
- Hayashi, C. Y. und Lewis, R. V. (1998). "Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks." Edited by M. F. Moody." *Journal of Molecular Biology*, **275**, 773-784.
- Hayashi, C. Y. und Lewis, R. V. (2000). "Molecular Architecture and Evolution of a Modular Spider Silk Protein Gene." *Science*, **287**, 1477-1479.
- Hayashi, C. Y. und Lewis, R. V. (2001). "Spider flagelliform silk: lessons in protein design, gene structure, and molecular evolution." *BioEssays*, **23**, 750-756.
- Heppner, R., Weichert, N., Schierhorn, A., Conrad, U. und Pietzsch, M. (2016). "Low-Tech, Pilot Scale Purification of a Recombinant Spider Silk Protein Analog from Tobacco Leaves." *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, 1687.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. und Bowdish, K. (1989). "Production of antibodies in transgenic plants." *Nature*, **342**, 76-78.
- Hijirida, D. H., Do, K. G., Michal, C., Wong, S., Zax, D. und Jelinski, L. W. (1996). "¹³C NMR of Nephila clavipes major ampullate silk gland." *Biophysical Journal*, **71**, 3442-3447.
- Himmelblau, E. und Amasino, R. M. (2001). "Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during leaf senescence." *Journal of Plant Physiology*, **158**, 1317-1323.
- Holtz, B. R., Berquist, B. R., Bennett, L. D., Kommineni, V. J. M., Munigunt, R. K., White, E. L., Wilkerson, D. C., Wong, K.-Y. I., Ly, L. H. und Marcel, S. (2015). "Commercial-scale biotherapeutics manufacturing facility for plant-made pharmaceuticals." *Plant Biotechnology Journal*, **13**, 1180-1190.
- Hood, E. E., Witcher, D. R., Maddock, S., Meyer, T., Baszczyński, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R. J., Hernan, R., Kappel, W. K., Ritland, D., Ping Li, C. und Howard, J. A. (1997). "Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification." *Molecular Breeding*, **3**, 291-306.

- Horsch, R. B., Fry, J. E. und Hoffmann, N. L. (1985). "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants." *Science*, **227**, 1229-1231.
- Ittah, S., Barak, N. und Gat, U. (2010). "A proposed model for dragline spider silk self-assembly: Insights from the effect of the repetitive domain size on fiber properties." *Biopolymers*, **93**, 458-468.
- Jackson, R. R., Pollard, S. D., Nelson, X. J., Edwards, G. B. und Barrion, A. T. (2001). "Jumping spiders (Araneae: Salticidae) that feed on nectar." *Journal of Zoology*, **255**, 25-29.
- Karatzas, C. N., Turner, J. D. und Karatzas, A. L. (1999). "Production of biofilaments in transgenic animals." Google Patents.
- KBL. (2017). "Kraig Biocraft Laboratories Homepage." www.kraiglabs.com. Zugriffsdatum: 03.08. 2017
- Khalilzadeh, R., Shojaosadati, S. A., Bahrami, A. und Maghsoudi, N. (2003). "Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*." *Biotechnology Letters*, **25**, 1989-1992.
- Kümmerlen, J., van Beek, J. D., Vollrath, F. und Meier, B. H. (1996). "Local Structure in Spider Dragline Silk Investigated by Two-Dimensional Spin-Diffusion Nuclear Magnetic Resonance." *Macromolecules*, **29**, 2920-2928.
- Kurtzman, C. P. (2009). "Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36**, 1435-1438.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- Lam, J. S., Huang, H. und Levitz, S. M. (2007). "Effect of Differential N-linked and O-linked Mannosylation on Recognition of Fungal Antigens by Dendritic Cells." *PLoS ONE*, **2**, 1-7.
- Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J.-F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E. A., Soares, J. W. und Karatzas, C. N. (2002). "Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells." *Science*, **295**, 472-476.
- Lefevre, T. und Pezolet, M. (2012). "Unexpected β -sheets and molecular orientation in flagelliform spider silk as revealed by Raman spectromicroscopy." *Soft Matter*, **8**, 6350-6357.
- Lewis, R. V. (2006). "Spider silk: ancient ideas for new biomaterials." *Chem Rev*, **106**, 3762–3774.
- Li, B., Alonso, D. O. V. und Daggett, V. (2001). "The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin." *Journal of Molecular Biology*, **305**, 581-592.
- Liebsch, D. und Keech, O. (2016). "Dark-induced leaf senescence: new insights into a complex light-dependent regulatory pathway." *New Phytologist*, **212**, 563-570.
- Lojewska, E., Kowalczyk, T., Olejniczak, S. und Sakowicz, T. (2015). "Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins." *Protein Expression and Purification*, **120**, 110-117.
- Lottspeich, F. und Engels, J. W. (2012). "Bioanalytik." 3 ed., Springer Spektrum.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent." *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Ma, J. K. C., Drake, P. M. W. und Christou, P. (2003). "The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants." *Nat Rev Genet*, **4**, 794-805.
- Malešević, M., Migge, A., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2015). "A Fluorescence-Based Array Screen for Transglutaminase Substrates." *ChemBioChem*, **16**, 1169-1174.
- Marsh, R. E., Corey, R. B. und Pauling, L. (1955). "An investigation of the structure of silk fibroin." *Biochimica et Biophysica Acta*, **16**, 1-34.
- Martin, S. L., Vrhovski, B. und Weiss, A. S. (1995). "Total synthesis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding human tropoelastin." *Gene*, **154**, 159-166.
- Martínez, D. E., Costa, M. L., Gomez, F. M., Otegui, M. S. und Guiamet, J. J. (2008). "Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves." *The Plant Journal*, **56**, 196-206.

- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat-sensitive variants." *Journal of Biotechnology*, **136**, 156-162.
- Matoba, N., Davis, K. R. und Palmer, K. E. (2011). "Recombinant Protein Expression in *Nicotiana*." In: *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols* (Birchler, J. A., ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 199-219.
- Matsuoka, K., Higuchi, T., Maeshima, M. und Nakamura, K. (1997). "A Vacuolar-Type H⁺-ATPase in a Nonvacuolar Organelle Is Required for the Sorting of Soluble Vacuolar Protein Precursors in Tobacco Cells." *The Plant Cell*, **9**, 533-546.
- Menzel, S., Holland, T., Boes, A., Spiegel, H., Bolzenius, J., Fischer, R. und Buyel, J. F. (2016a). "Comparison of Tobacco Host Cell Protein Removal Methods by Blanching Intact Plants or by Heat Treatment of Extracts." 1-15.
- Menzel, S., Holland, T., Boes, A., Spiegel, H., Bolzenius, J., Fischer, R. und Buyel, J. F. (2016b). "Optimized Blanching Reduces the Host Cell Protein Content and Substantially Enhances the Recovery and Stability of Two Plant-Derived Malaria Vaccine Candidates." *Frontiers in Plant Science*, **7**, 159.
- Meyer, D. E. und Chilkoti, A. (1999). "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides." *Nat Biotech*, **17**, 1112-1115.
- Natural-History-Museum-Bern. (2017). "World Spider Catalog." <http://www.wsc.nmbe.ch/statistics/>. Zugriffsdatum: 25.08.2017 2017
- Nguema-Ona, E., Vitré-Gibouin, M., Gotté, M., Plancot, B., Lerouge, P., Bardor, M. und Driouich, A. (2014). "Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function." *Frontiers in Plant Science*, **5**, 1-12.
- Nover, L. und Weiler, E. W. (2008). "Allgemeine und molekulare Botanik." Thieme.
- Owens, T. und Poole, R. J. (1979). "Regulation of Cytoplasmic and Vacuolar Volumes by Plant Cells in Suspension Culture." *Plant Physiology*, **64**, 900-904.
- Phan, H. T. und Conrad, U. (2011). "Membrane-Based Inverse Transition Cycling: An Improved Means for Purifying Plant-Derived Recombinant Protein-Elastin-Like Polypeptide Fusions." *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 2808-2821.
- Pillay, P., Schlüter, U., van Wyk, S., Kunert, K. J. und Vorster, B. J. (2014). "Proteolysis of recombinant proteins in bioengineered plant cells." *Bioengineered*, **5**, 15-20.
- Pixabay. (2016). "Spinnennetz mit Tautropfen." <https://pixabay.com/de/spinnennetz-netz-spinne-tautropfen-1698801/>. Zugriffsdatum: 29.08.2017 2017
- Rabilloud, T. (1990). "Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: A 10-year synthesis." *Electrophoresis*, **11**, 785-794.
- Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C. und Lawrence, J.-J. (1994). "Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview." *Cellular and Molecular Biology*, **40**, 57-75.
- Radtke, C., Allmeling, C., Waldmann, K. H., Reimers, K., Thies, K. und Schenk, H. C. (2011). "Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in sheep." *PLoS ONE*, **6**, 1-10.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. und Deber, C. M. (2009). "Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 1760-1765.
- Redmile-Gordon, M. A., Armenise, E., White, R. P., Hirsch, P. R. und Goulding, K. W. T. (2013). "A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts." *Soil Biology and Biochemistry*, **67**, 166-173.
- Richard, M. T., Stefan, S. und Rainer, F. (2013). "Optimizing the Yield of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants." *Current Pharmaceutical Design*, **19**, 5486-5494.
- Rizhsky, L., Liang, H. und Mittler, R. (2002). "The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco." *Plant Physiology*, **130**, 1143-1151.
- Römer, L. und Scheibel, T. (2008). "The elaborate structure of spider silk: Structure and function of a natural high performance fiber." *Prion*, **2**, 154-161.
- Sack, M., Rademacher, T., Spiegel, H., Boes, A., Hellwig, S., Drossard, J., Stoger, E. und Fischer, R. (2015). "From gene to harvest: insights into upstream process

- development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants." *Plant Biotechnology Journal*, **13**, 1094-1105.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangues, R., Ferrer-Mirallas, N., Vázquez, E. und Villaverde, A. (2016). "Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update." *Microbial Cell Factories*, **15**, 1-7.
- Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F. und Conrad, U. (2001). "Production of spider silk proteins in tobacco and potato." *Nat Biotechnol*, **19**, 573-577.
- Scheller, J., Henggeler, D., Viviani, A. und Conrad, U. (2004). "Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation." *Transgenic Res*, **13**, 51-57.
- Schulz, T. (2015). "Investigation on the multimerization of two spider silk analogs," Faculty of Sciences I, Institute of Pharmacy, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg.
- Smith, R. B. und Mommsen, T. P. (1984). "Pollen Feeding in an Orb-Weaving Spider." *Science*, **226**, 1330-1332.
- Sommer, C., Hertel, T. C., Schmelzer, C. E. H. und Pietzsch, M. (2012). "Investigations on the activation of recombinant microbial pro-transglutaminase: in contrast to proteinase K, dispase removes the histidine-tag." *Amino Acids*, **42**, 997-1006.
- Sommer, C., Volk, N. und Pietzsch, M. (2011). "Model based optimization of the fed-batch production of a highly active transglutaminase variant in *Escherichia coli*." *Protein Expression and Purification*, **77**, 9-19.
- Sommerfeld, S. und Strube, J. (2005). "Challenges in biotechnology production-generic processes and process optimization for monoclonal antibodies." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **44**, 1123-1137.
- Spiber. (2017). "Spiber Homepage." <https://www.spiber.jp/en>. Zugriffsdatum: 03.08. 2017
- Sponner, A., Schlott, B., Vollrath, F., Unger, E., Grosse, F. und Weisshart, K. (2005a). "Characterization of the protein components of *Nephila clavipes* dragline silk." *Biochemistry*, **44**, 4727-4736.
- Sponner, A., Vater, W., Rommerskirch, W., Vollrath, F., Unger, E., Grosse, F. und Weisshart, K. (2005b). "The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**, 897-902.
- Stafstrom, J. A. und Hebets, E. A. (2016). "Nocturnal foraging enhanced by enlarged secondary eyes in a net-casting spider." *Biology Letters*, **12**, 1-4.
- Stauffer, S. L., Coguill, S. L. und Lewis, R. V. (1994). "Comparison of Physical Properties of Three Silks from *Nephila clavipes* and *Araneus gemmoides*." *The Journal of Arachnology*, **22**, 5-11.
- Tanaka, T., Kamiya, N. und Nagamune, T. (2004). "Peptidyl Linkers for Protein Heterodimerization Catalyzed by Microbial Transglutaminase." *Bioconjugate Chemistry*, **15**, 491-497.
- Tekoah, Y., Shulman, A., Kizhner, T., Ruderfer, I., Fux, L., Nataf, Y., Bartfeld, D., Ariel, T., Gingis-Velitski, S., Hanania, U. und Shaaltiel, Y. (2015). "Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture—the protalix experience." *Plant Biotechnology Journal*, **13**, 1199-1208.
- Teulé, F., Miao, Y.-G., Sohn, B.-H., Kim, Y.-S., Hull, J. J., Fraser, M. J., Lewis, R. V. und Jarvis, D. L. (2012). "Silkworms transformed with chimeric silkworm/spider silk genes spin composite silk fibers with improved mechanical properties." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 923-928.
- Tsao, R. (2010). "Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols." *Nutrients*, **2**, 1231-1246.
- Tusé, D., Ku, N., Bendandi, M., Becerra, C., Collins, R., Langford, N., Sancho, S. I., López-Díaz de Cerio, A., Pastor, F., Kandzia, R., Thieme, F., Jarczowski, F., Krause, D., Ma, J. K. C., Pandya, S., Klimyuk, V., Gleba, Y. und Butler-Ransohoff, J. E. (2015). "Clinical Safety and Immunogenicity of Tumor-Targeted, Plant-Made Id-KLH Conjugate Vaccines for Follicular Lymphoma." *BioMed Research International*, **2015**, 1-15.

- Vollrath, F. (2000). "Strength and structure of spiders' silks." *Reviews in Molecular Biotechnology*, **74**, 67-83.
- Vollrath, F. und Edmonds, D. T. (1989). "Modulation of the mechanical properties of spider silk by coating with water." *Nature*, **340**, 305-307.
- Warwicker, J. O. (1960). "Comparative studies of fibroins." *Journal of Molecular Biology*, **2**, 350-362.
- Weems, H. V. und Edwards, G. B. (2001). "*Nephila clavipes*." University of Florida Zugriffsdatum: 24.08. 2017
- Wegener, A. D. und Jones, L. R. (1984). "Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Evidence for a protein structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits." *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 1834-1841.
- Weichert, N., Hauptmann, V., Menzel, M., Schallau, K., Gunkel, P., Hertel, T. C., Pietzsch, M., Spohn, U. und Conrad, U. (2014). "Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants." *Plant Biotechnology Journal*, **12**, 265-275.
- Whiffen, L. K., Midgley, D. J. und McGee, P. A. (2007). "Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method." *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 691-694.
- Wikipedia. (2005). "Spinnenetz in Trichterform."
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spinnennetz_in_Trichterform.jpg?uselang=de. Zugriffsdatum: 29.08. 2017
- Wikipedia. (2006). "Herbstwiese-Spinnweben."
<https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Herbstwiese-Spinnweben-1.jpg>. Zugriffsdatum: 29.08. 2017
- Wilken, L. R. und Nikolov, Z. L. (2012). "Recovery and purification of plant-made recombinant proteins." *Biotechnology Advances*, **30**, 419-433.
- Witcher, D. R., Hood, E. E., Peterson, D., Bailey, M., Bond, D., Kusunadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R., Kappel, W., Register, J. und Howard, J. A. (1998). "Commercial production of β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants." *Molecular Breeding*, **4**, 301-312.
- Xia, B., Feng, M., Xu, G., Xu, J., Li, S., Chen, X., Ding, L. und Zhou, Y. (2014). "Investigation of the Chemical Compositions in Tobacco of Different Origins and Maturities at Harvest by GC-MS and HPLC-PDA-QTOF-MS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 4979-4987.
- Xia, X.-X., Qian, Z.-G., Ki, C. S., Park, Y. H., Kaplan, D. L. und Lee, S. Y. (2010). "Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 14059-14063.
- Xu, H.-T., Fan, B.-L., Yu, S.-Y., Huang, Y.-H., Zhao, Z.-H., Lian, Z.-X., Dai, Y.-P., Wang, L.-L., Liu, Z.-L., Fei, J. und Li, N. (2007). "Construct Synthetic Gene Encoding Artificial Spider Dragline Silk Protein and its Expression in Milk of Transgenic Mice." *Animal Biotechnology*, **18**, 1-12.
- Xu, M. und Lewis, R. V. (1990). "Structure of a protein superfiber: spider dragline silk." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7120-7124.
- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K. und Mikata, K. (1995). "The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae)." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **59**, 439-444.
- Zeplin, P. H., Maksimovikj, N. C., Jordan, M. C., Nickel, J., Lang, G. und Leimer, A. H. (2014). "Spider Silk Coatings as a Bioshield to reduce Periprosthetic Fibrous Capsule Formation." *Adv Funct Mater*, **24**, 2658-2666.
- Zhou, C.-Z., Confalonieri, F., Medina, N., Zivanovic, Y., Esnault, C., Yang, T., Jacquet, M., Janin, J., Duguet, M., Perasso, R. und Li, Z.-G. (2000). "Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene." *Nucleic Acids Research*, **28**, 2413-2419.

Zischewski, J., Sack, M. und Fischer, R. (2016). "Overcoming low yields of plant-made antibodies by a protein engineering approach." *Biotechnology Journal*, **11**, 107-116.

7 Anhang

Tabelle 7-1: Aminosäuresequenzen der verwendeten Zielproteine.

Q-MaSp1-100xELP (102 kDa)					
GSGSGMAETA	AAAFERQHMD	SGSGPGAAQG	AGAAAAAAGG	AGQGGYGGLG	GQGAGQGGYG
GLGGQGAGQG	AGAAAAAAG	GAGQGGYGGL	GSQGAGRGGQ	GAGAAAAAAG	GAGQGGYGGL
GSQGAGRGG	GGQGAGAAAA	AAAGGAGQGG	YGGLGNQGAG	RGGQGAAAAA	AGGAGQGGYG
GLGSQGAGRG	GLGGQGAGAA	AAAAGGAGQG	GYGGLGGQGA	GQGGYGGLGS	QGAGRGGGLG
QGAGAAAAAA	AGGAGQGGLG	GQGAGQGAGA	SAAAAGGAGQ	GGYGGLGSQG	AGRGGEGAGA
AAAAAGGAGQ	GGYGGLGGQG	AGQGGYGGLG	SQGAGRGGGLG	GQGAGAAAAA	GAGQGGLGGQ
GAGQGAGAAA	AAAGGAGQGG	YGGLGSQGAG	RGGLGGQGAG	AVAAAAAGGA	GQGGYGGLGN
QGAGRGGQGA	AAAAGGAGQG	GYGGLGSQGA	GRGGQGAGAA	AAAAVGAGQG	GYGGLGGQGA
GQGGYGGLGS	QGSGRGGLGG	QGAGAAAAAA	GGAGQGGLGG	QGAGQGAGAA	AAAAGGVRQG
GYGGLGSQGA	GRGGQGAGAA	AAAAGGAGQG	GYGGLGGQGV	GRGGLGGQGA	GAAAAGGAGQ
GGYGGVGSAG	SAASAAASRL	SSPQASSRLS	SAVSNLVATG	PTNSAALSST	ISNVVSQIGA
SNPGLSGCDV	LIQALLEVVS	ALIQLIGSSS	IGQVNYGSAG	QATQIVGQSV	YQALGVYQAL
GAGGQAAAEQ	KLISEEDLNG	AVEMGHGTVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG
PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV
PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG
PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV
PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG
PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG
PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV
PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG
PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGLA	AAEPKDEL
K-MaSp1-100xELP (102 kDa)					
GSGSGMKETA	AARFERNHMD	SGSGPGAAQG	AGAAAAAAGG	AGQGGYGGLG	GQGAGQGGYG
GLGGQGAGQG	AGAAAAAAG	GAGQGGYGGL	GSQGAGRGGQ	GAGAAAAAAG	GAGQGGYGGL
GSQGAGRGG	GGQGAGAAAA	AAAGGAGQGG	YGGLGNQGAG	RGGQGAAAAA	AGGAGQGGYG
GLGSQGAGRG	GLGGQGAGAA	AAAAGGAGQG	GYGGLGGQGA	GQGGYGGLGS	QGAGRGGGLG
QGAGAAAAAA	AGGAGQGGLG	GQGAGQGAGA	SAAAAGGAGQ	GGYGGLGSQG	AGRGGEGAGA
AAAAAGGAGQ	GGYGGLGGQG	AGQGGYGGLG	SQGAGRGGGLG	GQGAGAAAAA	GAGQGGLGGQ
GAGQGAGAAA	AAAGGAGQGG	YGGLGSQGAG	RGGLGGQGAG	AVAAAAAGGA	GQGGYGGLGN
QGAGRGGQGA	AAAAGGAGQG	GYGGLGSQGA	GRGGQGAGAA	AAAAVGAGQG	GYGGLGGQGA
GQGGYGGLGS	QGSGRGGLGG	QGAGAAAAAA	GGAGQGGLGG	QGAGQGAGAA	AAAAGGVRQG
GYGGLGSQGA	GRGGQGAGAA	AAAAGGAGQG	GYGGLGGQGV	GRGGLGGQGA	GAAAAGGAGQ
GGYGGVGSAG	SAASAAASRL	SSPQASSRLS	SAVSNLVATG	PTNSAALSST	ISNVVSQIGA
SNPGLSGCDV	LIQALLEVVS	ALIQLIGSSS	IGQVNYGSAG	QATQIVGQSV	YQALGVYQAL
GAGGQAAAEQ	KLISEEDLNG	AVEMGHGTVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG
PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV
PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG
PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV
PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG
PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG
PGGGVPAGV	PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV
PGGGVPGVG	PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGVG
PVGVPGGGV	PGAGVPGVG	PVGVPGVG	PGGGVPAGV	PGGGVPGLA	AAEPKDEL
1xFlag-100xELP (59 kDa)					
SGAGPGGYGP	GGAGPGGYGP	GGAGPGGYGP	GGAGPGGYGP	GGTGPGGYGP	GGTGPGGVGP
GGAGPGGYGP	GGAGPGGAGP	GGAGPGGAGP	GGAGPGGAGP	GGYGPGGSGP	GGATIIEDLD
ITIDGADGPP	ITISEELTIS	GAGGSGPGGV	GPGGSGPGGV	GPGSFGPGGV	GPGGSGPGGV
GSGGSGQGGV	RPSGSGPGGV	RSQLPGGQAA	AEQKLISEED	LNGAVEMGHG	VGVPGVGVPG
GGVPGAGVPG	VGVPGVGVPG	VGVPGGGVPG	AGVPGGGVPG	VGVPGVGVPG	GGVPGAGVPG
VGVPGVGVPG	VGVPGGGVPG	AGVPGGGVPG	VGVPGVGVPG	GGVPGAGVPG	VGVPGVGVPG
VGVPGGGVPG	AGVPGGGVPG	VGVPGVGVPG	GGVPGAGVPG	VGVPGVGVPG	VGVPGGGVPG
AGVPGGGVPG	VGVPGVGVPG	GGVPGAGVPG	VGVPGVGVPG	VGVPGGGVPG	AGVPGGGVPG
VGVPGVGVPG	GGVPGAGVPG	VGVPGVGVPG	VGVPGGGVPG	AGVPGGGVPG	VGVPGVGVPG
GGVPGAGVPG	VGVPGVGVPG	VGVPGGGVPG	AGVPGGGVPG	VGVPGVGVPG	GGVPGAGVPG
VGVPGVGVPG	VGVPGGGVPG	AGVPGGGVPG	VGVPGVGVPG	GGVPGAGVPG	VGVPGVGVPG
VGVPGGGVPG	AGVPGGGVPG	VGVPGVGVPG	GGVPGAGVPG	VGVPGVGVPG	VGVPGGGVPG

AGVPPGGVPG GLAAAEPKDE L					
4xFlag-100xELP (106 kDa)					
SGAGPGGYGP	GGAGPGGYGP	GGAGPGGYGP	GGAGPGGYGP	GGTGPGGYGP	GGTGPGGVGP
GGAGPGGYGP	GGAGPGGAGP	GGAGPGGAGP	GGAGPGGAGP	GGYGPGGSGP	GGATIEDLD
ITIDGADGPP	ITISEELTIS	GAGGSGPGGV	GPGGSGPGGV	GPGSFGPGGV	GPGGSGPGGV
GSGGSGQGGV	RPSGSGPGGV	GPGGYGPGGA	GPGGYGPGGA	GPGGYGPGGA	GPGGYGPGGT
GPGGYGPGGT	GPGGVGPGGA	GPGGYGPGGA	GPGGAGPGGA	GPGGAGPGGA	GPGGAGPGGY
GPGGSGPGGA	TIIEDLDITI	DGADGPPITI	SEELTISGAG	GSGPGGVGPG	GSGPGGVGPG
SFGPGGVGPG	GSGPGGVGSG	GSGQGGVRS	GSGPGGVGPG	GYGPGGAGPG	GYGPGGAGPG
GYGPGGAGPG	GYGPGGTGPG	GYGPGGTGPG	GVGPGGAGPG	GYGPGGAGPG	GAGPGGAGPG
GAGPGGAGPG	GAGPGGYGPG	GSGPGGATII	EDLDITIDGA	DGPPITISEE	LTISGAGGSG
PGGVGPGGSG	PGGVGPFSFG	PGGVGPGGSG	PGGVGSGGSG	QGGVRSFSFG	PGGVGPGGYG
PGGAGPGGYG	PGGAGPGGYG	PGGAGPGGYG	PGGTGPGGYG	PGGTGPGGVG	PGGAGPGGYG
PGGAGPGGAG	PGGAGPGGAG	PGGAGPGGAG	PGGYGPGGSG	PGGATIEDL	DITIDGADG
PITISEELTI	SGAGGSGPGG	VGPGGSGPGG	VGPGSFGPGG	VGPGGSGPGG	VGSGGSGQGG
VRPSGSGPGG	VRSQLPGGQA	AAEQKLISEE	DLNGAVEMGH	GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP
GVGVPGVGVP	GVGVPGGGVP	GAGVPGGGVP	GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP	GVGVPGVGVP
GVGVPGGGVP	GAGVPGGGVP	GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP	GVGVPGVGVP	GVGVPGGGVP
GAGVPGGGVP	GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP	GVGVPGVGVP	GVGVPGGGVP	GAGVPGGGVP
GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP	GVGVPGVGVP	GVGVPGGGVP	GAGVPGGGVP	GVGVPGVGVP
GGGVPGAGVP	GVGVPGVGVP	GVGVPGGGVP	GAGVPGGGVP	GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP
GVGVPGVGVP	GVGVPGGGVP	GAGVPGGGVP	GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP	GVGVPGVGVP
GVGVPGGGVP	GAGVPGGGVP	GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP	GVGVPGVGVP	GVGVPGGGVP
GAGVPGGGVP	GVGVPGVGVP	GGGVPGAGVP	GVGVPGVGVP	GVGVPGGGVP	GAGVPGGGVP
GGLAAAEPKD	EL				

8 Lebenslauf

persönliche Angaben

Name: René Heppner

Geburtsdatum: 31.12.1978

Geburtsort: Torgau

Studium & Ausbildung

- 04/2012 – 10/2016 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
 wissenschaftlicher Mitarbeiter Arbeitsgruppe
Downstream Processing
 Thema Doktorarbeit: **Entwicklung eines Reinigungsverfahrens zur Gewinnung künstlicher Spinnenseidenproteine aus Tabakblättern im Pilotmaßstab**
- 10/2003 – 01/2012 **Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
 Studiengang: Bioingenieurwesen
 Abschluss: Diplomingenieur, Note: gut

 Thema Diplomarbeit: „Untersuchungen zur rekombinanten Expression einer *Bacillus subtilis*-Lipase in *Escherichia coli* und ihrer Reinigung“, Note: sehr gut
- 10/2000 – 09/2003 **Studium an der Fachhochschule Merseburg (FH)**
 Studiengang: Chemieingenieurwesen
- 10/1998 – 09/2000 **Studium an der Fachhochschule Merseburg (FH)**
 Studiengang: Umweltingenieurwesen
- 08/1991 – 07/1997 **Martin-Rinckart-Gymnasium Eilenburg, Abitur**

Praktika

- 05/2010 – 09/2010 **Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig**
 Entwicklung einer Anlage der ersten Stufe (Hydrolysestufe) einer zweistufigen Biogasanlage im Labormaßstab
- 11/2006 – 01/2007 **Institut für Partikel- und Umwelttechnologie e.V.**
 Bestimmung von Strömungskennwerten mittels LASER-Doppler-Anemometry (LDA)

9 Publikationen

René Heppner, Nicola Weichert, Angelika Schierhorn, Udo Conrad, and Markus Pietzsch: "Low-Tech, Pilot Scale Purification of a Recombinant Spider Silk Protein Analog from Tobacco Leaves", *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Oct; 17(10): 1687.

René Heppner and Markus Pietzsch: "Investigations on the purification of a synthetic spider silk protein", poster, First Conference of the International Society for Plant Molecular Farming, Berlin-Dahlem, 17th-19th June, 2014