

Dissertation

Herstellung von Spinnenseidenproteinen in Tabaksamen

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

vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Dipl-Biotechnol. Kai Schallau

geb. am 20.07.1977 in Marburg

Gutachter: 1. PD Dr. Udo Conrad
 2. Prof. Dr. Werner Roos
 3. Prof. Dr. Jürgen Scheller

eingereicht: 13.03.2008

Datum der Promotion: 11.09.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014379

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014379>]

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Bearbeitung dieser Arbeit unterstützt haben. Dabei ist zunächst die hervorragende technische Unterstützung bei der Regeneration und Analyse der transgenen Pflanzen durch Christine Helmold, Anita Winger und Rotraud Losse zu nennen. Auch die Hilfe meiner wissenschaftlichen Kollegen der Gruppe „Phytoantikörper“ hat, innerhalb wie außerhalb des Labors, wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Ihnen allen sei an dieser Stelle gedankt. Ich bedanke mich bei Dr. Helmut Bäumlein und Dr. Andreas Houben für ihre hilfreichen Anregungen bei der schriftlichen Verfassung meiner Arbeit.

Auch meinen Mentoren Dr. Jens Tiedemann und Dr. Uwe Spohn gilt mein Dank für ihre Hilfe.

Prof. Dr. Ulrich Wobus danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben durchzuführen.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. habil. Udo Conrad für die Möglichkeit dieses hochinteressante Thema zu bearbeiten und für seine kompetente und ehrliche Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich für die Unterstützung meiner Familie bedanken, ohne die nichts eine Bedeutung hätte.

Ich hoffe, dass ich alle Beteiligten in genügendem Umfang für ihre Hilfe gewürdigt habe. Sollte dem nicht so sein, bedenkt folgendes:

"Begegnet uns jemand, der uns Dank schuldig ist, gleich fällt es uns ein. Wie oft können wir jemandem begegnen, dem wir Dank schuldig sind, ohne daran zu denken!"

Johann Wolfgang von Goethe, Maximen und Reflexionen

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| +K | Positivkontrolle |
| °C | Grad Celsius |
| 9E10 | Anti-c-myc-Antikörper 9E10 (Evan et al., 1985) |
| A | Ampere |
| <i>A. tumefaciens</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| Abb. | Abbildung |
| AcSp | Spinnenseidenprotein der traubenförmigen Drüse |
| ADF | <i>Araneus diadematus</i> Fibroin |
| BAP | 6-Benzylaminopurin |
| bp | Basenpaare |
| BSA | "bovine serum albumine", Rinderserumalbumin |
| CaMV | „cauliflower mosaic virus“, Blumenkohl Mosaikvirus |
| cDNA | „complementary DNA“, komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| C-Terminus | carboxyterminaler Teil eines Proteins |
| Da | Dalton |
| ddH ₂ O | zweifach destilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | enzymatische Chemolumineszenz |
| ECP | "egg case protein", Protein des Spinnenkokons |
| EDTA | "ethylenediaminetetraacetic acid", Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELP | "elastin like polypeptide", Elastin ähnliches Polypeptid |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| F | Farad |
| Flag | Spinnenseidenprotein der geißelförmigen Drüse |
| g | Gramm bzw. relative Erdbeschleunigung |
| Gly | Glycin |
| His-Tag | Polyhistidinmotiv |
| Ig | Immunglobulin |
| IPK | Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben |
| ITC | Inverse Transition Cycling |
| J | Joule |
| k | Kilo 10 ³ |

| | |
|-----------------------|--|
| Kan ^r | Kanamycin resistent |
| KDEL | Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin-Peptid |
| l | Liter |
| LB-Medium | "lysogeny broth", komplexes Bakterienmedium |
| m | Meter, milli 10 ⁻³ |
| M | Mol/Liter |
| MaSp | Spinnenseidenprotein der großen ampullenförmigen Drüse |
| MES | Morpholinethansulfonsäure |
| MiSp | Spinnenseidenprotein der kleinen ampullenförmigen Drüse |
| MS-Medium | Medium nach Murashige und Skoog |
| N | Newton |
| n | Nano 10 ⁻⁹ |
| <i>N. tabacum</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> |
| <i>N. benthamiana</i> | <i>Nicotiana benthamiana</i> |
| NES | α-Naphtylessigsäure |
| N-Terminus | aminoterminaler Teil eines Proteins |
| OD | optische Dichte |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | „phosphate-buffered saline“, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | „polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion |
| PHB | Polyhydroxybuttersäure |
| Pro | Prolin |
| rcf | „Relative centrifugal force“, relative Zentrifugationskraft (=g) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| scFv | „single-chain Fv“, Einzelketten-Antikörperfragmente |
| SDS | „sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat |
| SNN | <i>Nicotiana tabacum</i> , Varietät Samsun NN (Wildtyp) |
| SOB-Medium | komplexes Bakterienmedium |
| SOC-Medium | komplexes Bakterienmedium |
| spp. | Mehrere Spezies einer Gattung |

| | |
|-------|--|
| Tab. | Tabelle |
| TGase | Transglutaminase |
| TRIS | Trishydroxymethylaminomethan |
| TSP | Gesamtmenge an löslichem Protein |
| TuSp | Spinnenseidenprotein der röhrenförmigen Drüse |
| ÜN | Über Nacht |
| V | Volt |
| Val | Valin |
| WT | Wildtyp, hier: <i>Nicotiana tabacum</i> Varietät Samsun NN |
| μ | Mikro 10 ⁻⁶ |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|--------|
| 1 | Einleitung | - 1 - |
| 1.1 | Spinnenseide | - 1 - |
| 1.2 | Pflanzen als Produktionsplattform für transgene Proteine | - 10 - |
| 1.3 | Elastin ähnliche Polypeptide (Elastin-like-polypeptides) | - 12 - |
| 1.4 | Proteinmodifikation | - 14 - |
| 1.5 | Zielsetzung | - 16 - |
| 2 | Material und Methoden | - 18 - |
| 2.1 | Material | - 18 - |
| 2.1.1 | Bakterienstämme | - 18 - |
| 2.1.2 | Vektoren | - 18 - |
| 2.1.3 | Pflanzenmaterial | - 18 - |
| 2.1.4 | Oligonukleotide, Primer | - 19 - |
| 2.1.5 | Medien | - 19 - |
| 2.1.5.1 | Pflanzenmedien | - 19 - |
| 2.1.5.2 | Bakterienmedien | - 20 - |
| 2.1.6 | Puffer | - 20 - |
| 2.1.7 | Enzyme | - 21 - |
| 2.1.8 | Antibiotika | - 21 - |
| 2.1.9 | Antikörper | - 21 - |
| 2.1.10 | Pflanzenhormone | - 21 - |
| 2.1.11 | Chemikalien, Reagenzien und Kits | - 22 - |
| 2.1.12 | Software | - 22 - |
| 2.1.13 | Laborgeräte | - 23 - |
| 2.1.14 | Verbrauchsmaterial | - 23 - |
| 2.2 | Methoden | - 24 - |
| 2.2.1 | Klonierung | - 24 - |
| 2.2.2 | Bakterienkultivierung | - 24 - |
| 2.2.3 | Transformation mittels Elektroporation | - 25 - |
| 2.2.3.1 | Herstellung elektrokompenter Zellen (XL1Blue) | - 25 - |
| 2.2.3.2 | Transformation | - 25 - |
| 2.2.4 | Pflanzenanzucht | - 25 - |
| 2.2.5 | Stabile Tabaktransformation | - 26 - |
| 2.2.6 | Transiente Tabaktransformation | - 26 - |
| 2.2.6.1 | Spritzeninfiltration | - 27 - |

| | | |
|---------|--|--------|
| 2.2.6.2 | Vakuuminfiltration | - 27 - |
| 2.2.7 | Herstellung von Proteinproben | - 28 - |
| 2.2.7.1 | Proteinproben aus Tabakblättern | - 28 - |
| 2.2.7.2 | Proteinproben aus Tabaksamen | - 28 - |
| 2.2.8 | Western blot | - 28 - |
| 2.2.8.1 | Protein Dot blot | - 29 - |
| 2.2.9 | Coomassiefärbung | - 29 - |
| 2.2.10 | Proteinreinigung aus Tabakblättern | - 29 - |
| 2.2.11 | Proteinreinigung aus Tabaksamen | - 30 - |
| 2.2.12 | Bestimmung der Enzymaktivität von Transglutaminase | - 30 - |
| 2.2.13 | Dimerisierung von Proteinen mittels Transglutaminase | - 31 - |
| 3 | Ergebnisse | - 32 - |
| 3.1 | Expression von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Tabaksamen | - 32 - |
| 3.1.1 | Konstruktion der Spinnenseiden-Fusionsgene mit samenspezifischen Promotoren | - 32 - |
| 3.1.2 | Test von Konstrukten mittels transienter Expression | - 36 - |
| 3.1.2.1 | Transiente Expression von samenspezifisch exprimierten Konstrukten | - 36 - |
| 3.1.3 | Produktion stabil transformierter Tabakpflanzen mit samenspezifischen Konstrukten | - 38 - |
| 3.1.3.1 | Nachweis der samenspezifisch exprimierten Proteine aus stabil transformierten Pflanzen mittels Western blot-Analyse | - 39 - |
| 3.1.4 | Analyse der Langzeitstabilität von Spinnenseiden- Fusionsproteinen in Tabaksamen | - 47 - |
| 3.1.5 | Reinigung des Spinnenseiden-Fusionsproteins SO1-100xELP aus Tabaksamen | - 48 - |
| 3.1.5.1 | Anpassung der Inverse Transition Cycling-Methode an Reinigung aus Tabaksamen | - 49 - |
| 3.1.5.2 | Filterbasierte Reinigung | - 56 - |
| 3.1.5.3 | Semiquantitative Auswertung des Reinigungsverfahrens | - 58 - |
| 3.2 | Posttranslationale Polymerisierung von Spinnenseiden- Fusionsproteinen | - 61 - |
| 3.2.1 | Konstruktion der Spinnenseiden-Fusionsgene mit Transglutaminasemarken | - 61 - |

| | | |
|-------|---|--------|
| 3.2.2 | Transiente Expression von Spinnenseidenproteinen mit Transglutaminasemarken | - 64 - |
| 3.2.3 | Stabile Transformation der Spinnenseiden-Fusionsproteine mit Transglutaminase-marken | - 64 - |
| 3.2.4 | Polymerisierung mittels bakterieller Transglutaminase | - 65 - |
| 3.2.5 | Transglutaminase-vermittelte Integration von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Gewebefasern | - 70 - |
| 4 | Diskussion | - 72 - |
| 4.1 | Sind Tabaksamen als Produktionsplattform für Spinnenseidenproteine geeignet? | - 74 - |
| 4.2 | Posttranslationale Verknüpfung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen | - 80 - |
| 5 | Zusammenfassung | - 84 - |
| 6 | Abbildungsverzeichnis | - 86 - |
| 7 | Literaturverzeichnis | - 89 - |

1 Einleitung

1.1 Spinnenseide

Schon seit Urzeiten verwendet der Mensch natürliche Polymere zu unterschiedlichsten Zwecken. Baumharze dienten als Klebstoffe, Naturkautschuk als Isolierung gegen Feuchtigkeit, Seide und Wolle zur Herstellung von Kleidung. Synthetische Materialien erweiterten das Spektrum an Werkstoffen durch ihre neuartigen Materialeigenschaften und die relativ einfache Produktion in großen Mengen. Doch trotz der unbestrittenen Vorzüge von synthetischen Materialien gibt es zahlreiche biologische Materialien, die den künstlich erzeugten Stoffen ebenbürtig oder sogar überlegen sind. Eines der eindrucksvollsten Beispiele für ein solches biologisches Supermaterial ist Spinnenseide (Vollrath 1999). Insbesondere die Tragfadenseide stellt mit ihrer Verbindung aus Elastizität und Zugfestigkeit einen vielseitigen potentiellen Werkstoff dar, doch sind auch andere Spinnenseidenarten von technischem Interesse (Hayashi und Lewis 2001; Tian und Lewis 2005; Hayashi et. al. 2004).

Spinnenseide ist ein Sammelbegriff für eine Anzahl verschiedener Fasern, die von Spezies der Ordnung *Aranaea* zu ebenso verschiedenen Zwecken zumeist in Abdominaldrüsen produziert werden (Abb. 1). Eine Ausnahme ist die Produktion von Seidenfäden an den Füßen von Taranteln zur Fortbewegung auf glatten Oberflächen (Gorb et. al. 2006).

Obwohl sich die sieben Arten der abdominalen Spinnenseide stark voneinander unterscheiden, gibt es einige Gemeinsamkeiten. So bestehen alle Spinnenseiden aus Proteinen, die nahezu irreversibel von einer extrem löslichen in eine extrem unlösliche Form übergehen. Ebenso bestehen die meisten bekannten Spinnenseidenproteine (Spidroine oder Fibroine) größtenteils aus Alanin, Serin und Glycin sowie in geringerem Umfang Glutamin, Tyrosin, Leucin und Valin. Während der Herstellung des Netzes werden verschiedene Fäden miteinander kombiniert, um schließlich das fertige Netz zu bilden.

Die große ampullenförmige Drüse und die darin enthaltenen Proteine wurden besonders intensiv untersucht, da diese Drüse aufgrund ihrer Größe und Lage leichter zu präparieren ist als die übrigen Spinndrüsen. Darüber hinaus ist das Produkt dieser Drüse die bereits erwähnte Tragfadenseide, die aufgrund ihrer einzigartigen mechanischen Eigenschaften hochinteressant für jede materialtechnische Untersuchung ist.

1 Einleitung

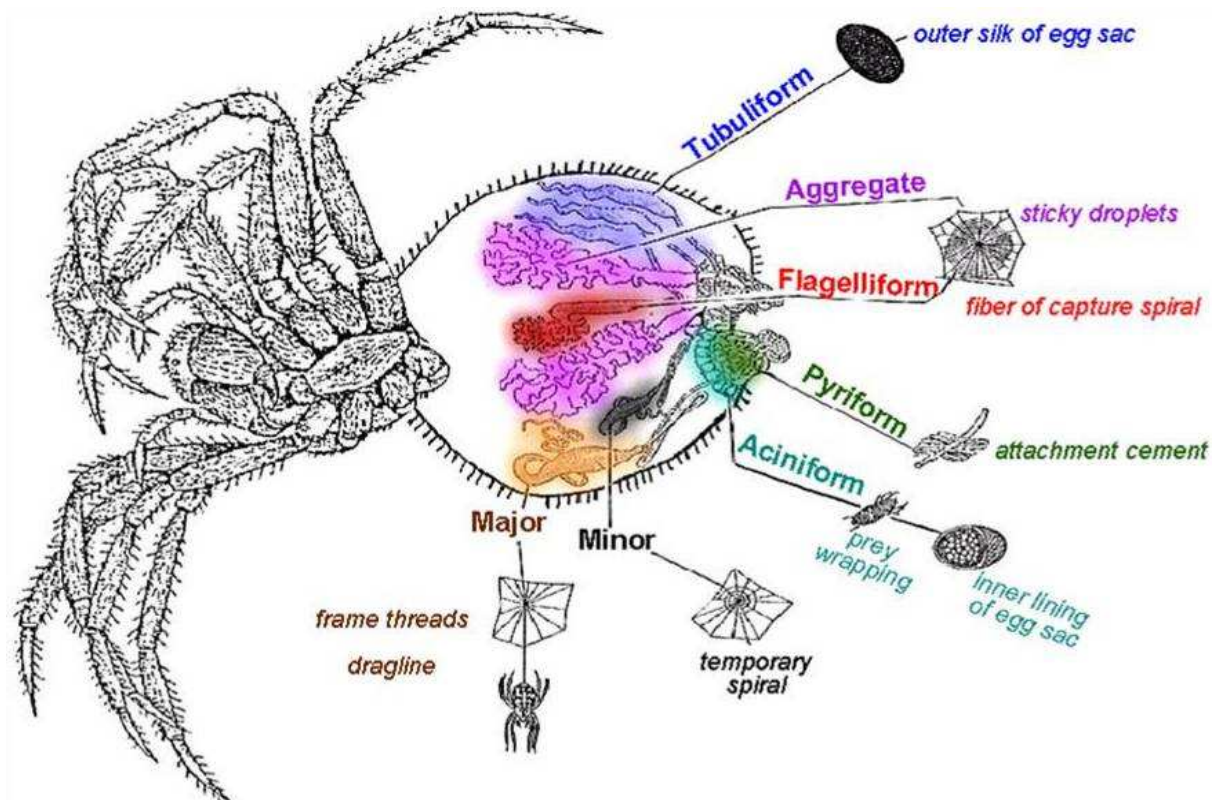


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung von *Araneus diadematus* mit hervorgehobenen Netzdrüsen und der Funktion der zugehörigen Spinnenseiden (variiert aus Vollrath 2000).

Abgesehen von der erwähnten dorsalen Seidenproduktion bei Taranteln werden von Spinnen, insbesondere natürlich von Webspinnen, bis zu sieben verschiedene Seidenarten produziert, die nach der korrespondierenden Drüse benannt wurden (Tabelle 1). Jede dieser Seidenarten erfüllt wichtige Funktionen. So wird die Seide der großen ampullenförmigen Drüse oft auch nach ihrer Funktion als Tragfadenseide bezeichnet, da sie als „Rettungsleine“ der Spinne dient, aber auch ein elementares Strukturelement des Spinnennetzes darstellt (Foelix 1996). Andere Seidenarten, die dem elastischen Abstoppen und Einfangen von Beute dienen (flagelliforme Seide), werden während der Konstruktion des Netzes als „Arbeitsgerüst“ verwendet (Seide der kleinen ampullenförmigen Drüse) oder konservieren gefangene Beute (aciniforme Seide) und Spinneneier (tubuliforme Seide) als Bestandteile von Kokons (Hu et al. 2006b).

Tab. 1: Funktionen von Spinnenseidenarten (variiert nach Hu et. al. 2006b).

| Bezeichnung der Spinndrüse/seide | Funktion | Strukturelement | Basisproteine |
|--|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| Große Ampullendrüse (mayor ampullate) | Fortbewegung, Beutefang | Tragfäden, Sicherheitsfaden | MaSp1 u. 2 |
| Kleine Ampullendrüse (minor ampullate) | Beutefang (Netzkonstruktion) | Konstruktionsspirale, Netzverstärkung | MiSp1 u. 2 |
| Geißelförmige Drüse (flagelliform) | Beutefang | Fangspirale | Flag |
| Traubenförmige Drüse (aciniform) | Beuteverwahrung, Fortpflanzung | Beutekokon, Samennetz | AcSp1 |
| Birnenförmige Drüse (pyriform) | Beutefang | Netzbefestigung, Verbindungsfaser | Unbekannt |
| Röhrenförmige Drüse (tubuliform) | Fortpflanzung | Eierkokon | TuSp1, ECP-1, ECP-2 |
| Clusterförmige Drüse (aggregate) | Beutefang | Klebstoff für Fangspirale | Unbekannt |

Die Tragfadenseide der großen ampullenförmigen Drüse besteht aus zwei Hauptkomponenten: Major ampullate spidersilk protein (MaSp) 1 und 2 im Falle von *Nephila clavipes*, bzw. *Araneus diadematus* fibroin 3 bzw. 4 (ADF-3 bzw. ADF 4, entsprechend MaSp2) und *Araneus diadematus* fibroin 2 (ADF-2, entsprechend MaSp1), mit einer Größe von 180 bis 720 kDa (Jackson und Obrien 1995; Candelas und Cintron 1981; Mello et. al. 1994; Guerette et. al. 1996). Das Verhältnis der beiden Komponenten zueinander variiert von Spezies zu Spezies, jedoch ist zumeist MaSp1 in größeren Mengen vorhanden als MaSp2. Die charakteristischen Motive der Tragfadenproteine MaSp1 und 2 sind poly-Alanin-Blöcke (in Abb. 2 rot markiert), multiple Wiederholungen des Dipeptids Glycin-Alanin (in Abb. 2 gelb markiert) sowie das Tripeptid Glycin-Glycin-X (in Abb. 2 grün markiert), wobei „X“ eine beliebige Aminosäure darstellt. Diese Motive bilden in unterschiedlicher Anzahl eine sogenannte Ensemblewiederholung, die zwischen den Spezies eine hohe Ähnlichkeit aufweist (Abb. 2). Diese sich wiederholenden Sequenzen bilden die zentralen Elemente der Spinnenseide und sind für die mechanischen Eigenschaften verantwortlich. Tragfadenproteine

1 Einleitung

enthalten überdies nichtrepetitive N- und C-Termini, deren genaue Funktion noch zu klären ist (Motriuk-Smith et. al. 2005; Challis et. al. 2006).

| | |
|---------------------------------|---|
| <i>Nephila clavipes</i> | GGA--GQGGYGGLGXQGA-----GR-----GGQ-GA--GAAAAAA----- |
| <i>Nephila madagascariensis</i> | GGA--GQGGYGGLGSQGA-----GRGGY--GGQ-GA--GAAAAAA----- |
| <i>Nephila senegalensis</i> | GGA--GQGGYGGLGQGA-----GR-----GA--GAAAAAA----- |
| <i>Tetragnatha kauaiensis</i> | GGLGGGQ-GAGQGGQQAGAGQGGYGSGLGGXGQ----GAGQASAAAAAAA |
| <i>Tetragnatha versicolor</i> | GGLGGGQGGY-----GSGLGGAGQGGQQAGAGQAAAAAASAAA |
| <i>Latrodectus geometricus</i> | GGA--GQGGY-----GQ-----GYGXGGAGQGA-----GAAAAAAA |
| <i>Argiope aurantia</i> | GGQ--GGXGGYGGLGSQAGAGQ-----GYXXGGA---GQG-----GAAAAAAA |
| <i>Argiope trifasciata</i> | GGQ--GGQGGYGGLGSQAGAGQ-----GGY---GQG-----GAAAAAAA |
| <i>Araneus diadematus</i> | GGX--GGXGGQGGGLGSQAGAG-----GAGQGGYGA-GQG-----GAAAAAAA |

Abb. 2: Vergleich der Ensemblewiederholungen von MaSp1-Proteinen aus verschiedenen Spinnenspezies, bzw. ADF-2 aus *Araneus diadematus* (Gatesy et. al. 2001).

Allerdings deuten erste Ergebnisse darauf hin, dass die C-Termini eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Löslichkeitsverhaltens von Tragfadenseide spielen (Huemmerich et. al. 2004) oder in den Prozess der Polymerisierung und damit der Faserbildung aus Seidenproteinen involviert sind (Sponner et. al. 2005).

Die zweite wichtige Komponente von Fangnetzen stellt die flagelliforme Seide dar, aus der die Fangspirale des Netzes besteht. Damit stellt diese Komponente den funktionellen Hauptteil des Netzes dar. Flagelliforme Seide besteht aus einem Hauptprotein, dem Flag – Protein (Hayashi und Lewis 1998).

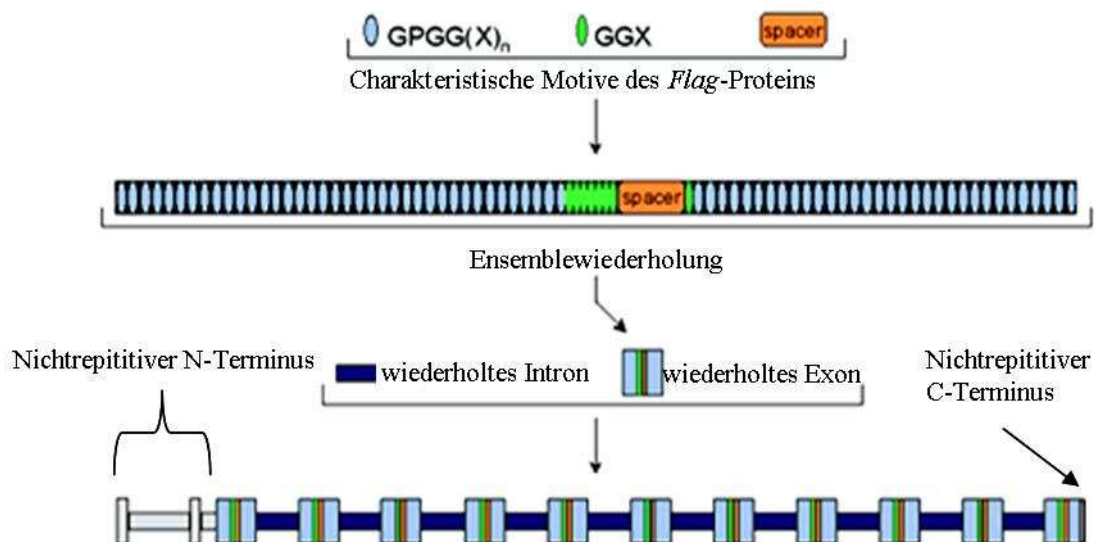


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Flag-Proteins mit besonderer Betrachtung der charakteristischen Ensemblewiederholungen (Hayashi und Lewis 2000).

1 Einleitung

Dieses Protein hat eine Größe von ca. 500 kDa, ist in dieser Hinsicht also mit Proteinen der Tragfadenseide vergleichbar. Das strukturelle Hauptmotiv der flagelliformen Seide ist das Pentapeptid Glycin-Prolin-Glycin-Glycin-X (in Abb. 3 blau markiert), welches eine Ähnlichkeit zum Pentapeptid des Elastin ähnlichen Polypeptids (ELP) besitzt. Zahlreiche Wiederholungen dieses Pentapeptids umgeben zwei weitere Motive: das bereits aus Tragfadenseide bekannte Tripeptid Gly-Gly-X (in Abb. 3 grün markiert) und eine glycinarne Spacerregion von 28 Aminosäuren Länge (in Abb. 3 orange markiert). Diese Motive bilden eine Ensemblewiederholung, die, unterbrochen von Introns, die Struktur des Flag-Proteins ausmachen, wie es bereits aus den Proteinen der Tragfadenseide bekannt ist. Ebenso wie diese Proteine besitzt das Flag-Protein nichtrepetitive N- und C-Termini.

Auch die Proteine der kleinen ampullenförmigen Drüse, MiSp1 und 2, wurden untersucht. Sie unterteilen sich in zwei Bereiche, eine repetitive Region und einen nichtrepetitiven Spacer am C-Terminus. Die repetitive Region enthält Motive, die denen von MaSp1 ähneln, allerdings sind die sich wiederholenden Einheiten in MiSp1 und 2 stärker konserviert (Colgin und Lewis 1998). Die Größen von MiSp1 und MiSp2 liegen bei 320 kDa bzw. bei 250 kDa.

Tubuliforme Seide dient dem Schutz der Spinneneier in Form eines Kokons. Diese Seide besteht aus tubuliformem Spinnseidenprotein (TuSp1), sowie den sogenannten Kokonproteinen (egg case protein) ECP 1 und 2. Es wurde die Vermutung geäußert, dass tubuliforme Seide die ursprüngliche Form der Spinnenseide war, aus der sich die übrigen Seidentypen entwickelt haben (Tian und Lewis 2005).

Aciniforme Seide dient der Verpackung von Beute sowie der Herstellung von Samennetzen (Foelix 1996). Sie unterscheidet sich in ihren Ensemblewiederholungen zum Teil erheblich von den übrigen Spinnenseiden. Obwohl sie aufgrund ihrer Eigenschaften (hohe Elastizität und geringe Bruchfestigkeit) eher Gemeinsamkeiten mit flagelliformer Seide aufweist, zeigen genetische Untersuchungen des C-Terminus der aciniformen Seidenproteine neben Ähnlichkeiten zur Sequenz des Flag-Proteins ebenfalls schwache Ähnlichkeiten mit den Sequenzen von MaSp und MiSp (Hayashi et. al. 2004).

Über die pyriforme Seide ist relativ wenig bekannt. So liegt für diese Seide bisher noch keine cDNA-Sequenz vor. Bisher ist lediglich sicher, dass pyriforme Seide die Aminosäuren Serin, Asparagin, Glutaminsäure, Threonin, Lysin und Arginin enthält (Vollrath und Knight 2001). Auch das Produkt der clusterförmigen Drüse (aggregate gland) ist noch weitgehend unerforscht. Allerdings ist die Funktion bekannt, nämlich Klebstoff für die Fangspirale zu bilden (Vollrath und Edmonds 1989).

1 Einleitung

Tab. 2: Aminosäuremotive der verschiedenen Spidroine (Hu et. al. 2006b).

| Spinnenseidenprotein | Charakteristische Motive |
|----------------------|---|
| MaSp1 | GGX, (GA) _n , poly(A)-Blöcke, |
| MaSP2 | poly(A)-Blöcke, GPGXX |
| MiSp1 | GGX, (GA) _n , poly(A)-Blöcke, Spacer |
| MiSp2 | GGX,(GA) _n , poly(A)-Blöcke, Spacer |
| Flag | GGX, GPGG(X) _n , Spacer |
| AcSp1 | GGX, poly(S)-Blöcke |
| TuSp1 | poly(S)-Blöcke, GX, AAQAASAA, AAAQA, AASQAA, SQ _n |
| ECP-1 | Kurze poly(A)-Blöcke, GA-Wiederholungen |
| ECP-2 | Kurze poly(A)-Blöcke, GA-Wiederholungen |

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich alle bisher identifizierten Spinnenseidenproteine durch charakteristische Aminosäuremotive auszeichnen. Diese Motive sind bei den verschiedenen Arten der Webspinnen bereits über extreme Zeiträume konserviert, im Falle von TuSp1 existieren diese seit mehr als 125 Millionen Jahre (Gatesy et. al. 2001). Dies verdeutlicht die enorme Bedeutung dieser Motive für die korrekte Funktion und für die beeindruckenden Eigenschaften dieser Proteine und der daraus produzierten Spinnfäden.

Spinnenseide ist bereits im nativen Zustand ein vielseitiges Material und erfüllt zahlreiche Aufgaben, vom Beutefang bis hin zur Fortpflanzung (Tab. 1). Die positiven Eigenschaften dieses Materials sind bereits seit vielen Jahrhunderten bekannt und daher ist es nicht verwunderlich, dass die ersten Vorschläge zur industriellen Nutzung von Spinnenseide bereits aus dem 18. Jahrhundert stammen (Floericke 1919). Spinnenseide wurde allerdings schon im antiken Griechenland als Wundauflage verwendet. Auf einigen Südseeinseln wurden Spinnenfäden zur Herstellung von Fischkeschern benutzt. Der geringe Durchmesser von Spinnenseide machte das Material geeignet zur Anwendung als „Fadenkreuz“ in optischen Geräten, so zum Beispiel in Mikroskopen, Zielfernrohren und ähnlichem (Gertsch 1979). Bis zum Zweiten Weltkrieg fanden Spinnenfäden hierfür Verwendung.

1 Einleitung

Zahlreiche weitere Anwendungen sind möglich. Allerdings ist dazu die Herstellung von Spinnenseide in großen Mengen nötig. Sehr naheliegend ist die Verwendung von Spinnenseide als technische Faser in direkter Konkurrenz zu synthetischen Fasern, wie zum Beispiel aromatische Polyamide, bekannt unter den Markennamen Kevlar oder Nomex der Firma DuPont. Diesen synthetischen Fasern ist die native Spinnenseide sowohl an Bruchfestigkeit als auch an Dehnungsfähigkeit überlegen (Tab. 3 aus Tirrell 1996; Hinman et. al. 2000; Vollrath und Knight 2001). Die Zugfestigkeit bezeichnet die maximale Spannung, der ein Material vor dem Zerreißen widerstehen kann. Sie ergibt sich aus der Zugkraft im Moment des Zerreißens bezogen auf den ursprünglichen Durchmesser des Werkstücks. Tragfadenseide ist hinsichtlich der Zugfestigkeit der technischen Faser Kevlar zumindest ebenbürtig. Beim Vergleich der Bruchenergie, also der Energie, die eine definierte Materialmenge aufnehmen kann, bevor sie zerreißt, übertreffen sowohl Tragfadenseide als auch flagelliforme Seide die bekannten synthetischen Materialien um wenigstens 200%. Im Gegensatz zur Tragfadenseide, die ihre Stabilität, ähnlich Kevlar, aus der Zugfestigkeit bezieht, ist die flagelliforme Seide eher mit Gummi vergleichbar. Beide Materialien besitzen sowohl eine hohe Bruchenergie als auch eine Elastizität von mehreren hundert Prozent und können sich also auf ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Länge ausdehnen.

Tab. 3: Vergleich der Materialeigenschaften von Spinnenseide mit technischen Materialien (Tirrell 1996).

| Material | Zugfestigkeit [N m ⁻²] | Dehnung [%] | Bruchenergie [J kg ⁻¹] |
|---------------------|---------------------------------------|-------------|------------------------------------|
| Tragfadenseide | 4x10 ⁹ | 35 | 1x10 ⁵ |
| Flagelliforme Seide | 1x10 ⁹ | >200 | 1x10 ⁵ |
| Kevlar | 4x10 ⁹ | 5 | 3x10 ⁴ |
| Gummi | 1x10 ⁶ | 600 | 8x10 ⁴ |
| Tendon | 1x10 ⁹ | 5 | 5x10 ³ |
| Nylon (Typ 6) | 4x10 ⁷ | 200 | 6x10 ⁴ |

Betrachtet man diese Eigenschaften, ist es nur zu klar, warum eine großtechnische Produktion von Spinnenseiden ökonomisch interessant ist. Allerdings müssten zu diesem Zweck Spinnenseidenproteine in einem weitaus größeren Maßstab hergestellt werden, als es bisher

1 Einleitung

möglich war. Ebenso ist das Problem der Polymerisierung von einzelnen Proteinen zur fertigen Spinnenseide zu lösen, um die Verspinnung zu ermöglichen und damit eine technisch verwendbare Faser zu erhalten. Spinnenseidenproteine wurden bereits erfolgreich als Aufwuchsfläche für Chondrozytenzellkulturen (Knorpelzellen) verwendet (Scheller et. al. 2004). Dabei zeigte sich, dass Chondrozyten auf einer Matrix aus Spinnenseidenproteinen sowohl weniger dedifferenzieren als auch in geringerem Maße absterben als auf Kulturmedien ohne Serum oder ohne weitere Hilfsstoffe. Weiterhin wurde native Tragfadenseide der Gattung *Nephila* als Stützstruktur für Schwannsche Zellen beim Aufbau künstlicher Nervenfasern eingesetzt (Allmeling et. al. 2006). Bei diesen Experimenten konnten erfolgreich einfache Nervenverbindungen hergestellt werden. Ein gänzlich anderer Ansatz basiert auf der veränderlichen Kontraktion von Spinnenseide. Dabei wurden Spinnenseidenfasern verwendet, um Blutgefäße gezielt zu verengen und so verschiedene ischämische Krankheiten im Mausmodell simulieren zu können (Zhou et. al. 2006). Für die meisten hier aufgeführten medizinischen Applikationen von Spinnenseide müssten die Spinnenseidenkonstrukte direkt in den Organismus des Patienten eingebracht werden. Aufgrund der geringen immunogenen Wirkung von Spinnenseide (Vollrath et. al. 2002) ist dies nicht nur problemlos möglich, sondern es ergibt sich eine weitere grundlegende Anwendung, nämlich als Beschichtung für Implantate, die unbeschichtet zu starken Abstoßungsreaktionen führen würden.

Im Bereich der Nanotechnologie wurden Spinnenfasern als Stützstrukturen für Nanopartikel aus Gold eingesetzt (Singh et. al. 2007). Dabei machte man ebenfalls die polaritätsabhängige Längenänderung von Spinnenseide nutzbar, die, wie bereits erwähnt, für die Verengung von Blutgefäßen eingesetzt werden kann. Durch die Abstandsänderung der auf die Spinnenseide aufgetragenen Goldschicht wird die Leitfähigkeit der Nanopartikel verändert. Somit können Konzentrationsänderungen verschiedener Lösungsmittel, wie zum Beispiel Chloroform oder Methanol, in der Nähe der beschichteten Spinnenseide gemessen werden. Die hohe Stabilität der Spinnenfäden ist auch bei dieser Anwendung entscheidend, um trotz des notwendigen geringen Durchmessers der wiederholten mechanischen Beanspruchung während der Längenänderungen widerstehen zu können.

Im Gegensatz zur Seide des Seidenspinners (*Bombyx mory*) kann Spinnenseide nicht in größeren Mengen von der Spinne direkt gewonnen werden, da Spinnen ein starkes Territorialverhalten besitzen und bei der Jagd auch vor Artgenossen nicht halt machen. Daher ist die Haltung von Spinnen in größerer Stückzahl auf engem Raum kaum möglich, bzw.

1 Einleitung

extrem kostenintensiv. Ein weiteres Problem ist die notwendige Versorgung der Spinnen mit Lebendfutter. Ebenso unpraktikabel für eine großtechnische Verwertung stellt sich die Gewinnung einzelner Seidenarten dar. Da die verschiedenen Spinnenseidenarten im fertigen Spinnennetz bereits miteinander kombiniert sind, ist die Gewinnung einer einzelnen Seidenart kaum ohne Kontaminationen oder große Mengenverluste möglich. Die einzige bisherige Alternative stellt das „Melken“ der Spinne („forced silking“) dar, wie es auch zur Gewinnung von kleinsten Probenmengen zu Analysezwecken bis heute üblich ist. Bei dieser Methode werden allerdings die mechanischen Eigenschaften verändert, sodass die Qualität von nativer Spinnenseide nicht erreicht wird (Vollrath et. al. 2001).

Erste Versuche zur technischen Gewinnung von Spinnenfäden unternahm der Missionar Paul Camboué (1849-1929). Er spannte weibliche Spinnen der Gattung *Nephila* in hohle Korkstücke, wobei der Hinterleib hervorragte. Um nun die Spinne zum Absondern von Seidenfäden zu veranlassen, hielt er der Spinne eine Fliege vor. Die so abgesonderten Fäden wickelte er auf einer Haspel auf (Abb. 4).

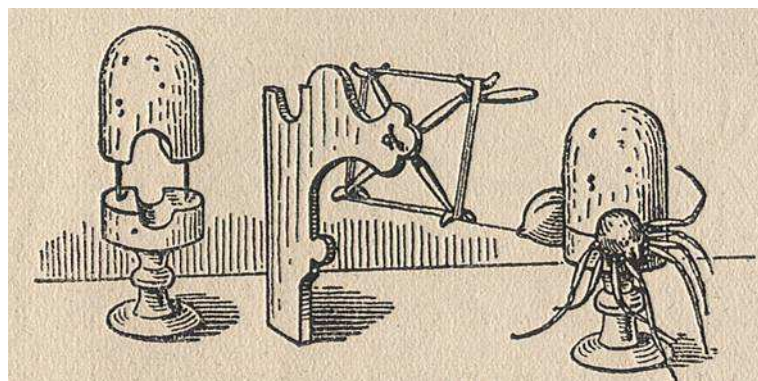


Abb. 4: Halterung zur Gewinnung von Spinnenseide (Floericke 1919).

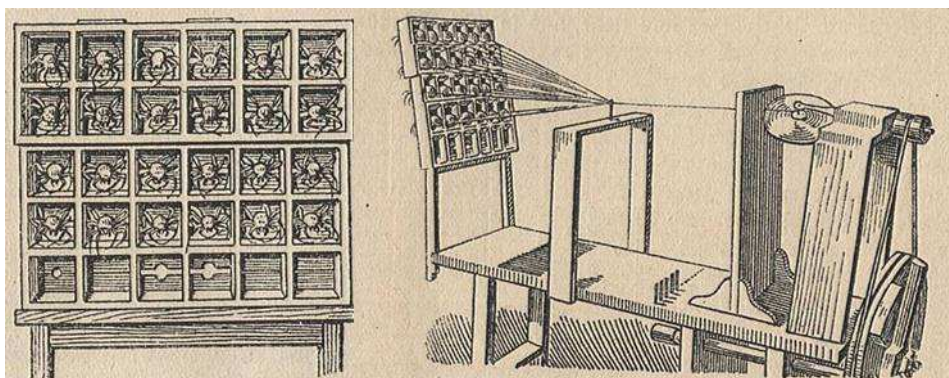


Abb. 5: Erweiterte Halterung mit verbesserter Haspel (Floericke 1919).

1 Einleitung

Das Prinzip dieser primitiven Vorrichtung wurde auch beim Nachfolgemodell verwendet (Abb. 5). Allerdings konnte das Problem der Lebendfütterung der Spinnen nicht wirtschaftlich gelöst werden und so wurde eine weitere industrielle Verwendung von Spinnenseide für unmöglich gehalten (Floericke 1919). Aus diesen Gründen ist die biotechnologische Herstellung von Spinnenseide die einzige Möglichkeit, diesen wertvollen Rohstoff in technisch relevanten Mengen herzustellen. Erste Ansätze zur biotechnologischen Herstellung von Spinnenseide beinhalteten Versuche zur Produktion von Spinnenseidenproteinen in Bakterienkulturen (Prince et. al. 1995), Hefekulturen (Fahnestock und Bedzyk 1997), Insektenzellkulturen (Miao et. al. 2006) und Säugetieren (Lazaris et. al. 2002).

Bei der Herstellung in *E. coli* ist sowohl die Gesamtgröße der exprimierten Spidroine als auch die Produkthomogenität durch Terminierungsfehler während der Proteinbiosynthese stark limitiert (Fahnestock et. al. 2000). Dieser Nachteil tritt bei der Produktion in Hefezellen (*Pichia pastoris*) nicht auf (Fahnestock und Bedzyk 1997), allerdings ist dieses System, ebenso wie die erwähnten tierische Zellkulturen sehr kostenintensiv und nur mit hohem Aufwand an veränderte Produktionsmengen anzupassen (Ma et. al. 2005).

1.2 Pflanzen als Produktionsplattform für transgene Proteine

Im Gegensatz zu den oben angeführten Limitierungen ist die Vergrößerung der Anbaufläche von Pflanzen relativ problemlos, was einen enormen Vorteil in Bezug auf Kosten und Planungsflexibilität bedeutet (Raskin et. al. 2002). Andere Vorteile der Proteinproduktion in Pflanzen sind die allgemein niedrigeren Produktionskosten im Vergleich zu transgenen Tieren, Bioreaktoren und Fermentern und die gut etablierten Infrastrukturen für Produktion und Ernte von Kulturpflanzen. Die meist korrekte Faltung und nur leicht abweichende Glykosylierung von eukaryotischen Proteinen in Pflanzen (Lerouge et. al. 2000) und die Möglichkeit zur Einlagerung von exprimierten Proteinen in Lagerkompartimente, die die Stabilität der Proteine gewährleisten sind weitere Vorteile (Horn et. al. 2004). Ebenso ist die Herstellung von pharmazeutischen Proteinen in Pflanzen nicht mit dem Risiko einer Kontamination durch humane oder tierische Viren oder andere Krankheitserreger behaftet, wie es im Falle von entsprechenden Zellkulturen oder transgenen Tieren der Fall wäre (Commandeur et. al. 2003). Es wurden bereits zahlreiche pharmazeutische Proteine in Pflanzen hergestellt, so zum Beispiel Impfstoffe zur Anwendung bei Hepatitis B (Richter et.

1 Einleitung

al. 2000), Diarrhöe (Tacket et. al. 1998) und Tollwut (Yusibov et. al. 2002), Antikörper gegen Karies (Ma et. al. 1998) und gegen bösartige Lymphknotengeschwüre (McCormick et. al. 1999). Darüber hinaus wurden zahlreiche weitere Anwendungen aus dem Bereich der Medizin (Übersicht u. a. bei Ma et. al. 2005 und Twyman et. al. 2003) und der Tiermedizin publiziert (Übersicht bei Floss et. al. 2007). Ein solches weiteres Beispiel ist die Herstellung von Einzelkettenantikörperfragmenten (scFv) in Tabakpflanzen (Owen et. al. 1992). Insbesondere die Expression von scFv's in Tabaksamen (Fiedler und Conrad 1995) ist aufgrund der Lagerstabilität bei Raumtemperatur ein vielversprechender Ansatz. So könnten Pflanzen zu einer zuverlässigen und schnell einsetzbaren Quelle für monoklonale Antikörper werden. Die Produktion in transgenen Säugetieren, wie zum Beispiel in der Milch von Kühen oder Ziegen, setzt neben den bereits erwähnten höheren Kosten langfristige Wartezeiten von fünf bis zehn Jahren von der Klonierung des Gens bis zur erstmaligen Proteinexpression voraus (Fischer und Emans 2000). Seit der ersten stabilen Transformation einer höheren Pflanze (Fraley et. al. 1983), namentlich *Nicotiana tabacum*, sind zahlreiche transgene Proteine in Pflanzen exprimiert worden. Die ersten dieser Proteine, die explizit aus kommerziellen Gründen in Pflanzen hergestellt wurden, waren Avidin (Hood et. al. 1997), β -Glucuronidase (Witcher et. al. 1998) und Trypsin (Woodard et. al. 2003) in Mais. 100 kg Samen aus transformierten Maispflanzen enthielten 20 g Avidin, eine Menge, die in etwa 900 kg Hühnereier enthalten ist. Erste Kostenabschätzungen ergaben einen Kostenrückgang um den Faktor zehn bei der Herstellung des unbehandelten Rohmaterials. Für eine endgültige Kostenberechnung muss die Isolierung des Avidins aus den Maiskörnern im großtechnischen Maßstab möglichst kostengünstig und verlustarm realisierbar sein, ein Punkt, der bei nahezu jeder Produktion von Proteinen in Pflanzen zu bedenken ist. Lediglich bei der Herstellung von Impfstoffen in essbaren Pflanzen kann die Reinigung und die damit verbundenen Kosten vermieden werden, sofern die Impfstoffe bei der Aufnahme mit der Nahrung eine ausreichende Immunantwort bewirken (Daniell et. al. 2001; Boehm 2007).

Die Expression von Poly3-hydroxybutyrat (PHB) in transgenen Pflanzen zielt auf die Herstellung von technischen Polymeren ab (Poirier et. al. 1992). Allerdings muss die Produktivität der pflanzlichen Expression stark erhöht werden, da die Kosten für ölbasierte Kunststoffe immer noch deutlich unter denen von Bioplastik liegen. Der Weltmarktpreis für konventionelle Kunststoffe liegt bei unter einem Euro pro Kilogramm. Nach ungefähren Schätzungen wäre es notwendig, den Anteil des jeweiligen Biopolymers auf 15% der geernteten Trockenmasse zu erhöhen, um mit diesem Herstellungspreis konkurrieren zu

1 Einleitung

können (Scheller und Conrad 2005). Bei der Herstellung von PHB in Zuckerrohrhybriden (*Saccharum* spp.) konnte ein maximaler PHB-Anteil von etwa 2% der Trockenmasse erreicht werden (Petrasovits et. al. 2007). Bei der Expression in Rapssamen (*Brassica napus*) wurde hingegen eine Konzentration von bis zu 8% erreicht (Houmiel et. al. 1999). Bereits Konzentrationen in dieser Größenordnung führen oft zu Wachstumshemmungen und Fehlbildungen der Pflanzen (Bohmert et. al. 2000), was zu einer geringen Erntemenge und damit zu einer niedrigen absoluten Ausbeute an PHB führt. Induzierbare Systeme stellen eine Möglichkeit dar, diese Schwierigkeit zu umgehen. Durch Induktion mit einem nicht-steroidartigen Ecdyson-Analogon (Retnakaran et. al. 2003) konnten in *Arabidopsis thaliana* Mengen von bis zu 14,3% des Trockengewichts erreicht werden (Kourtz et. al. 2006), allerdings nur in jungen Pflanzen, was wiederum eine geringe absolute Menge bedeutet. In älteren Blättern wurde lediglich ein Trockengewichtanteil von 7% erzielt.

Die Suche nach Möglichkeiten, die Ausbeute in pflanzlichen Expressionssystemen zu steigern wird ständig fortgesetzt. Die Stabilisierung gegen Proteolyse kann durch die Expression des Proteins mit einem geeigneten Fusionspartner erreicht werden (Jacquet et. al. 1999; Miyano et. al. 2003). Eine Gruppe solcher stabilisierender Fusionspartner sind Elastin ähnliche Polypeptide (ELP).

1.3 Elastin ähnliche Polypeptide (Elastin-like-polypeptides)

ELPs sind Polypeptide mit einer stark repetitiven Struktur, die auf Säugetier-Elastin basieren (Urry 1988). ELP-Fusionsproteine, die verschiedene Spinnenseidenproteine oder Interleukine als Fusionspartner enthielten, wurden im pflanzlichen Expressionssystem durch ELP stabilisiert, wodurch die effektive Ausbeute der Fusionsproteine erhöht werden konnte (Scheller et. al. 2004; Patel et. al. 2007). Die Fusion von ELP mit scFvs erhöhte die Ausbeute sogar um das 40-fache, so dass ein Mengenanteil von 25% TSP erreicht werden konnte (Scheller et. al. 2006). Neben der Stabilisierung des Fusionsproteins sind ELPs auch für die Reinigung aus Pflanzenmaterial interessant.

Die Reinigung von Spinnenseidenproteinen aus pflanzlichem Material muss insbesondere mit Blick auf die Herstellung wirtschaftlich lohnenswerter Proteinmengen betrachtet werden.

Die im Laborbetrieb üblichen Säulenreinigungsverfahren sind für eine Maßstabsvergrößerung aus ersichtlichen Kostengründen nicht geeignet und selbst für eine Reinigung im Labormaßstab ergeben sich Probleme, da zahlreiche Spinnenseidenproteine nur schwer vom

1 Einleitung

Säulenmaterial eluierbar sind. Ein Alternativverfahren, das erfolgreich bei der Reinigung von Spinnenseidenproteinen aus Tabakblättern eingesetzt wurde, nutzt die temperaturabhängige Löslichkeit von ELPs. Unterhalb einer bestimmten Temperatur (Transitionstemperatur) ist ELP stark hydrophil. Wird die ELP-Lösung jedoch über diese Temperatur hinaus erhitzt, fällt ELP aus. Diese Fällung wird durch Zugabe von NaCl unterstützt und ist nahezu vollständig reversibel, was Reinigungsmethoden auf ELP-Basis ermöglicht. Bereits seit mehreren Jahren wird diese Methode des Inverse Transition Cycling (ITC) zur Reinigung von ELP-Fusionsproteinen eingesetzt. Eine ELP-Einheit ist ein Pentapeptid mit der Aminosäuresequenz Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (Xaa kann jede Aminosäure außer Prolin sein). Die freie Aminosäure wird je nach gewünschter Anwendung gewählt, ebenso die Anzahl an ELP-Einheiten im vollständigen ELP-Gen. Neben diesen Faktoren beeinflusst auch das mit ELP fusionierte Protein die Transitionstemperatur und damit das Reinigungsverfahren (Trabbic-Carlson et. al. 2004). Um die Ausfällung zu verstärken und auf diese Weise die Ausbeute zu erhöhen, kann nicht fusioniertes ELP im Überschuss zugegeben werden und so als Interaktionspartner für gering exprimierte ELP-Fusionsproteine dienen (Christensen et. al. 2007). Proteine mit His-Tag wurden erfolgreich an ELP mit metallbindenden Liganden assoziiert (Stiborova et. al. 2003). Ebenso wurden mit ELP-Varianten Quecksilber, Arsen und Cadmium aus wässrigen Lösungen entfernt (Kostal et. al. 2003; Kostal et. al. 2004; Kostal et. al. 2005), spezifische Antigene gereinigt (Kim et. al. 2005) und lektinbindende Polymere erzeugt (Sun et. al. 2005).

Neben der Reinigungsfunktion sind auch medizinische Anwendungen für ELP und ELP-Fusionsproteine denkbar. ELP-Varianten wurde beispielsweise mittels rekombinanter Gewebetransglutaminase zu einem Hydrogel vernetzt, um Knorpelgewebe zu ersetzen (McHale et. al. 2005). Dazu wurden Chondrozyten mit zwei ELP-Varianten gemischt, die an der Position der vierten Aminosäure in jedem siebten Pentapeptid die Aminosäuren Lysin bzw. Glutamin enthielten, um an diesen Stellen die Vernetzung mit Transglutaminase zu ermöglichen. Auf diese Weise wurden die Zellen innerhalb des sich bildenden ELP-Hydrogels eingeschlossen, was eine Verbesserung der mechanischen Belastbarkeit der Gewebematrix zur Folge hatte.

Ein interessanter Ansatz ist die Fusion von ELP mit pharmazeutischen Wirkstoffen. Durch die präzise Kontrolle der Löslichkeit wäre es möglich, einen Wirkstoff in bestimmten Geweben mittels einer lokal induzierten Hyperthermie auszufällen und so in diesem Gewebe den Wirkstoff anzureichern (Meyer et. al. 2001a; Meyer et. al. 2001b). Dieses Verfahren wird

1 Einleitung

auch für die Krebstherapie getestet. So soll der Wirkstoff Doxorubicin gezielt in Tumore geschleust und dort angereichert werden, da eine systemische Erhöhung des Wirkstoffs zu starken Nebenwirkungen führt (Bidwell et. al. 2007b). Durch die Fusion mit ELP konnten sogar Krebszellen, die gegen den verwendeten Wirkstoff resistent waren, erfolgreich abgetötet werden. Dabei blockierte ELP offenbar den Transport des Wirkstoffs aus den resistenten Krebszellen (Bidwell et. al. 2007a).

Aufgrund der exakt kontrollierbaren Löslichkeit ermöglichen ELP-Varianten ebenfalls die Entwicklung von Biosensoren. Über eine Änderung der Temperatur oder des Salzgehaltes kann ELP gezielt mittels hydrophober Wechselwirkungen an Oberflächen gebunden und ebenso wieder gelöst werden. Somit können diese beiden Parameter im umgebenden Medium anhand eines mit ELP fusionierten Markers bestimmt werden (Frey et. al. 2003a; Frey et. al. 2003b).

1.4 Proteinmodifikation

Neben den Strukturelementen der Spinnenseiden-Fusionsproteine ist auch die Gesamtgröße der Proteine von enormer Bedeutung, namentlich für die Ausrichtung während des Spinnvorganges (Kojic et. al. 2006). Daher ist es wünschenswert, die Größe der nativen Spinnenseidenproteine zu erreichen. Die im Rahmen dieser Arbeit in Pflanzen hergestellten Spinnenseiden-Fusionsproteine erreichen bereits eine Größe von über einhundert kDa. Eine weitere Vergrößerung auf genetischer Basis, also die Klonierung eines größeren nativen Spinnenseidenproteins ist mit enormen Stabilitätsproblemen verbunden (Hinman et. al. 1992). Insbesondere während der Klonierung in *E. coli* ist die Instabilität von transgenen Sequenzen durch Rekombination gut dokumentiert (Nakamura 1974; Pierce und Gutteridge 1985; Bzymek und Lovett 2001). Ähnliche Prozesse in *Agrobacterium tumefaciens* wurden zwar bisher nicht publiziert, doch ist anzunehmen, dass hochrepetitive Sequenzen in dieser Größenordnung auch in diesem bakteriellen System instabil werden können. Eine Möglichkeit zur Überwindung dieser Größenbegrenzung ist die posttranslationale Modifikation bzw. Polymerisierung der Proteine.

Ein geeignetes Werkzeug für die posttranslationale Modifikation der Spinnenseiden-Fusionsproteine, insbesondere für die Polymerisierung, ist Transglutaminase (Protein-Glutamin- γ -Glutamyltransferase). Transglutaminase bildet Isopeptidbindungen zwischen der ϵ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin und der γ -Glutamylgruppe der Aminosäure Glutamin

1 Einleitung

(Pisano et. al. 1968). Diese kovalenten Bindungen können durch Proteasen nicht gespalten werden, sind biochemisch also sehr stabil, was für die Verknüpfung von Strukturproteinen notwendig ist, um die Gesamtstabilität nicht zu beeinträchtigen. Transglutaminasen sind weit verbreitet. So wurden sie bereits unter anderem in Säugetieren (Sarkar et. al. 1957), Bakterien (Kanaji et. al. 1993), Pflanzen (Serafini-Fracassini et. al. 2002) und in Amphibien (Zhang und Masui 1997) gefunden. Calciumabhängige Transglutaminasen, die auch im menschlichen Organismus nachgewiesen wurden, erfüllen Funktionen bei der Blutgerinnung, dem Knochenwachstum und der Ausbildung von Zellstrukturen (Lorand und Graham 2003). Obwohl bereits diese Enzyme für die Verknüpfung von Proteinen geeignet sind, konnte erst an eine industrielle Verwertung gedacht werden, als eine calciumunabhängige bakterielle Transglutaminase in *Streptoverticillium mobaraense* entdeckt wurde (Ando et. al. 1989). Diese bakterielle Transglutaminase wird in das Kulturmedium der Bakteriensuspension sekretiert, wodurch eine kostengünstige Massenproduktion möglich wurde. Das primäre Anwendungsgebiet der Transglutaminase ist die Lebensmittelindustrie. Mittels Transglutaminase werden strukturabhängige Eigenschaften von Nahrungsmitteln verbessert, wie zum Beispiel die Bindung von Wasser, Viskosität, Elastizität oder Textur. Darüber hinaus kann mittels Transglutaminase die Ausbeute an verwertbaren Fleischprodukten erhöht werden, indem ansonsten unbrauchbare Fleischreste in Aussehen und Textur verbessert werden und so anschließend für den Konsum geeignet sind (Muguruma et. al. 1990.) Aber auch die Verbesserung der Backeigenschaften von Weizenmehl (Tseng und Lai 2002) oder die erhöhte Haltbarkeit von Obst und Gemüse (Takagaki et. al. 1991) wird durch die Behandlung mit bakterieller Transglutaminase erreicht. Eine extrem interessante Anwendung, insbesondere im Hinblick auf die Nutzung von Spinnenseidenproteinen, ist die Bearbeitung von Wollfasern mittels bakterieller Transglutaminase (Cortez et. al. 2004). Dabei wurden Wollfasern entweder untereinander mit Transglutaminase verknüpft oder mit Seidenproteinen der Seidenraupe *Bombyx mori* verbunden (Cortez et. al. 2005; Cortez et. al. 2007). Dadurch konnte in beiden Fällen die Farbechtheit, die mechanische Belastbarkeit und Widerstandsfähigkeit der Wollfasern gegen Abnutzung bei chemischer und enzymatischer Behandlung (z.B. durch Reinigungsmittel) verbessert werden. Alle aufgeführten Beispiele verdeutlichen eine weitere Eigenschaft der bakteriellen Transglutaminase, nämlich eine geringe Substratspezifität (DeJong und Koppelman 2002), was zahlreiche weitere Anwendungen ermöglicht.

1 Einleitung

1.5 Zielsetzung

Eine Herausforderung auf dem Weg zur technischen Produktion von Spinnenseidenproteinen in Pflanzen ist deren kostengünstige Produktion in großen Mengen. Bereits im Labormaßstab werden mehrere Gramm gereinigtes Spinnenseidenprotein benötigt, um eine möglichst vollständige mechanische Testung zu ermöglichen. Die erfolgreiche Expression von Spinnenseidenproteinen in Tabakblättern und das etablierte Reinigungsverfahren bieten eine gute Ausgangsbasis für die Herstellung und mechanische Testung weiterer Spinnenseidenproteine. Allerdings stellt sich das Problem der langfristigen Lagerung der Tabakblätter, was im Labormaßstab ein organisatorisches Problem ist und bei größeren Produktionsmengen den nötigen Aufwand für die Nutzung des Expressionssystems Tabakblatt über ein tolerierbares Maß hinaus steigert.

Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Spinnenseidenkonstrukte in Samen von *Nicotiana tabacum* exprimiert und das Samensystem mit der Expression im Blatt verglichen, insbesondere die produzierbaren Mengen sowie die Anwendbarkeit und möglicherweise notwendige Adaption des ELP-basierten Reinigungsverfahrens. Im Hinblick auf das erwähnte Lagerungsproblem wird die Langzeitstabilität der Proteine im Samen bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von einem Jahr untersucht, um die Samenexpression als unkompliziertes Produktionssystem für den Laborbedarf zu etablieren. Darüber hinaus könnten diese Versuche Aufschluss über die Lagerungsstabilität von Spinnenseidenproteinen in anderen pflanzlichen Systemen geben, die für eine kommerzielle Herstellung von Spinnenseidenproteinen in Pflanzen zukünftig verwendet werden können.

Die Reinigung des transgenen Proteins wird, wie bereits erwähnt, mittels der etablierten Inverse Transition Cycling-Methode durchgeführt. Die kritischen Parameter dieser Reinigungsmethode sind die Transitionstemperatur und die Salzkonzentration während der Fällung. Diese Parameter müssen gegebenenfalls für das neue Expressionssystem Tabaksamen optimiert werden. Dabei sind selbstverständlich eine möglichst niedrige Transitionstemperatur und eine ebenfalls möglichst niedrige Salzkonzentration wünschenswert, da dies erstens eine Reduzierung der Reinigungskosten bedeuten würde und zweitens die Reinigung im größeren Maßstab stark vereinfachen würde. So ist die Entfernung des Salzes nach der Fällung mittels Dialyse ein kritischer Schritt der Reinigung, der mit hohen Ausbeuteverlusten einhergeht. Eine geringe Salzkonzentration könnte die Dauer der abschließenden Dialyse reduzieren und so die Proteinausbeute erhöhen.

1 Einleitung

Die im Rahmen dieses Projektes verwendeten repetitiven Spinnenseidenkonstrukte liegen in einem Größenbereich oberhalb von einhundert kDa. In stabil transformierten Pflanzen konnten derartige Proteine ohne nennenswerten Abbau exprimiert werden (Scheller et. al. 2001; Scheller et. al. 2004). Allerdings ist es für die Materialeigenschaften oder für eine etwaige spätere Fasergewinnung der Spinnenseidenproteine wünschenswert, die Größe der Fusionsproteine weiter zu erhöhen. Dazu werden verschiedene Spinnenseidenkonstrukte mit Dimerisierungsmarkern versehen und in Tabak exprimiert. Anschließend soll die posttranslationale Dimerisierung mittels bakterieller Transglutaminase durchgeführt werden. Neben der reinen Vergrößerung der Produkte soll ebenfalls die *in-vitro* Verknüpfung von Spinnenseidenproteinen mit ELP-Blocks untersucht werden, um so das Protein nachträglich mit einer Reinigungskomponente versehen zu können. Zusätzlich muss überprüft werden, ob die Verknüpfung der Glutamin- und Lysinmarkern spezifisch eine Heterodimerisierung darstellt, oder ob ebenfalls unspezifische Verknüpfungen zwischen den Spinnenseiden-Fusionsproteinen auftreten. Dies wäre zwar interessant für neue Materialeigenschaften, könnte aber auch ein Problem für die Reinigung mittels Inverse Transition Cycling bedeuten, da heterogene Produkte möglicherweise unterschiedliche Transitionstemperaturen aufweisen.

Zusammenfassend betrachtet soll im Rahmen dieser Arbeit die Produktion von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Tabaksamen und damit eine mögliche Alternative für die Produktion in Blättern etabliert werden. Darüber hinaus soll anhand dieses Modellsystems das Potential von Samen zur Herstellung und Lagerung von Spinneseiden-Fusionsproteinen bewertet werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit zielt auf die posttranslationale Verknüpfung von Proteinen zur Steigerung der Maximalgröße ab.

2 Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Escherichia coli:

XL1Blue (Stratagene) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)] (Bullock et. al. 1987)

Agrobacterium tumefaciens:

pGV 2260 in C58C1 (Deblaere et. al. 1985)

2.1.2 Vektoren

pRTRA 7/3 Amp^r (Artsaenko et. al. 1995)

pCB301 (Xiang et. al. 1999) mit Kan^r (Scheller et. al. 2004)

2.1.3 Pflanzenmaterial

Die im Rahmen dieses Projektes verwendeten Spinnenseidenkonstrukte wurden in Blättern von *Nicotiana tabacum* (Varietät Samsun NN) und *Nicotiana benthamiana*, sowie in Samen von *Nicotiana tabacum* (Varietät Samsun NN) exprimiert. Blattmaterial wurde bis zur Reinigung bei -80°C, Samen sowohl bei -80°C, als auch bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.1.4 Oligonukleotide, Primer

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide bzw. Primer

| Name | Sequenz (5' > 3') | Hersteller | Funktion |
|---------------|---|---------------------------|---|
| MaSp1- for | gacggtaccgaaattgtttcagctttggta | Metabion (Martinsried) | Nachweis von MaSp1 mittels PCR |
| MaSp1- rev | gacagtacttgagaatgcttggtttatag | Metabion (Martinsried) | Nachweis von MaSp1 mittels PCR |
| LeB4- for | actcatgtggagtggcaggt | Metabion (Martinsried) | Nachweis des LeB4- Promotors mittels PCR |
| LeB4- rev | cacgtgtgacagaacgtgtg | Metabion (Martinsried) | Nachweis des LeB4- Promotors mittels PCR |
| USP- for | gcaggtcgacctgcagca | Metabion (Martinsried) | Nachweis des USP- Promotors mittels PCR |
| USP- rev | gtcgagatctgctggctatga | Metabion (Martinsried) | Nachweis des USP- Promotors mittels PCR |
| Gln- for | gatccggctctggaatggctgaaacggccgc agcggctttcгааagacagcatatggattctg | Biomers.net (Ulm) | Linker mit Glutamin-Tag |
| Gln- rev | gatccagaatccatatgctgtctttcgaaagcc gctgcggccgtttcagccattccagagccg | Biomers.net (Ulm) | Linker mit Glutamin-Tag |
| Lys- for | gatccggctctggaatgaaggaaacggccgc agcgagattcгаааааacccatatggattctg | Biomers.net (Ulm) | Linker mit Lysin-Tag |
| Lys- rev | gatccagaatccatatggtttctttcgaatctcg ctgcggccgtttccttcattccagagccg | Biomers.net (Ulm) | Linker mit Lysin-Tag |

2.1.5 Medien

2.1.5.1 Pflanzenmedien

MS-Medium: 4,3g/l Murashige und Skoog-Medium mit 0,5g/l MES,

1% Saccharose, pH mit 1N KOH auf 6,0 einstellen

MS-Agar: Zugabe von 0,8% (w/v) Agar

2 Material und Methoden

MG-Medium: MS-Medium, 16g/l Glukose, 1mg/l BAP, 0,2mg/l NES,
500mg/l Cefotaxime, 50mg/l Kanamycin

MG-Agar: Zugabe von 0,9% Agar

2.1.5.2 Bakterienmedien

LB-Medium: 10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 0,17M NaCl, 0,1%(v/v) 1N NaOH

YEB-Medium: 1g/l Hefeextrakt, 5g/l Fleischextrakt, 5g/l Trypton, 15mM Saccharose,
2mM MgSO₄, pH7,0

SOB-Medium : 20g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 8,5mM NaCl, 2,5mM KCl
mit 5M NaOH auf pH7,0 einstellen

SOC-Medium: SOB-Medium, 100mM MgCl (steril), 50mM Glukose (sterilfiltriert)

2.1.6 Puffer

4xMarvelpuffer: 80mM TRIS (pH7,8), 720mM NaCl

Marvelmilch: 5% (w/v) Milchpulver in 1xMarvelpuffer

5xTBE: 0,44M TRIS HCl, 12mM EDTA, 0,44M Borsäure, pH8,0

Infiltrationspuffer: 10mM MES-NaOH (pH5,5), 10mM MgSO₄

10xPBS: 0,02M KH₂PO₄, 0,08M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,5M NaCl, pH7,6

Samenextraktionspuffer : 50mM TRIS (pH8,0), 200mM NaCl, 5mM EDTA (pH8,0), 0,1%
(v/v) Tween 20

SDS-Elektrophoresepuffer: 0,025M TRIS, 0,25M Glycin, pH8,3, 3,5mM SDS

SDS-Probenpuffer: 36mM TRIS-HCl (pH6,8), 35mM SDS, 1,45mM Bromphenolblau,
0,68M Glycerin, 0,36M β-Mercaptoethanol

SDS-Sammelgelpuffer: 28mM SDS, 1M TRIS-HCl (pH6,8)

SDS-Trenngelpuffer: 28mM SDS, 2,7M TRIS-HCl (pH8,8)

Coomassie-Färbelösung (Variation nach Maldener 2004): 3,1M Isopropanol, 1,75M
Essigsäure, 0,6mM Coomassie-R250

TE-Puffer: 10mM TRIS-HCl (pH8,0), 1mM EDTA

Transferpuffer: 1000ml Methanol, 4000ml SDS-Elektrophoresepuffer

2.1.7 Enzyme

Ajinomoto Foods Deutschland GmbH (Hamburg): Activa WM Transglutaminase

Boehringer (Mannheim): Restriktionsendonukleasen

Fermentas (Burlington, Kanada): Restriktionsendonukleasen, Shrimp alkalische Phosphatase

Gibco-BRL (Gaithersburg, USA): Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Shrimp Alkalische Phosphatase

Invitrogen (Paisley, UK): Agarose, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase

N-Zyme BioTec GmbH (Darmstadt): rekombinante bakterielle Transglutaminase

2.1.8 Antibiotika

Die hier aufgeführten Antibiotika wurden als Selektionsmarker für Bakterienkolonien bzw. für transgene Pflanzen verwendet.

Tab. 5: Verwendete Antibiotika

| Antibiotikum | Stammlösung [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] | Endkonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$] | Hersteller |
|---------------|--|---|-------------------------------|
| Kanamycin | 50 | 50 | Duchefa (Haalem, Niederlande) |
| Carbenicillin | 100 | 500 | Duchefa (Haalem, Niederlande) |
| Ampicillin | 10 | 100 | Duchefa (Haalem, Niederlande) |
| Rifampicin | 50 | 50 | Duchefa (Haalem, Niederlande) |
| Tetracyclin | 5 | 12,5 | Duchefa (Haalem, Niederlande) |

2.1.9 Antikörper

GE Healthcare/Amersham (Braunschweig): Anti-Maus-IgG-POD (mit Meerrettichperoxidase konjugierter Sekundärantikörper aus Kaninchen, gegen Maus-IgG gerichtet)

2.1.10 Pflanzenhormone

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): 6-Benzylaminopurin (BAP), Naphtylessigsäure (NES)

2 Material und Methoden

2.1.11 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Amersham Life Science (Braunschweig): ECL Western blotting analysis system

Appligene (Heidelberg): Ampicillin

BioRad (Richmond, USA): BIO-RAD-Protein Assay (Bradford Reagenz)

Difco Laboratories (Detroit, USA): Hefeextrakt, Bacto®-Agar, Bacto®- Trypton, Bacto®-Pepton

Duchefa (Amsterdam, Niederlande): Murashige-Skoog Vollmedium

Eurogentec (Seraing, Belgien): DNA-SmartLadder (DNA-Längenstandard)

Gibco-BRL (Gaithersburg, USA): Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Merck (Darmstadt): Natriumhydroxid, Natriumchlorid, Magnesiumsulfat, Magnesiumchlorid, Polyethylenglykol (PEG), Cystaminiumdichlorid, Glutathion (reduziert), Eisen(III)chlorid-Hexahydrat, Hydroxylammoniumchlorid

N-Zyme BioTec GmbH (Darmstadt): Carbobenzoxym-L-Glutaminylglycin

Qiagen (Hilden): QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiaquick Gel Extraction Kit

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim): Complete Protease Inhibitor

Roth (Karlsruhe): Acetosyringon, Chloroform, Ethidiumbromid, Ethanol, Essigsäure, Fleischextrakt, Formaldehydlösung (37%), Glycin, Glycerin, Isopropanol, Kaliumcarbonat, Phenol/Chloroform, Methanol, Natriumacetat, Salzsäure, Natriumthiosulfat, Roti-Hybrid-Quick (Hybridisierungslösung), Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1), Silbernitrat

Serva (Heidelberg): Tween-20, Natriumdodecylsulfat (SDS), , Bovines Serumalbumin (BSA), 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Quarzsand, Dinatriumhydrogenphosphat, β -Mercaptoethanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat

Sigma (St. Louis, USA): Dimethylsulfoxid, Kaliumnitrat, Triton X-100, DEPC, Saccharose, Bromphenolblau

2.1.12 Software

DNASTAR Inc. (Madison, USA): Computerprogramm Lasergene, Version 6.00

2.1.13 Laborgeräte

Applied Biosystems (Foster City, USA): PE Geneamp 9700 PCR-System

Beckman Coulter (Fullerton, USA): GS-15R Zentrifuge, Allegra X-15R Zentrifuge

BioRad (München): Gene Pulser (Elektroporationsgerät), Mini-PROTEAN 3 und Tetra Proteinelektrophorese- System, Mini Trans-blot Cell

DuPont (Wilmington, USA): Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge

Eppendorf (Hamburg): Concentrator 5301, Kühlzentrifuge 5402, Thermomixer 5436, Tischzentrifuge 5415 C, Tischzentrifuge 5415 D, Präzisionspipetten

Gilson (Abimed Langenfeld): Präzisionspipetten

Heraeus Instruments (Hanau): Sepatech Suprafuge 22

Keutz (Reiskirchen) : Consort E835 Electrophoresis Power Supply

Hycy Vakuumtechnik (Krailling): Vakuumpumpe

IKA-Werke (Staufen): Magnetthermorührer IKAMAG RCT basic, Rührwerk Eurostar Digital

Infors-AG (Bottmingen, CH): Schüttelinkubatoren für die Bakterienkultivierung

Intas (Göttingen): Gel Jet Imager

Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern): Elektronische Analysenwaage

Liebherr (Ochsenhausen): Kühlschränke, Tiefkühlschränke

Milton Roy (USA): UV/VIS Spektralphotometer Genesys 5

Qiagen(Hilden): TissueLyser (hergestellt von Retsch)

Sanyo (Bad Nenndorf): Ultratiefkühlschränke

Schott (Mainz): Vakuumexsikkator

SPEX Certiprep (Metuchen, USA): Kugelmühle Geno/Grinder 2000

Stovall Life Science (Greensboro,USA): Schüttler The Belly Dancer

Thermo Scientific (Waltham, USA): Sorvall EvolutionTM RC Superspeed Refrigerated Centrifuge, Jouan GT4i Centrifuge

2.1.14 Verbrauchsmaterial

Amersham (Braunschweig): Nylonmembran (Hybond N+)

NalgeneTM (Rochester NY.,USA): Spritzenfilter 0,2µm Celluloseacetat

Schleicher und Schüll (Dassel): Nitrocellulosemembran (Cellulosenitratmembran BA 85),

Blotting Papier GB 002, Rundfilter (Durchmesser 70mm)

2 Material und Methoden

2.2 Methoden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Standardmethoden wie die Anzucht von Bakterien, die Plasmidisolierung aus *E. coli* Stämmen, Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese und Proteinanalyse mittels Western blot wurden nach den von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Protokollen durchgeführt.

2.2.1 Klonierung

Sämtliche Konstruktionsschritte erfolgten im pRTRA 7/3-Vektor. Nach der Spaltung und Dephosphorylierung des Plasmids wurde das mit identischen kohäsiven Enden versehene Fragment (Spinnenseidengen bzw. Dimerisierungsmarke) mittels T4-DNA-Ligase eingefügt. Nach der Transformation mittels Elektroporation in *E. coli* und der Kultivierung einzelner Klone wurden deren Plasmide aus den Bakterienkulturen mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits präpariert und anschließend sequenziert. Nach Identifizierung eines geeigneten Klons wurde das entsprechende Plasmid mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* gespalten und über ein Agarosegel (0,75%-1,5% in TBE) mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das gesuchte Fragment wurde anhand eines Größenstandards identifiziert. Die durch interkalierendes Ethidiumbromid fluoreszierenden DNS-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Qiaquick Gel Extraktions-Kit von Qiagen über eine Silica-Matrix gereinigt. Das so erhaltene *HindIII*-Fragment wurde in den ebenfalls mit *HindIII* gespaltenen binären Vektor pCB301 Kan^r ligiert.

Die Ausgangskonstrukte wurden von Dr. Jürgen Scheller zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Bakterienkultivierung

Der verwendete *E. coli*-Stamm XL 1 Blue wurde in LB-Flüssigmedium beziehungsweise auf LB-Agar nach Sambrook und Russel 2000 unter Zugabe des jeweiligen selektiven Antibiotikums bei 37°C kultiviert. *Agrobacterium tumefaciens* wurde in YEB-Flüssigmedium bzw. auf YEB-Agarplatten ebenfalls unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika bei 28°C kultiviert.

2.2.3 Transformation mittels Elektroporation

2.2.3.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (XL1Blue)

5ml Übernachtskultur kompetenter Zellen wurden in LB-Medium angesetzt. Nach 16 h Inkubation bei 37°C und 260 rpm wurde das Inokulum zu 500 ml LB-Medium gegeben und weiter bis zu einer OD von 0,5-0,8 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 500 ml sterilem ddH₂O (4°C) resuspendiert. Die Pelletierung wurde unter den genannten Bedingungen wiederholt und das Pellet nacheinander in 250 ml sterilem ddH₂O (4°C), 10 ml 10% Glycerin (4°C) und schließlich in 1-1,5 ml 10% Glycerin (4°C) resuspendiert und in Aliquots von 40 µl bei -70°C eingefroren.

2.2.3.2 Transformation

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte nach dem Protokoll von Mersereau et. al. 1990), die Transformation von *E. coli* nach dem Protokoll von Inoue et. al. 1990). Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 10µl tropfendialysierter Ligationsansatz oder Plasmidlösung zugegeben. Die Mischung wurde in eine Elektroporationsküvette gefüllt und mit einem BioRad Gene Pulser bei 25 µF, 1,8 kV und 200 Ω transformiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1ml gekühltem LB-Medium. Die transformierten *E. coli*-Bakterien wurden 1 h bei 37°C inkubiert und abschließend auf selektiven LB-Agarplatten ausgebracht. *Agrobacterium tumefaciens* wurden bei 30 min 28°C inkubiert und auf YEB-Agarplatten ausplattiert.

2.2.4 Pflanzenanzucht

Die Kultivierung der Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) unter sterilen Bedingungen erfolgte nach der Methode von Murashige und Skoog 1962) auf MS-Medium. Der pH-Wert von 5,8 des Mediums wurde vor dem Autoklavieren eingestellt. Die Aussaat von Tabaksamen erfolgte auf MS-Agar nach Oberflächensterilisation der Samen in 80% Ethanol (2 min) mit anschließenden Waschschritten (4x in ddH₂O) und 30-minütiger Quellung. Nach der *in vitro*

2 Material und Methoden

Anzucht wurden die Pflanzen in Erde überführt und im Gewächshaus bei einem Belichtungsrythmus von 16 h Belichtung und 8 h Dunkelheit kultiviert.

Sowohl im Falle der transienten als auch der stabilen Transformation von Tabakpflanzen erfolgte die Übertragung der DNS mittels *Agrobacterium tumefaciens*-Infektion.

2.2.5 Stabile Tabaktransformation

Die Transformation von *Nicotiana tabacum* erfolgte nach einer variierten Methode von Horsch et. al. 1985):

Blattmaterial von unter sterilen Bedingungen kultivierten *Nicotiana tabacum*-Pflanzen (Varietät Samsun NN) wurde in Blattscheiben von ca. 1 cm² Größe geschnitten. Für die Transformation wurden diese in eine Suspension von transgenen *Agrobacterium tumefaciens* (ÜN-Kultur mit MS-Medium 1:10 verd.) überführt und in dieser Lösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Blattstückchen von überschüssiger Bakteriensuspension befreit und für die Kokultivierung auf MS-Agarplatten ausgelegt. Die Kokultivierung erfolgte über Nacht im Kulturraum unter Lichtabschluss. Anschließend wurden die Blattstücke auf MS-Agarplatten mit 0,1 mg/l NES, 1 mg/l BAP, 50mg/l Kanamycin und

500 mg/l Cefotaxime transferiert und die Kultivierung mit einem 16 h / 8 h-Licht/Dunkel-Rhythmus fortgesetzt. Die nach etwa 5-8 Wochen gebildeten Sprosse wurden zur Wurzelbildung auf MS-Medium mit 50 mg/l Kanamycin und 500 mg/l Cefotaxime überführt. Die regenerierten Pflanzen wurden in Erde gesetzt und im Gewächshaus bis zur Samenbildung kultiviert.

2.2.6 Transiente Tabaktransformation

Die transiente Infiltration von *Agrobacterium tumefaciens* in Blätter von *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana benthamiana* wurde lokal mittels Spritzeninfiltration (variiert nach Yang et. al. 2000) und für die Behandlung ganzer Pflanzen mittels Vakuuminfiltration (variiert nach Kapila et. al. 1997) durchgeführt.

2.2.6.1 Spritzeninfiltration

Das zu infiltrierende Spinnenseidenkonstrukt wurde in 10 ml YEB-Medium unter Zugabe selektiver Antibiotika (50 µg/ml Rifampicin, 50 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Kanamycin) für 24 h bei 28°C und 170 rpm inkubiert. Anschließend wurden folgende Stammlösungen zugegeben: 0,2 M Acetosyringon (Endkonzentration 20 µM), 1 M Glukose (Endkonzentration 10 mM) und 1 M MES (Endkonzentration 10 mM). Die Inkubation wurde für weitere 24 fortgesetzt. Abschließend erfolgte die Einstellung der optischen Dichte (OD₆₀₀) auf 1 mit ddH₂O und 2xInfiltrationspuffer sowie die finale Zugabe von 0,2 M Acetosyringon (Endkonzentration 200 µM). Anschließend wurde die Suspension mit einer Spritze in die Unterseite der Tabakblätter injiziert und die Pflanzen 4 Tage bei ca. 22°C und 16 h/Tag Licht inkubiert.

2.2.6.2 Vakuuminfiltration

Der *Agrobacterium-tumefaciens*-Stamm mit dem zu infiltrierenden Spinnenseidenkonstrukt wurde in 10 ml YEB-Medium unter Zugabe selektiver Antibiotika (50 µg/ml Rifampicin, 50 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Kanamycin) für 48 h bei 28°C und 170 rpm inkubiert. Anschließend wurde diese Vorkultur in 500 ml YEB-Medium (50 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Kanamycin) gegeben und weitere 24 h unter den genannten Bedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe folgender Stammlösungen: 0,2 M Acetosyringon (Endkonzentration 20 µM), 1 M Glukose (Endkonzentration 10 mM) und 1M MES (Endkonzentration 10 mM). Nach weiteren 24 h Inkubation bei 28°C und 170 rpm wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) mittels ddH₂O und 2xInfiltrationspuffer auf den Wert 1 eingestellt (ca. 2 l Volumen) und 0,2M Acetosyringon (Endkonzentration 200 µM) zugegeben. Für die eigentliche Infiltration wurden die Pflanzen vollständig in die Bakteriensuspension eingetaucht und mittels einer Pumpe und eines Exsikkators ein starker Unterdruck angelegt. Die infiltrierten Pflanzen wurden vier Tage bei ca. 22°C und 16 h Licht/Tag inkubiert.

2 Material und Methoden

2.2.7 Herstellung von Proteinproben

2.2.7.1 Proteinproben aus Tabakblättern

Die Extraktion der Proteine aus Blättern von Tabakpflanzen für die Western-blot-Analyse erfolgte durch Homogenisierung von ca. 30 mg Blattmaterial in einem Reaktionsgefäß mit Hilfe eines konischen Rührstabes (IKA Eurostar D) unter Zugabe von 100 µl SDS-Probenpuffer. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 100°C denaturiert und bei $rcf = 15000$ g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes im Überstand (Bradford 1976) mit BSA als Standardprotein wurden jeweils 20 µg TSP gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.7.2 Proteinproben aus Tabaksamen

Für die Selektion der Samen wurde eine Probenmenge von ca. 80 mg reife Tabaksamen mit Quarzsand in flüssigem Stickstoff gemörsert und 0,8 ml Proteinextraktionspuffer zugegeben. Nach dem Auftauen wurden die Rohextrakte in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C und $rcf = 15000$ g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Konzentration der löslichen Proteine in diesem Extrakt bestimmt (Bradford 1976). Für die Analyse im Western blot wurden die Extrakte mit 2xSDS-Probenpuffer auf eine Konzentration von 1 µg/µl TSP eingestellt und 10 min bei 100°C denaturiert.

2.2.8 Western blot

Die Proteine (je Proteinprobe 20µg/µl TSP) wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (Konzentration zwischen 7,5% und 12%) in SDS-Elektrophoresepuffer aufgetrennt (Laemmli 1970). Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer (blotting) ($\sim 1,2\text{mA}/\text{cm}^2$, 16h) in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektrotransferapparatur auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell) übertragen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran mit 5%-iger Trockenmilch in Marvelpuffer für 2h bei RT abgesättigt. Die Bindung des monoklonalen Antikörpers 9E10 (Evan et. al. 1985) an das *c-myc*-Peptid der nachzuweisenden Proteine wurde durch eine zweistündige Inkubation der Membran bei RT in einer 1:60 verdünnten Lösung von 9E10-Konzentrat in 5%-iger

2 Material und Methoden

Marvelmilch erreicht. Danach wurde der Filter dreimal für jeweils 5 min mit 0,5%iger Marvelmilch bei RT gewaschen und anschließend für 2h in einer Verdünnung des Sekundärantikörpers (Anti-mouse IgG horseradish peroxidase) von 1:2000 in 5%-iger Marvelmilch bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den folgenden Waschschritten (je zweimal 5 min in 5%-iger Marvelmilch, Marvelpuffer und PBS) erfolgte der Nachweis der Proteine durch Chemolumineszenz der antikörpergekoppelten Peroxidase mit einem ECL-Kit (Western blotting analysis system, GE-Amersham). Der verwendete Primärantikörper wurde als Konzentrat nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen PBS aus dem Überstand der Hybridomazellen 9E10 (Evan et. al. 1985) gewonnen, die im Zellzuchtlabor der Arbeitsgruppe „Phytoantikörper“ kultiviert wurden. Das Epitop umfasst einen Bereich des humanen Proto-Onkogens p62, c-myc (Bernard et al., 1983, Hilpert et al., 2001).

2.2.8.1 Protein Dot blot

Die Protein Dot blot-Methode ist eine methodische Vereinfachung der Western blot-Analyse. Im Gegensatz zu dieser Methode werden die Proteinproben nicht auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, sondern direkt auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell) aufgetragen (Allen und Parsons 1979). Nach 30 min Trocknung bei Raumtemperatur wird analog zur Western blot-Methode verfahren.

2.2.9 Coomassiefärbung

Obwohl Spinnenseide-ELP-Fusionsproteine nicht effektiv durch Coomassie-Brillant-Blau R250 angefärbt werden, konnte diese Methode benutzt werden, um Kontaminationen durch Proteine aus Tabak während der Proteinreinigung nachzuweisen. Dazu wurde das SDS-Gel über Nacht in einer variierten Coomassielösung (Maldener 2004) gefärbt. Die anschließende Entfärbung erfolgte für ca. 2 h in 10% (v/v) Essigsäure.

2.2.10 Proteinreinigung aus Tabakblättern

Zur Reinigung der Spinnenseiden-Fusionsproteine aus Tabakblättern wurde eine Variation der Inverse Transition Cycling-Methode angewandt (Meyer und Chilkoti 1999; Scheller et. al. 2004). Dazu wurden Tabakblätter bei -80°C eingefroren und in einem Mixer in PBS (ohne

2 Material und Methoden

NaCl) zerkleinert (pro Gramm Tabakblätter 1,5 ml PBS). Größere Blattteile wurden über ein Sieb abgetrennt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde eine Stunde bei 100°C erhitzt und anschließend auf 60°C abgekühlt. Die Zentrifugation erfolgte für eine Stunde bei 4°C und $r_{cf} = 10.000$ g. Der abgenommene Überstand wurde mit 2 M NaCl versetzt und auf 50°C erhitzt. Die nun folgende Zentrifugation wurde für eine Stunde bei 8000 rpm durchgeführt, allerdings bei 40°C, um die ausgefällten ELP-Fusionsproteine nicht erneut zu lösen. Das Proteinpellet wurde bei RT in 80 ml PBS (ohne NaCl) resuspendiert und sterilfiltriert (Spritzenfilter 0,2 µm Porengröße). Abschließend erfolgte die Dialyse gegen PBS (ohne NaCl) mit anschließender Trocknung des Proteins (Vakuumtrocknung oder Lyophilisierung).

2.2.11 Proteinreinigung aus Tabaksamen

Die Reinigung der Proteine aus Tabaksamen basiert, ebenso wie die Reinigung aus Tabakblättern, auf der Inverse Transition Cycling-Methode. Dazu wurden jeweils 0,06 g reife Tabaksamen mit Quarzsand in flüssigem Stickstoff gemörsert und 0,8ml Proteinextraktionspuffer zugegeben. Nach dem Auftauen wurden die Rohextrakte in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C und $r_{cf} = 10.000$ g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 10 min bei 100°C und weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt 30 min bei 4°C und >10.000 g zentrifugiert, um denaturierte Proteine abzutrennen. Der Überstand wurde mit 2M NaCl versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Die hierbei ausgefällten ELP-Fusionsproteine wurden mittels Zentrifugation bei RT und $r_{cf} = 10.000$ g für 30 min pelletiert und anschließend in PBS (ohne NaCl) resuspendiert und sterilfiltriert (Spritzenfilter 0,2 µm Porengröße). Abschließend wurde die Proteinlösung gegen PBS dialysiert und lyophilisiert.

2.2.12 Bestimmung der Enzymaktivität von Transglutaminase

Der Nachweis der Transglutaminaseaktivität basiert auf dem Verfahren von Grossowicz et. al. (1950). Dabei wird durch das Enzym der Einbau von Hydroxylamin in das synthetische Substrat Carbobenzoxy-L-Glutamylglycin (Z-Gln-Gly-OH) katalysiert und die dabei abgespaltene Hydroxamsäure mit Eisen(III)-Ionen komplexiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 525nm nachgewiesen. Dazu wurden folgende Reagenzien benötigt:

Reagenz 1:

30 mM Z-Gln-Gly-OH, 10 mM Glutathion, 0,1 M Hydroxylamin, 0,2 M TRIS pH 6,0

Reagenz 2:

1,1 M HCl, 0,24 M FeCl₃ (angesetzt in 0,1 M HCl), 0,1 M Trichloressigsäure

500 µl Reagenz 1 wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 10 min bei 37°C temperiert. Anschließend wurden 50 µl Probenflüssigkeit (Transglutaminaselösung) bzw. Nullprobe (PBS) zugegeben und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl Reagenz 2 wurde die Reaktion beendet und die Absorption gegen die Nullprobe bestimmt.

2.2.13 Dimerisierung von Proteinen mittels Transglutaminase

Für die Transglutaminase-vermittelte Verknüpfung wurden Proteine mit Lysin- bzw. Glutamin-Marker verwendet. Die verschiedenen Proteine wurden transient bzw. stabil in Tabakblättern exprimiert und gereinigt. Anschließend wurden verschiedene Kombinationen dieser Proteine zusammengegeben und mit Transglutaminase inkubiert (variiert nach Tanaka et. al. 2004). Sowohl die Inkubationsdauer (2h-12h) als auch die Inkubationstemperatur (4°C-25°C) wurden im Verlauf der Experimente variiert. Als kompetitiver Inhibitor zur Negativkontrolle diente Cystamin (Lorand und Conrad 1984).

3 Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Tabaksamen

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung von Tabaksamen als Produktionssystem für Spinnenseiden-Fusionsproteine, wie SO1-100xELP (Scheller et. al. 2001). Dazu wurden zunächst Spinnenseidenkonstrukte mit den samenspezifischen Promotoren LeB4 und USP verwendet, die ursprünglich für die Expression in Erbsen vorgesehen waren. Das zu exprimierende Spinnenseidenprotein SO1 ist ein synthetisches Gen mit einer mehr als 90%-igen Sequenzhomologie zu einem der Proteine der Tragfadenseide der goldenen Radnetzspinne *Nephila clavipes* (MaSp1: Mayor ampullate spidersilk protein 1). Das Protein wurde mit 100 Wiederholungen des Elastin ähnlichen Polypeptids fusioniert, um die Reinigung mittels der Inverse Transition Cycling-Methode (ITC) zu ermöglichen (Meyer und Chilkoti 1999). ER-Retention ist heute generell die Methode der Wahl, um rekombinante Proteine in transgenen Pflanzen zu produzieren. Das wurde sowohl für Immunglobulinfragmente (Übersicht bei Conrad und Fiedler 1998) und komplette Antikörper (Übersicht bei Twyman et. al. 2003, Fischer et. al. 2004) als auch für Vakzine gezeigt (Übersicht bei Floss et. al. 2007). Diese Methode wurde daher auch bereits bei Spinnenseidenproteinen angewandt (Scheller et. al. 2001). Daher enthalten die in dieser Dissertation verwendeten Konstrukte das LeB4-Signalpeptid und ein ER-Retentionssignal (KDEL), um die Lagerung der Spinnenseidenproteine im endoplasmatischen Retikulum zu gewährleisten.

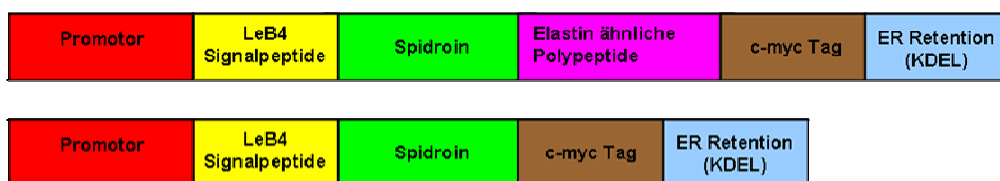


Abb. 6: Schematische Darstellung der verwendeten Spinnenseidenkonstrukte mit und ohne 100xELP.

3.1.1 Konstruktion der Spinnenseiden-Fusionsgene mit samenspezifischen Promotoren

Die ursprünglichen Samenkonstrukte wurden von Dr. Jürgen Scheller zur Verfügung gestellt. Sie wurden auf der Basis von ubiquitär exprimierten Konstrukten für die Expression in

Tabakblättern hergestellt. Dazu wurde der dort verwendete CaMV-35S-Promotor mittels der Restriktionsenzyme *HincII* und *NcoI* ausgeschnitten und der entsprechend geschnittene Samenpromotor (USP bzw. LeB4) mittels T4 DNA-Ligase eingefügt (Abb. 7).

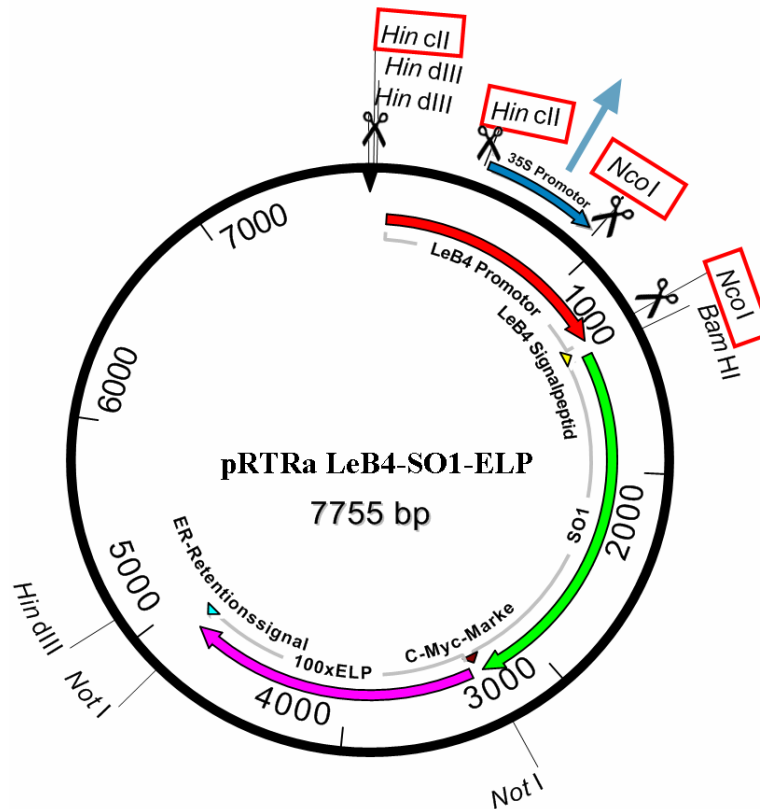


Abb. 7: Plasmidkarte pRTRA-SO1-ELP.

Darstellung des Spinnenseidengens SO1 mit 100xELP als Fusionskonstrukt im Klonierungsvektor pRTRa 7/3 unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors LeB4. Der Austausch des ubiquitären Promotors CaMV-35S (blau markiert) gegen den samenspezifischen Promotor LeB4 erfolgte mittels Restriktion an den Schnittstellen *HincII* und *NcoI* (rot markiert).

Tab. 6: Funktionale Bestandteile der samenspezifisch exprimierten Konstrukte.

| Promotor | Signalpeptid | Spidroin | Fusionsprotein | Marker |
|----------|--------------|----------|----------------|--------|
| USP | LeB4 | SO1 | - | c-myc |
| USP | LeB4 | 2xSO1 | - | c-myc |
| USP | LeB4 | 3xSO1 | - | c-myc |
| LeB4 | LeB4 | 2xSO1 | - | c-myc |
| LeB4 | LeB4 | SO1 | 100xELP | c-myc |

3 Ergebnisse

Anschließend wurde die gesamte Expressionskassette mittels des Restriktionsenzym *HindIII* aus dem Konstruktionsvektor getrennt und in den entsprechend geschnittenen Transformationsvektor pCB301Kan^r eingefügt (Abb. 8). Die weiteren Konstrukte (Tab. 6) basieren ebenfalls auf dem Spinnenseidenprotein SO1, allerdings wurden sie nicht mit 100xELP fusioniert. Stattdessen enthielten diese Konstrukte jeweils ein, zwei bzw. drei Wiederholungen der SO1-Sequenz unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors (Abb. 9) sowie 2xSO1 unter Kontrolle des bereits eingeführten LeB4-Promotors (Abb. 10).

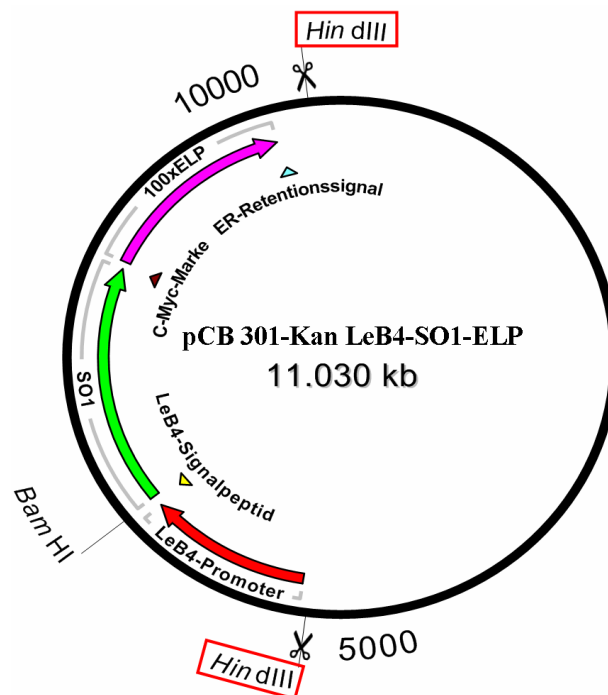


Abb. 8: Plasmidkarte pCB301-Kan-LeB4-SO1-ELP.

Darstellung der *HindIII*-Expressionskassette mit dem Spinnenseidigen SO1 mit 100xELP als Fusionskonstrukt unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors LeB4 im Transformationsvektor pCB 301-Kan. Die Expressionskassette wurde mittels *HindIII* Restriktion (rot markiert) und Ligation in das Plasmid eingefügt.

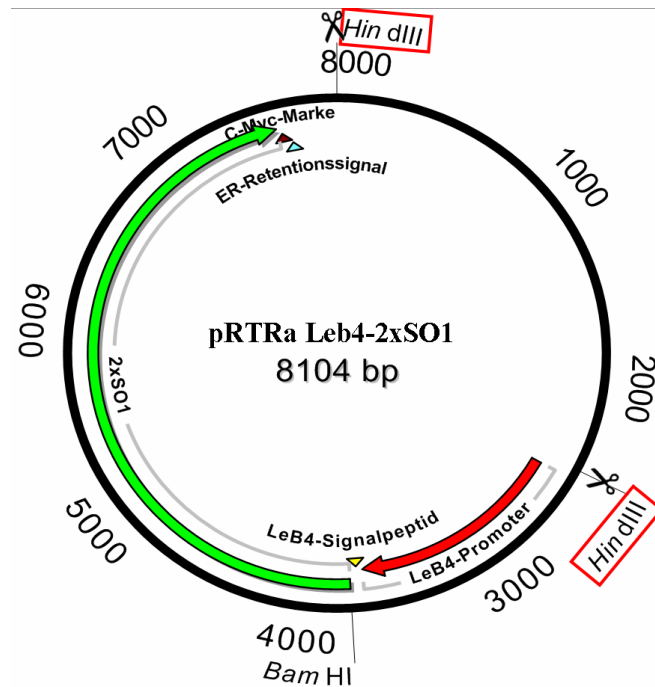


Abb. 9: Plasmidkarte pRTRa Leb4-2xSO1.

Darstellung des Spinnenseidengens 2xSO1 im Klonierungsvektor pRTRa 7/3 unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors LeB4. Die Expressionskassetten wurden mittels einer *HindIII* Restriktion ausgeschnitten (rot markiert) und in den Transformationsvektor pCB 301-Kan kloniert.

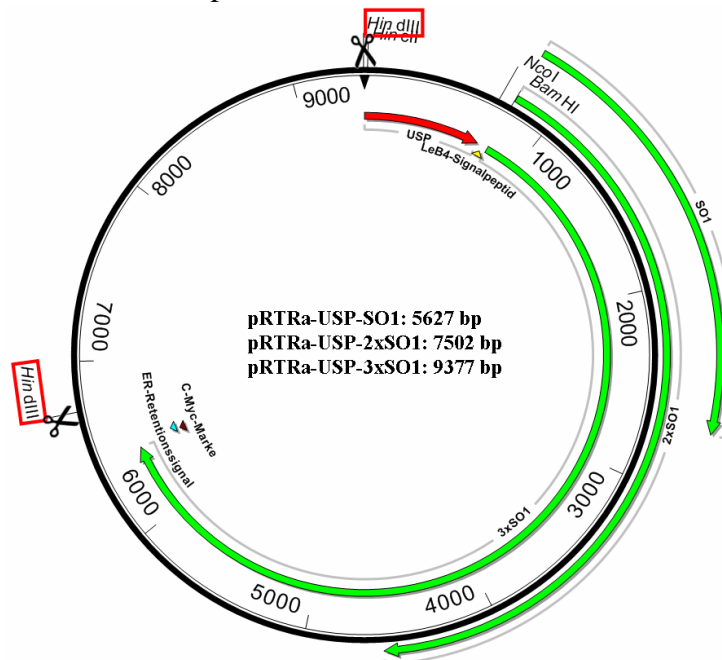


Abb. 10: Plasmidkarte pRTRa-USB-SO1/ 2xSO1/ 3xSO1.

Darstellung der Spinnenseidengene SO1, 2xSO1 und 3xSO1 im Klonierungsvektor pRTRa 7/3 unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors USP. Die Expressionskassetten wurden mittels einer *HindIII* Restriktion ausgeschnitten (rot markiert) und in den Transformationsvektor pCB 301-Kan kloniert.

3 Ergebnisse

3.1.2 Test von Konstrukten mittels transienter Expression

Nach der Klonierung und Sequenzierung der Spinnenseidenkonstrukte ist es insbesondere bei Konstrukten mit einem derart hohen Anteil an hochrepetitiven Motiven hilfreich, die vollständige Expression im pflanzlichen System zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde die Technik der Agroinfiltration benutzt (Kapitel 2.2.5 und 2.2.6). Hier standen zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung: Das Einspritzen von rekombinanten Agrobakterien in die Blattspreiten sowie die Vakuuminfiltration. Die erste Methode diente zur Konstruktkontrolle, die Vakuummethode ermöglichte die Infiltration in vollständige Pflanzen und damit die Herstellung von ausreichenden Proteinmengen für weiterführende Versuche. Auf diese Weise standen uns neue Proteinvarianten bereits Monate vor der Ernte der ersten stabil transformierten Pflanzen zur Verfügung.

3.1.2.1 Transiente Expression von samenspezifisch exprimierten Konstrukten

Im Gegensatz zur transienten Expression von konstitutiv exprimierten Proteinen werden die Konstrukte unter der Kontrolle der samenspezifischen Promotoren LeB4 und USP außerhalb des Samengewebes kaum transkribiert. Um eine Ablesung durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase zu ermöglichen, ist die Anwesenheit eines samenspezifischen Transkriptionsfaktors nötig, der an den samenspezifischen Promotor bindet und so die Transkription initiiert. Daher wurden samenspezifische Konstrukte mit dem Transkriptionsfaktor FUSCA3 (Bäumlein et. al. 1994; Baumlein et. al. 1994) koinfiltriert. Die Bindung dieses Faktors an samenspezifische Promotoren *in vitro* und *in vivo* ist bekannt (Mönke et. al. 2004, Reidt et. al. 2001). Es wurden zwei *Agrobacterium tumefaciens*-Kulturen (GV 2260) jeweils mit einem samenspezifisch exprimierten Spinnenseidenkonstrukt bzw. mit dem *FUS3*-Gen unter Kontrolle eines ubiquitären Pflanzenpromotors nach dem Standardverfahren für Spritzeninfiltration in die Tabakpflanzen injiziert. Entgegen dem Standardverfahren wurden die Pflanzen jedoch 6-7 Tage bis zur Probennahme bzw. Ernte inkubiert, da zunächst der Transkriptionsfaktor FUSCA3 unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimiert wurde, woraufhin die Transkription des samenspezifischen Konstruktes folgte. Daher war eine verlängerte Inkubationszeit nötig. Die transiente Expression der samenspezifischen Konstrukte wurde sowohl in *N. tabacum* als auch in *N. benthamiana* erfolgreich durchgeführt (Abb. 9A). Die verwendeten Konstrukte beinhalteten das

synthetische Spinnenseidengen SO1 sowie zwei bzw. drei Wiederholungen von SO1 (Abb. 9B). SO1 (ca. 51 kDa) und 2xSO1 (ca. 99 kDa) konnten erfolgreich transient exprimiert werden. Die Proteinbanden im Western blot (Abb. 11) entsprachen den erwarteten Proteingrößen (Tab. 7). Im Falle von 3xSO1 (ca. 140 kDa) waren nur vereinzelte Banden unterhalb von 72 kDa sichtbar.

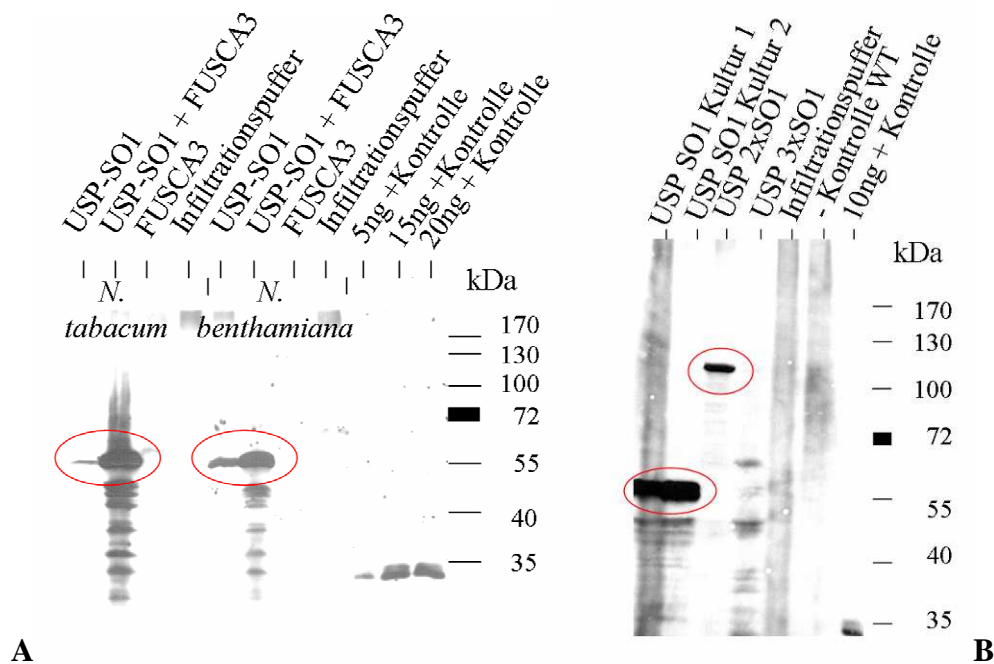


Abb. 11: Western blot-Analyse von transient exprimierten Proteinen aus Tabakblättern. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).
 A: Proteinbanden erwarteter Größe (51 kDa, rot markiert) sowie einige Abbaubanden sind sowohl in Proben aus *N. benthamiana* als auch aus *N. tabacum* bei gleichzeitiger Infiltration des Spinnenseiden-Fusionskonstrukts und des *FUS3*-Gens sichtbar. Schwache Proteinbanden sind ebenfalls sichtbar bei alleiniger Infiltration des Spinnenseidengens.
 B: Infiltration von Spinnenseidenproteinen in *N. tabacum* liefert Proteinbanden bis zu 99 kDa (2xSO1). Die Infiltration von 3xSO1 (erwartete Größe bei ca. 147 kDa) lieferte nicht das vollständige Protein, sondern lediglich Abbaubanden unterhalb von 72 kDa.

Fast alle Konstrukte unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors konnten erfolgreich transient exprimiert werden. Lediglich das Konstrukt mit drei Wiederholungen der SO1-Sequenz konnte nicht exprimiert werden. Es waren zwar Proteinbanden sichtbar, diese lagen aber deutlich unterhalb der erwarteten Größe von 147 kDa und sind somit aller Wahrscheinlichkeit nach ein Zeichen von Instabilität des Proteins. Die Konstrukte unter

3 Ergebnisse

Kontrolle des LeB4-Promotors (LeB4-2xSO1, LeB4-SO1-100xELP) wurden nicht transient getestet, da diese Proteine bereits erfolgreich in Pflanzen exprimiert werden konnten (Scheller und Conrad, unveröffentlicht).

Tab. 7: Erwartete Größe der samenspezifisch exprimierten Spinnenseiden-Fusionsproteine.

| Transgen | Proteingröße [kDa] |
|------------------|--------------------|
| USP SO1 | 51 |
| USP 2xSO1 | 99 |
| USP 3xSO1 | 147 |
| LeB4 2xSO1 | 99 |
| LeB4 SO1-100xELP | 94 |

Nach der erfolgreichen transienten Expression von SO1 und 2xSO1 unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors wurden beide Konstrukte für die stabile Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) ausgewählt. Trotz der unvollständigen Expression von 3xSO1 wurde auch dieses Konstrukt für die stabile Transformation ausgewählt. In der Analyse der mit 3xSO1 infiltrierten Tabakblätter waren, wie bereits erwähnt, deutlich zu kleine Proteinbanden nachweisbar. Dies kann auch ein Artefakt der transienten Expression sein und ist nicht zwangsläufig auf ein defektes Konstrukt zurückzuführen. Die bereits erprobten Konstrukte unter Kontrolle des LeB4-Promotors wurden ebenfalls zur Transformation verwendet.

3.1.3 Produktion stabil transformierter Tabakpflanzen mit samenspezifischen Konstrukten

Ziel der weiteren Experimente war die Erzeugung und Charakterisierung von transgenen Tabaksamen und die Entwicklung eines geeigneten Reinigungsverfahrens zur Gewinnung der Spinnenseiden-Fusionsproteine aus diesen Samen.

Nach den erfolgreichen transienten Tests wurden Tabakblattstücke (*Nicotiana tabacum*) mit den erwähnten Konstrukten (Tab. 6) mittels *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und jeweils 50 Pflanzen aus den Blattstücken regeneriert. Die regenerierten Pflanzen wurden in Gewächshäusern bis zur Samenernte auf Erde kultiviert. Anschließend wurden die Samen

getrocknet und mittels Nachweis der c-myc-Marke im Western blot auf Expression der Spinnenseidenproteine getestet (Abb. 12-16).

3.1.3.1 Nachweis der samenspezifisch exprimierten Proteine aus stabil transformierten Pflanzen mittels Western blot-Analyse

Von 50 transgenen T₀-Pflanzen konnte im Western blot je nach Konstrukt bei zwei bis maximal 10 Pflanzen die Proteinexpression des Transgens nachgewiesen werden (Tab. 8, Abb. 11-16). Je Konstrukt wurden 2 Linien zur weiteren Vermehrung ausgesät, während die übrigen Linien für erste Reinigungsexperimente verwendet wurden.

Tab. 8: Anzahl der transformierten Pflanzen mit samenspezifisch exprimierten Konstrukten.

| Konstrukt | Regenerierte Pflanzen | Spinnenseidenprotein exprimierende Pflanzen | Bezeichnung der vermehrten Linien |
|------------------|-----------------------|---|-----------------------------------|
| USP-SO1 | 50 | 6 | 34, 50 |
| USP-2xSO1 | 50 | 2 | 5, 8 |
| USP-3xSO1 | 50 | 2 (1 unstabil) | 3 |
| LeB4-2xSO1 | 50 | 5 | 24, 32 |
| LeB4-SO1-100xELP | 50 | 10 | 14, 18 |

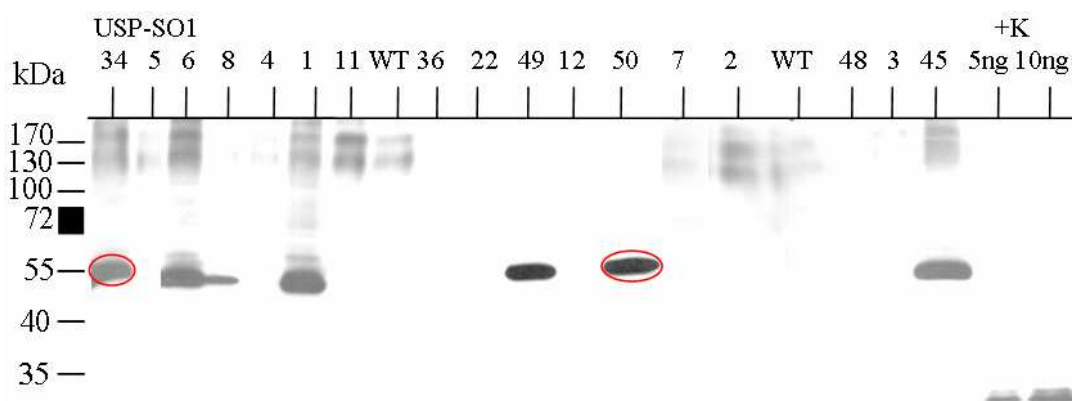


Abb. 12: Expressionsnachweis in transgenen Linien mit dem Konstrukt USP-SO1. Je 20µg TSP pro Probe wurden aufgetragen. Sieben positive Linien (Nr. 1, 6, 34, 45, 49 und 50) wurden mittels c-myc-Antikörper und anti-Maus-Antikörper markiert und mittels ECL-Kit detektiert. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

3 Ergebnisse

In den Samen der 50 regenerierten USP-SO1-Pflanzen konnten sieben Linien (Nr. 1, 6, 34, 45, 49 und 50) anhand der c-myc-Marke als Expressionslinien für das Spinnenseiden-Fusionsprotein identifiziert werden. Die Abschätzung des Molekulargewichtes im Western blot ergab einen Wert von ca. 51 kDa. Dies entsprach der erwarteten Größe (Tab. 7) und ein proteolytischer Abbau war nicht erkennbar. Während das Saatgut der Linien 34 und 50 weiter vermehrt wurde, um genügend Samen für die Maßstabsvergrößerung der Reinigungsmethode und die Etablierung einer stabilen Linie zu gewinnen, wurden die übrigen Samen für Reinigungsexperimente verwendet.

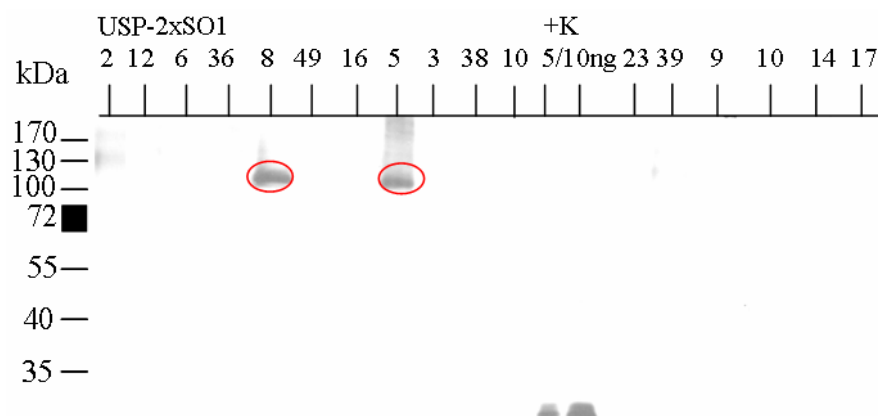


Abb. 13: Expressionsnachweis in transgenen Linien mit dem Konstrukt USP-2xSO1.

Je 20µg TSP pro Probe wurden aufgetragen. Zwei positive Linien (Nr. 8 und 5) wurden mittels c-myc-Antikörper und anti-Maus-Antikörper markiert und mittels ECL-Kit detektiert. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

In den Samen der 50 regenerierten USP-2xSO1-Pflanzen konnten lediglich zwei Linien (Nr. 5 und Nr. 8) anhand der c-myc-Marke als Expressionslinien für das Spinnenseiden-Fusionsprotein identifiziert werden. Die Abschätzung des Molekulargewichtes im Western blot ergab einen Wert von ca. 100 kDa. Dies entsprach der erwarteten Größe (Tab. 7). Ein proteolytischer Abbau war nicht erkennbar. Aufgrund der geringen Menge an exprimierenden Linien wurden beide Linien vermehrt und zunächst keine Reinigungsexperimente mit diesem transgenen Protein vorgenommen.

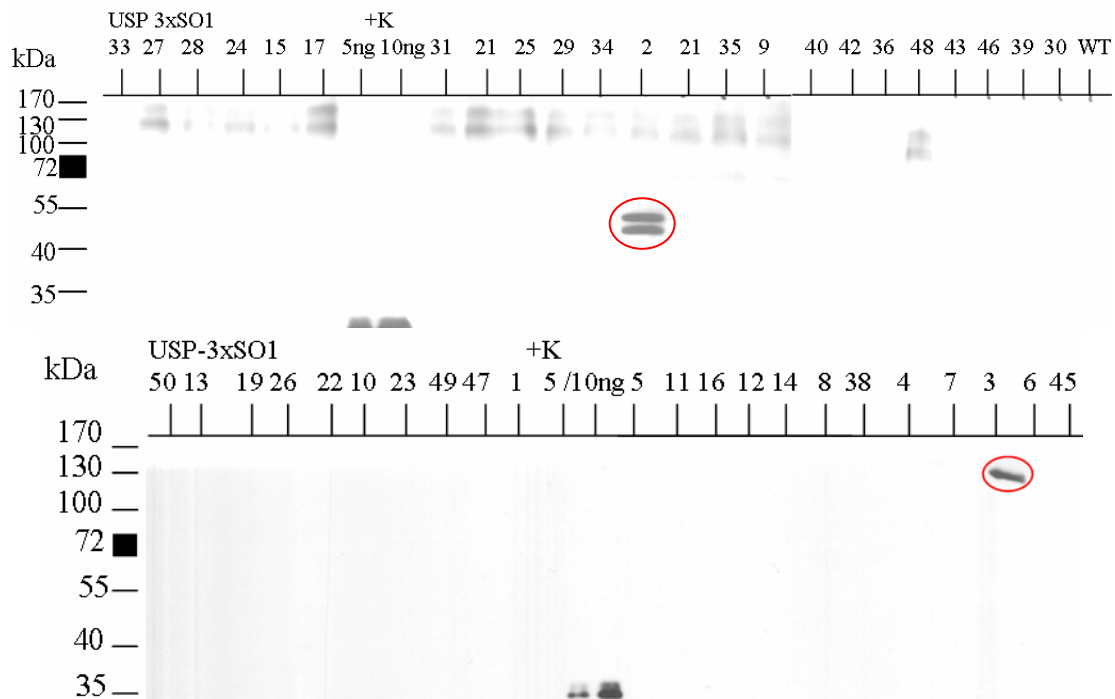


Abb. 14: Expressionsnachweis in transgenen Linien mit dem Konstrukt USP-3xSO1.

Je 20 μ g TSP pro Probe wurden aufgetragen. Zwei exprimierende Linien (Nr. 2 und 3) wurden mittels c-myc-Antikörper und anti-Maus-Antikörper markiert und mittels ECL-Kit detektiert. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA). In Linie 2 liegt das Protein in Fragmenten vor.

In den Samen der 50 regenerierten USP-3xSO1-Pflanzen konnte nur eine Linie (Nr. 3) anhand der c-myc-Marke als Expressionslinie für das Spinnenseiden-Fusionsprotein identifiziert werden. Die Abschätzung des Molekulargewichtes im Western blot ergab einen Wert von ca. 150 kDa. Dies entsprach der erwarteten Größe (Tab. 7). Ein proteolytischer Abbau war nicht erkennbar. Das Saatgut der Linie 3 wurde weiter vermehrt, um genügend Samen für die Etablierung der Reinigungsmethode und die Etablierung einer stabilen Linie zu gewinnen. Linie 2 zeigt zwar ebenfalls Signale im Western blot, allerdings liegen 2 Banden von vergleichsweise geringer Größe (ca. 55-60 kDa) vor. Daher wurde die Linie aufgrund dieser Instabilität nicht weiter verwendet. Dieses Ergebnis zeigt erneut das Stabilitätsproblem der hochrepetitiven Struktur von 3xSO1, welches bereits im transienten Test zu beobachten war (Abb. 11B).

3 Ergebnisse



Abb. 15: Expressionsnachweis in transgenen Linien mit dem Konstrukt LeB4-2xSO1. Je 20µg TSP pro Probe wurden aufgetragen. Auftrennung auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel. Fünf exprimierende Linien (Nr. 23, 24, 25, 32 und 39) wurden mittels c-myc-Antikörper und anti-Maus-Antikörper markiert und mittels ECL-Kit detektiert. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA). Linie 23 exprimiert das Protein nur in vergleichsweise geringer Menge.

In den Samen der 50 regenerierten LeB4-2xSO1-Pflanzen konnten fünf Linien (Nr. 23, 24, 25, 32 und 39) anhand der c-myc-Marke als Expressionslinien für das Spinnenseiden-Fusionsprotein identifiziert werden. Die Abschätzung des Molekulargewichtes im Western blot ergab einen Wert von ca. 100 kDa. Dies entsprach der erwarteten Größe (Tab. 7). Ein proteolytischer Abbau war nicht erkennbar. Während das Saatgut der Linien 24 und 32 weiter vermehrt wurde, um genügend Samen für die Maßstabsvergrößerung der Reinigungsmethode und die Etablierung einer stabilen Linie zu gewinnen, wurden die übrigen Samen für Reinigungsexperimente verwendet.

Die letzten untersuchten Linien wurden mit dem Konstrukt LeB4-SO1-ELP transformiert worden. Von diesen Linien wurden ebenfalls 50 Pflanzen regeneriert und die daraus gewonnenen Samen anhand der c-myc-Marke im Western blot charakterisiert (Abb. 16). Dabei konnten zehn exprimierende Linien (Nr. 14, 18, 20, 21, 22, 29, 30, 38, 46 und 49) identifiziert werden. Die Linien 14 und 18 wurden zur Etablierung stabiler Linien und zur Maßstabsvergrößerung des Reinigungsverfahrens weiter vermehrt, während die übrigen Linien für erste Reinigungsexperimente verwendet wurden.

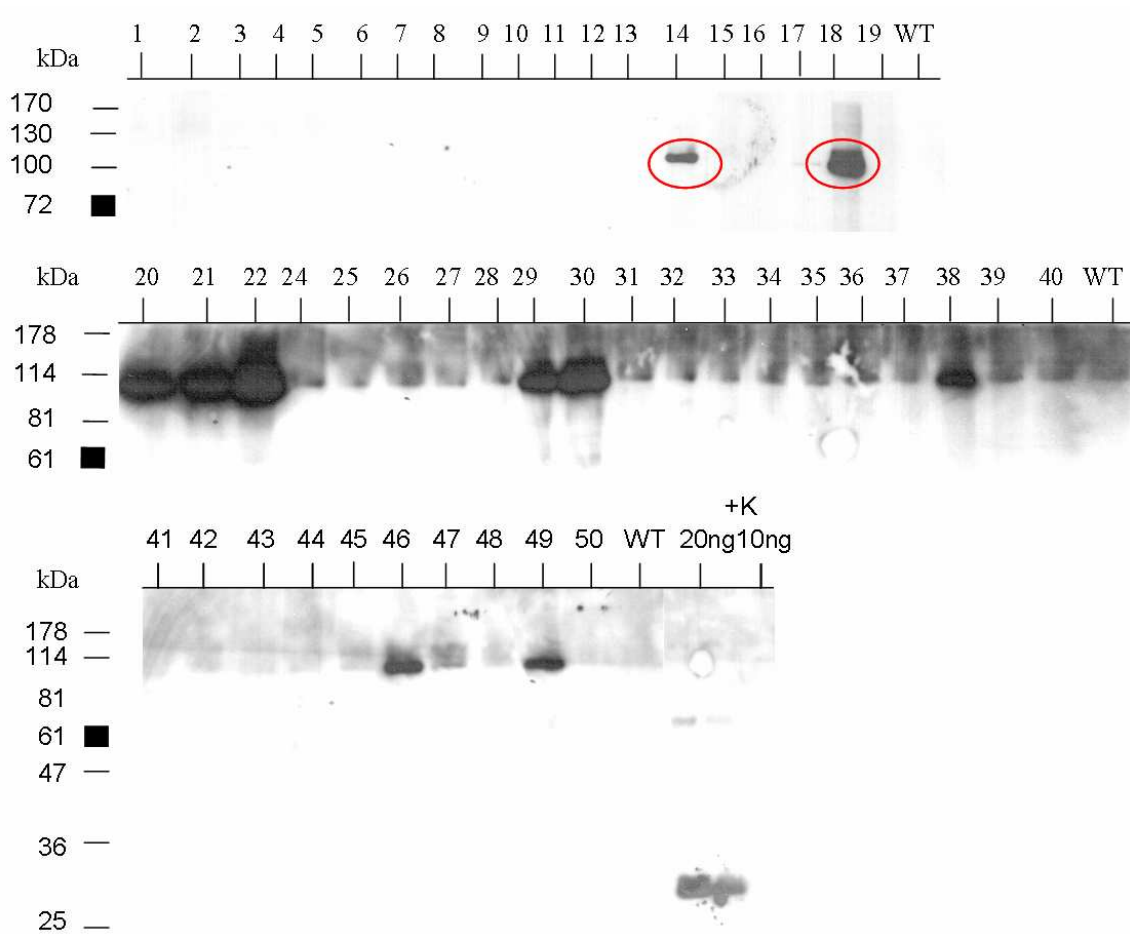


Abb. 16: Expressionsnachweis in transgenen Linien der T₀-Generation mit dem Konstrukt LeB4 SO1-ELP. Je 20µg TSP pro Probe wurden aufgetragen. Zehn positive Linien (Nr. 14, 18, 20, 21, 22, 29, 30, 38, 46 und 49) wurden mittels c-myc-Antikörper und anti-Maus-Antikörper markiert und mittels ECL-Kit detektiert. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Die Ergebnisse der Nachkommensanalyse der Linien 14 und 18 (T₁) sind in Abbildung 17 dargestellt.

3 Ergebnisse

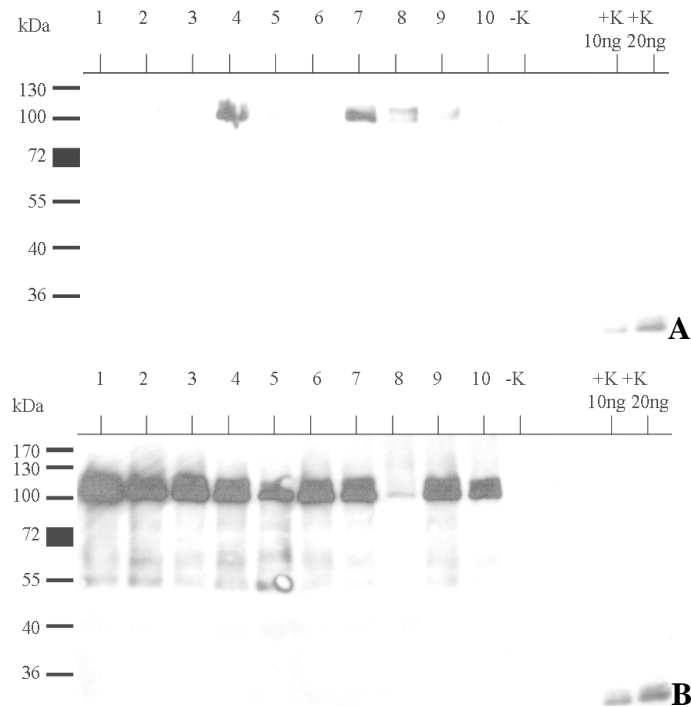


Abb. 17: Expressionsnachweis in transgenen Linien der T₁-Generation mit dem Konstrukt LeB4 SO1-100xELP.

A: Linie 14/1-10; B: Linie 18/1-10; je 20µg TSP pro Probe wurden aufgetragen. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

In Linie 14 wurde nur in wenigen Sublinien Transgenexpression in T₁-Nachkommen gezeigt. Ob dies auf Silencing-Effekte zurückzuführen war, bleibt offen.

Tab. 9: Anteil der Kanamycin-resistenten Pflanzen der weiter vermehrten SO1-ELP exprimierenden Linien (T₁) bei jeweils einhundert neu ausgesäten Samen.

| Linie | Getestete Pflanzen | Kan ^r Pflanzen |
|-------|--------------------|---------------------------|
| 14/1 | 98 | 84 |
| 14/4 | 100 | 68 |
| 18/1 | 103 | 98 |
| 18/2 | 100 | 71 |

In Linie 18 wurde in nahezu allen Nachkommen Transgenexpression nachgewiesen. Das galt auch für die T₂-Generation (Abb. 18). Die bis zu diesem Zeitpunkt angewandte manuelle Aufschlussmethode mittels Mörser war aufgrund der hohen Probenanzahl nicht praktikabel.

3 Ergebnisse

Daher musste eine neue Aufschlussmethode für Tabaksamen mit höherem Durchsatz etabliert werden.

Nach der Ernte der ersten T₂-Samen wurden dazu jeweils 0,06 g Samen mit Quarzsand und je zwei Stahlkugeln in 2ml Eppendorfgefäße gefüllt und bei -80°C für 24 Stunden gelagert. Anschließend wurden je 32 Proben mittels eines Qiagen (Retsch) TissueLyser (2 min Hubzahl 30 pro Sekunde) zerkleinert und je 800µl Samenextraktionspuffer zugegeben. Anschließend wurde entsprechend der Standardmethode für Proteinproben aus Samen verfahren.

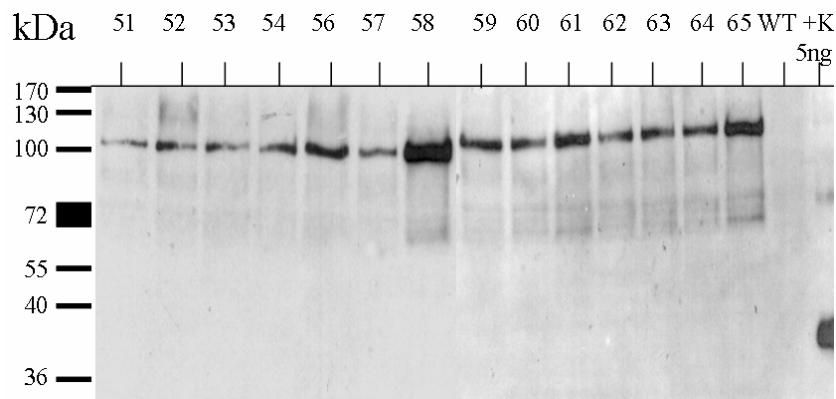


Abb. 18: Expressionsnachweis in transgenen Linien der T₂-Generation mit dem Konstrukt LeB4 SO1-100xELP.

Exemplarische Darstellung der Linien 18/1 Nr.51-65; je 20µg TSP pro Probe wurden aufgetragen. Samenaufschluss erfolgte nach neuer Methode (Retschmühle). Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Da in dieser Generation die Proteinexpression in den einzelnen Sublinien variierte, wurde eine Dot blot-Methode inklusive mechanisierter Probengewinnung eingeführt, um Sublinien mit stark exprimierenden Samen zu identifizieren. Dabei wurden je 0,04 g Samen der zu beprobenden Linien mit 0,01 g Quarzsand und je zwei Stahlkugeln in einen 96-Well Masterblock gefüllt und bei -80°C über Nacht gelagert. Anschließend wurde der Masterblock bei 4°C 2 min bei 4750 rpm (rcf = 5251g) zentrifugiert, um die Samen zu konzentrieren. Schließlich wurden die Samen in einer Geno/Grinder 2000-Kugelmühle 2 min bei einer Hubzahl von 300 pro Minute aufgeschlossen, 400µl Samenextraktionspuffer zugegeben und der Masterblock bei 4°C und 4750 rpm (rcf = 5251g) 30 min zentrifugiert, um die Samentrümmen abzutrennen. Die Proteinproben wurden mit einer Mehrkanalpipette entnommen und jeweils 20µl auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Der Nachweis des Spinnenseiden-Fusionsproteins erfolgte anschließend nach der Standardmethode für Dot blot-

3 Ergebnisse

Analyse (Kapitel 2.2.8.1). Die Proteinproben wurden in drei Gruppen eingeteilt: stark exprimierend, schwach exprimierend und nicht exprimierend. Stark exprimierende Samen wurden während der Maßstabsvergrößerung des Reinigungsverfahrens verwendet.

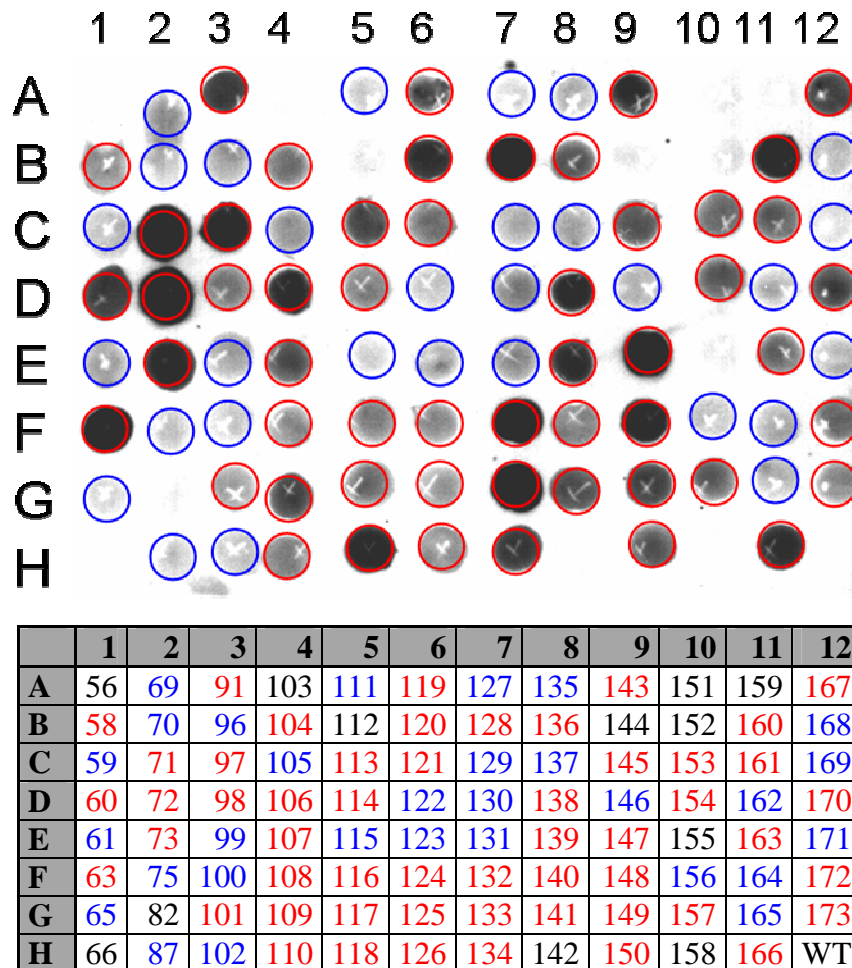


Abb. 19: Dot blot-Analyse der Linien LeB4 SO1-100xELP (T₂-Generation).

Sublinien von 18/1; je 20µg TSP pro Probe wurden aufgetragen. Exemplarische Darstellung der ersten 95 Proben (+Wildtyp-Kontrolle) im 96-well Masterblock; Samenaufschluss erfolgte nach neuer Hochdurchsatzmethode (Aufschluss im GenoGrinder). Markierung mittels Anti-c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Stark exprimierende Linien wurden rot markiert, schwach exprimierende Linien blau.

In Abbildung 19 werden Samen von Sublinien von LeB4 SO1-100xELP Linie 18/1 im Einzelnen analysiert. Die hier eingeführte Methode ermöglichte eine effiziente Untersuchung größerer Probenzahlen, wie bei der Nachkommensanalyse transgener Pflanzen gefordert wird. Die auf diese Weise analysierten transgenen Samen bildeten den Grundstock für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen.

3.1.4 Analyse der Langzeitstabilität von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Tabaksamen

Lagerstabilität für Samenproteine stellt eine der Grundfunktionen von Pflanzensamen dar. Diese Eigenschaft von Pflanzensamen führte auch zu ausgedehnter Lagerstabilität für rekombinante Proteine in transgenen Samen, wie zum Beispiel rekombinante Antikörper (Artsaenko et. al. 1995). Eine derartige Lagerstabilität wurde auch für entsprechende rekombinante Antikörper-ELP-Fusionen gezeigt (Scheller et. al. 2006). Doch die Lagerstabilität beschränkt sich nicht auf Tabaksamen. Auch in Kartoffelknollen konnten rekombinante Antikörper stabil gelagert werden (Artsaenko et. al. 1998), während z.B. SO1-100xELP in Knollen weder im Boden noch nach der Ernte stabil war und abgebaut wurde (Münnich und Conrad, unveröffentlicht). Daher war es von großem Interesse, die Lagerstabilität von SO1-ELP in Samen zu untersuchen. Dazu wurden Proben von zwei Linien (Leb4 SO1-100xELP 18/3 und 18/9) jeweils unmittelbar nach der Ernte genommen. Nach sechs Monaten Lagerung bei Raumtemperatur wurden monatlich Proben genommen, bis eine Lagerzeit von insgesamt zwölf Monaten beendet war. Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden jeweils 100 Samen abgezählt, in flüssigem Stickstoff gemörsert und gleiche Volumina (je 20µl) im Western blot analysiert (Abb. 20 und 21).

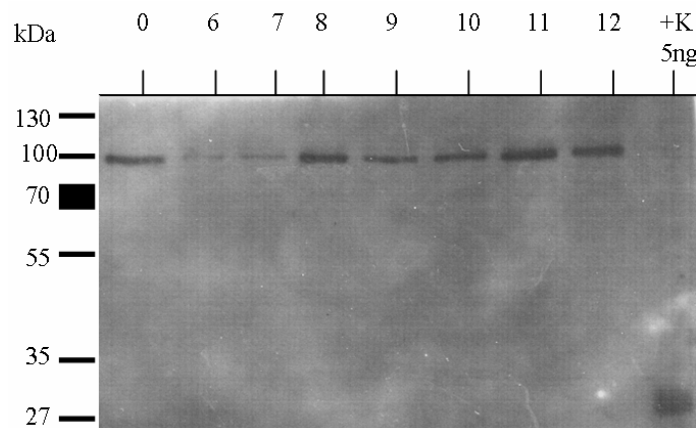


Abb. 20: Western blot Analyse von Samenproben der Linie SO1-ELP. 18/3 zeigt die Stabilität der Spinnenseidenproteine nach 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

3 Ergebnisse

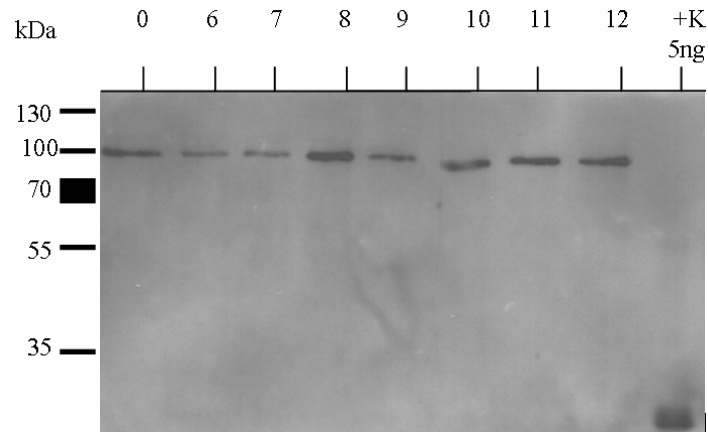


Abb. 21: Western blot Analyse von Samenproben der Linie SO1-ELP. 18/9 zeigt die Stabilität der Spinnenseidenproteine nach 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Beide hier analysierten Linien zeigen Proteinbanden der erwarteten Größe (ca. 94 kDa) in allen zu verschiedenen Zeiten genommenen Proben. Leichte Schwankungen in der Stärke der Proteinbanden waren erkennbar. Diese Schwankungen können zufällig und experimentell bedingt sein. Proteinbanden geringerer Größe, die auf Abbauprozesse hindeuten wurden, waren nicht erkennbar. Wie die Abbildungen 19 und 20 zeigen, wurde die Lagerstabilität von SO1-ELP in Tabaksamen für zwei transgene Sublinien für lange Zeiträume (12 Monate) nachgewiesen.

3.1.5 Reinigung des Spinnenseiden-Fusionsproteins SO1-100xELP aus Tabaksamen

Die Reinigung von Spinnenseidenproteinen aus Blattmaterial durch Inverse Transition Cycling wurde von Scheller und Mitarbeitern 2004 beschrieben (Scheller et. al. 2004). Die Extraktion und Reinigung aus Samen erfordert in vielerlei Hinsicht (Aufschlußverhalten, hoher Ölgehalt, hoher Samenproteinanteil) eine Anpassung der Verfahrensweise. Bedauerlicherweise konnte lediglich die Reinigung von SO1-ELP im Großmaßstab erprobt werden, da die übrigen Linien durch experimentelle Probleme nicht in genügenden Mengen zur Verfügung standen.

3.1.5.1 Anpassung der Inverse Transition Cycling-Methode an Reinigung aus Tabaksamen

Die Anpassung des Reinigungsverfahrens wurde zunächst im Labormaßstab (0,06 g Samen) durchgeführt und später mit größeren Probenmengen (bis zu 50 g Samen) wiederholt.

Die Inverse Transition Cycling-Methode basiert auf der Löslichkeitsänderung von ELP-Fusionsproteinen in Abhängigkeit von der Temperatur, dem Salzgehalt und dem pH-Wert der Proteinlösung. Daher wurden Fällungstemperatur und Salzgehalt unabhängig voneinander variiert und die resultierenden Proteinpellets und Überstände mittels Western blot analysiert. Bei diesen Experimenten wurde zunächst nur das Verhalten des transgenen Proteins untersucht. Die ebenfalls im Extrakt enthaltenen Samenproteine wurden hier zunächst nicht betrachtet.

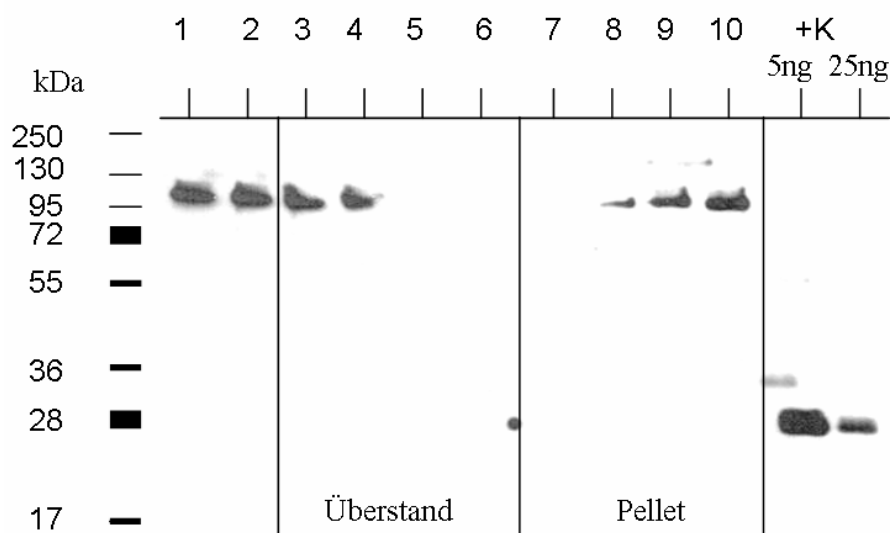


Abb. 22: Optimierung der Proteineinigung aus Tabaksamen durch Variation der Salzkonzentration.

1: Rohextrakt; 2: Überstand Hitzebehandlung; 3: Überstand Salzfällung (+1 Vol. ddH₂O); 4: Überstand Salzfällung (+1 Vol. 2 M NaCl); 5: Überstand Salzfällung (+1 Vol. 5 M NaCl); 6: Überstand Salzfällung (+1 Vol. gesättigte NaCl-Lsg.); 7: Pellet Salzfällung (+1 Vol. ddH₂O); 8: Pellet Salzfällung (+1 Vol. 2 M NaCl); 9: Pellet Salzfällung (+1 Vol. 5 M NaCl); 10: Pellet after Salzfällung (+1 Vol. gesättigte NaCl-Lsg.). Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Die starke Abhängigkeit der Fällungseffizienz von der Salzkonzentration zeigte sich deutlich bei der Variation dieses Parameters (Abb. 22). Die Standardmethode beinhaltet die Zugabe von NaCl bis zur Endkonzentration von 2 M. Bei der Zugabe von 1 Vol. ddH₂O zur

3 Ergebnisse

Proteinlösung verblieb die gesamte Proteinmenge im Überstand. Bei einer Endkonzentration von 1 M NaCl war zwar eine Proteinbande im Pellet zu erkennen, allerdings verblieb der Großteil des Spinnenseiden-Fusionsproteins nach wie vor im Überstand. Die weitere Erhöhung der Endkonzentration auf 2,5 M NaCl bzw. die Zugabe von 1 Vol. gesättigter NaCl-Lösung führte zu einer völligen Fällung des Spinnenseidenproteins. Bei den Proben dieser Fällungen zeigten sich im Western-blot (Proteinnachweis durch Anti-c-myc-Antikörper) keine Banden des transgenen Proteins im Überstand und entsprechende Zunahmen der korrespondierenden Banden im Pellet.

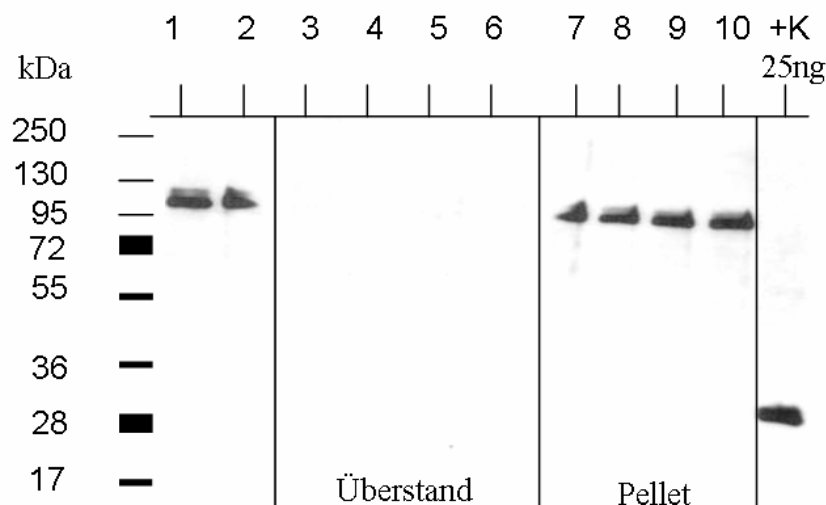


Abb. 23: Western blot-Analyse der Reinigungsoptimierung von SO1-ELP aus Tabaksamen im Labormaßstab durch Variation der Temperatur.

1: Rohextrakt; 2: Überstand Hitzebehandlung; 3: Überstand Salzfällung (95°C); 4: Überstand Salzfällung (75°C); 5: Überstand Salzfällung (65°C); 6: Überstand Salzfällung (50°C); 7: Pellet Salzfällung (95°C); 8: Pellet Salzfällung (75°C); 9: Pellet Salzfällung (65°C); 10: Pellet Salzfällung (50°C). Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Die Variation der Fällungstemperatur bewirkte keinerlei Veränderung im Überstand nach der Fällung bezogen auf das transgene Protein (Abb. 23). Es waren keine Banden des Spinnenseidenproteins in den Überstandfraktionen im gesamten Temperaturspektrum (50°C-95°C) sichtbar. Nennenswerte Unterschiede in den Bandenstärken der Pelletfraktionen waren nicht zu erkennen. In weiterführenden Experimenten wurde die Fällungstemperatur weiter auf bis zu 25°C abgesenkt (Abb. 24). Die Analyse dieser Fällung mittels Western blot zeigte eine Erhöhung der Fällungseffizienz bei sinkenden Temperaturen. Bei allen Temperaturen waren deutliche Proteinbanden im Pellet zu erkennen, allerdings nahm die Proteinmenge im Überstand erkennbar mit der Temperatur (von 25°C über 37°C bis zu 50°C) zu.

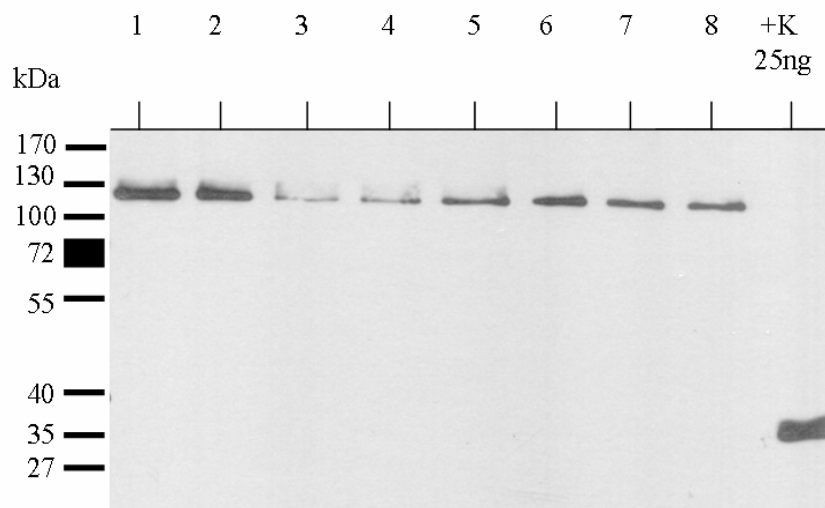


Abb. 24: Western blot-Analyse der Reinigungsoptimierung von SO1-ELP aus Tabaksamen im Labormaßstab durch Variation der Temperatur.

1: Rohextrakt; 2: Überstand Hitzbehandlung; 3: Überstand Salzfällung (25°C); 4: Überstand Salzfällung (37°C); 5: Überstand Salzfällung (50°C); 6: Pellet Salzfällung (25°C); 7: Pellet Salzfällung (37°C); 8: Pellet Salzfällung (50°C). Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

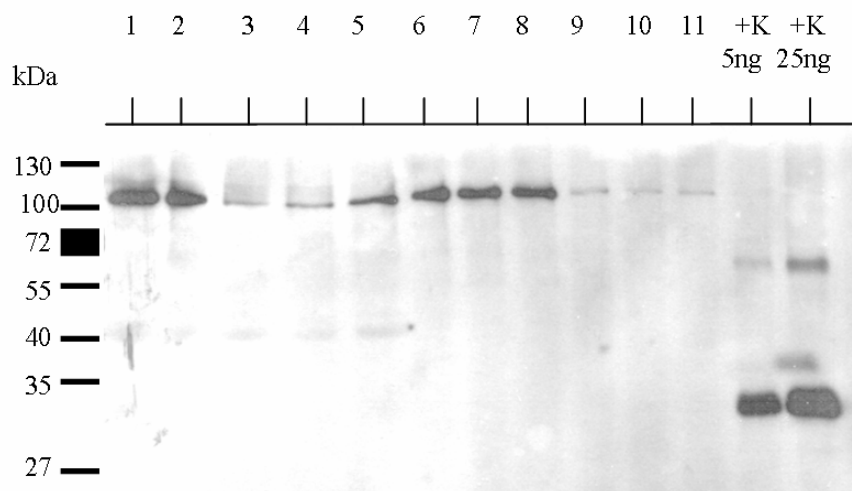


Abb. 25: Western blot-Analyse der Reinigung von SO1-100xELP aus Tabaksamen im Labormaßstab.

1: Rohextrakt; 2: Überstand Hitzbehandlung; 3: Überstand Salzfällung (25°C); 4: Überstand Salzfällung (37°C); 5: Überstand Salzfällung (50°C); 6: Pellet Salzfällung (25°C); 7: Pellet Salzfällung (37°C); 8: Pellet Salzfällung (50°C); 9: Pellet 2 Salzfällung (25°C); 7: Pellet 2 Salzfällung (37°C); 8: Pellet 2 Salzfällung (50°C). Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

3 Ergebnisse

Um die Vollständigkeit der Fällung zu überprüfen, wurde der Fällungsschritt ein weiteres Mal unter identischen Bedingungen wiederholt (Abb. 25). In diesem Experiment wiederholten sich die Ergebnisse der Temperaturvariation (Verbesserung der Fällungseffizienz bei Reduzierung der Fällungstemperatur).

Der zweite Fällungsschritt lieferte jeweils eine schwache, kaum erkennbare Bande des transgenen Proteins. Eine Wiederholung der Fällung erhöhte die Ausbeute nicht nennenswert. Die Erhöhung der Probenmenge auf bis zu 50 g Tabaksamen machte einige zusätzliche Reinigungsschritte notwendig. Im Labormaßstab wurde die notwendige Abtrennung der öligen Phase aus dem Tabaksamenrohextrakt nach der ersten Zentrifugation manuell mittels einer Pipette durchgeführt. Nach der Maßstabsvergrößerung war diese einfache Abtrennung nicht mehr praktikabel, da die fetthaltige Phase mit zunehmender Oberfläche instabil wurde und sich eine stabile Fett-in-Wasser-Emulsion bildete. Daher wurde eine zusätzliche Filtration mit einem Faltenfilter vor der Hitzebehandlung durchgeführt und die Effizienz der Reinigungsschritte mittels Western blot analysiert (Abb. 26). Die Salzfällung wurde entsprechend der Temperaturoptimierung im Labormaßstab bei 25°C durchgeführt.

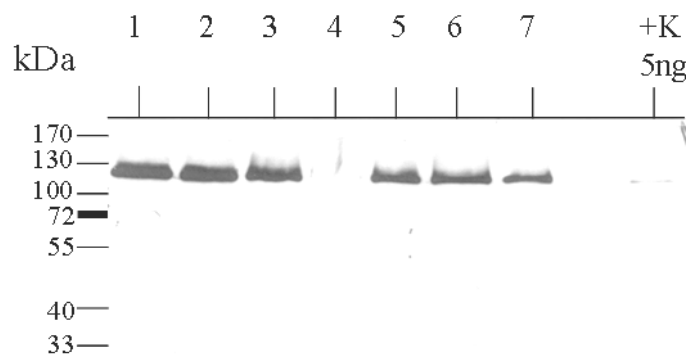


Abb. 26: Western blot-Analyse der maßstabsvergrößerten Reinigung von SO1-ELP aus Tabaksamen (50g) mit zusätzlichem Filterschritt. 1: Rohextrakt; 2: Filtrat; 3: Überstand Hitzebehandlung; 4: Pellet Hitzebehandlung; 5: Pellet Salzfällung; 6: Überstand Salzfällung; 7: Pellet Salzfällung (sterilfiltriert). Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Es zeigte sich, dass unter den vorliegenden Bedingungen nach der Maßstabsvergrößerung andere Bedingungen für die Fällung des Spinnenseiden-Fusionsproteins notwendig sind, da sich nach der Salzfällung immer noch eine große Proteinmenge im Überstand befand (Abb. 26, Bahn 6). Zur Erhöhung der Ausbeute boten sich eine Erhöhung der Fällungstemperatur

oder eine Erhöhung der Salzkonzentration an. Eine Erhöhung der Salzkonzentration war nicht wünschenswert, da es anschließend mittels eines Dialyseschrittes entfernt werden musste und eine Verlängerung der Dialyse bei der Reinigung von Spinnenseidenproteinen aus anderen Expressionssystemen zu Instabilität und starken Mengenverlusten geführt hat. Daher wurde die Proteinlösung zur Fällung bei einer Temperatur von 37°C inkubiert und zentrifugiert. Zur Abtrennung der Fettphase, die nach einer einfachen Filtration noch zu großen Teilen in der Proteinlösung vorhanden war, wurden schließlich insgesamt zwei Filterschritte nach der ersten Hitzebehandlung eingeführt, um die enthaltenen Fette abzutrennen.

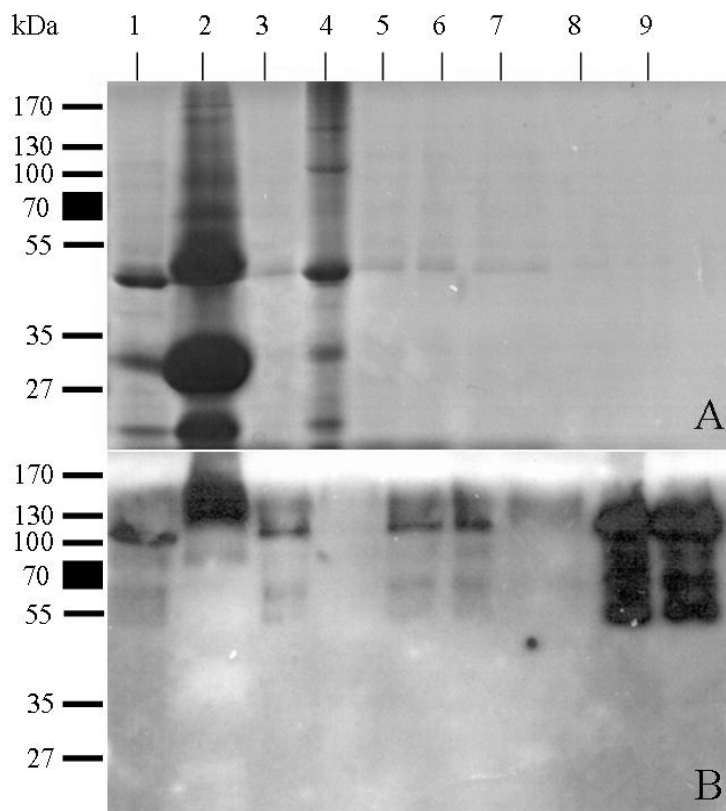


Abb. 27: Analyse der maßstabsvergrößerten Reinigung (Inverse Transition Cycling) von SO1-100xELP aus Tabaksamen (50g) mittels Coomassiefärbung (A) und Western-blot (B).

1: Rohextrakt; 2: Pellet Rohextrakt; 3: Überstand Hitzebehandlung; 4: Pellet Hitzebehandlung; 5: Filter 1; 6: Filter 2; 7: Überstand Salzfällung; 8: Pellet Salzfällung; 9: Sterilfiltrat. Markierung (in B) mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Dazu wurde das Fett zunächst durch einen Faltenfilter und anschließend durch einen Membranfilter (0,45µm) von der Proteinlösung abgetrennt. Mittels dieser Filterschritte wurde die optische Dichte der Proteinlösung bei 600nm von über 4 auf 1,7 und schließlich auf 0,4 reduziert. Die abschließende Analyse der Reinigung wurde sowohl mit Hilfe des Western

3 Ergebnisse

blots (Abb. 27B) als auch durch Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau vorgenommen (Abb. 27A), da das verwendete Spinnenseiden-Fusionsprotein nicht mit Coomassie-Brilliant-Blau und nur minimal im Silbergel färbbar ist. Daher wurden Kontaminationen mittels Coomassie-Färbung, bzw. Silberfärbung visualisiert, während die Ausbeute an Spinnenseiden-Fusionsprotein im Western blot bewertet werden musste. Neben der höheren Nachweisgrenze ist auch die Coomassie-Färbereaktion selbst denkbar ungeeignet, um Spinnenseiden-ELP-Fusionen anzufärben, da sowohl SO1 als auch ELP kaum basische oder aromatische Aminosäuren enthalten. Die Analyse des modifizierten Reinigungsverfahrens mittels Western blot zeigte kaum Verluste im gesamten Verlauf der Reinigung (Abb. 27B). Es waren keine nennenswerten Proteinbanden im Pellet des Rohextrakts (Abb. 27B, Bahn 2), im Pellet der Hitzebehandlung (Abb. 27B, Bahn 4), oder im Überstand der Salzfällung (Abb. 27B, Bahn 7) erkennbar. Die finalen Banden (Abb. 27B, Bahn 8 und 9) wurden in dieser Analyse 20-fach stärker konzentriert als die übrigen Banden, um etwaige Kontaminationen mit Hilfe der Coomassiefärbung (Abb. 27A) besser nachweisen zu können.

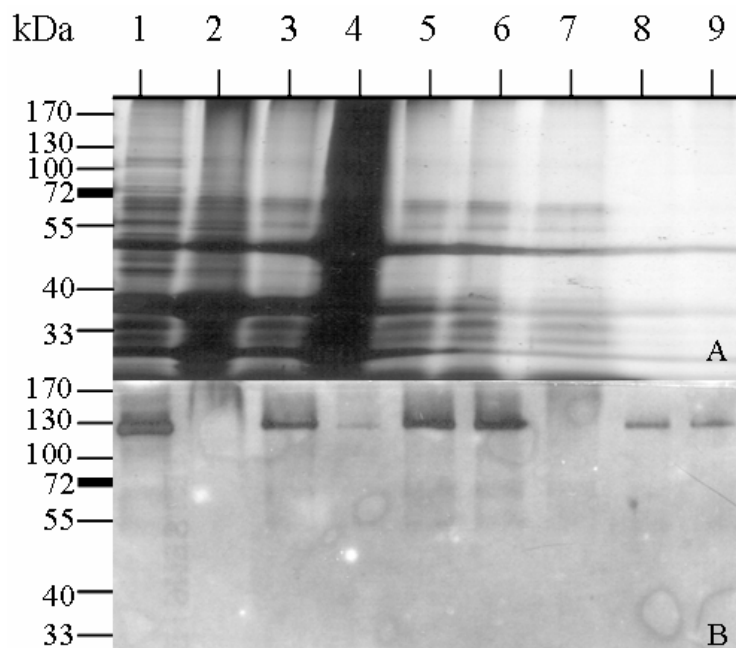


Abb. 28: Analyse der modifizierten Reinigung von SO1-ELP aus Tabaksamen (50 g) mittels Silberfärbung (A) und Western blot (B).

1: Rohextrakt; 2: Pellet Rohextrakt; 3: Überstand Hitzebehandlung; 4: Pellet Hitzebehandlung; 5: Filter 1; 6: Filter 2; 7: Überstand Salzfällung; 8: Pellet Salzfällung; 9: Sterilfiltrat. Markierung (in B) mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Doch trotz der Konzentrierung des Endprodukts waren keine Banden in der Coomassiefärbung sichtbar. Proteinbanden waren vermehrt im Pellet des Rohextraktes (Abb. 27A, Bahn 2) sowie im Pellet der Hitzebehandlung (Abb. 27A, Bahn 4) zu erkennen.

Um die während der Reinigung auftretenden Verluste zu verdeutlichen, wurden die Proben in vergleichbaren Volumina auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Western blot und Silberfärbung analysiert (Abb. 28). Im silbergefärbten Proteingel (Abb. 28A) sind zu Beginn der Reinigung starke Kontaminationen sichtbar. Insbesondere in den ersten Pelletfraktionen, also in den Pellets des Rohextraktes und der Hitzebehandlung, sind starke Proteinbanden sichtbar. Die Filterschritte zur Eliminierung des Fettanteils haben keinen erkennbaren Einfluss auf die verbliebenen Proteinbanden (Abb. 28A, Bahn 5 und 6). Die abschließende Salzfällung hingegen trennt effektiv das Spinnenseiden-Fusionsprotein von den verbliebenen Samenproteinen. Während die Samenproteine im Überstand (Abb. 28A, Bahn 7) verbleiben, wird das Spinnenseiden-Fusionsprotein nahezu vollständig ausgefällt (Abb. 28B, Bahn 8). Allerdings konnte auch im Silbergel keine sichtbare Anfärbung des Spinnenseiden-Fusionsproteins erreicht werden.

Der Vergleich des Rohextraktes (Abb. 28B; Bahn 1) mit dem Sterilfiltrat des resolubilisierten Proteinpellets (Abb. 28B; Bahn 8) zeigte den erwarteten Proteinverlust. Allerdings war dieser Verlust, wie bereits erwähnt, nicht auf eine unvollständige Fällung zurückzuführen, da in den Proben aus zu verwerfenden Phasen (Pellet Rohextrakt, Abb. 28B; Bande 2; Pellet Hitzebehandlung, Abb. 28B; Bande 4; Überstand Salzfällung, Abb. 28B; Bande 7) kaum Spinnenseiden-Proteinbanden sichtbar waren. Auch waren keine Abbaubanden erkennbar, was auf Proteaseaktivität oder Hitzeinstabilität hindeuten würde. Eine schwache Spinnenseiden-Proteinbande und damit ein Verlust ist im Pellet der Hitzebehandlung sichtbar (Abb. 28B, Bahn 4). Demzufolge wurde nach der ersten Proteindenaturierung nicht das gesamte transgene Protein wieder in Lösung gebracht und ging damit verloren. Schließlich treten weitere Verluste während der Salzfällung auf, obwohl, wie bereits erwähnt, im entsprechenden Überstand keine Bande des transgenen Proteins sichtbar ist (Abb. 28B, Bahn 7). Ein Verlust während dieses Verfahrensschrittes ist also nicht auf eine unvollständige Fällung sondern wahrscheinlich auf Proteinabbau zurückzuführen. Da andererseits keine Abbaubanden im Pellet der Salzfällung (Abb. 28B, Bahn 8) sichtbar sind, muss ein etwaiger Abbau nahezu vollständig und ohne Zwischenprodukte verlaufen.

3 Ergebnisse

3.1.5.2 Filterbasierte Reinigung

Eine alternative Reinigungsmethode basiert auf der Arbeit von Ge et. al. 2006), in deren Verlauf erfolgreich ELP-Fusionsproteine aus einer Bakteriensuspension gereinigt werden konnten (Ge et. al. 2006). In diesem Verfahren wird, ebenso wie bei der ITC-Methode, die kontrollierte und reversible Ausfällung von ELP-Fusionproteinen zur Trennung des transgenen Proteins von Verunreinigungen verwendet. Im Falle der filterbasierten Reinigung wurden die durch Salzzugabe aggregierten ELP-Fusionproteine allerdings nicht abzentrifugiert, sondern mittels 0,2µm Zelluloseacetatfiltern vom Suspensionsmedium abgetrennt. Anschließend wurden die auf der Filteroberfläche zurückgehaltenen Proteinaggregate durch Zugabe eines salzfreien Lösungsmittels in Lösung gebracht und von der Filteroberfläche gewaschen. Dieses Prinzip wurde auch zur Reinigung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen aus dem Rohextrakt von Tabaksamen erprobt (Abb. 29). Im Western blot wurde erkennbar, dass das Spinnenseiden-Fusionsprotein nicht vollständig vom Filter zurückgehalten wird, sondern dass ein Großteil der Proteinmenge im Durchlauf verblieb (Abb. 29, Bahn 2). Ebenso wurde ein Teil des Proteins bei den folgenden Waschschrritten ausgespült. Das erste Eluat (Abb. 29, Bahn 5) war erkennbar höher konzentriert als die Waschfraktionen, es fand also eine Anreicherung statt.

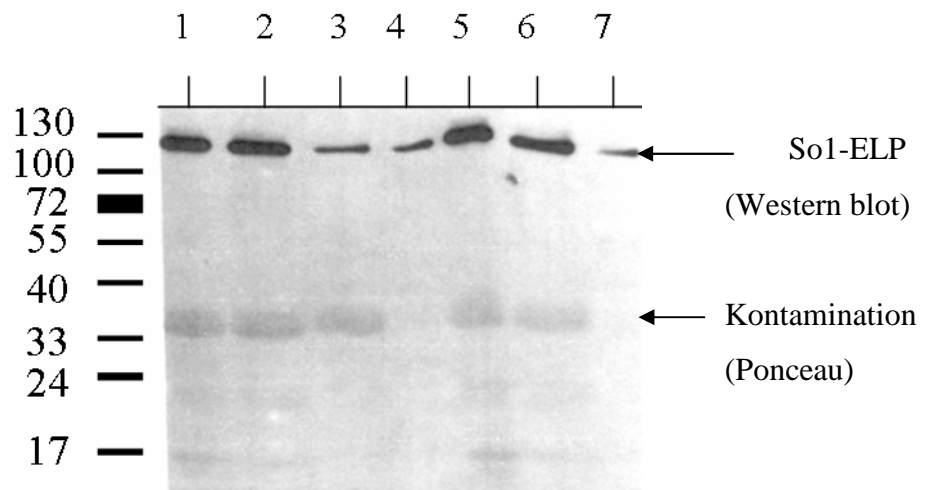


Abb. 29: Analyse der Filterreinigung des Spinnenseiden-Fusionsproteins SO1-100xELP mittels Western blot und Ponceaufärbung.
1: Rohextrakt; 2: Durchlauf; 3: Waschschr. 1; 4: Waschschr. 2; 5: Eluat 1;
6: Eluat 2; 7: Eluat 3. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Aufgrund der geringen Probenmengen konnte kein zweites Gel mit ausreichenden Proteinmengen beladen werden, um eine Coomassiefärbung durchzuführen. Daher wurden die auf der im Western blot analysierten Membran gebundenen Proteine mittels Ponceaurot angefärbt.

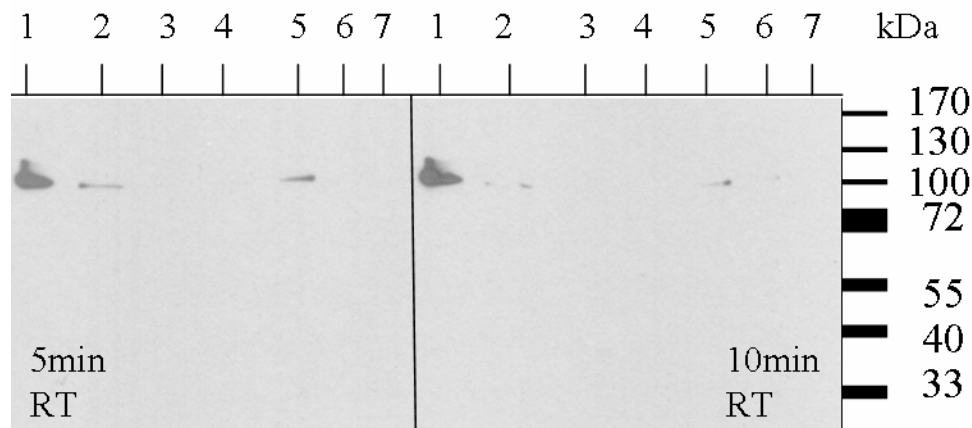


Abb. 30: Western blot-Analyse der Filterreinigung von SO1-100xELP mit erhöhter Inkubationszeit (10 min).

1: Rohextrakt; 2: Durchlauf; 3: Waschschrift 1; 4: Waschschrift 2; 5: Eluat1; 6: Eluat 2; 7: Eluat 3. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

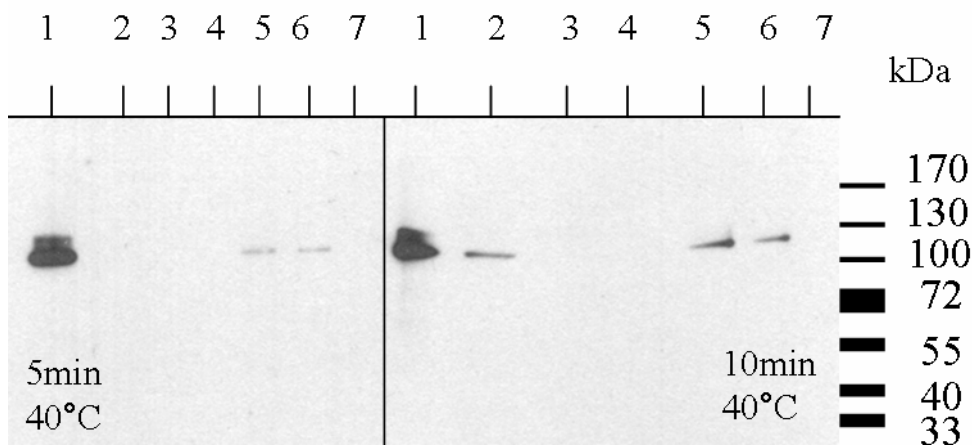


Abb. 31: Western blot-Analyse der Filterreinigung von SO1-100xELP mit erhöhter Inkubationstemperatur (40°C) und -zeit (10 min).

1: Rohextrakt; 2: Durchlauf; 3: Waschschrift 1; 4: Waschschrift 2; 5: Eluat1; 6: Eluat 2; 7: Eluat 3. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Die Ponceaufärbung zeigte eine Verteilung der Kontaminationen analog zur Verteilung des transgenen Proteins: ein Großteil verblieb im Durchfluss, in der ersten Waschfraktion war

3 Ergebnisse

eine deutliche Bande erkennbar und auch in den Eluaten 1 und 2 waren Kontaminationen vorhanden. Eine Trennung von Kontaminationen und transgenem Protein konnte also nicht erreicht werden. Eine Erhöhung der Inkubationszeit bewirkte keine Erhöhung der Ausbeute (Abb. 30). Allerdings wurde in diesem Versuch deutlich, dass ein Großteil des Proteins weder im Durchlauf noch in den Wasch- oder Eluatfraktionen nachweisbar war, also möglicherweise auf dem Filter verblieb. Die Erhöhung der Inkubationstemperatur (Abb. 31) lieferte ebenfalls keine klare Verbesserung der Ausbeute. Wieder war ein Proteinverlust im Verlauf der Reinigung vom Rohextrakt zu den Eluatfraktionen erkennbar.

Die weitere Erprobung der filterbasierten Reinigung wurde daraufhin als wenig erfolgversprechend bewertet und eingestellt.

3.1.5.3 Semiquantitative Auswertung des Reinigungsverfahrens

Um abschätzen zu können, welche biotechnische Kapazität ein „Expressionssystem Tabaksamen“ aufweist, war es wichtig, die Ergebnisse der Reinigungen einer semiquantitativen Analyse zu unterziehen. Nach drei durchgeführten Reinigungen im Großmaßstab (50g) wurden die resolubilisierten Proteinpellets dialysiert und die finalen Proben anhand eines geeigneten Standards quantifiziert (Abb. 32).

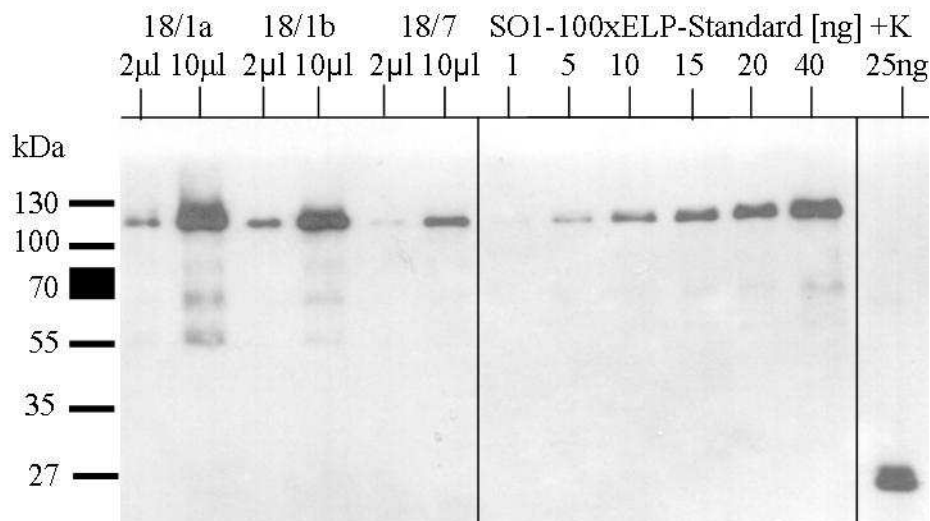


Abb. 32: Semiquantitative Auswertung der Samenlinien 18/1 a und b sowie 18/7.

Je 2µl und 10µl gereinigtes Spinnenseidenprotein wurden mit definierten Standardmengen verglichen und so quantifiziert. Das Ergebnis der Auswertung ist aus Tabelle 10 (Seite 59) ersichtlich. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

3 Ergebnisse

Der verwendete Standard ist SO1-100xELP aus Tabakblättern. Das Fusionsprotein wurde gereinigt, lyophilisiert und gewogen. Eine definierte Menge wurde anschließend in einem definierten Volumen SDS-Probenpuffer gelöst und in verschiedenen Volumina im Western blot mit den zu quantifizierenden Proben des Spinnenseidenproteins aus Samen verglichen. Die Probenbande wurde mit der Standardbande gleicher Stärke gleichgesetzt. Die so abgelesene Proteinmenge wurde anschließend auf das jeweilige Probenvolumen (2µl bzw. 10µl) bezogen und so eine vergleichbare Konzentration bestimmt. Aus beiden Proben wurde anschließend der entsprechende Durchschnittswert für die Reinigungsprobe errechnet. Allerdings stellte sich das Problem, dass die Analyse der Proben 18/1a -10µl und 18/1b-10µl zu einer höheren Signalstärke führten als die Analyse der maximalen Standardprobe (40ng). Dies erschwert die Bestimmung der Konzentrationen und verfälscht den Durchschnittswert.

Tab. 10: Konzentrationsbestimmung der gereinigten Spinnenseidenproteine anhand der ersten semiquantitativen Western blot-Analyse (Abb. 32).

| Bezeichnung der gereinigten Samenlinie | Konzentration (2µl) [ng/µl] | Konzentration (10µl) [ng/µl] | Durchschnitt [ng/µl] |
|--|-----------------------------|------------------------------|----------------------|
| 18/1a | 5 | >4 | >4 |
| 18/1b | 5 | >4 | >4 |
| 18/7 | <0,5 | 1,5 | 1< |

Aus diesem Grund wurde der semiquantitative Western blot mit der Probe 18/1a wiederholt. Ein weiteres Probenvolumen (0,5µl) wurde aufgetragen, um mit wenigstens zwei Proben innerhalb der Standardmengengrenzen zu bleiben. Darüber hinaus wurden ebenso zwei Proben des entsprechenden Rohextraktes der Probe 18/1a aufgetragen, um so die Ausbeute der Reinigung bestimmen zu können (Abb. 33).

Bei der weiteren Auswertung der Analyse ist allerdings zu beachten, dass das gereinigte Spinnenseidenprotein in einem geringeren Volumen gelöst wurde als der Rohextrakt (20-fach konzentriert gegenüber dem Rohextrakt). Dieser Unterschied wurde rechnerisch berücksichtigt, indem die errechnete Konzentration des Pellets durch den entsprechenden Faktor 20 geteilt wurde (Tab. 11).

3 Ergebnisse

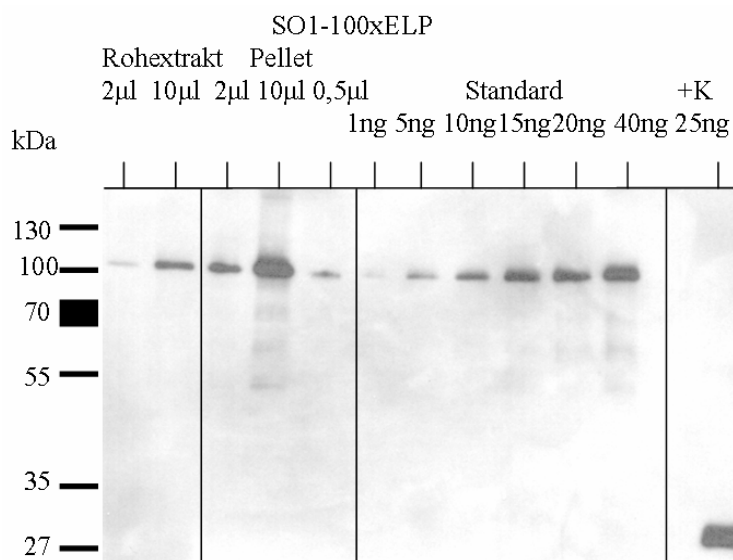


Abb. 33: Vergleich von SO1-100xELP im Rohextrakt und gereinigtem SO1-100xELP aus Tabaksamen der Linie 18/1a mit So1-100xELP-Standard (gereinigt aus Tabakblättern) mittels Western blot-Analyse. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Die 10µl-Probe wurde erneut aus der Berechnung ausgeschlossen, da die Menge transgenen Proteins dieser Probe oberhalb des definierten Standardbereichs lag. Die durchschnittlich gereinigte Proteinmenge entsprach einer Ausbeute von 44% der ursprünglich im Rohextrakt vorhandenen Proteinmenge (Tab. 11).

Tab. 11: Konzentrationsbestimmung der gereinigten Spinnenseidenproteine anhand der zweiten semiquantitativen Western blot-Analyse und Bestimmung der Reinigungsausbeute (Abb. 33).

| | Rohextrakt | Pellet (20-fach konzentriert) |
|------------------------------------|---------------------------|--|
| Konzentration (2µl) [ng/µl] | (1ng/2µl) 0,5 | (15ng/2µl) 7,5 |
| Konzentration (10µl) [ng/µl] | (15ng/10µl) 1,5 | (>40ng/10µl) außerhalb des Standards >4: |
| Konzentration (0,5µl) [ng/µl] | Nicht aufgetragen | (5ng/0,5µl) 10 |
| Durchschnittskonzentration [ng/µl] | 1 | 8,75 (20x konz.) Korrigiert: 0,4 (1x konz.) |
| Konzentration im Samen [µg/g] | 4 | 1,75 |
| Ausbeute [%] | 44% | |

3.2 Posttranslationale Polymerisierung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen

Die bisher verwendeten Spinnenseidenkonstrukte kodieren Proteine, die wesentlich kleiner sind als native Spinnenseidenproteine. Die genetische Instabilität der hochrepetitiven Sequenzen dieser Konstrukte limitiert die transgen herstellbare Proteingröße. Um die Größe der transgenen Spinnenseidenproteine dennoch weiter zu steigern, wurde im Rahmen dieser Arbeit die posttranslationale Multimerisierung von Spinnenseidefusionsproteinen mittels bakterieller Transglutaminase etabliert. Auch native Spinnenseidenproteine werden in den Spinndrüsen miteinander auf eine ähnliche Art und Weise verknüpft, wodurch die transgenen Proteine nicht nur in ihrer Größe, sondern gegebenenfalls auch strukturell den nativen Spinnenseidenproteinen weiter angeglichen werden.

3.2.1 Konstruktion der Spinnenseiden-Fusionsgene mit Transglutaminasemarken

Zur Durchführung der Transglutaminase-vermittelten Dimerisierung wurden verschiedene Konstrukte (MaSp1 und MaSp2, SO1, SO1-100xELP sowie 100xELP) ausgewählt und mit Glutamin- bzw. Lysin-Marken versehen (Aufbau der Dimerisierungsmarken siehe Tabelle 12). Dazu wurden die Dimerisierungsmarken als Einzelstrang-DNS synthetisiert und ligiert. Die etablierten Spinnenseidenkonstrukte für ubiquitäre Expression wurden entsprechend der überhängenden Enden der Marken mit BamHI zwischen Signalpeptid und Fusionsprotein geschnitten und mit den Marken ligiert.

Tab. 12: DNS- und Aminosäuresequenzen der Dimerisierungsmarken (Bindungsstellen rot markiert)

| Marke | DNS-Sequenz | Aminosäuresequenz |
|----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Glutamin | gatccggctctggaatggctgaaacggccgca | S G S G M A E T A A A A F E R Q H |
| | gcggctttcgaaagacagcatatggattctg | M D |
| Lysin | gatccggctctggaatgaaggaaacggccgca | S G S G M K E T A A A R F E R N H |
| | gcgagattcgaaagaaacatattggattctg | M D |

Die Expression der neuen Konstrukte erfolgte sowohl transient als auch stabil im Blatt, um möglichst frühzeitig genügende Proteinmengen für erste Verknüpfungsversuche zur Verfügung zu haben. Auch diese Konstrukte wurden mit einem LeB4-Signalpeptid und einem

3 Ergebnisse

Retentionssignal versehen, um die Expression und Retention im Endoplasmatischen Retikulum und damit eine möglichst gute Produktstabilität sicherzustellen.

Tab. 13: Aufbau der Konstrukte mit Transglutaminasemarken.

| Promotor | Signalpeptid | Spidroin | Fusionsprotein | Nachweismarke (Western blot) | Dimerisierungsmarke |
|----------|--------------|----------|----------------|---------------------------------|---------------------|
| CaMV35S | LeB4 | - | 100xELP | c-myc | Lysin |
| CaMV35S | LeB4 | MaSp1 | 100xELP | c-myc | Lysin |
| CaMV35S | LeB4 | MaSp1 | 100xELP | c-myc | Glutamin |
| CaMV35S | LeB4 | SO1 | - | c-myc | Lysin |
| CaMV35S | LeB4 | MaSp2 | - | c-myc | Glutamin |

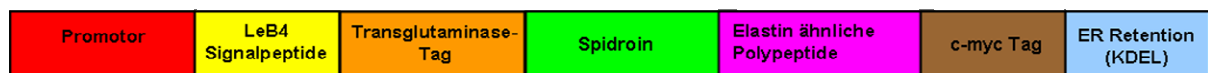


Abb. 34: Schematische Darstellung der Spinnenseidenkonstrukte mit Transglutaminasemarken.

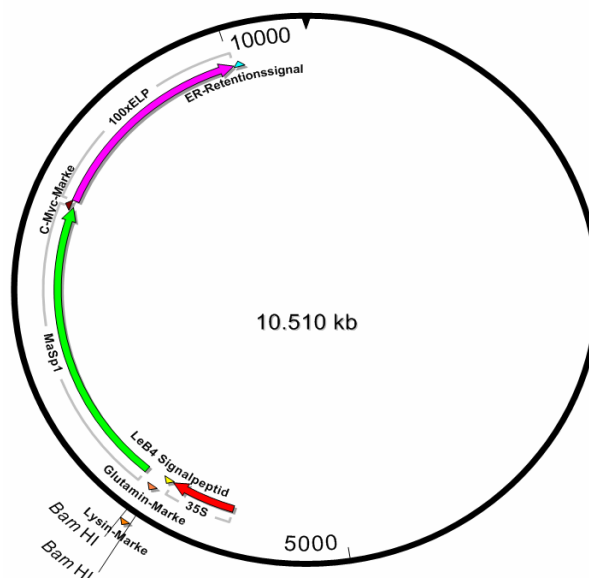


Abb. 35: Plasmidkarte pCB301-Kan MaSp1-ELP+Glu bzw.+Lys.

Spinnenseiden-Fusionsprotein MaSp1-100xELP mit Lysin- bzw. Glutamin-Marke im Expressionsvektor pCB 301 Kan unter Kontrolle des ubiquitären CaMV-32S-Promotors. Die Dimerisierungsmarke wurde jeweils mittels *Bam*HI-Restriktion in das bestehende Konstrukt eingefügt.

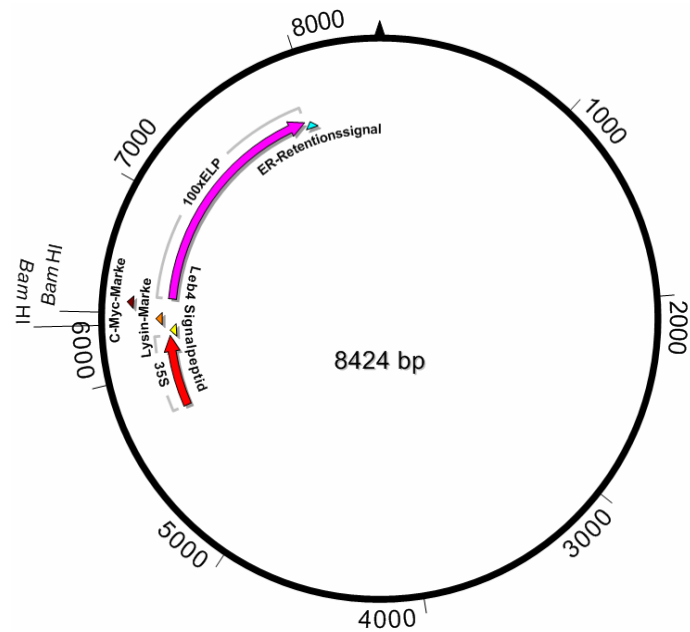


Abb. 36: Plasmidkarte pCB301-Kan MaSp1-ELP+Glu bzw.+Lys.
 Spinnenseiden-Fusionsprotein MaSp1-100xELP mit Lysin- bzw. Glutamin-Marke im Expressionsvektor pCB 301 Kan unter Kontrolle des ubiquitären CaMV-32S-Promotors. Die Dimerisierungsmarke wurde jeweils mittels *Bam*HI-Restriktion in das bestehende Konstrukt eingefügt.

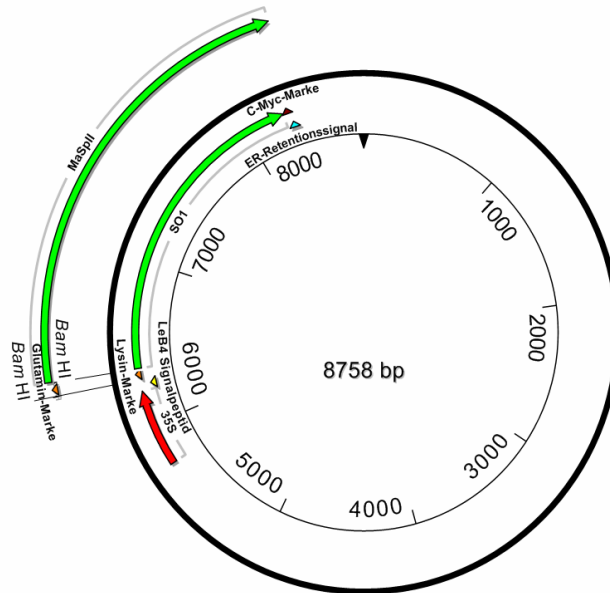


Abb. 37: Plasmidkarte pCB301-Kan MaSp1-ELP+Glu bzw.+Lys.
 Spinnenseiden-Fusionsprotein MaSp1-100xELP mit Lysin- bzw. Glutamin-Marke im Expressionsvektor pCB 301 Kan unter Kontrolle des ubiquitären CaMV-32S-Promotors. Die Dimerisierungsmarke wurde jeweils mittels *Bam*HI-Restriktion in das bestehende Konstrukt eingefügt.

3 Ergebnisse

3.2.2 Transiente Expression von Spinnenseidenproteinen mit Transglutaminasemarken

Zur Kontrolle wurden die Konstrukte mit Transglutaminasemarken transient exprimiert und mittels Western blot analysiert (Abb. 29). Alle transgenen Proteine zeigten die erwartete Größe (1, 2: ca. 120 kDa; 3: ca. 60 kDa, 4, 5: ca. 70 kDa). Die hier gezeigten Konstrukte wurden anschließend für stabile Transformationen verwendet. Bis zur Ernte der stabil transformierten Tabakpflanzen (*N. tabacum*) wurde die transiente Transformation mehrfach wiederholt, um genügend Proteinmaterial zur Durchführung erster Dimerisierungsversuche bereitzustellen. Das so gewonnene Material wurde gemäß der etablierten Inverse Transition Cycling-Methode gereinigt.

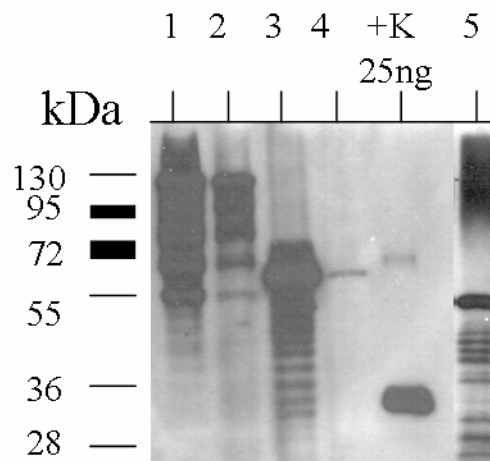


Abb. 38: Nachweis von transient exprimierten Spinnenseiden-Fusionsproteinen mit Transglutaminasemarken mittels Western blot-Analyse.
1: MaSp1-100xELP+Lysinmarke; 2: MaSp1-100xELP+Glutaminmarke; 3: 100xELP +Lysinmarke; 4:MaSp2+Glutaminmarke; 5: SO1+Lysinmarke. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

3.2.3 Stabile Transformation der Spinnenseiden-Fusionsproteine mit Transglutaminasemarken

Zur weiteren Produktion von Spinnenseiden-Fusionsproteinen mit Transglutaminasemarken wurden nach erfolgreicher transienter Erprobung stabile Transformationen in Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) durchgeführt.

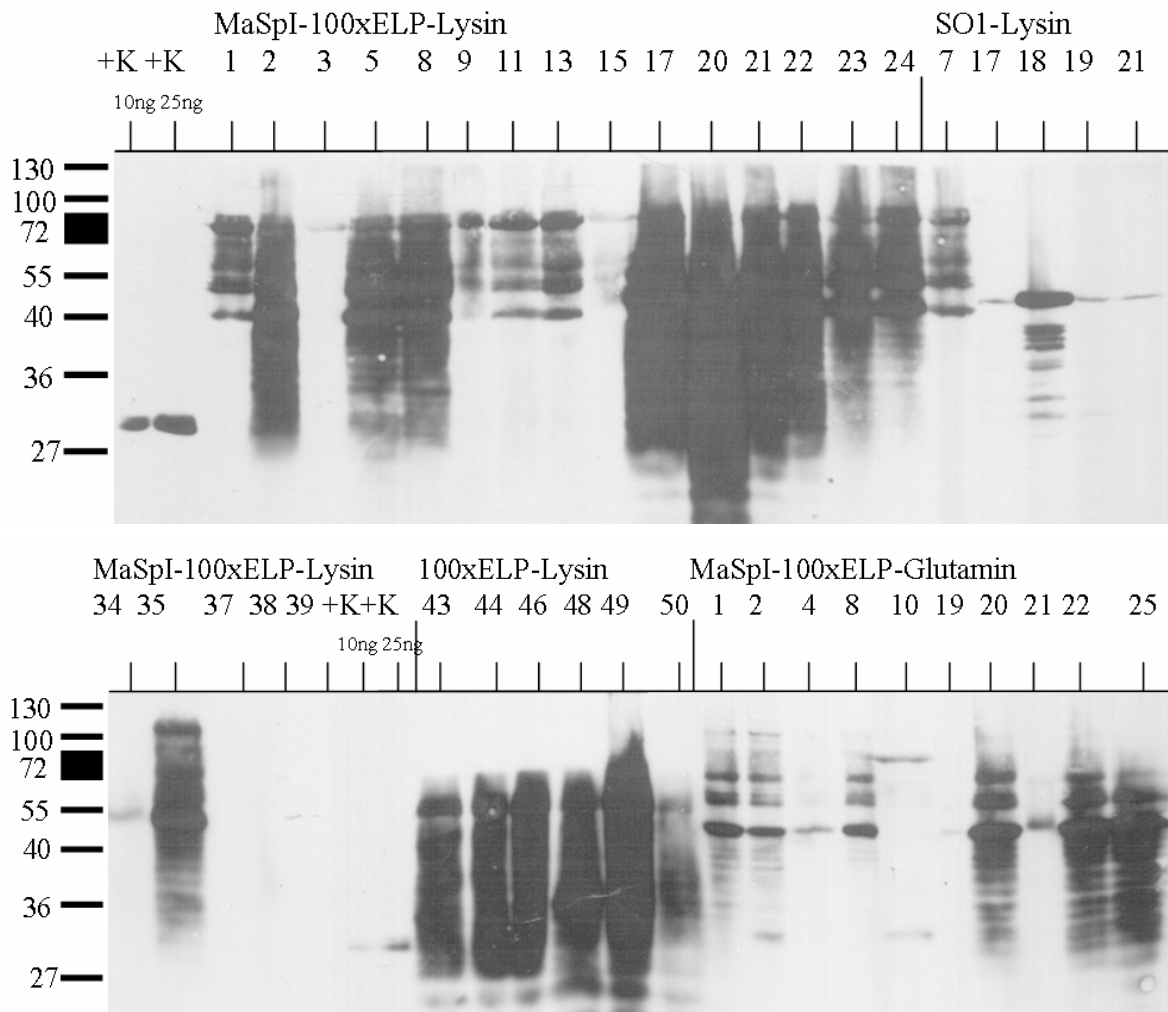


Abb. 39: Nachweis der Expression verschiedener Spinnenseiden-Fusionsproteine mit Transglutaminase-Marken mittels Western blot-Analyse. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Proben der regenerierten Pflanzen wurden zum frühestmöglichen Zeitpunkt genommen und im Western blot analysiert (Abb. 39). Zahlreiche das Transgen exprimierende Linien wurden bestimmt und zu gegebener Zeit geerntet. Weiterführende Reinigungen und Dimerisierungsversuche der stabil exprimierten Spinnenseiden-Fusionsproteine konnten aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden.

3.2.4 Polymerisierung mittels bakterieller Transglutaminase

Transglutaminasen katalysieren die Bildung kovalenter Bindungen zwischen einem primären Amin, wie zum Beispiel Lysin, und der Säureamidgruppe von in Proteinen inkorporiertem

3 Ergebnisse

Glutamin. Die Verknüpfung ist insensitiv gegen proteolytischen Abbau und wird bereits als industrielles Standardverfahren im Bereich der Lebensmitteltechnologie zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von Milch- und Fleischprodukten genutzt.

Im Rahmen des Projektes wurden Transglutaminasen von zwei Herstellern (Ajinomoto, N-Zyme) verwendet. Die Ajinomoto-Transglutaminase ist für die lebensmitteltechnische Anwendung gedacht, wohingegen die Transglutaminase der Firma N-Zyme als Laborchemikalie vertrieben wird. Zunächst wurde die enzymatische Aktivität der Transglutaminase photometrisch gemessen (Tab. 14).

Tab. 14: Photometrischer Nachweis der enzymatischen Aktivität von Transglutaminase.

| Probe | Konzentration [U/ml] | Absorption bei 525nm |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Ajinomoto | 0,25 | 0,151 |
| Ajinomoto | 0,25 | 0,197 |
| N-zyme | 0,25 | 0,235 |
| N-zyme | 0,25 | 0,172 |
| -Kontrolle | 0 | -0,031 |
| -Kontrolle | 0 | 0,010 |
| N-zyme (+1M Cystein) | 0,25 | 0,049 |

Die Aktivität der Transglutaminase beider Hersteller wurde eindeutig nachgewiesen (Kapitel 2.2.12). Ebenso wurde die kompetitive Inhibition mittels Cystamin erfolgreich durchgeführt.

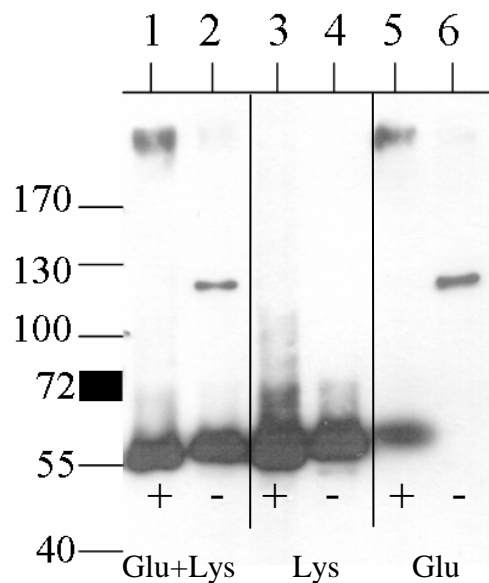


Abb. 40: Posttranslationale Polymerisierung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen mit bakterieller Transglutaminase (N-Zyme).

1: 240µl ELP-Lysin+240µl Masp1-ELP-Glutamin+20µl Transglutaminase (0,05 U/µl); 2: 240µl ELP-Lysin+240µl Masp1-ELP-Glutamin+20µl ddH₂O; 3: 480µl ELP-Lysin +20µl Transglutaminase (0,05 U/µl); 4: 480µl ELP-Lysin +20µl ddH₂O; 5: 480µl Masp1-ELP-Glutamin+20µl Transglutaminase (0,05 U/µl); 6: 480µl Masp1-ELP-Glutamin+20µl ddH₂O. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (10% PAA).

Die Analyse der ersten erfolgreichen Dimerisierung von 100xELP und MaSp1-100xELP mittels bakterieller Transglutaminase zeigt die Bildung einer Proteinbande oberhalb von 250 kDa, die nicht bei der Inkubation ohne Transglutaminase bzw. bei der Inkubation ohne MaSp1-100xELP zu sehen war (Abb. 40). Wider Erwarten zeigte sich diese Bande jedoch auch bei der Inkubation von MaSp1-100xELP-Glutamin ohne Zugabe des zweiten Monomers 100xELP-Lysin. Dies deutet auf Homodimerisierungen zwischen MaSp1-100xELP-Glutamin-Monomeren unabhängig von der zweiten Dimerisierungsmarke hin. Um auszuschließen, dass die Bildung der Dimerbande unabhängig von der Transglutaminase erfolgt, wurde dieser Ansatz um eine weitere Negativkontrolle erweitert. Dazu wurde neben Transglutaminase Cystamin als kompetitiver Inhibitor zugegeben (Abb. 41). Auch in diesem Experiment zeigte sich die gewohnte Bande oberhalb von 250 kDa, wohingegen die Dimerbande in der Negativkontrolle ohne Transglutaminase kaum sowie im Inhibitionsansatz nicht sichtbar war. Eine extrem schwache Dimerisierung ist also ohne Inhibition auch ohne Zugabe von Transglutaminase erkennbar.

3 Ergebnisse

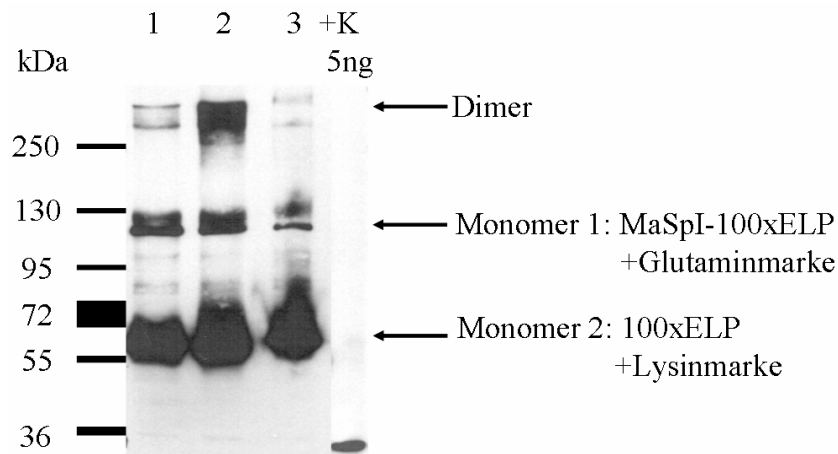


Abb. 41: Western blot-Analyse der posttranslationalen Polymerisierung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen mit bakterieller Transglutaminase (N-Zyme).
1: ELP-Lysin + Masp1-ELP-Glutamin; 2: ELP-Lysin+Masp1-ELP-Glutamin + Transglutaminase (N-zyme, 2U/ml); 3: ELP-Lysin+Masp1-ELP-Glutamin + Transglutaminase (N-zyme 2U/ml)+1M Cystamin. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (8% PAA).

Bei allen hier durchgeführten Versuchen muss beachtet werden, dass der Elektrotransfer von derart großen Proteinen im Western blot meist nicht ohne Verluste durchgeführt werden kann. Es ist daher anzunehmen, dass Verhältnis der Signalstärken im Western blot nicht das Verhältnis der Monomerkonzentrationen zur Dimerkonzentration wiedergibt.

Die Polymerisierung verschiedener Monomere mit Dimerisierungsmarken lieferte einige unerwartete Ergebnisse (Abb. 42). Während MaSp1-ELP-Monomere (jeweils mit Glutamin- bzw. Lysinmarken, Bahn 1 und 2) bei Zugabe von Transglutaminase (Bahn 1) größere Dimere oberhalb von 250 kDa bildeten, bewirkte die Zugabe von Transglutaminase zu MaSp1-Elp-Lysin und MaSp2-Glutamin keinerlei Dimerisierung (Bahn 3 und 5). Eine schwache Dimerbande war im Falle von MaSp1-ELP-Glutamin und ELP-Lysin sichtbar, eine wesentlich stärkere Bande jedoch im Falle von MaSp1-ELP-Lysin und ELP-Lysin. Diese Banden befanden sich ebenfalls oberhalb von 250 kDa, obwohl das Monomer ELP-Lysin eine Größe von lediglich ca. 50 kDa aufweist und damit ein Heterodimer mit MaSp1-ELP bei ca. 150 kDa liegen würde. Zur Überprüfung einer möglichen Homodimerisierung wurden die Monomere MaSp1-ELP-Glutamin (Bahn 3) und MaSp1-ELP-Lysin (Bahn 6) getrennt mit Transglutaminase inkubiert. In diesen Fällen war eine diffuse Bande oberhalb von 130 kDa sichtbar. Diese diffuse Bande war deutlich stärker im Falle von MaSp1-ELP-Lysin. Eine

mögliche Erklärung für diese unspezifischen Dimerisierungen liefert die Aminosäuresequenz der Spinnenseiden-Fusionsproteine. Die für die Bildung der kovalenten Bindungen notwendigen Lysin- und Glutaminreste sind auch außerhalb der Dimerisierungsmarken vorhanden. Allerdings ist nicht geklärt, inwieweit diese innerhalb der repetitiven Sequenz gelegenen Aminosäuren zugänglich sind und damit für die Bildung der kovalenten Bindungen zur Verfügung stehen. Dabei ist zu beachten, dass Glutamin vermehrt in SO1, MaSp1 und MaSp2 auftritt, wohingegen Lysin lediglich im ER-Retentionssignal aller Fusionsproteine vorhanden ist. Abgesehen von diesem Lysin enthält 100xELP keine vernetzbare Gruppe. Es ist also anzunehmen, dass die Lysine zum limitierenden Faktor der Multimerisierungsreaktion werden.

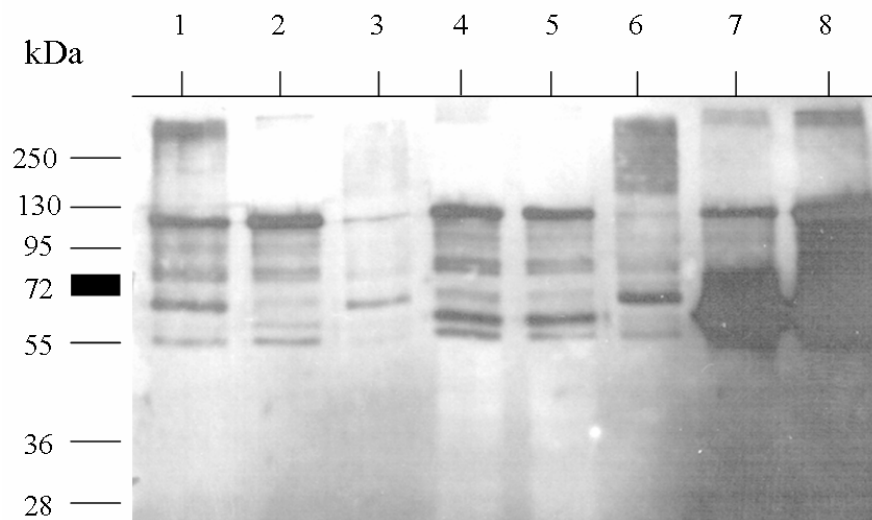


Abb. 42: Western blot-Analyse der posttranslationalen Polymerisierung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen mit bakterieller Transglutaminase (N-Zyme).
 1: MaSp1-ELP-Lysin + Masp1-ELP-Glutamin + Transglutaminase (2U/ml);
 2: MaSp1-ELP-Lysin + Masp1-ELP-Glutamin; 3: Masp1-ELP-Glutamin + Transglutaminase (2U/ml); 4: MaSp1-ELP-Lysin + MaSp2-Glutamin + Transglutaminase (2U/ml); 5: MaSp1-ELP-Lysin + MaSp2-Glutamin; 6: MaSp1-ELP-Lysin + Transglutaminase (2U/ml); 7: MaSp1-ELP-Glutamin + ELP-Lysin + Transglutaminase (2U/ml); 8: MaSp1-ELP-Lysin + ELP-Lysin + Transglutaminase (2U/ml). Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit. Die Auftrennung erfolgte durch SDS-PAGE (8% PAA).

Weitere Unterschiede zwischen den einzelnen Proben können auch auf Unterschiede in den Monomerkonzentrationen zurückzuführen sein.

3 Ergebnisse

3.2.5 Transglutaminase-vermittelte Integration von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Gewebefasern

Neben dem Verspinnen von Spinnenseiden-Fusionsproteinen wurden bereits zahlreiche weitere Methoden zur Nutzbarmachung ihrer positiven Eigenschaften erprobt, so zum Beispiel die Herstellung von Folien und die Beschichtung von Gewebekulturplatten. Eine weitere Anwendung, gerade im Hinblick auf die Transglutaminase-vermittelte Verknüpfung, ist die Verbindung von Seidenproteinen in Textilfasern, wie zum Beispiel Wolle (Cortez et. al. 2007). In diesen Experimenten wurde das bei der Seidenproduktion anfallende Protein Sericin, auch bekannt als Seidenleim, mittels Transglutaminase mit Wollfasern verknüpft. Um diese Methode mit Spinnenseiden-Fusionsproteinen anzuwenden, wurden gereinigte Konstrukte mit Transglutaminasemarken in PBS zu Wollfäden gegeben und nach Zugabe von Transglutaminase 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Fäden sorgfältig mit PBS ausgewaschen, um nicht verknüpfte Proteine zu entfernen. Die beschichteten Fäden wurden nach dem Standardprotokoll für Western blot-Analyse behandelt (Abb. 43).

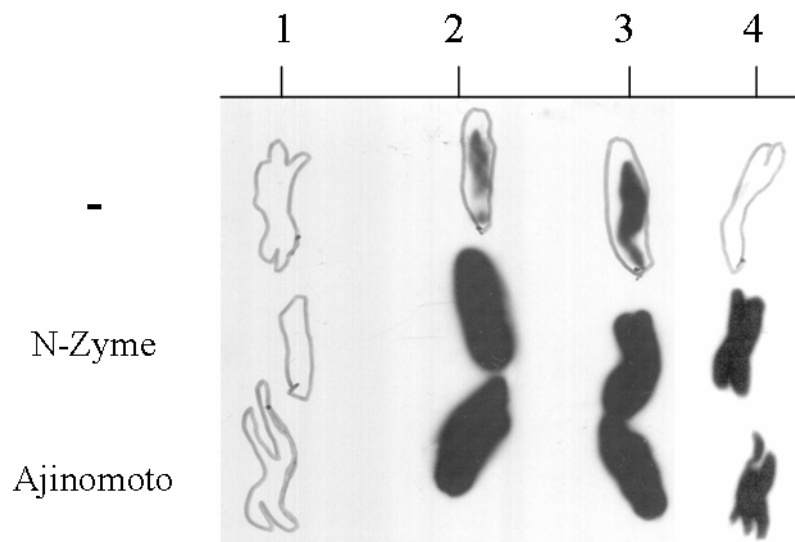


Abb. 43: Western blot-Analyse von Wollfäden nach Inkubation mit Spinnenseiden-Fusionsproteinen und bakterieller Transglutaminase.

1: Negativkontrolle (PBS); 2: 98µl ELP-Lysin+2µl TGase (1U/ml); 3: 49µl MaSp1-ELP-Glutamin + 49µl ELP-Lysin+2µl TGase (1U/ml); 4: Proben Nr. 3 erneut in PBS ausgespült. Markierung mittels c-myc-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper, Detektion mittels ECL-Kit.

3 Ergebnisse

Während in den PBS-Negativkontrollen keinerlei Signal im Western blot sichtbar war, zeigten sich deutliche Signale in den mit Spinnenseidenproteinen inkubierten Wollfäden. Dabei war kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Transglutaminasen erkennbar. Ebenfalls deutliche, wenn auch erheblich schwächere Signale waren bei der Inkubation mit Spinnenseiden-Fusionsproteinen, ohne Zugabe von Transglutaminase sichtbar. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS waren nur noch Signale an den Wollfäden sichtbar, die mit Transglutaminase inkubiert worden waren.

4 Diskussion

4 Diskussion

Die Herstellung von transgenen Proteinen in Pflanzen, insbesondere für medizinische Anwendungen, wird als kostengünstige Alternative zur Herstellung derartiger Proteine in transgenen Tieren oder Zellkulturen angesehen (Daniell et. al. 2001). Zahlreiche Produkte wurden bereits in pflanzlichen Systemen hergestellt und die Liste dieser Produkte wächst ständig weiter (Übersicht bei Horn et. al. 2004; Ma et. al. 2005). In den USA wurde Anfang 2006 ein von der Firma Dow AgroSciences in Tabakzellkultur hergestellter veterinärmedizinischer Impfstoff für den Markt zugelassen (Floss et. al. 2007)

Bei der Herstellung von technischen Materialien in Pflanzen wurde bisher zumeist auf bereits in Pflanzen produzierte Stoffe zurückgegriffen, die in genügend großen Mengen vorliegen. Ein Beispiel hierfür ist die Gewinnung von technischer Stärke zur Herstellung von Bioplastik (Übersicht bei Bastioli 2004). Eine Grundvoraussetzung für die Produktion von technischen Materialien ist die Erhöhung der Produktivität, um einen wirtschaftlich attraktiven Herstellungs- und damit Verkaufspreis zu erreichen. Dies gilt auch für die Produktion von Spinnenseidenproteinen.

Die potentiellen Anwendungsgebiete von Spinnenseiden sind, ebenso wie die Eigenschaften dieser Materialgruppe, sehr weit gefächert. Die Anwendung, die der natürlichen Funktion der meisten Spinnenfäden am nächsten kommt, ist die Herstellung und Verbesserung technischer Fasern. Der Markt für heutige Hochleistungsfasern, namentlich Aramide wie Kevlar®, umfasst eine Produktion von über 30.000 Tonnen pro Jahr und wächst jedes Jahr um 5-10% (10% im Jahr 2007). Bei weiter steigenden Produktionsmengen und steigenden Rohstoffpreisen ist der Versuch einer Herstellung von hochwertigen technischen Fasern aus nachwachsenden Rohstoffen ein wirtschaftlich sinnvolles Projekt. Doch die Anwendbarkeit der Spinnenfasern erstreckt sich darüber hinaus auf zahlreiche weitere Bereiche und wird von Jahr zu Jahr vielfältiger. Die *in vitro*-Züchtung von Nervenfasern (Allmeling et. al. 2006), Verkapselung von Medikamenten (Hermanson et. al. 2007) oder der Bau von Komponenten in mikroelektromechanischen Systemen (Bai et. al. 2006) wurden in den letzten Jahren mit Spinnenseidenproteinen realisiert. Durch die weitere Aufklärung der Sequenzen verschiedener Spinnenseidenproteine und die Evaluierung der Eigenschaften nativer und künstlich erzeugter Spinnenseidenarten werden die Anwendungsmöglichkeiten in den nächsten Jahren voraussichtlich stark erweitert.

Im letzten Jahr wurden die vollständigen Sequenzen der Tragfadenseidenproteine MaSp1 und MaSp2 der Spinnenart *Latrodectus hesperus* (Westliche Schwarze Witwe) veröffentlicht (Ayoub et. al. 2007). Damit ist die Produktion dieser extrem stabilen Proteine erstmals in der vollständigen nativen Form möglich, sofern es gelingt, diese hochrepetitiven Proteine mit der beachtlichen Größe von mehr als 3000 Aminosäuren im Großmaßstab stabil herzustellen. Demzufolge ist zu erwarten, dass die Herstellungsmethoden von Spinnenseidenproteinen in den nächsten Jahren ebenfalls weiter verbessert werden. Allein im Jahr 2007 wurden zahlreiche Patente auf diesem Gebiet eingereicht (Scheibel et. al. 2007; Scheibel 2007; Johansson et. al. 2007; Lewis und Roth 2007).

Bei gegebener starker Nachfrage nach hochwertigen technischen Materialien muss eine kostengünstige Produktion in einem ausreichenden Maßstab etabliert werden. Je nach geplanter Anwendung und Aufbau der experimentell verwendeten Spinnenseidenproteine werden momentan verschiedene Herstellungsverfahren zur Produktion der notwendigen Mengen benutzt. Von einer großindustriellen Herstellung sind jedoch alle Produktionsplattformen noch weit entfernt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Produktionsplattform, *N. tabacum*, wurde zur Herstellung von Proteinen im Labormaßstab und als Modellpflanze zur Bewertung zukünftiger Produktionsplattformen verwendet. Wie bereits erläutert ist die Nutzung von Spinnen als Produktionsplattform nicht möglich. Grundsätzlich ist daher zu fragen, inwieweit pflanzliche Expressionssysteme eine für technische Anwendungen notwendige Produktivität ermöglichen. Das umfasst nicht nur die Expressionshöhe der transgenen Proteine, sondern auch deren Gewinnung und Reinigung. Hierzu zählen auch Möglichkeiten zur Lagerung von Rohprodukten sowie die gesamte Prozessierung. Um diese Fragen zu beantworten, wurden samenspezifische Expressionssysteme für Spinnenseidenproteine experimentell evaluiert. Hier standen die Expressionshöhe, die Lagerstabilität sowie die Extraktion und Anreicherung der transgenen Proteine im Mittelpunkt.

Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der Produktion von Spinnenseidenproteinen ist die enorme Größe dieser Proteine. Dieses Problem stellt sich insbesondere bei der Produktion in Bakterienkulturen. Doch selbst in pflanzlichen Systemen wurde die Herstellung von Spinnenseidenproteinen nativer Größe noch nicht realisiert. Mögliche Lösungen dieser Probleme sind verschiedene Methoden zur posttranslationalen Dimerisierung, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden. Auf diese Weise werden zu ausgedehnte hochrepetitive Sequenzen vermieden, die zu genetischer Instabilität in Agrobakterien führen

4 Diskussion

können. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob Grundbausteine (Module) aus Pflanzen gewonnen und erst ausserhalb der Pflanze zu größeren variablen Endprodukten zusammengefügt werden können.

4.1 Sind Tabaksamen als Produktionsplattform für Spinnenseidenproteine geeignet?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Spinnenseidenkonstrukte erstmals erfolgreich in Tabaksamen exprimiert (Tab. 7, Abb. 12-16). Neben den bereits getesteten Konstrukten LeB4-2xSO1 und LeB4-SO1-ELP (Scheller und Conrad, unveröffentlicht) wurden drei Konstrukte unter der Kontrolle des USP-Promotors verwendet. Diese Konstrukte wurden mittels eines transienten Verfahrens zur Expression von samenspezifischen Konstrukten getestet, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde (Abb. 11). Als Ausgangsverfahren diente die transiente Expression mittels *Agrobacterium tumefaciens* (Janssen und Gardner 1990). Mittels dieses Verfahrens ist der problemlose Test von ubiquitär exprimierten Konstrukten in Tabakblättern möglich (Vaquero et. al. 1999). Durch die Cotransformation mit dem Transkriptionsfaktor FUSCA3 ist es nun möglich, die Expression von samenspezifischen Konstrukten innerhalb von 14 Tagen zu überprüfen. Im Gegensatz dazu war es bisher lediglich möglich, die entsprechenden DNS-Sequenzen zu überprüfen und anschließend mehrere Monate bis zur Samenernte von stabil transformierten Pflanzen abzuwarten, um dann die transgenen Proteine nachzuweisen. Die hier vorgestellte schnelle und unkomplizierte Überprüfung neuer Konstrukte wird bei zukünftigen experimentellen Ansätzen zur samenspezifischen Expression vermehrt Verwendung finden. Nachdem die USP-Konstrukte erfolgreich transient exprimiert werden konnten, wurden alle genannten Konstrukte stabil in *Nicotiana tabacum* transformiert. Nach der Samenernte und der Selektion positiver Linien wurden jeweils zwei Linien vermehrt, um ausreichende Samenmengen für die Maßstabsvergrößerung der Reinigungsmethode zu erzeugen. Bedauerlicherweise konnten aufgrund von experimentellen Problemen lediglich die Linien mit dem Transgen SO1-100xELP unter Kontrolle des LeB4-Promotors in ausreichenden Mengen geerntet werden. Das transgene Protein SO1-100xELP konnte bis zur T₂-Generation mittels Western blot nachgewiesen werden. Weiterführende Nachkommensuntersuchungen wurden bisher nicht durchgeführt. Die im Verlauf der Reinigungsexperimente verwendeten stark exprimierenden Samenlinien unter Kontrolle des LeB4-Promotors wiesen eine Menge von 4µg SO1-100xELP pro Gramm Tabaksamen auf (Tab. 11). Von diesen Samen standen ca. 250 g für die

abschließenden Experimente zur Verfügung, was theoretisch einer Gesamtmenge von 1mg SO1-100xELP entspricht. Im Vergleich dazu konnten in früheren Experimenten, z. B. in Tabakblättern, deutlich höhere Mengen von bis zu 80mg Protein pro Kilogramm Blattmasse (Frischgewicht) erreicht werden (Scheller et. al. 2004). Selbst bei einer Produktion von 1170 kg Samen pro Hektar, wie sie von einigen Tabaksorten erreicht wird (Patel und Parmar 1997), würde sich die Produktionsmenge an SO1-100xELP in Tabaksamen auf etwa 4 g pro Hektar belaufen, was in keiner Weise für eine wirtschaftliche Produktion ausreicht. Allerdings war die Anzahl exprimierender Linien zu gering, um das gesamte Potential dieses Konstruktes in Tabaksamen abschätzen zu können. Eine Erhöhung der Produktionsmenge ist unbedingt notwendig, um eine Produktion von Spinnenseidenproteinen unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten möglich zu machen.

Der in dieser Arbeit verwendete LeB4-Promotor wurde bereits bei der Expression von scFV-ELP-Fusionen in Tabaksamen benutzt (Scheller et. al. 2006). Dabei konnten Produktmengen bis zu 25% TSP erreicht werden. Die hier erreichten Mengen (Tab. 11) entsprechen etwa 0,013% TSP und liegen damit deutlich unter diesem Wert, was auf die Größe und die repetitive Struktur des Spinnenseiden-Fusionsproteins zurückzuführen sein kann. Andererseits wurden bei der Expression von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Tabakblättern unter der Kontrolle des ubiquitären CaMV 35S-Promotors maximale Proteinmengen von 4% TSP im Western blot nachgewiesen (Scheller et. al. 2004). Dies liegt ebenfalls deutlich über den im Samen erreichten Mengen. Eine Instabilität des Fusionsproteins ist auszuschließen, da zu keiner Zeit im Western blot Abbaubanden erkennbar waren. Diesbezüglich ist insbesondere der Langzeitversuch zu beachten (Abb. 20 und 21). Es stellt sich die Frage, ob eventuell Silencing-Effekte für die niedrige Proteinkonzentration verantwortlich sind. Eine Erhöhung der Expression in Tabaksamen könnte durch eine Optimierung des Promotors (Jaeger et. al. 2002) sowie durch die Angleichung der DNS-Sequenz des Spinnenseidenkonstruktes an die Codonnutzung in Tabak erfolgen (Übersicht bei Gustafsson et. al. 2004). Dennoch ist es fraglich, ob im Produktionssystem Tabaksamen eine ausreichende Proteinproduktion etabliert werden kann. Daher ist der Wechsel des Expressionssystems notwendig, um die wirtschaftlich sinnvolle Produktion von Spinnenseidenproteinen zu erreichen. So wäre die Transformation einer Pflanze mit einem höheren Proteingehalt und generell größeren Samen, also höherem Ernteertrag als Tabaksamen ein vielversprechender Ansatz. Erbsen oder Sojabohnen übertreffen mit einer durchschnittlichen Jahresernte von ca. 2500 kg pro Hektar

4 Diskussion

und einem Proteingehalt von bis zu 25% bzw. über 40% Tabak mit einer maximalen Samenernte von 1170 kg und einem Proteingehalt von etwa 10% bei Weitem (Tab. 15).

Tab. 15: Betrachtung der Ausbeute an Samen und Samenprotein verschiedener Kulturpflanzen (Stoger et. al. 2005).

| Spezies | Durchschnittliche jährliche Ernte [kg ha ⁻¹] | Proteinanteil (%) |
|---|--|-------------------|
| Mais (<i>Zea mays</i>) | 8670 | 10 |
| Reis (<i>Oryza sativa</i>) | 7270 | 8 |
| Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>) | 3100 | 13 |
| Weizen (<i>Triticum aestivium</i>) | 2700 | 12 |
| Soja (<i>Glycine max</i>) | 2600* | >40* |
| Erbse (<i>Pisum sativum</i>) | 2500 (max. 4000*) | 20-25* |
| Raps (<i>Brassica napus</i>) | 1500 | 22 |
| Färberdistel (<i>Carthamnus tinctorius</i>) | 1500 | 25 |
| Leindotter (<i>Camelina sativa</i>) | 1100 | 25 |

*: Angaben über Ernte und Proteinanteil von Soja und Erbse aus De Kathen und Pickardt 2005

Ein Wechsel des Expressionssystems für zukünftige Experimente zu diesen Pflanzen ist also durchaus empfehlenswert. Für alle weiteren Expressionsversuche ist die Langzeitstabilität der Spinnenseidenproteine in Tabaksamen zu bewerten, da diese Produktionsplattform als Modellsystem dienen kann. Die Langzeitstabilität der Fusionsproteine im gewählten Expressionssystem ist von entscheidender Bedeutung, um eine Lagerung nach der Ernte bis zur Reinigung bzw. einen kostengünstigen Transport von der Anbaufläche zur Reinigungsanlage zu ermöglichen. Im Falle der Expression von Spinnenseidenproteinen in Tabakblättern erfolgt die Lagerung bei -80°C, was die Anwendbarkeit der Produktionsplattform Tabakblatt an vorhandene Tiefkühlkapazitäten bindet. Kartoffeln wurden ebenfalls als Produktionsplattform getestet. Dabei traten sowohl bei gekühlter Lagerung der Kartoffeln (10°C) als auch bei der anschließenden Reinigung Abbauvorgänge auf, die zu starken Verlusten des exprimierten Fusionsproteins bis hin zum vollständigen Abbau führten. Dieser Abbau begann bereits vor der Ernte in den noch im Boden befindlichen Knollen (C. Münnich und U. Conrad, unpublizierte Daten). Das Produktionssystem Tabaksamen wurde als vielversprechend angesehen, da bereits in früheren Arbeiten die

Langzeitstabilität von Einzelketten-Antikörperfragmenten (scFv) in Tabaksamen nachgewiesen werden konnte (Scheller et. al. 2006). Die starken Unterschiede der Stabilität bei unterschiedlichen Proteinen im selben Expressionssystem haben sich allerdings bereits im Falle der Produktion in der Kartoffelknolle gezeigt. Während bei der Produktion von scFv-Antikörpern in Kartoffelknollen nach 1,5 Jahren Lagerung noch 50% der ursprünglichen Proteinmenge vorhanden waren und problemlos gereinigt werden konnten (Artsaenko et. al. 1998), wurden Spinnenseidenproteine, wie bereits zuvor erwähnt, nahezu vollständig abgebaut. Im Gegensatz dazu blieben die Spinnenseidenproteine in Tabaksamen auch über lange Zeiträume (1 Jahr) stabil. Darüber hinaus waren keinerlei Spuren von Abbauprozessen sichtbar. Damit erfüllt die Produktion von Spinnenseidenproteinen in Samen ein Hauptkriterium als wirtschaftlich interessante Produktionsplattform.

Abschließend sind die Reinigung aus Samen und die dabei erzielte Proteinausbeute zu bewerten. Bei der Herstellung von technischen Materialien sind die Anforderungen an die Reinheit des Rohstoffes weniger streng als bei pharmazeutischen Produkten, aber trotzdem ist der Aufschluss der Samen und die Entfernung von Kontaminationen möglichst ohne Produktverluste selbst bei geeigneten Proteinmengen im Samen von entscheidender Bedeutung. Bei einem zu hohen Fremdstoffanteil können eine Verschlechterung der positiven Eigenschaften des Spinnenseidenproteins und eine höhere Variation der Produktqualität eintreten, was eine industrielle Verwertung unmöglich machen würde.

Die bereits vielfach erfolgreich angewandte ITC-Methode konnte auch für die Reinigung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen aus Samen verwendet werden. Allerdings war die Anpassung dieser Methode an den hohen Fettgehalt der Samen notwendig. Nachdem dieses verfahrenstechnische Problem mittels zweier zusätzlicher Filtrationsschritte gelöst werden konnte, wurde die Menge an Reinigungsgut vom Kleinstmaßstab (0,06 g Tabaksamen) auf den maximalen Labormaßstab (bis zu 50 g Tabaksamen) erhöht. Kontaminationen des transgenen Proteins mit Samenproteinen konnten weder mittels Silber- noch mit Coomassiefärbung nachgewiesen werden (Abb. 27A, 28A), was den Erfolg des angewandten Reinigungsverfahrens verdeutlicht. Trotz der geringen Proteinkonzentration und der bereits erwähnten zusätzlichen Verfahrensschritte zur Abtrennung von Fetten konnte eine Proteinausbeute von über 40% bezogen auf den Rohextrakt erreicht werden (Kap. 3.1.5.3). Zwar können mittels chromatographischer Methoden (Übersicht bei Müller 2005) oder

4 Diskussion

Adsorptionsverfahren teilweise durchaus höhere Ausbeuten erreicht werden (Tab. 16), jedoch verursachen dieses Verfahren wesentlich höhere Kosten als die Inverse Transition Cycling-Methode.

Tab. 16: Vergleich von verschiedenen Reinigungsverfahren mittels Adsorption an magnetische Partikel (variiert aus Franzreb et. al. 2006) mit der ITC-Reinigung von Spinneseiden-Fusionsproteinen aus Tabaksamen

| Reinigungsgut | Protein- ausbeute (%) | Referenz |
|---|-----------------------------|-------------------------------|
| Fv-Antikörperfragmente aus geklärtem <i>E. coli</i> -Lysat | 53 | Zulqarnain 2000 |
| L1 Hüllprotein aus <i>E. coli</i> -Lysat (mit Spermin) | 72 | Heeboll-Nielsen et. al. 2003 |
| His-eGFP aus <i>E. coli</i> -Lysat | 61 | Ebner 2006 |
| His-eGFP aus <i>E. coli</i> -Lysat | 66 | Ebner 2006 |
| His-eGFP aus <i>E. coli</i> -Lysat | 25 | Ebner 2006 |
| Lactatdehydrogenase aus Hefehomogenat | 44 | Zulqarnain 2000 |
| Malatdehydrogenase aus Hefehomogenat | 32 | Zulqarnain 2000 |
| Lactoperoxidase aus hydrolisierter Molke | 90 | Heebøll-Nielsen et. al. 2004b |
| Trypsin aus hydrolisierter Molke | 75 | Heebøll-Nielsen 2003 |
| Superoxiddismutase aus hydrolisierter Molke | 79 | Meyer et. al. 2005 |
| Lactoferrin aus hydrolisierter Molke | 47 | Meyer 2004 |
| Trypsin aus entfetteter Molke | 34 | Hubbuch 2001 |
| Trypsin aus Schweinepankreatin | 62 | Hubbuch und Thomas 2002 |
| Maus-Ig2b-Antikörper | 75 | Holschuh und Schwammle 2005 |
| Lektin (ConA) aus zerkleinerten Jackbohnen (<i>Canavalia ensiformis</i>) | 69 | Heebøll-Nielsen et. al. 2004a |
| Spinneseiden-Fusionsproteine (mittels ITC) aus Tabaksamen (<i>Nicotiana tabacum</i>)* | 44 | |

* aus der vorliegenden Arbeit

Dieser wirtschaftlich relevante Unterschied wird bei chromatographischen Systemen durch die Kosten des Adsorbens bedingt. Ist die Aufnahmekapazität des Adsorbens überschritten, treten Verluste auf, da das transgene Protein nicht mehr gebunden werden kann. Daher muss eine genügend große Menge an Adsorbens zur Verfügung stehen. Im Gegensatz dazu kann die ITC-Methode in nahezu beliebigen Durchsatzmengen durchgeführt werden und es wird lediglich NaCl in größeren Mengen benötigt.

Einzig die Pelletierung des ELP-Fusionsproteins mittels Zentrifugation stellt im industriellen Maßstab einen limitierenden Schritt dar und sollte daher, wenn möglich, durch andere Trennungsvorgänge ersetzt oder ergänzt werden. Bisherige Versuche zur Abtrennung des ELP-Fusionsproteins mittels Filtration im Labormaßstab scheiterten an den auftretenden starken Proteinverlusten, die wahrscheinlich auf eine irreversible Bindung des ausgefällten Fusionsproteins an die Filtermembran zurückzuführen sind (Kap. 3.1.5.2). Das im Rohextrakt mittels Western blot nachweisbare Fusionsprotein wurde nach der Ausfällung über die Filtermembran vom Durchfluss getrennt, was durch die deutlich schwächeren Proteinbande in der Durchflussprobe nachgewiesen wurde (Abb. 30 und 31). Anschließend konnte das Protein jedoch nur in extrem geringen Mengen wieder in Lösung gebracht werden. Außerdem wurden bei höheren Konzentrationen im Rohextrakt stärkere Proteinbanden im Durchfluss und damit Proteinverluste gezeigt (Abb. 29). Im Gegensatz zu unseren Experimenten gelang die Abtrennung eines Thioredoxin-ELP-Fusionsproteins aus einer Bakteriensuspension mit diesem Verfahren problemlos (Ge et. al. 2006). Es ist daher anzunehmen, dass entweder die Anzahl der ELP-Pentapeptide oder der Fusionspartner entscheidend für die erneute Lösung des Fusionsproteins von der Membranoberfläche sind. Die Filtration zur Abtrennung der im Samenrohextrakt vorhandenen Fette erfolgte vor der Fällung des Fusionsproteins, wodurch keine nennenswerten Verluste auftraten (Abb. 26, 27B, 28B). Überdies wurden hierbei Filter mit größeren Poren verwendet. Die ausschließlich filterbasierte Reinigung stellt also keine Alternative zur gut funktionierenden ITC-Methode mittels Zentrifugation bei der Reinigung von Spinnenseiden-ELP-Fusionsproteinen dar.

Tabaksamen sind als Produktionssystem für Spinnenseiden-Fusionsproteine im Labormaßstab durchaus geeignet, insbesondere durch die unkomplizierte Lagerung. Für Produktionen in größeren Maßstäben sind die bisher erreichten Mengen an Spinnenseidenproteinen in Tabaksamen nicht ausreichend.

4 Diskussion

4.2 Können Spinnenseiden-Fusionsproteine posttranslational verknüpft werden?

Alle bisher identifizierten Spinnenseidenproteine weisen eine enorme Größe und eine hochrepetitive Struktur auf (Prashad et. al. 1972; Hayashi und Lewis 1998; Rising et. al. 2005; Hu et. al. 2006a; Zhao et. al. 2006; Higgins et. al. 2007; Tian und Lewis 2005). Ein Beispiel dafür sind die Tragfadenproteine MaSp1 und MaSp2 von *Latrodectus hesperus*, deren Sequenzen inzwischen vollständig bekannt sind (Ayoub et. al. 2007). *MaSp1* hat eine Größe von 9390 bp und kodiert für 3129 Aminosäuren. Das *MaSp2*-Gen umfasst 11340 bp und kodiert für 3779 Aminosäuren. Aufgrund dieser Eigenschaften stellt die Produktion von vollständigen nativen Spinnenseidenproteinen immer noch ein enormes Problem dar. Eine alternative Strategie zur Expression kompletter Spinnenseidenproteine natürlicher Größe im jeweiligen Expressionssystem ist die Herstellung verschiedener Proteinmonomere und deren posttranslationale Verknüpfung. Diese Strategie bietet nicht nur den Vorteil einer problemlosen Erhöhung der Proteingröße, sondern stellt ebenfalls eine Erweiterung des Produktspektrums dar, denn durch die spätere Dimerisierung können weitere funktionelle Gruppen an Spinnenseidenproteine angefügt werden und so die Basis für neue Verbundwerkstoffe bilden (Kap. 4.2.2). Die Strategie der Verbindung von funktionellen Gruppen mit Strukturelementen aus Spinnenseidenproteinen wurde bereits bei der modularen Konstruktion synthetischer Spinnenseidenproteine verfolgt (Scheibel 2004). Allerdings wurde die Verbindung der funktionellen Gruppen und der Strukturelemente bereits auf der Ebene der DNS-Konstrukte vorgenommen. Eine spätere *in vitro* Verknüpfung hingegen erlaubt die flexible Anpassung der Konstrukte, da fertige Proteinmonomere gereinigt und gelagert werden und zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt mit Proteinen aus neuen Konstrukten kombiniert werden können. Eine Methode zur posttranslationalen Verknüpfung von Proteinen ist die Inkubation mit bakterieller Transglutaminase. Die Verwendung von Transglutaminase zur unspezifischen Verknüpfung von Proteinen, namentlich in der Lebensmittelindustrie, ist weit verbreitet (Muguruma et. al. 1990; Takagaki et. al. 1991; DeJong und Koppelman 2002; Tseng und Lai 2002; Malandain 2005). Über die gezielte Heterodimerisierung von Proteinen mittels Transglutaminase wurde erst vor kurzer Zeit berichtet (Tanaka et. al. 2004).

Die Polymerisierung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen mittels Transglutaminase wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt. Auf diese Weise konnten rekombinante Proteine mit einer Größe von über 200 kDa erzeugt werden (Abb. 40 und 41). Spinnenseidenproteine dieser Größe konnten bisher nicht in transgenen Systemen erzeugt

werden. Allerdings ist zu beachten, dass die Polymerbildung nicht vollständig war, sondern ein Großteil der Proteine weiterhin in Monomerform vorlag. Um die Verknüpfung der Monomere weiter zu verbessern, könnte die Zugabe der Transglutaminase sukzessiv erfolgen und gleichzeitig die Inkubationszeit verlängert werden. Darüber hinaus ist die Qualität der Transglutaminase von entscheidender Bedeutung. Die zunächst verwendete Transglutaminase in Lebensmittelqualität (Ajinomoto) konnte aufgrund von Verunreinigungen nicht verwendet werden. Erst die für den Laborbedarf hergestellte Transglutaminase (N-Zyme) war für die Polymerisierung der Spinnenseiden-Fusionsproteine einsetzbar. Während dieser Experimente wurden schwache Polymerbanden bereits vereinzelt in Rohextrakten aus Tabakblättern beobachtet. Eine Erklärung für diese Reaktion könnte, neben unspezifischen Bindungen der Monomere, die Anwesenheit von Transglutaminasen in pflanzlichem Gewebe sein. Dies wurde bereits im Gewebe des Blütenkelches von *Nicotiana tabacum* nachgewiesen (Serafini-Fracassini et. al. 2002). Allerdings ist diese Transglutaminaseaktivität nur unwesentlich stärker als in der Negativkontrolle. In zukünftigen Experimenten werden unter anderem die Reinigung und Charakterisierung der Polymere sowie der vollständige Umsatz der Monomere zu realisieren sein.

Zwar ist die Verspinnung von Spinnenseidenproteinen zu Fasern und Fäden das langfristige Ziel zur Nutzung dieses vielseitigen Materials, doch wie aus den vorangegangenen Ausführungen hervorgeht, sind noch einige technische Schwierigkeiten zu überwinden. Eine Möglichkeit, die bereits herstellbaren Spinnenseidenproteine technisch zu nutzen, ist unter anderem die Anwendung in mikroelektromechanischen Systemen, da dort nur winzige Mengen des Proteins benötigt werden und das Verspinnen zu Fasern nicht notwendig ist (Bai et. al. 2006). In bisherigen Tests wurde eine selbsttragende Struktur, eine sogenannte Mikrobrücke, aus Spinnenseidenproteinen erstellt und die mechanischen Eigenschaften ermittelt. Obwohl die maximale Belastbarkeit und Elastizität der verwendeten Tragfadenseide aus *N. clavipes* wegen der Seidengewinnung durch Melken der Spinnen und des anschließenden Lösens der Proteine in 1,1,1,3,3,3 Hexafluoro-2-propanol deutlich reduziert war, konnte die selbsttragende Brücke zwei- bis zehnmal höheren Belastungen standhalten als alle bisher für derartige Konstrukte verwendeten Biopolymere, wie z.B. Hydrogele. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die hier vorgestellte Einbindung von Spinnenseidenproteinen in Wollfäden. Wie bereits erwähnt wird Transglutaminase zur Verknüpfung von zahlreichen Proteinen eingesetzt. Eine Anwendung, die erst vor kurzem beschrieben wurde, ist die Verbesserung der Materialeigenschaften von Wolle (Cortez et. al.

4 Diskussion

2004; Cortez et. al. 2005). Diese Behandlung führte zu einem Zuwachs der mechanischen Belastbarkeit der Wollfasern. Eine interessante Variante dieses Verfahrens ist die Transglutaminase-vermittelte Einbindung von Sericin in Wollfasern (Cortez et. al. 2007). Sericin ist auch bekannt als Seidenleim und fällt als Abfallprodukt bei der Gewinnung von Seidenfäden aus *Bombyx mori* an. Durch die Behandlung mit Transglutaminase wurde Seidenleim sowohl an der Oberfläche als auch in den tieferen Schichten der Wollfaser gebunden. Die Eigenschaften der behandelten Wollfasern entsprachen im Wesentlichen den Eigenschaften der nur mit Transglutaminase behandelten Fasern. Allerdings war die mechanische Belastbarkeit weiter erhöht und die Fasern wiesen eine weichere Oberfläche auf. Aufbauend auf diesen Experimenten konnten wir die stabile Einbindung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen und ELP-Konstrukten in Wollfasern mittels Western blot-Analyse demonstrieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mit Transglutaminase inkubierten Fusionsproteine auch bei mehrmaliger intensiver Waschung nicht aus den Wollfasern gelöst werden konnten. Im Gegensatz dazu wurden nicht verknüpfte Fusionsproteine einfach ausgespült (Abb.43). In zukünftigen Experimenten werden die Materialeigenschaften der veränderten Wollfasern und damit der potentielle Nutzen dieses neuen Materials untersucht und bewertet werden. In den bereits durchgeführten Experimenten wurde die posttranslationale Verknüpfung der Spinnenseiden-Fusionsproteine eindeutig gezeigt.

Obwohl weitere Verbesserungen der Expression von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Tabaksamen denkbar sind, ist für eine großtechnische Herstellung von Spinnenseidenproteinen in Pflanzen eine alternative Expressionsplattform zu wählen, da die Menge des transgenen Proteins im Tabaksamen um ein Vielfaches zu niedrig ist.

Allerdings wird durch die Ergebnisse der Versuche zur Langzeitstabilität von Spinnenseiden-Fusionsproteinen in Tabaksamen deutlich, dass die weitere Verwendung von Samen als Expressionssystem durchaus Vorteile bietet. Ebenfalls für die weitere Verwendung von Samen spricht die Tatsache, dass die Inverse Transition Cycling-Methode zur Reinigung von ELP-Fusionsproteinen an die Reinigung aus Samen und insbesondere an den hohen Fettgehalt des Rohextraktes angepasst werden konnte. Damit steht für die Reinigung aus Samen eine effektive Methode für Samenmengen bis zu 50 g zur Verfügung. Diese Reinigungsmethode verläuft effektiver bei zunehmender Konzentration des ELP-Fusionsproteins (Meyer und Chilkoti 2002), was eine höhere Ausbeute bei Samen mit einer höheren Produktion des transgenen Proteins bedeuten könnte.

4 Diskussion

Die Versuche zur ausschließlich filterbasierten Reinigung, die bei der Reinigung aus Bakteriensuspensionen erfolgreich eingesetzt wird, konnten bisher nicht mit Spinnenseidenproteinen repliziert werden. Die auftretenden Proteinverluste nach der Abtrennung des ausgefällten Fusionsproteins aus dem Rohextrakt sind höchstwahrscheinlich auf irreversible Bindungen an die Filtermembran zurückzuführen. Die Verwendung anderer Filtermaterialien könnte dieses Problem lösen. Damit könnte die bisher notwendige Zentrifugation der Proteinproben zur Pelletierung des gefällten Spinnenseiden-Fusionsproteins unnötig werden.

Mittels des Modellsystems Tabaksamen konnte das Potential von Samen als Lagersystem für Spinnenseiden-Fusionsproteine erfolgreich gezeigt werden. Allerdings ist Tabak selbst nicht als technische Produktionsplattform geeignet. Stattdessen sollte eine Pflanze mit einem hohen Proteinanteil im Samen verwendet werden. Auf diese Weise könnten die Vorteile einer hohen Produktionsrate mit der hervorragenden Lagerstabilität kombiniert werden. Dann bedarf es nur minimaler Anpassungen des etablierten Reinigungsverfahrens an die neue Pflanze, um das Expressionssystem zu einer vollständigen Produktionsplattform zu machen.

5 Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob Tabaksamen als Produktionsplattform für Spinnenseiden-Fusionsproteine geeignet sind. Darüber hinaus wurden neue Spinnenseidenkonstrukte zur posttranslationalen Modifikation mittels bakterieller Transglutaminase erzeugt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit kurz zusammengefasst.

1. Verschiedene Spinnenseidenproteine, basierend auf dem semisynthetischen Protein SO1, wurden erstmalig erfolgreich in Tabaksamen unter Kontrolle des LeB4-bzw. USP-Promotors exprimiert. Das Spinnenseiden-Fusionsprotein SO1-100xELP unter Kontrolle des LeB4-Promotors wurde weiter vermehrt und konnte bis zur T₂-Generation nachgewiesen werden. Die Gesamtmenge an Protein pro Samen blieb sowohl deutlich unter den bisher erreichten Mengen an Spinnenseidenproteinen in Tabakblättern als auch unter den Mengen an Einzelkettenantikörper-ELP-Fusionen in Tabaksamen.
2. Die Expression von samenspezifisch exprimierten Konstrukten in Tabakblättern konnte durch Cotransformation mit dem Transkriptionsfaktor FUSCA3 induziert werden. Damit steht ein schnelles und effektives Testverfahren für samenspezifisch exprimierte Konstrukte zur Verfügung.
3. Trotz der niedrigen Konzentration des transgenen Proteins konnte bei der Reinigung aus Tabaksamen mittels der durch Filtrationsschritte erweiterten Inverse Transition Cycling-Methode eine Ausbeute von über 40% erreicht werden. Erste Versuche zur ausschließlich filterbasierten Reinigung von ELP-Fusionproteinen lieferten kein befriedigendes Ergebnis, da ein Großteil des transgenen Proteins nach der salzinduzierten Fällung nicht wieder von der Filtermembran gelöst werden konnte und dadurch starke Verluste auftraten.
4. Das Spinnenseiden-Fusionsprotein SO1-100xELP blieb bei Raumtemperatur in Tabaksamen über den Zeitraum von einem Jahr stabil. Es konnten weder Mengenverluste

noch Abbaubanden im Western blot nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht das Potential von Samen als Produktionssystem für Spinnenseiden-Fusionsproteine.

5. ELP-Fusionskonstrukte mit Dimerisierungsmarken (Glutamin-bzw. Lysinmarke) wurden erzeugt und sowohl transient als auch stabil in Tabakblättern exprimiert. Die gereinigten Fusionsproteine ermöglichten die Transglutaminase-vermittelte Herstellung von transgenen Spinnenseiden-Fusionsproteinen mit einer bisher unerreichten Größe von über 200 kDa. Darüber hinaus verspricht diese Methode die Herstellung von neuartigen Verbundstoffen mit interessanten Eigenschaften. So wurden Spinnenseiden-Fusionsproteine mittels Transglutaminase in Wollfasern stabil eingefügt. Allerdings konnte bisher kein vollständiger Umsatz der Monomere zum Polymer erreicht werden, was das Ziel weiterer Versuche sein wird.

6 Abbildungsverzeichnis

6 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Vereinfachte Darstellung von *Aranaeus diadematus* mit hervorgehobenen Netzdrüsen und der Funktion der zugehörigen Spinnenseiden (variiert aus Vollrath 2000);- 2 -
- Abb. 2: Vergleich der Ensemblewiederholungen von MaSp1-Proteinen aus verschiedenen Spinnenspezies, bzw. ADF-2 aus *Araneus diadematus* (Gatesy et. al. 2001);- 4 -
- Abb. 3: Schematischer Aufbau des Flag-Proteins mit besonderer Betrachtung der charakteristischen Ensemblewiederholungen (Hayashi und Lewis 2000);- 4 -
- Abb. 4: Halterung zur Gewinnung von Spinnenseide (Floericke 1919);- 9 -
- Abb. 5: Erweiterte Halterung mit verbesserter Haspel (Floericke 1919);- 9 -
- Abb. 6: Schematische Darstellung der Spinnenseidenkonstrukte mit und ohne ELP;- 32 -
- Abb. 7: Plasmidkarte SO1-100xELP im Konstruktionsvektor pRTRa 7/3 unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors LeB4;- 33 -
- Abb. 8: Plasmidkarte SO1-100xELP im Transformationsvektor pCB 301 Kan^r unter Kontrolle des samenspezifischen LeB4-Promotors;- 34 -
- Abb. 9: Western blot-Analyse von transient exprimierten Proteinen aus Tabakblättern;- 37 -
- Abb. 10: Nachweis transgener Linien LeB4 SO1-100xELP der T₀-Generation mittels Western blot-Analyse;- 43 -
- Abb. 11: Nachweis transgener Linien LeB4 SO1-100xELP der T₁-Generation mittels Western blot-Analyse;- 44 -
- Abb. 12: Nachweis transgener Linien LeB4 SO1-100xELP der T₂-Generation mittels Western blot-Analyse (Linie 18/1 36-65; je 20µg TSP pro Probe);- 45 -
- Abb. 13: :Nachweis der transgenen Linien LeB4 SO1-100xELP der T₂-Generation mittels Dot blot-Analyse (Linien 18/1 2.Aussaat);- 46 -
- Abb. 14: Western blot Analyse von Samenproben der Linie SO1-ELP 18/3 zeigt Stabilität der Spinnenseidenproteine nach 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten.- 47 -
- Abb. 15: Western blot Analyse von Samenproben der Linie SO1-ELP 18/9 zeigt Stabilität der Spinnenseidenproteine nach 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 Monaten.- 48 -
- Abb. 16: Analyse der Filterreinigung des Spinnenseiden-Fusionsproteins SO1-100xELP mittels Western blot und Ponceaufärbung;- 56 -
- Abb. 17: Western blot-Analyse der Filterreinigung von SO1-100xELP mit erhöhter Inkubationszeit (10 min);- 57 -

6 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 18: Western blot-Analyse der Filterreinigung von SO1-100xELP mit erhöhter Inkubationstemperatur (40°C) und -zeit (10 min);- 57 -
- Abb. 19: Optimierung der Reinigung aus Tabaksamen (Salzkonzentration);- 49 -
- Abb. 20: Western blot-Analyse der Reinigungsoptimierung von SO1-ELP aus Tabaksamen im Labormaßstab (0,06g) (Temperatur1);- 50 -
- Abb. 21: Western blot-Analyse der Reinigungsoptimierung von SO1-ELP aus Tabaksamen im Labormaßstab (0,06g) (Temperatur2);- 51 -
- Abb. 22: Western blot-Analyse der Reinigung von SO1-100xELP aus Tabaksamen im Labormaßstab (0,06g);.....- 51 -
- Abb. 23: Western blot-Analyse der maßstabsvergrößerten Reinigung von SO1-ELP aus Tabaksamen (50g) mit zusätzlichem Filterschritt;- 52 -
- Abb. 24: Analyse der maßstabsvergrößerten Reinigung (Inverse Transition Cycling) von SO1-100xELP aus Tabaksamen (50g) mittels Coomassiefärbung (A) und Western-blot (B);- 53 -
- Abb. 25: Analyse der modifizierten Reinigung von SO1-ELP aus Tabaksamen (50g) mittels Silberfärbung (A) und Western blot (B);- 54 -
- Abb. 26: Vergleich von gereinigtem SO1-100xELP aus Tabaksamen der Linien 18/1 (zwei Reinigungsansätze) und 18/7 mit So1-100xELP-Standard (gereinigt aus Tabakblättern) mittels Western blot-Analyse;.....- 58 -
- Abb. 27: Vergleich von SO1-100xELP im Rohextrakt und gereinigtem SO1-100xELP aus Tabaksamen der Linie 18/1 mit So1-100xELP-Standard (gereinigt aus Tabakblättern) mittels Western blot-Analyse;.....- 60 -
- Abb. 28: Schematische Darstellung der Spinnenseidenkonstrukte mit Transglutaminase-Marken.....- 62 -
- Abb. 29: Nachweis von transient exprimierten Spinnenseiden-Fusionsproteinen mit Transglutaminasemarken mittels Western blot-Analyse;- 64 -
- Abb. 30: Posttranslationale Polymerisierung von Spinnenseiden-Fusionsproteinen mit bakterieller Transglutaminase (N-Zyme);- 67 -
- Abb. 31: Western blot-Analyse der posttranslationalen Polymerisierung von Spinnenseiden-fusionsproteinen mit bakterieller Transglutaminase (N-Zyme);- 68 -
- Abb. 32: Western blot-Analyse der posttranslationalen Polymerisierung von Spinnenseiden-fusionsproteinen mit bakterieller Transglutaminase (N-Zyme);- 69 -

6 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 33: Western blot-Analyse von Wollfäden nach Inkubation mit Spinnenseiden-Fusionsproteinen und bakterieller Transglutaminase;.....- 70 -
- Abb. 34: Nachweis der Expression verschiedener Spinnenseiden-Fusionsproteine mit Transglutaminase-Marken mittels Western blot-Analyse- 65 -

7 Literaturverzeichnis

- Allen, J. D. & Parsons, S. M. Nitrocellulose filter binding: Quantitation of the histidyl-tRNA-ATP phosphoribosyltransferase complex. *Analytical Biochemistry* 92, 22-30 (1-1-1979).
- Allmeling, C., Jokuszies, A., Reimers, K., Kall, S. & Vogt, P. M. Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. *J.Cell Mol.Med.* 10, 770-777 (2006).
- Ando, H. *et al.* Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 2613-2617 (1989).
- Artsaenko, O. *et al.* Expression of A Single-Chain Fv Antibody Against Abscisic-Acid Creates A Wilty Phenotype in Transgenic Tobacco. *Plant Journal* 8, 745-750 (1995).
- Artsaenko, O., Kettig, B., Fiedler, U., Conrad, U. & Doring, K. Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding* 4, 313-319 (1-8-1998).
- Ayoub, N., Garb, J., Tinghitella, R., Collin, M. & Hayashi, C. Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes. *PLoS ONE* 2 (2007).
- Bai, J. *et al.* Regenerated spider silk as a new biomaterial for MEMS. *Biomed.Microdevices.* 8, 317-323 (2006).
- Bastioli, C. Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review. *Polymer Reviews* 44, 231-274 (2004).
- Baumlein, H. *et al.* The FUS3 gene of Arabidopsis thaliana is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *The Plant Journal* 6, 379-387 (24-9-1994).
- Bäumlein, H. *et al.* The FUS3 gene of Arabidopsis thaliana is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *The Plant Journal* 6, 379-387 (24-9-1994).
- Bidwell, G. L., Davis, A. N., Fokt, I., Priebe, W. & Raucher, D. A thermally targeted elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate overcomes drug resistance. *Investigational New Drugs* 25, 313-326 (2007a).
- Bidwell, G. L., Fokt, I., Priebe, W. & Raucher, D. Development of elastin-like polypeptide for thermally targeted delivery of doxorubicin. *Biochem.Pharmacol.* 73, 620-631 (1-3-2007b).
- Boehm, R. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1102, 121-134 (2007).
- Bohmert, K. *et al.* Transgenic Arabidopsis plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta* 211, 841-845 (2000).
- Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254 (1976).

7 Literaturverzeichnis

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. X11-Blue - A High-Efficiency Plasmid Transforming Recombinant Escherichia-Coli Strain with Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* 5, 376-& (1987).

Bzymek, M. & Lovett, S. T. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 8319-8325 (17-7-2001).

Candelas, G. C. & Cintron, J. A Spider Fibroin and Its Synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 216, 1-6 (1981).

Challis, R. J., Goodacre, S. L. & Hewitt, G. M. Evolution of spider silks: conservation and diversification of the C-terminus. *Insect Mol.Biol.* 15, 45-56 (2006).

Christensen, T., Trabbic-Carlson, K., Liu, W. & Chilkoti, A. Purification of recombinant proteins from Escherichia coli at low expression levels by inverse transition cycling. *Analytical Biochemistry* 360, 166-168 (1-1-2007).

Colgin, M. A. & Lewis, R. V. Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like "spacer regions". *Protein Science* 7, 667-672 (28-12-1998).

Commandeur, U., Twyman, R. M. & Fischer, R. The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet* 5, 1-9 (2003).

Conrad, U. & Fiedler, U. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Molecular Biology* 38, 101-109 (1-9-1998).

Cortez, J., Anghieri, A., Bonner, P. L. R., Griffin, M. & Freddi, G. Transglutaminase mediated grafting of silk proteins onto wool fabrics leading to improved physical and mechanical properties. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1698-1704 (1-6-2007).

Cortez, J., Bonner, P. L. R. & Griffin, M. Transglutaminase treatment of wool fabrics leads to resistance to detergent damage. *Journal of Biotechnology* 116, 379-386 (6-4-2005).

Cortez, J., Bonner, P. L. R. & Griffin, M. Application of transglutaminases in the modification of wool textiles. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 64-72 (5-1-2004).

Daniell, H., Streatfield, S. J. & Wycoff, K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* 6, 219-226 (2001).

De Kathen, A. & Pickardt, T. Plattformen zur Produktion rekombinanter Arzneimittel. (2005).

Deblaere, R. *et al.* Efficient Octopine Ti Plasmid-Derived Vectors for Agrobacterium-Mediated Gene-Transfer to Plants. *Nucleic Acids Research* 13, 4777-4788 (1985).

- DeJong, G. A. H. & Koppelman, S. J. Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications. *Journal of Food Science* 67, 2798-2806 (2002).
- Ebner, N. Einsatz von Magnettechnologie bei der Bioproduktaufarbeitung. (2006).
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. & Bishop, J. M. Isolation of Monoclonal-Antibodies Specific for Human C-Myc Proto-Oncogene Product. *Molecular and Cellular Biology* 5, 3610-3616 (1985).
- Fahnestock, S. R. & Bedzyk, L. A. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47, 33-39 (1997).
- Fahnestock, S. R., Yao, Z. & Bedzyk, L. A. Microbial production of spider silk proteins. *J.Biotechnol.* 74, 105-119 (2000).
- Fiedler, U. & Conrad, U. High-Level Production and Long-Term Storage of Engineered Antibodies in Transgenic Tobacco Seeds. *Nat Biotech* 13, 1090-1093 (1995).
- Fischer, R. & Emans, N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 9, 279-299 (2000).
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. & Twyman, R. M. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 152-158 (2004).
- Floericke, K. Spinnen und Spinnenleben. (1-1-1919).
- Floss, D. M., Falkenburg, D. & Conrad, U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Research* 16, 315-332 (2007).
- Foelix, R. F. Biology of Spiders. 2 (1996).
- Fraley, R. T. *et al.* Expression of Bacterial Genes in Plant Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 4803-4807 (1-8-1983).
- Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Hogley, T. & Thomas, O. Protein purification using magnetic adsorbent particles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 505-516 (8-5-2006).
- Frey, W., Meyer, D. E. & Chilkoti, A. Dynamic addressing of a surface pattern by a stimuli-responsive fusion protein. *Advanced Materials* 15, 248-251 (2003a).
- Frey, W., Meyer, D. E. & Chilkoti, A. Thermodynamically reversible addressing of a stimuli responsive fusion protein onto a patterned surface template. *Langmuir* 19, 1641-1653 (2003b).
- Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J. & Lewis, R. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science* 291, 2603-2605 (30-3-2001).
- Ge, X., Trabbic-Carlson, K., Chilkoti, A. & Filipe, C. D. Purification of an elastin-like fusion protein by microfiltration. *Biotechnol.Bioeng.* 95, 424-432 (20-10-2006).

7 Literaturverzeichnis

Gertsch, W. J. American spiders. (1979).

Gorb, S. N. *et al.* Biomaterials: silk-like secretion from tarantula feet. *Nature* 443, 407 (28-9-2006).

Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. THE ENZYMATIC FORMATION OF HYDROXAMIC ACIDS FROM GLUTAMINE AND ASPARAGINE. *Journal of Biological Chemistry* 187, 111-125 (1-11-1950).

Guerette, P. A., Ginzinger, D. G., Weber, B. H. F. & Gosline, J. M. Silk Properties Determined by Gland-Specific Expression of a Spider Fibroin Gene Family. *Science* 272, 112-115 (5-4-1996).

Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology* 22, 346-353 (2004).

Hayashi, C. Y., Blackledge, T. A. & Lewis, R. V. Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. *Mol.Biol.Evol.* 21, 1950-1959 (2004).

Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *J.Mol.Biol.* 275, 773-784 (6-2-1998).

Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. *Science* 287, 1477-1479 (25-2-2000).

Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. Spider flagelliform silk: lessons in protein design, gene structure, and molecular evolution. *Bioessays* 23, 750-756 (2001).

Heeboll-Nielsen, A., Choe, W. S., Middelberg, A. P. J. & Thomas, O. R. T. Efficient Inclusion Body Processing Using Chemical Extraction and High Gradient Magnetic Fishing. *Biotechnology Progress* 19, 887-898 (6-6-2003).

Heebøll-Nielsen, A. Functionalisation of Non-Porous Superparamagnetic Protein Adsorbents and their Application in High Gradient Magnetic Fishing. (2003).

Heebøll-Nielsen, A., Justesen, S. F. L., Hobley, T. J. & Thomas, O. R. T. Superparamagnetic Cation–Exchange Adsorbents for Bioproduct Recovery from Crude Process Liquors by High-Gradient Magnetic Fishing. *Separation Science and Technology* 39, 2891-2914 (2004a).

Heebøll-Nielsen, A., Justesen, S. F. L. & Thomas, O. R. T. Fractionation of whey proteins with high-capacity superparamagnetic ion-exchangers. *Journal of Biotechnology* 113, 247-262 (30-9-2004b).

Hermanson, K. D., Huemmerich, D., Scheibel, T. & Bausch, A. R. Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk. *Advanced Materials* 19, 1810-+ (2007).

Higgins, L. E., White, S., Nunez-Farfan, J. & Vargas, J. Patterns of variation among distinct alleles of the Flag silk gene from *Nephila clavipes*. *Int.J.Biol.Macromol.* 40, 201-216 (20-2-2007).

- Hinman, M., Dong, Z., Xu, M. & Lewis, R. V. Spider silk: a mystery starting to unravel. *Results Probl. Cell Differ.* 19, 227-254 (1992).
- Hinman, M. B., Jones, J. A. & Lewis, R. V. Synthetic spider silk: a modular fiber. *Trends Biotechnol.* 18, 374-379 (2000).
- Holschuh, K. & Schwammler, A. Preparative purification of antibodies with protein A--an alternative to conventional chromatography. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293, 345-348 (2005).
- Hood, E. E. *et al.* Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding* 3, 291-306 (1997).
- Horn, M. E., Woodard, S. L. & Howard, J. A. Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports* 22, 711-720 (2004).
- Horsch, R. B. *et al.* A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science* 227, 1229-1231 (8-3-1985).
- Houmiel, K. L. *et al.* Poly(beta-hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of *Brassica napus*. *Planta* 209, 547-550 (1999).
- Hu, X. *et al.* Spider egg case core fibers: trimeric complexes assembled from TuSp1, ECP-1, and ECP-2. *Biochemistry* 45, 3506-3516 (21-3-2006a).
- Hu, X. *et al.* Molecular mechanisms of spider silk. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 1986-1999 (2006b).
- Hubbuck, J. J. Development of adsorptive separation systems for recovery of proteins from crude bioprocess liquors. (2001).
- Hubbuck, J. J. & Thomas, O. R. T. High-gradient magnetic affinity separation of trypsin from porcine pancreatin. *Biotechnology and Bioengineering* 79, 301-313 (6-6-2002).
- Huemmerich, D. *et al.* Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* 43, 13604-13612 (26-10-2004).
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High-Efficiency Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Gene* 96, 23-28 (1990).
- Jackson, C. & O'Brien, J. P. Molecular-Weight Distribution of *Nephila-Clavipes* Dragline Silk 1. *Macromolecules* 28, 5975-5977 (1995).
- Jacquet, A. *et al.* Expression of a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. *Protein Expression and Purification* 17, 392-400 (1999).
- Jaeger, G. D. *et al.* Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotech* 20, 1265-1268 (2002).
- Janssen, B. J. & Gardner, R. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology* 14, 61-72 (1-1-1990).

7 Literaturverzeichnis

- Johansson, J. *et al.* SPIDER SILK PROTEINS AND METHODS FOR PRODUCING SPIDER SILK PROTEINS. PCT/SE2006/001505 (12-7-2007).
- Kanaji, T. *et al.* Primary Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovercillium* Sp Strain-S-8112. *Journal of Biological Chemistry* 268, 11565-11572 (1993).
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. & Angenon, G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122, 101-108 (15-1-1997).
- Kim, H. J., Kim, U. J., Vunjak-Novakovic, G., Min, B. H. & Kaplan, D. L. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* 26, 4442-4452 (2005).
- Kojic, N., Bico, J., Clasen, C. & McKinley, G. H. Ex vivo rheology of spider silk. *J.Exp.Biol.* 209, 4355-4362 (2006).
- Kostal, J., Mulchandani, A., Gropp, K. E. & Chen, W. A temperature responsive biopolymer for mercury remediation. *Environmental Science & Technology* 37, 4457-4462 (2003).
- Kostal, J. *et al.* Customizable biopolymers for heavy metal remediation. *Journal of Nanoparticle Research* 7, 517-523 (2005).
- Kostal, J., Yang, R., Wu, C. H., Mulchandani, A. & Chen, W. Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing *ArsR*. *Appl.Environ.Microbiol.* 70, 4582-4587 (2004).
- Kourtz, L., Dillon, K., Daughtry, S., Peoples, O. & Snell, K. D. Chemically inducible expression of the PHB biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Transgenic Research* (22-12-2006).
- Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-& (1970).
- Lazaris, A. *et al.* Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* 295, 472-476 (18-1-2002).
- Lerouge, P., Bardor, M., Pagny, S., Gomord, V. & Faye, L. N-Glycosylation of Recombinant Pharmaceutical Glycoproteins Produced in Transgenic Plants Towards an Humanisation of Plant N-Glycans. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 1, 347-354 (2000).
- Lewis, R. V. & Roth, D. A. Expression of spider silk proteins in higher plants. 10479638 (30-8-2007).
- Lorand, L. & Conrad, S. M. Transglutaminases. *Molecular and Cellular Biochemistry* 58, 9-35 (1984).
- Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 140-156 (2003).
- Ma, J. K. *et al.* Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep.* 6, 593-599 (2005).

- Ma, J. K. C. *et al.* Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Medicine* 4, 601-606 (1998).
- Malandain, H. Transglutaminases: a meeting point for wheat allergy, celiac disease, and food safety. *Allerg.Immunol.(Paris)* 37, 397-403 (2005).
- Maldener, I. Coomassie-Färbung ohne Methanol. *Laborjournal* (8-9-2004).
- McCormick, A. A. *et al.* Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 703-708 (19-1-1999).
- McHale, M. K., Setton, L. A. & Chilkoti, A. Synthesis and in vitro evaluation of enzymatically cross-linked elastin-like polypeptide gels for cartilaginous tissue repair. *Tissue Eng* 11, 1768-1779 (2005).
- Mello, C. M., Senecal, K., Yeung, B., Vouros, P. & Kaplan, D. Initial Characterization of Nephila-Clavipes Dragline Protein. 67-79 (1994).
- Mersereau, M., Pazour, G. J. & Das, A. Efficient Transformation of Agrobacterium-Tumefaciens by Electroporation. *Gene* 90, 149-151 (1990).
- Meyer, A. *et al.* Demonstration of a Strategy for Product Purification by High-Gradient Magnetic Fishing: Recovery of Superoxide Dismutase from Unconditioned Whey. *Biotechnology Progress* 21, 244-254 (4-2-2005).
- Meyer, A. Einsatz magnetischer Trennverfahren zur Aufbereitung von Molkereiprodukten. (2004).
- Meyer, D. E. & Chilkoti, A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nat.Biotechnol.* 17, 1112-1115 (1999).
- Meyer, D. E. & Chilkoti, A. Protein Purification by Inverse Transition Cycling. Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual. 329-343 (2002).
- Meyer, D. E., Shin, B. C., Kong, G. A., Dewhirst, M. W. & Chilkoti, A. Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia. *Journal of Controlled Release* 74, 213-224 (6-7-2001a).
- Meyer, D. E., Kong, G. A., Dewhirst, M. W., Zalutsky, M. R. & Chilkoti, A. Targeting a Genetically Engineered Elastin-like Polypeptide to Solid Tumors by Local Hyperthermia. *Cancer Research* 61, 1548-1554 (1-2-2001b).
- Miao, Y. *et al.* Expression of spider flagelliform silk protein in Bombyx mori cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system 2. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 71, 192-199 (2006).
- Miyano, K., Fukuda, H., Ebisu, K. & Tamura, M. Remarkable stabilization of neutrophil NADPH oxidase using RacQ61L and a P67(phox)-p47(phox) fusion protein. *Biochemistry* 42, 184-190 (2003).

7 Literaturverzeichnis

- Mönke, G. *et al.* Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta* 219, 158-166 (2004).
- Motriuk-Smith, D., Smith, A., Hayashi, C. Y. & Lewis, R. V. Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules* 6, 3152-3159 (2005).
- Muguruma, M., Sakamoto, K., Numata, M., Yamada, H. & Nakamura, T. Studies on Application of Transglutaminase to Meat and Meat-Products .2. the Effect of Microbial Transglutaminase on Gelation of Myosin B, Myosin and Actin. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 37, 446-453 (1990).
- Müller, E. Properties and Characterization of High Capacity Resins for Biochromatography. *Chemical Engineering & Technology* 28, 1295-1305 (7-11-2005).
- Murashige, T. & Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-& (1962).
- Nakamura, H. Plasmid-Instability in Acra Mutants of Escherichia-Coli-K12. *Journal of General Microbiology* 84, 85-93 (1974).
- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B. & Whitlam, G. Synthesis of a Functional Anti-Phytochrome Single-Chain Fv Protein in Transgenic Tobacco. *Nat Biotech* 10, 790-794 (1992).
- Patel, J. *et al.* Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. *Transgenic Res.* 16, 239-249 (2007).
- Patel, P. T. & Parmar, M. T. Yield of summer crops and changes in soil nutrients as influenced by applied fertilizers in Bidi tobacco-based cropping system. *Journal of the Indian Society of Soil Science* 45, 770-774 (1997).
- Petrasovits, L. A., Purnell, M. P., Nielsen, L. K. & Brumbley, S. M. Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. *Plant Biotechnology Journal* 5, 162-172 (2007).
- Pierce, J. & Gutteridge, S. Large-scale preparation of ribulosebisphosphate carboxylase from a recombinant system in Escherichia coli characterized by extreme plasmid instability. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1094-1100 (1-5-1985).
- Pisano, J. J., Finlayso, J. S. & Peyton, M. P. Cross-Link in Fibrin Polymerized by Factor 13 Epsilon-(Gamma-Glutamyl)Lysine. *Science* 160, 892-& (1968).
- Poirier, Y., Dennis, D. E., Klomparens, K. & Somerville, C. Polyhydroxybutyrate, a Biodegradable Thermoplastic, Produced in Transgenic Plants. *Science* 256, 520-523 (24-4-1992).
- Prashad, B., Saund, A. K. & Mathur, N. K. Amino acid composition of spider silk. *Indian J.Biochem.Biophys.* 9, 351-352 (1972).

Prince, J. T., McGrath, K. P., DiGirolamo, C. M. & Kaplan, D. L. Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry* 34, 10879-10885 (29-8-1995).

Raskin, I. *et al.* Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 20, 522-531 (2002).

Reidt, W. *et al.* FUS3-dependent gene regulation during late embryogenesis. *Journal of Plant Physiology* 158, 411-418 (2001).

Retnakaran, A., Krell, P., Feng, Q. L. & Arif, B. Ecdysone agonists: Mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54, 187-199 (2003).

Richter, L. J., Thanavala, Y., Arntzen, C. J. & Mason, H. S. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization
1. *Nat.Biotechnol.* 18, 1167-1171 (2000).

Rising, A. *et al.* Spider silk proteins--mechanical property and gene sequence. *Zoolog.Sci.* 22, 273-281 (2005).

Sambrook, J. & Russel, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3 Volume Set. 3 (12-1-2000).

Sarkar, N. K., Clarke, D. D. & Waelsch, H. An Enzymically Catalyzed Incorporation of Amines Into Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 25, 451-452 (1957).

Scheibel, T. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb.Cell Fact.* 3, 14 (16-11-2004).

Scheibel, T. MODIFIED SPIDER SILK PROTEINS. PCT/EP2006/008452 (8-3-2007).

Scheibel, T., Huemmerich, D., Bausch, A. R. & Hermanson, K. D. METHOD OF PRODUCING NANO- AND MICROCAPSULES OF SPIDER SILK PROTEIN. PCT/EP2006/007608 (8-2-2007).

Scheller, J. & Conrad, U. Plant-based material, protein and biodegradable plastic. *Curr.Opin.Plant Biol.* 8, 188-196 (2005).

Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F. & Conrad, U. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat.Biotechnol.* 19, 573-577 (2001).

Scheller, J., Henggeler, D., Viviani, A. & Conrad, U. Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res.* 13, 51-57 (2004).

Scheller, J., Leps, M. & Conrad, U. Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides. *Plant Biotechnol.J.* 4, 243-249 (2006).

Serafini-Fracassini, D. *et al.* Transglutaminase activity during senescence and programmed cell death in the corolla of tobacco (*Nicotiana tabacum*) flowers. *Cell Death and Differentiation* 9, 309-321 (2002).

7 Literaturverzeichnis

Singh, A., Hede, S. & Sastry, M. Spider silk as an active scaffold in the assembly of gold nanoparticles and application of the gold-silk bioconjugate in vapor sensing. *Small* 3, 466-473 (2007).

Spohner, A. *et al.* The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 338, 897-902 (16-12-2005).

Stiborova, H., Kostal, J., Mulchandani, A. & Chen, W. One-step metal-affinity purification of histidine-tagged proteins by temperature-triggered precipitation. *Biotechnology and Bioengineering* 82, 605-611 (2003).

Stoger, E., Ma, J. K. C., Fischer, R. & Christou, P. Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 167-173 (2005).

Sun, X. L., Haller, C. A., Wu, X. Y., Conticello, V. P. & Chaikof, E. L. One-pot glyco-affinity precipitation purification for enhanced proteomics: The flexible alignment of solution-phase capture/release and solid-phase separation. *Journal of Proteome Research* 4, 2355-2359 (2005).

Tacket, C. O. *et al.* Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 4, 607-609 (1998).

Takagaki, Y., Narakawa, K. & Uchio, R. Coating of vegetables and fruits with transglutaminase and proteins for preservation. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 03272639* (1991).

Tanaka, T., Kamiya, N. & Nagamune, T. Peptidyl Linkers for Protein Heterodimerization Catalyzed by Microbial Transglutaminase. *Bioconjugate Chemistry* 15, 491-497 (19-5-2004).

Tian, M. & Lewis, R. V. Molecular characterization and evolutionary study of spider tubuliform (eggcase) silk protein. *Biochemistry* 44, 8006-8012 (7-6-2005).

Tirrell, D. A. Putting a new spin on spider silk. *Science* 271, 39-40 (5-1-1996).

Trabac-Carlson, K. *et al.* Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity? *Protein Engineering Design and Selection* 17, 57-66 (1-1-2004).

Tseng, C. S. & Lai, H. M. Physicochemical Properties of Wheat Flour Dough Modified by Microbial Transglutaminase. *Journal of Food Science* 67, 750-755 (2002).

Twyman, R. M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. & Fischer, R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21, 570-578 (2003).

Urry, D. W. Entropic Elastic Processes in Protein Mechanisms .1. Elastic Structure Due to An Inverse Temperature Transition and Elasticity Due to Internal Chain Dynamics. *Journal of Protein Chemistry* 7, 1-34 (1988).

Vaquero, C. *et al.* Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 11128-11133 (28-9-1999).

- Vollrath, F. Biology of spider silk. *Int.J.Biol.Macromol.* 24, 81-88 (1999).
- Vollrath, F. Strength and structure of spiders' silks. *Reviews in Molecular Biotechnology* 74, 67-83 (17-4-2000).
- Vollrath, F., Barth, P., Basedow, A., Engstrom, W. & List, H. Local tolerance to spider silks and protein polymers *in vivo*. *In Vivo* 16, 229-234 (2002).
- Vollrath, F. & Knight, D. P. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 410, 541-548 (29-3-2001).
- Vollrath, F., Madsen, B. & Shao, Z. The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. *Proc.Biol.Sci.* 268, 2339-2346 (22-11-2001).
- Vollrath, F. & Edmonds, D. T. Modulation of the mechanical properties of spider silk by coating with water. *Nature* 340, 305-307 (27-7-1989).
- Witcher, D. R. *et al.* Commercial production of beta-glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. *Molecular Breeding* 4, 301-312 (1998).
- Woodard, S. L. *et al.* Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnology and applied Biochemistry* 38, 123-130 (1-10-2003).
- Xiang, C. B., Han, P., Lutziger, I., Wang, K. & Oliver, D. J. A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 40, 711-717 (1999).
- Yang, Y., Li, R. & Qi, M. In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal* 22, 543-551 (2000).
- Yusibov, V. *et al.* Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 20, 3155-3164 (19-8-2002).
- Zhang, J. S. & Masui, Y. Role of amphibian egg transglutaminase in the development of secondary cytotstatic factor in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 47, 302-311 (1997).
- Zhao, A. C. *et al.* Novel molecular and mechanical properties of egg case silk from wasp spider, *Argiope bruennichi*. *Biochemistry* 45, 3348-3356 (14-3-2006).
- Zhou, X. H. *et al.* Subacute bloodstream blockade effect by supercontraction of spider silk. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* 28, 713-717 (2006).
- Zulqarnain, K. Scale-up of affinity separation based on magnetic support particles. (2000).

Lebenslauf

| | |
|--------------------------------|--|
| Persönliche Informationen | <ul style="list-style-type: none">▪ Familienstand: verheiratet▪ Nationalität: deutsch▪ Geburtsdatum: 20.07.1977▪ Geburtsort: Marburg |
| Ausbildung und Berufserfahrung | <p>Seit 01.11.2003 IPK-Gatersleben</p> <p>Durchführung der experimentellen Arbeiten zum Thema „Herstellung von Spinnenseidenproteinen in Tabaksamen“ als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Phytoantikörper.</p> <p>01.10.1997-26.04.2003 TU Braunschweig</p> <p>Diplom in Biotechnologie</p> <p>Gesamtnote: gut</p> <p>Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema: „Biotechnische Untersuchungen zur Er-tüchtigung eines 600 m² Biofilters der Kläranlage Steinhof unter veränderten Hochlastbedingungen (Faulschlammentwässerung)“</p> <p>Note: sehr gut</p> <p>Anfertigung der Studienarbeit zum Thema: „Untersuchung der differentiellen Chemo-kininduktion während einer Infektion mit Listeria monocytogenes“</p> <p>Note: sehr gut</p> <p>1988-1997 Gustav Stresemann-Schule Bad Wildungen</p> <p>Allgemeine Hochschulreife</p> <p>Abschlussnote: 1,3</p> <p>1984-1988 Grundschule Bad Wildungen-Braunau</p> |

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, ausschließlich die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den be-nutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Informationen als solche kenntlich gemacht habe.

Gatersleben, den 06.03.2008

Kai Schallau