Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Verbundvorhaben: Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen

Teilvohaben 1: Konstruktion, Produktion und Charakterisierung

Teilvorhaben 2: Reinigungsoptimierung, Scale up und posttranslationale Multimerisierung

Zuwendungsempfänger:

Teilvorhaben 1: Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK)

Teilvorhaben 2: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Förderkennzeichen:

22037511 bzw. 11NR375, 22014412 bzw. 12NR144

Laufzeit:

01.07.2012 bis 31.01.2017

Monat der Erstellung:

08/2017

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Schlussbericht

I. Ziele

In diesem Projekt sollte der Zusammenhang zwischen Sequenzmotiven, Proteingröße und den Materialeigenschaften dargestellt werden. Des Weiteren sollte geprüft werden, inwieweit in Tabak in Gazehäusern und im Freiland diese materialwissenschaftlich interessanten Eiweiße effizient hergestellt werden können. Besonders aus ökonomischen Gründen ist die Entwicklung von preiswerten und effizienten Reinigungsmethoden auch in größerem Maßstab eine weitere wichtige Aufgabe, die gelöst werden. Folgende wissenschaftliche Ziele standen im Fokus des Projektes:

1. Erzeugung von transgenen Tabakpflanzen, die Multimere verschiedener Spinnenseidenproteine, Elastine und Gluteline mit ausreichend großem Molekulargewicht produzieren

2. Optimierung der Expression in transgenen Pflanzen

3. Erzeugung von linearen Dimeren durch posttranslationale Fusion *in vitro* durch Transglutaminasen und

4. die materialwissenschaftliche und mikro/nanomechanische Charakterisierung der erzeugten Proteine, um Zusammenhänge zwischen Sequenzen, Molekulargewichten (Multimerisierungsgrad und Heteromerisierungsgrad) und den mechanischen Eigenschaften herzustellen.

Die Erfüllung folgender technischer Ziele sollte die Voraussetzungen für das Erreichen der wissenschaftlichen Ziele schaffen:

1. Optimierung der Pflanzenanzucht, des Erntezeitpunktes und die Auswahl der am besten geeigneten Blätter

2. Optimierung der Blattextraktion

3. Optimierung der Reinigung durch mITC inclusive der qualitativen und quantitativen biochemischen Analyse im Labor- und im Technikumsmaßstab

4. Optimierung der mikro/ nanomechanischen Charakterisierung der der Spinnenseidenproteinderivate und Etablierung von geeigneten Methoden der Schichtbildung für Härte- und Elastizitätsmessungen

1. Aufgabenstellung

Folgende Aufgaben wurden in Form von 3 Arbeitspaketen gestellt:

- Design von Expressionsvektoren zur Produktion Spinnenseidenproteinvarianten als Multimere in Tabakpflanzen; Erzeugung und Charakterisierung hochexprimierender transgener Linien.
- Reinigung und Formulierung von Spinnenseidenproteinen aus Tabakblättern. Screening auf geeignete Transglutaminasen zur Quervernetzung
- Biochemische und materialwissenschaftliche Analysen (Unterauftrag) der Spinnenseidenproteinmultimere.

Hinsichtlich der erzielten Ergebnisse wird auf Teil II verwiesen.

Die Arbeiten folgten folgendem Plan:

Arbeitspaket 1

Design von Expressionsvektoren

Ein Expressionsvektor zur Erzeugung von FLAG-Multimeren existiert bereits und wurde zur transienten und stabilen Transformation von Tabak eingesetzt (siehe eigene Vorarbeiten). Ein vergleichbarer Vektor zur Produktion von 60xELP wurde entworfen und von der Fa. Geneart synthetisiert. Er wurde transient erfolgreich getestet und steht zur Verfügung.

Innerhalb des Projektes werden in entsprechender Weise weitere Vektoren zur Produktion von MaSp1-Multimeren, von MaSp2-Multimeren und von Glutelinmultimeren erzeugt. Darüber hinaus wenden wir uns der samenspezifischen Expression zu. Hierzu werden Signalpeptid-dnaB InteinC-FLAG-HIS-Tag-dnaB InteinN-KDEL-; Signalpeptid- dnaB InteinCmut-60xELP-cmyc-Tag-dnaB InteinNmut-KDEL- und Signalpeptid- dnaB InteinC-Glutelin-HIS-Tag-dnaB InteinN-KDEL-Konstrukte unter Kontrolle des USP-Promotors gestellt.

Transiente Expression

Die Vektoren werden durch Elektroporation in A.tumefaciens transformiert. Die isolierten Agrobakterienlinien werden durch Restriktionsanalyse mit HindIII auf Anwesenheit der Expressionskassette geprüft und zur transienten Expression durch Agro-Injektion in N. benthamiana genutzt. Durch Westernanalysen unter Nutzung des HIS-Tags bzw. des c-myc-Tags wird die Expression der Spinnenseidenmultimere in 3-10% Gradientengelen geprüft. Von geeigneten Klonen werden durch Agro-Infiltration größere Mengen an geeignetem Rohextrakt mit Spinnenseidenproteinen erzeugt, um wichtige methodische Arbeiten (Extraktion, verschiedene Reinigungsschritte) schon vor der Erzeugung stabiler Transfomanten durchführen zu können. Die transiente Expression der samenspezifischen Konstrukte erfolgt in Blättern durch Ko-Expression eines samenspezifischen Transkriptionsfaktors (FUS-3 oder ABI-3). Dieser wird unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors in den gleichen Blättern zur Expression gebracht und aktiviert den USP-Promotor.

Erzeugung stabiler Transformanten

Stabil transformierte Tabaklinien werden mit Hilfe der „Leaf Disc“ Methode erzeugt und durch Westernanalysen charakterisiert. Pro Konstrukt werden 50 das jeweilige Transgen exprimierende TG0-Transformanten produziert, um die Kapazität des CaMV35S-Promotors voll auszunutzen und hochexprimierende Pflanzen zu selektieren. Hochexprimierende Linien werden geselbstet und die Nachkommen erneut durch Westernanalysen getestet. Vorher wird durch Segregationsanalyse der Kanamycinresistenz nach „single locus insertions“ gesucht (3:1-Spaltung), um homozygote und hochexprimierende Pflan¬zen einfacher isolieren zu können. Das wird durch Southernanalysen im Blattmaterial unterstützt. Nach weiterer Selbstung werden aus TG2-Linien potentiell homozygote Linien ausgewählt und durch Southern blot untersucht. Homozygosität wird durch Rückkreuzung mit dem Wildtyp bestätigt. K- und Q-getaggte MaSp1-Linien zur Dimerisierung/Multimerisierung durch Transglutaminase sind vorhanden.

Bei den samenspezifischen Konstrukten werden ebenfalls 50 TG0-Transformanten pro Konstrukt erzeugt und die Expression im reifen Samen durch Western Blot getestet. Hochexprimierende Linien werden geselbstet und die Nachkommen erneut durch Westernanalysen getestet. Dabei wird bei ausgewählten Linien die Expressionshöhe und der Multimerisierungsgrad während der Samenreifung geprüft. Zusätzlich erfolgt Expressionsanalyse nach Lagerung. Nach 2 Jahren wird eingeschätzt, inwieweit Experimente zur Erzeugung transgener Erbsen begonnen werden. Dazu können die gleichen Konstrukte verwendet werden.

Arbeitspaket 2

Kontrollierte Anzucht der Pflanzen

Während Vorexperimente zur Extraktion und Reinigung an Material aus transienten Expressionsexperimenten durchgeführt werden, erfolgen die Hauptarbeiten an Blattmaterial aus Gewächshäusern bzw. aus für transgene Pflanzen zugelassenen Gazehäusern im Freiland. In Vorarbeiten wurde bereits der geeignete Erntezeitpunkt für Blätter mit FLAG-Multimeren ermittelt. Solche Analysen erfolgen für alle Konstrukte. Freisetzungsversuche erfordern homozygotes Material und können daher für FLAG-Intein-HIS frühestens 2013 durchgeführt werden. Die Entscheidung über das Stellen eines solchen Antrags fällt während der Projektlaufzeit frühestens im September 2013.

Reinigung im Labormaßstab

Die Reinigung erfolgt bei ELP-Fusionen über membranbasiertes Inverse Transition Cycling, wie wir es für Spinnenseidenproteine entwickelt haben (siehe Ausführungsbeispiel 2.2). Hierbei müssen die benutzten Methoden für jede Proteinvariante angepasst werden. Prote¬ine mit HIS-Tag und ohne ELP werden über regenerierbare Nickel-Säulen affinitätschro-matografisch isoliert, um zunächst im Maßstab von etwa 1 mg Spinnenseidenproteinmul¬timere zu erzeugen. In beiden Varianten erfolgt anschließend die Entsalzung durch Sepha¬dex-Chromatografie, die Lyophilisierung und die biochemische Charakterisierung (Löslichkeit in

Wasser und in Hexafluorisopropanol, Molekulargewicht, Einheitlichkeit der Proteine). Das so erzeugte Material kann für erste materialwissenschaftliche Analysen im Mikromaßstab genutzt werden. Zur Vorbereitung von Reinigungen von Multimeren ohne ELP in größerem Maßstab werden methodische Versuche zur scalierbaren Reinigung durchgeführt, die die hohe Hitze- und Säurestabilität der Spinnenseidenproteine ausnutzen und einen Ammonium-sulfatfraktionierungsschritt beinhalten. Die an den affinitätsgereinigten Proteinen gewon¬nenen Erkenntnisse zur Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und/oder in wässrigen Lösungen werden genutzt, um weitere selektive Schritte einzubauen. Diese Arbeiten erfolgen in enger Kooperation zwischen den Arbeitsgruppen in Halle und in Gatersleben.

Reinigung im Technikumsmaßstab

Das Blattmaterial wird von der AG Conrad bereitgestellt. Es ist geplant, pro Saison ca. 50 kg Pflanzenmaterial zu verarbeiten. Zum Scale-up der Reinigung wird auf der Erfahrung der AG Conrad aufgebaut. Dazu kommt zunächst die membranbasierte Inverse Transition Cycling Methode zum Einsatz. Dabei ist zu untersuchen, wie ein vermuteter proteolytischer Abbau der Zielproteine vermieden werden kann. Ggf. werden weitere Reinigungsschritte erforderlich (Präzipitation, Extraktion, Chromatographie). Untersuchungen zur Lagerstabilität der Zielproteine sollen erfolgen, damit ein Transport ohne Veränderung möglich wird.

Für die Versuche zur Reinigung und Formulierung stehen Membranfiltrations- und Chromatographieanlagen, Behälter, Zentrifugen sowie eine Sprühtrocknungsanlage zur Verfügung.

Der Zellaufschluß des Blattmaterials soll zusammen mit einem Hersteller von Kolloidmühlen entwickelt werden.

Posttranslationale Dimerisierung/Multimerisierung von Spinnenseidenproteinvarianten in vitro

Ziel dieser Arbeiten ist die Verknüpfung von K-MaSp1-ELP und Q- MaSp1-ELP durch Transglutaminase bei möglichst niedrigen Temperaturen, um Abbauprozesse zu minimieren. Hierzu sollen neuartige Transglutaminasevarianten benutzt werden, deren Erzeugung in Bakterien optimiert werden muss. Dazu ist zunächst ein Screening der vorhandenen Transglutaminase-Bibliotheken auf kälteaktive Enzyme durchzuführen. Dazu kann die vorhandene Technologie der AG Pietzsch verwendet werden, die schon erfolgreich für die Suche nach hitzestabilen Enzymen eingesetzt wurde.

Die Vorgehensweise beim Screening ist in Abb. 11 schematisch dargestellt. Die existierende Transglutaminase-Bibliothek umfasst ca. 6000 Klone, die jeweils einen Aminosäureaustausch im Vergleich zum Wildtyp-Enzym tragen. Alle Klone sollen auf Deep-well-Mikrotiterplatten angezogen werden. Anschließend erfolgt die Zellabtrennung durch Zentrifugation. Der Kulturüberstand wird entfernt und das Zellpellet mittels enzymatischer Lyse aufgeschlossen. Anschließend erfolgt noch die proteolytische Abspaltung der pro-Sequenz der pro-

Transglutaminase, um das aktive Enzym freizusetzen. Der Aktivitätstest wird dann bei Temperaturen von 4°C, 15°C und der Standardtemperatur von 37°C durchgeführt, um kälteaktive Varianten zu identifizieren.

Arbeitspaket 3

Im Rahmen eines an das Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik zu vergebenden Unterauftrages werden aus hochgereinigten Proteinen dünne Schichten assembliert, die morphologisch und nanomechanisch charakterisiert werden. Die nanomechanische Charakterisierung wird durch rasterkraftmikroskopische Nanoindentation vorgenommen, wobei elastische Eindringmodule gemessen und miteinander verglichen werden. An Proteinschichten mit einer Dicke > 4 Mikrometer wird die dynamische Nanoindentation angewendet, die eine Bestimmung der komplexen Eindringmodule und der Härte nach Martens erlaubt. An auf geeigneten Trägern adsorbierten oder spezifisch gebundenen Proteinmolekülen werden mittels Einzelmolekül-Kraft-Spektroskopie Kraft-Distanz-Kurven gemessen und statistisch sowie modellbasiert ausgewertet. Die ermittelten mechanischen Parameter, wie z.B. molekulare Kraftkonstanten und elastische Eindringmodule, werden den zu Grunde liegenden Proteinsequenzen mit dem Ziel zugeordnet, physikalische Zusammenhänge mit der Moleküllänge und –struktur aufzuklären.

2. Stand der Technik

Während der Evolution haben Spinnen die Produktion und Nutzung sehr verschiedener proteinbasierter Seidenmaterialien entwickelt (Übersicht bei (1), (2)). Diese Seidenfasern weisen außerordentliche Eigenschaften auf, die hinsichtlich Festigkeit und Elastizität technische Fasern bei weitem übertreffen ((3); (4)). Die „dragline silk“, von den Spinnen als Haltefaden und als Rahmenfaden ihrer Netze benutzt, weist dabei ganz besondere mechanische Eigenschaften auf: Sie ist fünfmal fester als Stahl und dreimal zäher als Kevlar (p-Aramid), die beste von Menschen hergestellte Kunstfaser. „Drag line silk“ besteht aus 2 Spidroinen, „major ampullate spidroin 1“ (MaSp1) und „major ampullate spidroin 2“ (MaSp2,; (1, 5)). Die Fangfadenseiden, z.B. die flagelliforme Seide, sind weniger fest als die „dragline silk“, können aber auf das Mehrfache ihrer Länge gedehnt werden, bevor sie reißen. Die flagelliforme Seide weist somit eine sehr hohe Elastizität und Dehnbarkeit auf ((6); (7); Übersicht bei (8)). Flagelliforme Seide kann die kinetische Energie der Beute daher sehr gut aufnehmen und wäre deshalb als Material zur mechanischen Schwingungsdämpfung hervorragend geeignet. Sie besteht aus nur einem Protein, genannt FLAG (Übersicht bei (8)).

Die molekulare Struktur der Seiden wird durch Proteinkristalle, die durch weniger organi¬sierte Proteinketten unterbrochen werden, charakterisiert (9). Verschiedene repetitive

Primärstrukturmodule („ensemble repeats“, Übersicht bei (8), (10)) bedingen Sekundärstrukturen, denen Eigenschaften verschiedenen Spinnenseiden zugeordnet werden können. Kristalline ß-Faltblätter tragen hier besonders zur hohen Dehnungsfestigkeit von Spinnenseidenfasern bei. ß-Faltblätter werden durch natürliche Wechselwirkung zwischen Aminosäuresequenzen mit multiplen „repeats“ von Alanin, Glycin-Alanin oder Glycin-Alanin-Serin gebildet. Diese Sequenzen sind typisch für MaSp1 und MaSp2 von Nephila clavipes ((5); (1)) sowie für Araneus diadematus Fibroin-3 und Araneus diadematus Fibroin-4 (ADF-3; ADF-4; Übersicht bei (11). Nicht-kristalline Regionen bestehen bei Spinnenseiden aus entweder GPGXX-„repeats“ (ß-Spiralen) oder aus helicalen GGX-„repeats“ (9). Diese Regionen bewirken Elastizität und kommen besonders häufig im Protein FLAG der flagelliformen Seide von Nephila clavipes vor (12).

An den N- und C-Termini der Spinnenseidenproteine befinden sich nicht-repetitive terminale Domänen mit wichtigen Funktionen für die Assemblierung der Spinnenseidenproteine zu Fasern (13). Welche Rolle sie bei der Kontrolle der Kettenassemblierung in Abhängigkeit von der Ionenzusammensetzung, dem pH-Wert-Wechsel beim Durchgang durch die Spinndrüsen und von mechanischen Stimuli spielen, ist Gegenstand aktueller Forschungen (14); (15); (16). Grundsätzlich werden 2 Modelle zum Mechanismus der Faserassemblierung vorgeschlagen: flüssig-kristallines Verhalten der Spinnflüssigkeit oder Mizellenbildung und Formierung von Globulen, die durch Scherkräfte zu Fasern werden (8).

Grundlage der Produktion von Spinnenseidenproteinen in verschiedenen Expressionssys¬te-men ist die Verfügbarkeit geeigneter cDNA-Sequenzen. Natürliche Spinnenseidenproteine weisen ein sehr hohes Molekulargewicht von mindestens 250 kDa bis zu mehreren 100 kDa auf (17); (18). „Major ampullate“ (MA) Fibroine besitzen sehr große Exons kodierender Sequenzen von über 9000 bp (8), was in etwa einem Molekulargewicht von 330 kDa pro Exon entsprechen würde. Bisher stehen nur zwei vollständig aufgeklärte Spinnenseidenproteinsequenzen zur Verfügung , das FLAG-Protein von Nephila clavipes (12) und ein MA-Protein der Schwarzen Witwe (Latrodectus hesperus) (17), (19). Für Expressionsexperimente wurden im Wesentlichen 3´-Sequenzen verschiedener Spinnen¬sei-denproteine genutzt (5); (1); (20); (21); (22); Übersicht bei (11). Deshalb wurden Strategien entwickelt, um rekombinante seidenartige Proteine, die natürlichen MA-Proteinen bzw. flagelliformen Seidenproteinen stark ähneln, zu konstruieren (11). Das betrifft die Expression in E. coli (23); (24); (25); (26), in Pichia pastoris (27), in Pflanzen (28); (29); (30), in Säugerzellen (31), in transgenen Mäusen (32) und in Baculovirussystemen (33); (26). Die Produktion in E. coli war aufgrund der hohen Repetitivität, der Größe der Gene und der unterschiedlichen Kodonnutzung zunächst schwierig (25); (8). Huemmerich und Mitarbeiter publizierten 2004 eine neue Klonierungsstrategie, die auf der Kombination von synthetischen DNA-Modulen mit authen¬tischen Spinnenseidensequenzen beruht (26). Die Klonierung erfolgte durch übergangslose Fusion der DNA-Elemente (34). Für die synthetischen DNA-Module wurde die bakterielle Kodonnutzung gewählt. Aus den authentischen Sequenzen (C-terminale nichtrepetitive Sequenzen) wurden für die Expres¬sion in E.coli problematische Kodonen durch Mutagenese entfernt. Verschiedene synthetische Elemente basierend auf den MA-Proteinen ADF-

3 und ADF-4 (21) konnten auf diese Weise mit nichtrepetitiven C-terminalen Regionen verknüpft werden. Die Reinigung erfolgte, wie auch in anderen Expressionsstudien gezeigt, durch einen Hitzeschritt gefolgt von Ammoniumsulfatpräzipitation (26); (27). Auch die Kombination von Säurepräzipitation und Ammoniumsulfatfraktionierung ermöglicht die effiziente Reinigung von Spinnenseidenproteinen aus E. coli (35). Das auf diese Weise entwickelte bakterielle Expressionssystem stellt die Basis für die Produktion von spinnenseidenproteinähnlichen Eiweißen in Fermentoren dar (11). Diese Technologie wird in der Firma AMSilk genutzt und weiterentwickelt (http://www.amsilk.com/).

Spinnenseidenproteine nativer Größe können auf diese Weise nicht erzeugt werden. Es wird angenommen, dass die Größe der „dragline silk“ Proteine ein Schlüsselfaktor für die mechanischen Eigenschaften gesponnener Fasern ist, da alle bisher untersuchten Spinnen sehr hochmolekulare „dragline silk“ Proteine erzeugen (35); (17); (18). Weiterhin enthalten diese Proteine sich wiederholende Peptidmotive (5); (10). Große Proteine weisen eine größere Zahl dieser Motive auf. Dadurch werden mehr Interaktionen innerhalb der Proteinketten und zwischen den Proteinketten möglich. Letztlich können bei Nutzung kleinerer Proteine auch mehr Fehlstellen durch Proteinkettenenden in den Fasern auftreten (35). Durch metabolisches Engineering von E. coli wurden „dragline silk“-ähnliche Proteine nativer Größe erzeugt. Der Glycyl-tRNA-Pool und der Glycin-Pool wurden erhöht. Die aus diesem Material gesponnenen Fasern zeigten ähnliche mechanische Eigenschaften wie native Spinnenseide. Rekombinante Spinnenseidenproteine mit niedrigerem Molekular¬gewicht zeigten keine vergleichbaren Eigenschaften nach Verspinnung (35). Die Verspinnung erfolgte in HFIP (Hexafluorisopropanol) und unter diesen Bedingungen wurden offensichtlich keine nichtrepetitiven N- und C-Termini gebraucht. Bei der Prozeßierung von Seide in Wasser sind diese Domänen offenbar wichtig (36).

Bei der Expression in eukaryotischen Hefen waren es vor allem Probleme bei der Reinigung, die eine industrielle Nutzung der Spinnenseidenproteine bisher nicht ermöglichten (27). Bei der Expression von MaSp1-Derivaten in Pflanzen wurden zur Reinigung die Hitzestabilität und die Säurestabilität der Spinnensei¬denproteine genutzt und Ammoniumsulfatpräzipitation angewendet. Auf diese Weise konn¬ten die Spinnenseidenproteine stark angereichert werden, allerdings war die Effizienz der Methode nicht ausreichend (28). Die Expression von Spinnenseiden-Elastin-like-Peptide (ELP)-Fusionsproteinen in Tabak ermöglichte eine Verdopplung der Expressionshöhe und die ELP-basierte Reinigung über Inverse Transi¬tion Cycling (29), Übersicht bei (37). Obwohl diese Technik im kleinen Labormaßstab sehr gut funktioniert, bewirken notwendige schnelle Temperaturwechsel und wiederholtes Trennen durch Zentrifugieren Probleme beim “Upscaling“.

Tierische Expressionssysteme (Säugerzelllinien, transgene Mäuse) wiesen zu niedrige Expression auf. Die Effizienz der Reinigung war ebenfalls nicht ausreichend (32).

Im Baculovirussystem wurden erfolgreich „dragline silk“ Proteine erzeugt (26). Große Vorteile dieses Systems sind der einfache Kultivierungsprozess und die relativ einfachen Möglichkeiten die

Expressionsbedingungen zu modifizieren. Ein Nachteil ist, dass dieses System für die Produktion in großem Maßstab zu aufwendig ist (8).

Transgene Pflanzen können durchaus eine Option für die Produktion von Spinnenseiden-proteinen im großen Maßstab sein, wenn die Fragen der ausreichenden und wirtschaftlichen Reinigung gelöst werden (9); (8). Verbesserte Reinigungsverfahren werden im Projekt mit der vorgeschlagenen Primärer¬zeugung von Spinnenseidenproteinderivaten nativer Größe kombiniert.

Während in der Natur Spinnenseidenproteine im Wesentlichen zu Fäden assembliert werden, kann man in vitro daraus auch Filme, Hydrogele, Nanofibrillen, Kapseln, sphärische Partikel oder poröse Schwämme herstellen (38); (8); http://www.amsilk.com/; (9). Darüber hinaus bestehen Möglichkeiten der Oberflächenmodifizierung dieser Partikel wie die Insertion einer Integrinerkennungssequenz RGDS zur Verbesserung von Zellanheftung (39) und einer Reihe von weiteren Modifikationen, die alle der Anwendung in der regene¬rativen Medizin dienen (Übersicht bei (38). Für die Anwendung beim Tissue Engineering kommt der Erzeugung von geeigneten Rahmenstrukturen („scaffolds“) unter Nutzung von Seidenproteinen durch Elektrospinning besondere Bedeutung zu (Übersicht bei (40)). Es ist eine überaus verlockende anwendungstechnische Perspektive, die für Spinnenseidenfäden bekannten mechanischen Polymereigenschaften auf Schichten, Bänder und Scaffolds zu übertragen.

Literatur

1. Hinman M, Dong Z, Xu M, & Lewis RV (1992) Spider silk: a mystery starting to unravel. (Translated from eng) Results Probl Cell Differ 19:227-254 (in eng).

2. Craig CL (2004) Broad patterns of speciation are correlated with the evolution of new silk proteins in spiders but not in the lepidoptera. (Translated from eng) Biomacromolecules 5(3):739-743 (in eng).

3. Gosline JM, Guerette PA, Ortlepp CS, & Savage KN (1999) The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. (Translated from eng) J Exp Biol 202(Pt 23):3295-3303 (in eng).

4. Vollrath F & Knight DP (2001) Liquid crystalline spinning of spider silk. Nature 410(6828):541-548.

5. Xu M & Lewis RV (1990) Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. Proceedings of the National Academy of Sciences 87(18):7120-7124.

6. Vollrath F & Edmonds DT (1989) Modulation of the mechanical properties of spider silk by coating with water. Nature 340(6231):305-307.

7. Köhler T & Vollrath F (1995) Thread biomechanics in the two orb-weaving spiders Araneus diadematus (Araneae, Araneidae) and Uloborus walckenaerius (Araneae, Uloboridae). Journal of Experimental Zoology 271(1):1-17.

8. Romer L & Scheibel T (2008) The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. (Translated from eng) Prion 2(4):154-161 (in eng).

9. Kluge JA, Rabotyagova O, Leisk GG, & Kaplan DL (2008) Spider silks and their applications. Trends in Biotechnology 26(5):244-251.

10. Hayashi CY, Shipley NH, & Lewis RV (1999) Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. International Journal of Biological Macromolecules 24(2-3):271-275.

11. Scheibel T (2004) Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. Microb Cell Fact 3(1):14.

12. Hayashi CY & Lewis RV (2000) Molecular Architecture and Evolution of a Modular Spider Silk Protein Gene. Science 287(5457):1477-1479.

13. Ittah S, Cohen S, Garty S, Cohn D, & Gat U (2006) An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation. (Translated from eng) Biomacromolecules 7(6):1790-1795 .

14. Hagn F, et al. (2010) A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. Nature 465(7295):239-242.

15. Askarieh G, et al. (2010) Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. Nature 465(7295):236-238.

16. Rammensee S, Slotta U, Scheibel T, & Bausch AR (2008) Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(18):6590-6595.

17. Ayoub NA, Garb JE, Tinghitella RM, Collin MA, & Hayashi CY (2007) Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes. PLoS ONE 2(6):e514.

18. Sponner A, et al. (2005) Characterization of the Protein Components of Nephila clavipes Dragline Silk†. Biochemistry 44(12):4727-4736.

19. Ayoub NA & Hayashi CY (2008) Multiple Recombining Loci Encode MaSp1, the Primary Constituent of Dragline Silk, in Widow Spiders (Latrodectus: Theridiidae). Molecular Biology and Evolution 25(2):277-286.

20. Beckwitt R & Arcidiacono S (1994) Sequence conservation in the C-terminal region of spider silk proteins (Spidroin) from Nephila clavipes (Tetragnathidae) and Araneus bicentenarius (Araneidae). Journal of Biological Chemistry 269(9):6661-6663.

21. Guerette PA, Ginzinger DG, Weber BHF, & Gosline JM (1996) Silk Properties Determined by Gland-Specific Expression of a Spider Fibroin Gene Family. Science 272(5258):112-115.

22. Hayashi CY & Lewis RV (1998) Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. Journal of Molecular Biology 275(5):773-784.

23. Prince JT, McGrath KP, DiGirolamo CM, & Kaplan DL (1995) Construction, Cloning, and Expression of Synthetic Genes Encoding Spider Dragline Silk. Biochemistry 34(34):10879-10885.

24. Fahnestock SR & Irwin SL (1997) Synthetic spider dragline silk proteins and their production in Escherichia coli. (Translated from eng) Appl Microbiol Biotechnol 47(1):23-32.

25. Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, Cheley S, & Bayley H (1998) Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in <i>Escherichia coli</i&gt. Appl Microbiol Biotechnol 49(1):31-38.

26. Huemmerich D, et al. (2004) Primary Structure Elements of Spider Dragline Silks and Their Contribution to Protein Solubility†. Biochemistry 43(42):13604-13612.

27. Fahnestock SR & Bedzyk LA (1997) Production of synthetic spider dragline silk protein in Pichia pastoris. (Translated from eng) Appl Microbiol Biotechnol 47(1):33-39.

28. Scheller J, Guhrs K-H, Grosse F, & Conrad U (2001) Production of spider silk proteins in tobacco and potato. Nat Biotech 19(6):573-577.

29. Scheller J, Henggeler D, Viviani A, & Conrad U (2004) Purification of Spider Silk-elastin from Transgenic Plants and Application for Human Chondrocyte Proliferation. Transgenic Research 13(1):51-57.

30. Menassa R, et al. (2004) Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. Plant Biotechnology Journal 2(5):431-438.

31. Lazaris A, et al. (2002) Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells. Science 295(5554):472-476.

32. Karatzas CN, et al. (2005) High-toughness Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells. Biopolymers Online, (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

33. Miao Y, et al. (2006) Expression of spider flagelliform silk protein in <i>Bombyx mori</i> cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system. Appl Microbiol Biotechnol 71(2):192-199.

34. Padgett KA & Sorge JA (1996) Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. (Translated from eng) Gene 168(1):31-35.

35. Xia XX, et al. (2010) Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered Escherichia coli results in a strong fiber. (Translated from eng) Proc Natl Acad Sci U S A 107(32):14059-14063.

36. Jin H-J & Kaplan DL (2003) Mechanism of silk processing in insects and spiders. Nature 424(6952):1057-1061.

37. Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, & Scheller J (2010) Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. Trends in Biotechnology 28(1):37-45.

38. Vepari C & Kaplan DL (2007) Silk as a Biomaterial. (Translated from Eng) Prog Polym Sci 32(8-9):991-1007.

39. Pierschbacher MD & Ruoslahti E (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309(5963):30-33.

40. Zhang D, et al. (2009) Electrospun polyacrylonitrile nanocomposite fibers reinforced with Fe3O4 nanoparticles: Fabrication and property analysis. Polymer 50(17):4189-4198.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Unteraufträge gingen an die Arbeitsgruppe Proteinbasierte Materialien, Fraunhofer IWM Halle

Unterauftrag in TV1: Spinnenseidenmultimere aus Pflanzen: Konstruktion, Produktion und Charakterisierung.

Die Arbeitsgruppe befasst sich im Rahmen eines Unterauftrages mit der mikro- und nanomechanischen Charakterisierung der in dünnen Schichten assemblierten Proteine (siehe auch 1.6). Dazu werden folgende Arbeiten durchgeführt:

1. Herstellung dünner Schichten aus ausgewählten, reinen Proteinen,
2. Untersuchung der Morphologie und Oberflächenstruktur dieser Schichten durch Rasterkraftmikroskopie und Elektronenmikroskopie,
3. Mechanische Charakterisierung der Proteinschichten durch AFM basierte Nanoindentation
4. Untersuchungen zur Einzelmolekülkraftspektroskopie an ausgewählten Proteinen und deren statistische Auswertung.

Ein weiterer Unterauftrag ging an die Klinik für Plastische, Ästhetische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover zur cytotoxischen Analyse der Spinnenseidenderivate aus Pflanzen und zur Prüfung von Fibroblastenwachstum auf diesen Materialien.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

1.1 Spinnenseidenproteinmultimere aus Tabakpflanzen

Die hohe Repetitivität der Spinnenseidensequenzen verursacht genetische Instabilität und mRNA-Instabilität auch in Pflanzen und daher ist die Größe der offenen Leserahmen begrenzt. Als Lösung bietet sich hier posttranslationale Multimerisierung der exprimierten Proteine an. Im Rahmen dieses Projektes wurden 3 Strategien zur posttranslationalen Multimerisierung von Spinnenseidenproteinderivaten benutzt:

- Dimerisierung durch native nichtrepetitive C-Termini
- Crosslinking durch Transglutaminase
- Intein-vermittelte Multimerisierung (*trans-splicing*)

1.1.1 Dimerisierung durch native nichtrepetitive C-Termini

Spinnenseidenproteine wie die „*major and minor ampullate spidroins“* oder das Spinnenseidenpretein FLAG enthalten nicht-repetitive C-Termini. Diese C-terminalen Sequenzen sind hochkonserviert. Diese Sequenzen wurden im „*spinning dope*“ nachgewiesen. Die C-terminale Sequenz des Spinnenseidenprotein FLAG ist nicht repetitiv und enthält Cysteine, die eine Dimerisierung durch Bildung von Schwefeldisulfidbrücken erlauben. Das FLAG protein enthält 2 Cysteine am C-Terminus (Abb.1C). Die Kreuzvernetzung von FLAG-Molekülen durch Disulfidbrücken wird daher vermutet. Da das pflanzliche ER nichtreduzierende Bedingungen sowie eine Menge Disulfidisomerase aufweist, sollte eine Dimerisierung ermöglicht werden. Wir fanden auch eine partielle Dimerisierung, die aber weder durch Mercaptoäthanol noch durch Dithiothreithrol zu beseitigen war (Abb.1A, B). Wir vermuten daher, dass hydrophobe Wechselwirkungen dafür verantwortlich waren (Abb. 1C). Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert (HAUPTMANN, V., N. WEICHERT, M. RAKHIMOVA & U. CONRAD: Spider silks from plants - a challenge to create native-sized spidroins. Biotechnol. J. 8 (2013) 1183-1192 http://dx.doi.org/10.1002/biot.201300204.). Wir haben aufgrund dieser Ergebnisse diesen Ansatz nicht weiter verfolgt.

1.1.2 Crosslinking durch Transglutaminase

Zunächst wurde eine Gensequenz, die auf dem Spinnenseidenprotein MaSp 1 beruhte, jeweils N-terminal entweder mit einem Lysin-Tag (GSGMKETAAARFERNHMDSGS) bzw. mit einem Glutamin-Tag (GSGMAETAAAAFERQHMDSGS) versehen. Diese Tags sollen eine optimale Verknüpfung durch Transglutaminase gewährleisten. Das Konstrukt enthält weiterhin 100xELP („*Elastin-like-Peptide*“)-Sequenzen (Abb.2). Diese ELP-Fusionen verbessern die Expressionshöhe und ermöglichen die effiziente Reinigung durch ITC (*inverse transition cycling*, PHAN, H.T. & U. CONRAD: Membrane-based inverse transition cycling: an improved means for purifying plant-derived recombinant protein-elastin-like polypeptide fusions. Int. J. Mol. Sci. 12 (2011) 2808-2821).

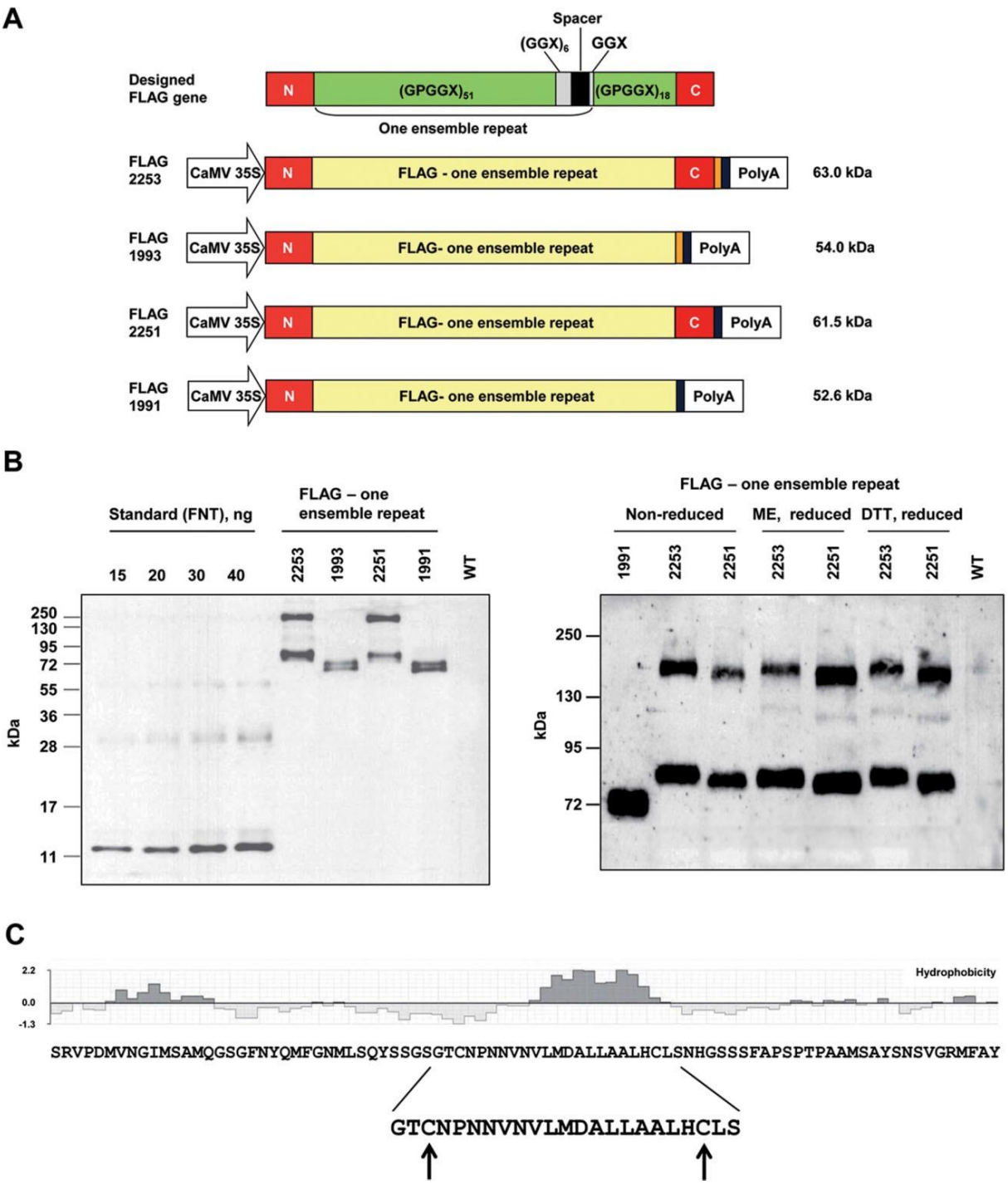

Abb.1: Dimerisierung von Derivaten des Spinnenseidenproteins FLAG durch nicht-pepetitive C-terminale Domänen *in planta.* FLAG-Derivate wurden im ER von transgenen Tabakblättern exprimiert (CaMV35S-Promotor, Signalpeptid, KDEL). Standardprozduen wurden zur Produktion, Propagierung, Selektion und Charakterisierung der transgenen Pflanzen benutzt (Fiedler, U., Phillips, J., Artsaenko, O., Conrad, U., Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. Immunotechnology,1997, 3, 205–216. 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 Mol. Biol. 1998, 38, 101–109. Gahrtz, M., Conrad, U., Immunomodulation of plant function by in vitro selected single-chain Fv intrabodies. Methods Mol. Biol. 2009, 483, 289–312). A: Design der FLAG kodierenden Gene (Sequenzen nach Hayashi, C. Y., Lewis, R. V., Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. Science 2000, 287, 1477–1479). B: Nachweis der FLAG-Protein-Expression in Tabakblattextrakten durch nichtreduzierende SDS-PAA-Gellektrophorese gefolgt von Immunoblotting auf Nitrozellulosemembranen. C: Aminosäuresequenz der C-terminalen nichtrepetitiven Domänen von FLAG. Der

Hydrophobiozitätsplot wurde mit Hilfe von Protean 3D software (Lasergene 10.0.1 software suite, DNASTAR Inc., USA) erstellt.

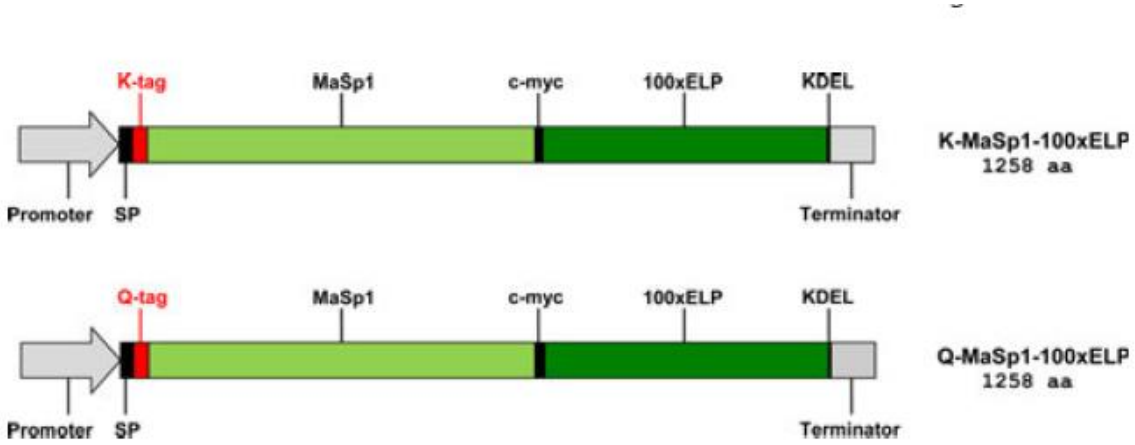

Abb.2: Schematische Darstellung der Expressionskassetten von MaSp1 – 100xELP mit K- bzw. Q-Tag. MaSp1: *Major ampullate spidroin 1* , 100xELP: 100 *repeats* des Peptides VPGXG, SP: LeguminB4 Signalpeptid, KDEL: ER-Retentionssignal, c-myc: Nachweis-Tag, Promotor: CaMV35S-Promotor für die ubiquitäre Expression in Tabakblättern.

Die Expressionsprofile wurden für beide Konstrukte durch Western Blot analysiert. 1 von 16 Q- MaSp1 – 100xELP- und 1 von 24 K- MaSp1 – 100xELP- wurden ausgewählt und die T1-Nachkommen analysiert. Banden erwarteter Größe (102 kDa) wurden nachgewiesen (Abb. 3 A, B).

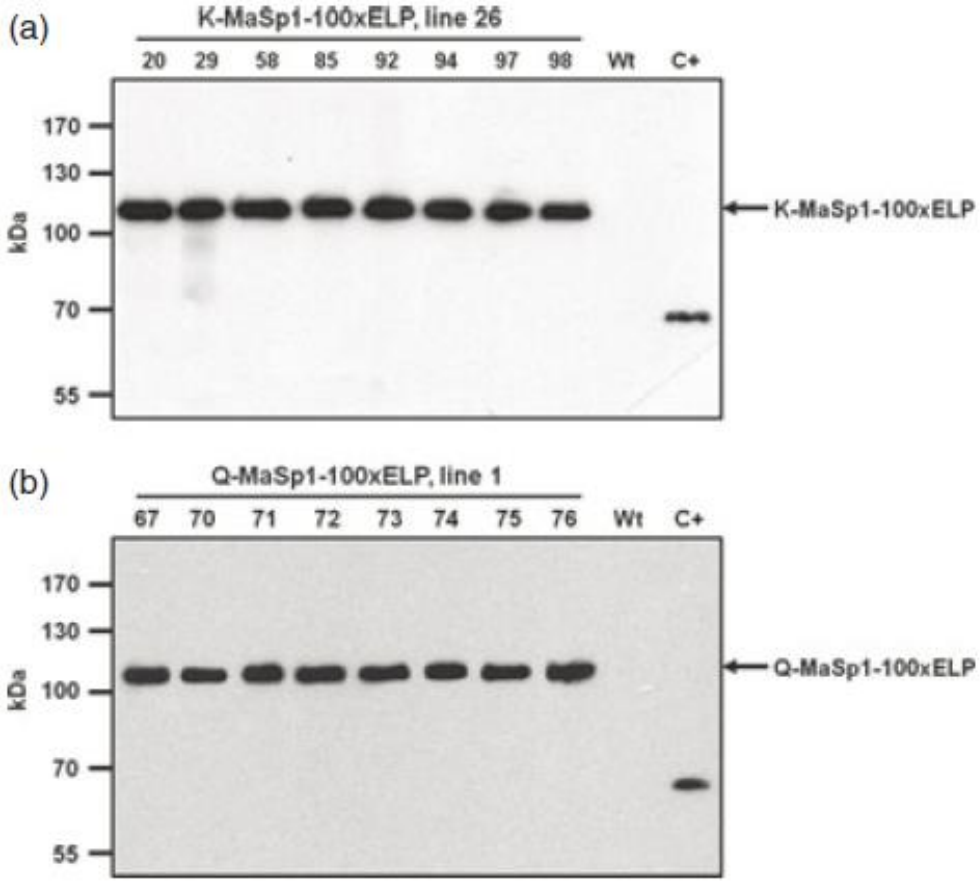

Abb.3: Expression der Fusionsproteine Q- MaSp1 – 100xELP (A) und K- MaSp1 – 100xELP (B) in Blättern stabil transformierter Tabakpflanzen. Blattextrakte wurden 10% SDS-PAGE getrennt und durch Western Blot analysiert. Nummern: transgene T1-Linien, WT: Wildtyptabak Samsun NN, C+: c-myc Western Blot-Standard.

Diese transgenen Tabakpflanzen wurden zur Reinigung durch ITC benutzt. Hierzu wurden Anpassungen der ITC-Methode vorgenommen. Im Wesentlichen wurde ein einstündiger Hitzeschritt zu Beginn der Reinigungsprozedur hinzugefügt. Die Ergebnisse der Reinigung werden beispielhaft in Abb. 4 gezeigt. Im linken Teil der Abbildung wird deutlich, dass membranbasiertes ITC eine sehr gut reproduzierbare Methode ist, mit deren Hilfe MaSpI-ELP einfach angereichert und gereinigt werden kann. Der rechte Teil der Abbildung zeigt entsalztes und lyophilisiertes MaSpI-ELP. Durch die Entsalzung und die Lyophilisierung enstehen fibröse

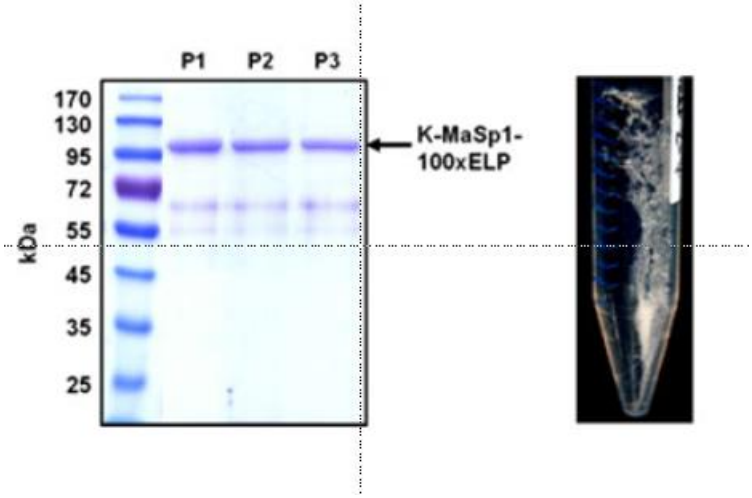

Abb.4: Reinigung von MaSpI-ELP durch mITC. Die Zielproteine aus 3 unabhängigen Reinigungen wurden durch SDS-PAGE und Coomassie –Färbung analysiert. Entsalztes MaSpI-ELP wurde lyophilisiert.

Strukturen. Die gereinigten Monomere Q-MaSpI-ELP und K-MaSpI-ELP wurden *in vivo* durch rekombinante Transglutaminase verknüpft. Auf diese Weise wurden sehr viel größere Moleküle erzeugt. Die *cross-linking* – Experimente wurden mit jeweils nur Q-MaSpI-ELP bzw. K-MaSpI-ELP sowie mit einem Mix durchgeführt. Die jeweiligen Monomere enthielten noch weitere Glutamine sowie jeweils ein Lysin innerhalb der KDEL-Sequenz am C-Terminus. Deshalb haben wir keine lineare Dimerisierung über die jeweiligen Enden erwartet, sondern mussten mit kreuzvernetztem Material rechnen. Hochmolekulares Material mit nahezu nativem Molekulargewicht mindestens 250 kDa) konnte erzeugt werden (Abb. 5).

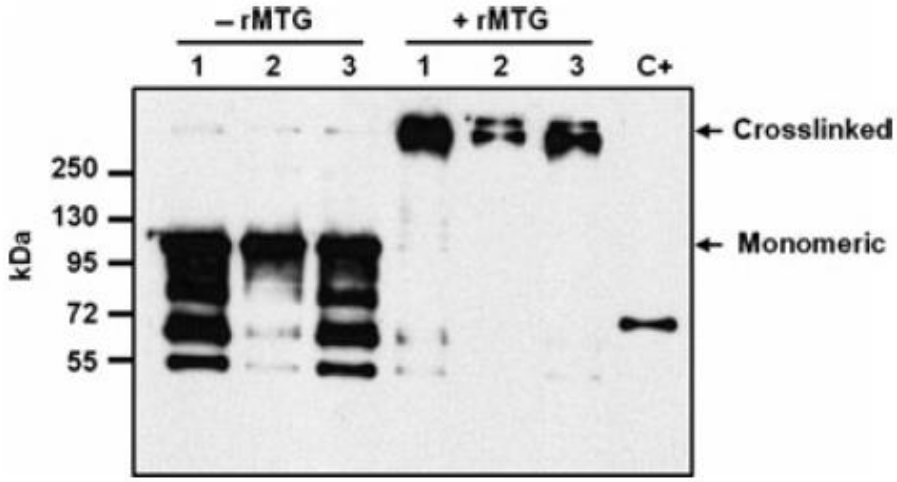

Abb. 5: *In vitro cross-linking* gereinigter MaSp1-100xELP-Proteine durch mikrobielle Transglutaminase (rMTG). 1: Q/K- MaSp1-100xELP, 2: Q-MaSp1-100xELP, 3: K- MaSp1-100xELP, C+: c-myc Western Blot-Standard. Western Blot-Analyse.

Dünne Schichten wurden aus Monomeren und Multimeren erzeugt und durch *Atomic force microscopy* (AFM) sowie durch AFM-basierte Nanointendation untersucht. Dabei zeigte sich, dass Multimerschichten die höchsten E-Module (*elastic penetration modulus)* aufwiesen. Diese Arbeiten wurden gemeinsam mit der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ (Prof. Dr. M. Pietzsch, Universität Halle) sowie den Kollegen vom Fraunhofer-Institut für Microstruktur von Materialien und Systemen IMWS, publiziert (WEICHERT, N., V. HAUPTMANN, M. MENZEL, K. SCHALLAU, P. GUNKEL, T.C. HERTEL, M. PIETZSCH, U. SPOHN & U. CONRAD: Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants. Plant Biotechnol. J. 12 (2014) 265-275).

1.1.3 Intein-vermittelte Multimerisierung (*trans-splicing*)

1.1.3.1 Intein-vermittelte Multimerisierung (*trans-splicing*) in Blättern

Zur Multimerisierung durch Intein-vermitteltes *trans-splicing* wurde das Spinnenseidenprotein FLAG ausgewählt. FLAG ist das Spinnenseidenprotein der Fangfäden und ermöglicht eine sehr hohe Elastizität. Die komplette Amionosäuresequenz von FLAG ist bekannt. Wir haben eine FLAG-Monomer-Einheit entworfen und sie mit Inteinsequenzen fusioniert. Inteine sind intervenierende Proteinelemente, die autokatalytisch aus *precursor*-Molekülen herausgespalten werden und die flankierenden Proteinsequenzen (Exteine) durch einen Prozess, den man als *protein-splicing* bezeichnet miteinander verbindet (Perler, 1998, Cell 92(1):1-4). Hier konnten wir das erste Mal überhaupt zeigen, dass hochmolekulare Spinnenseidenproteine (über 250 kDa, native Größe) durch *trans-splicing in planta* erzeugt werden können. Abb. 6 zeigt das Konstrukt, modellhaft den Prozess *in planta* und das Ergebnis. Die Intein-basierte Verknüpfung ermöglicht im Gegensatz zur Multimerisierung durch Transglutaminase die Erzeugung linearer Oligomere („*end-by-end*-“Verknüpfung). Dadurch können neuartige Werkstoffe entstehen.

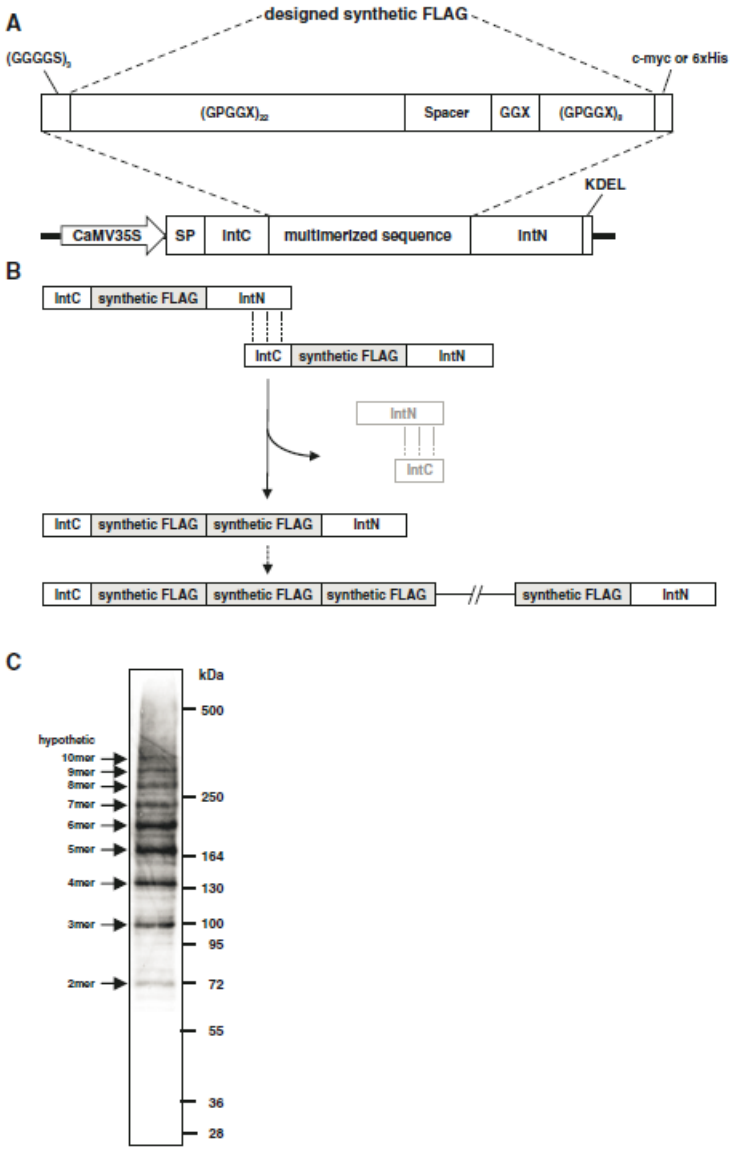

Abb. 6: Design der FLAG-Intein-Expressionskassetten und das Prinzip der Intein-vermittelten FLAG-Multimer-Assemblierung. A: Schematische Übericht der Expressionskassette; CaMV35S, cauliflower mosaic virus 35S konstitutiver Promotor; SP, legumin B4 Signalpeptid; KDEL, ER Retentionsequenz; IntN/IntC, C- und N-terminal Inteinsequenzen des *Synechocystis* sp.
DnaB Gens; GPGGXn; GGX/spacer, Motive in Wildtyp FLAG Sequenzen; (GGGGS)3, flexible *spacer*; c-myc-tag (Detektion) , 6xHis-tag (Reinigung). B Multimerisierung der synthetisch FLAG Monomere. C: Western blot Analysedurch 3–13 % SDS-PAGE und ECL-Nachweis.

Durch affinitätschromatografische Reinigung und Diafiltration konnten wir salzfreie Multimere erzeugen, die elektronenmikroskopisch charakterisiert wurden. Fibrillen mit einem Durchmesser von 1-2µm und einer Länge bis zu 500µM wurden sichtbar. Das unterstreicht das Potential dieser Proteine zur Faserbildung (Abb. 7).

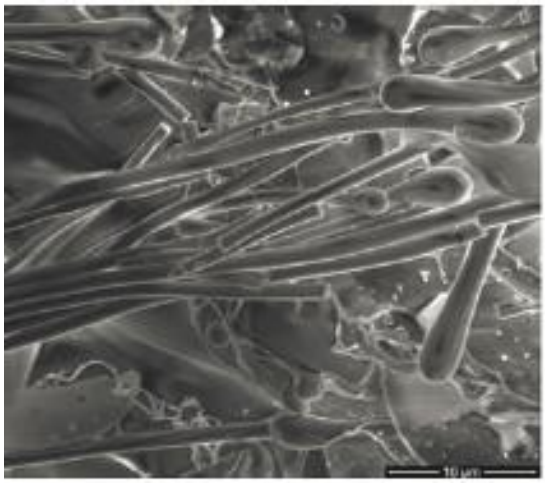

Abb. 7: SEM-Image von *in planta* produzierten FLAG-Multimeren.

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden gemeinsam mit unseren Kooperationspartnern publiziert und sind auch Teil eines Patentantrages (HAUPTMANN, V., N. WEICHERT, M. MENZEL, D. KNOCH, N. PAEGE, J. SCHELLER, U. SPOHN, U. CONRAD & M. GILS: Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. Transgenic Res. 22 (2013) 369-377 http://dx.doi.org/10.1007/s11248-012-9655-6.; HAUPTMANN, V., M. GILS, U. CONRAD & H.T. PHAN: Methods of producing and purifying polymeric proteins in transgenic plants (Patent). EP 2518081, Granted on 31.10.2012, IPK-Nr. 2011/07 (2012)).

Das Fehlen des ELP-Fusionsproteins in den Flag-Multimeren machte die Ausarbeitung einer speziellen Reinigungsstrategie für diese Art von Proteinen erforderlich, weil die etablierte membranbasierte ITC-Methode für derartige Proteine nicht anwendbar ist. Außerdem sind die Proteine der Fangspiralenseide sehr klebrig, so dass Reinigungsprozeduren über Membranen bzw. Dialysen vermieden werden sollten, da sie bis zum Totelverlust an Zielprotein führen würden. Als effektivste Methode für die Extraktion von nicht ELPylierten multimeren Flag-Inteinen aus Tabakblättern wurde schließlich eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung in Kombination mit einer Aceton-Fällung verwendet (siehe Jahresbericht 2015).

1.1.3.2 Intein-vermittelte Multimerisierung (*trans-splicing*) in Samen

Samen haben im Verlaufe der Evolution einmalige Eigenschaften entwickelt, die Überleben unter extremen Bedingungen ermöglichen. Für diese Eigenschaften ist die Anwesenheit von Speicherstoffen esentiell. Unter vielen verschiedenen Stoffkomponenten spielen Speicherproteine eine besondere Rolle. Diese Proteine bleiben über lange Dormanzperioden hin intakt. Die stabile Lagerung verschiedener Samenproteine ist daher eine wichtige Voraussetzung für die Erhaltung

der Samenfunktionalität. In verschiedenen *Molecular Farming*-Projekten wurden und werden diese Eigenschaften zur stabilen und lagerfähigen Produktion von interessanten Proteinen in Samen genutzt. Wir haben erfolgreich FLAG-Multimere, erzeugt über Intein-vermitteltes *trans-splicing*, in Tabaksamen produziert.

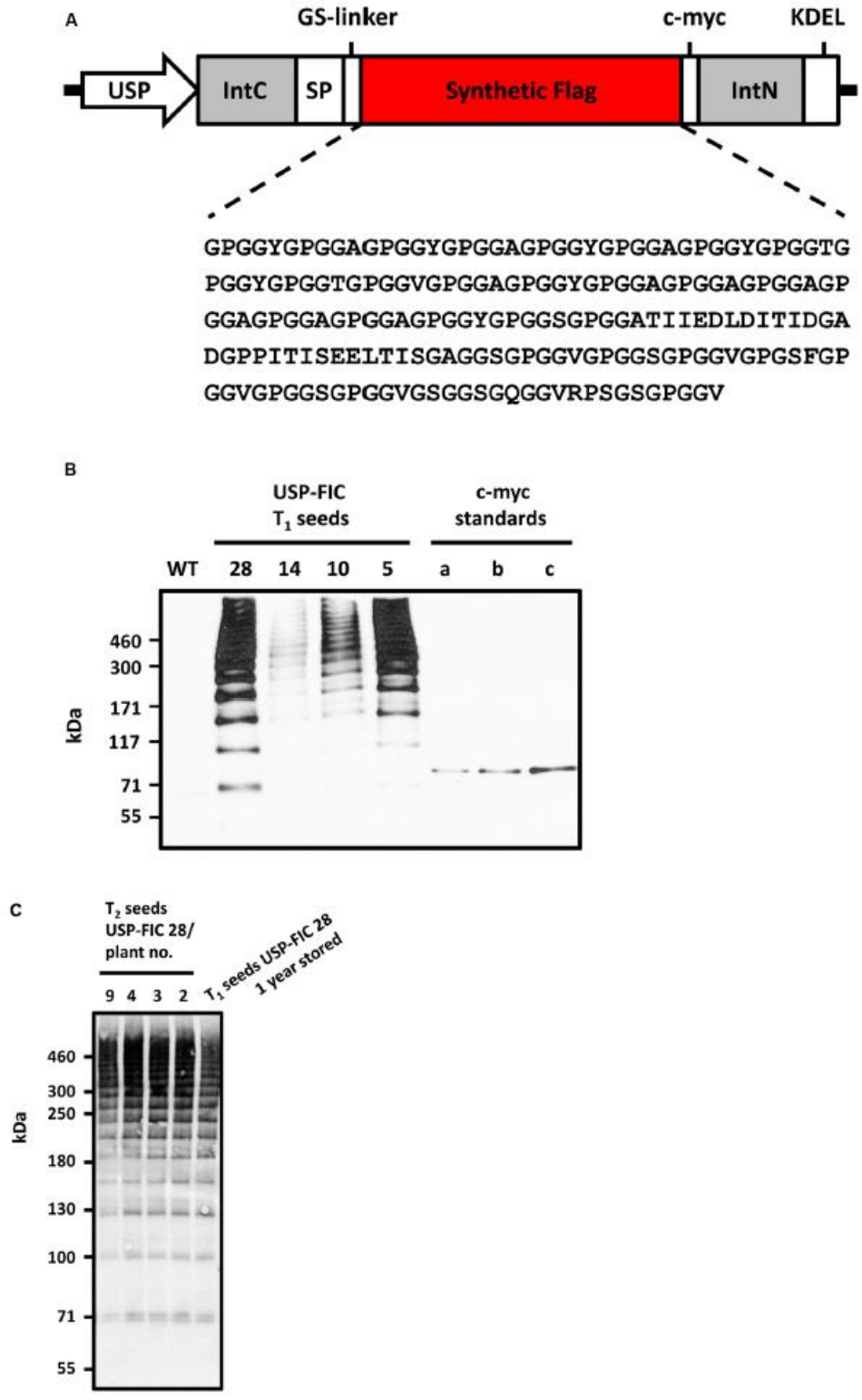

Abb. 8: Expression von FLAG-Multimeren in Tabaksamen. A: Schematische Repräsentation der Pflanzenexpressionskassette, USP samenspezifischer Promotor, SP, legumin B4 Signalpeptid; KDEL, ER Retentionsequenz; IntN/IntC, C- und N-terminal Inteinsequenzen des *Synechocystis* sp.

DnaB Gens; GS: GPGGXn; GGX/spacer, c-myc: Tag zur Immundetektion. B: Samenspezifische Expression von FLAG-Multimeren in T1-Tabaksamen untersucht durch Western blot. C: Stabilität von FLAG-Multimeren nach einjähriger Lagerung bei 15°C und 49% rel. Luftfeuchtigkeit im Vergleich zu frisch geernteten T2-Tabaksamen nachgewiesen durch Western blot –Analyse.

Ein sehr wesentliches Ergebnis war, dass diese transgenen Tabaksamen über ein Jahr bei üblichen Temperaturen gelagert werden konnten und das transgene multimere Protein im Samen stabil blieb. Die Akkumulation von Samenproteinen und der Samenreifungsprozess wurden nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse wurden publiziert (WEICHERT, N., V. HAUPTMANN, C. HELMOLD & U. CONRAD: Seed-specific expression of spider silk protein multimers causes long-term stability. Front. Plant Sci. 7 (2016) 6 http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00006.). Im Rahmen weiterer Arbeiten wurde eine stabile transgene Erbsenlinie mit dem gleichen Konstrukt hergestellt. Des Weiteren wurde eine effiziente Methode zur Extraktion von Proteinen aus Erbsenmehl für qualitative Analysen etabliert. Dabei werden pro Probe 40 mg Erbsenmehl mit 400 µL Samenextraktionspuffer (pH 8,5) und 10 µL a-Amylase (10 U/µL; Sigma-Aldrich) gemischt und 30 min bei 80°C zur Denaturierung hitzestabiler Proteine inkubiert. Die im Extrakt enthaltenen Spinnenseidenproteine sind thermostabil und werden durch die thermische Behandlung nicht in ihrer Stabilität beeinflusst. Dieser Schritt ist notwendig, da der Anteil an erbseneigenen Proteinen im Extrakt dadurch stark reduziert wird. Weiterhin verhindert die enthaltene □-Amylase bei Erhitzung der Probe eine Verkleisterung der enthaltenen Stärke im Erbsenmehl, so dass die Viskosität des Samenextraktes nicht erhöht wird. Die festen Bestandteile des Samenextraktes wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4°C) sedimentiert und verworfen. Der Überstand mit den enthaltenen rekombinanten Spinnenseidenproteinen wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.
Erste Western-Blot-Analysen zeigen, dass die Flag-Multimere auch in reifen Erbsensamen nach einjähriger Lagerung stabil sind. Die Konzentration an Flag und die Multimerisierung werden durch die Lagerung nicht beeinflusst. Die Reinigung von nicht ELPylierten Flag-Inteinen aus dem Samenextrakt von Erbse erfolgte in der Regel nach dem im Rahmen des Projektes etablierten Protokoll der Extraktion von nicht ELPylierten Spinnenseidenproteinen aus Tabakblättern. Der Samenextrakt mit den enthaltenen Spinnenseidenproteinen wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung bis zu einer Endkonzentration von 20 % Ammmoniumsulfat in 10 %-Schritten unterzogen. Ein weiterer wichtiger Schritt war die weitere Reinigung durch Acetonpräzipitation. Zum Abschluß wurde das gereinigte Spinnenseidenmultimer wurde über Sephadex G50 entsalzt. Die entsalzten Fraktionen mit den enthaltenen Flag-Inteinen wurden vereinigt und lyophilisiert.

1.2 *Pilot Scale* –Reinigung von Spinnenseidenproteinen aus Tabakpflanzen

Bereits im vorigen Kapitel wurde über die verschiedenen von uns entwickelten Methoden zur Reinigung im Labormaßstab berichtet. Im Rahmen von Kalthausversuchen wurden größere mengen an transgenen Tabakblättern erzeugt. Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, um den besten Erntezeitpunkt zu bestimmen.

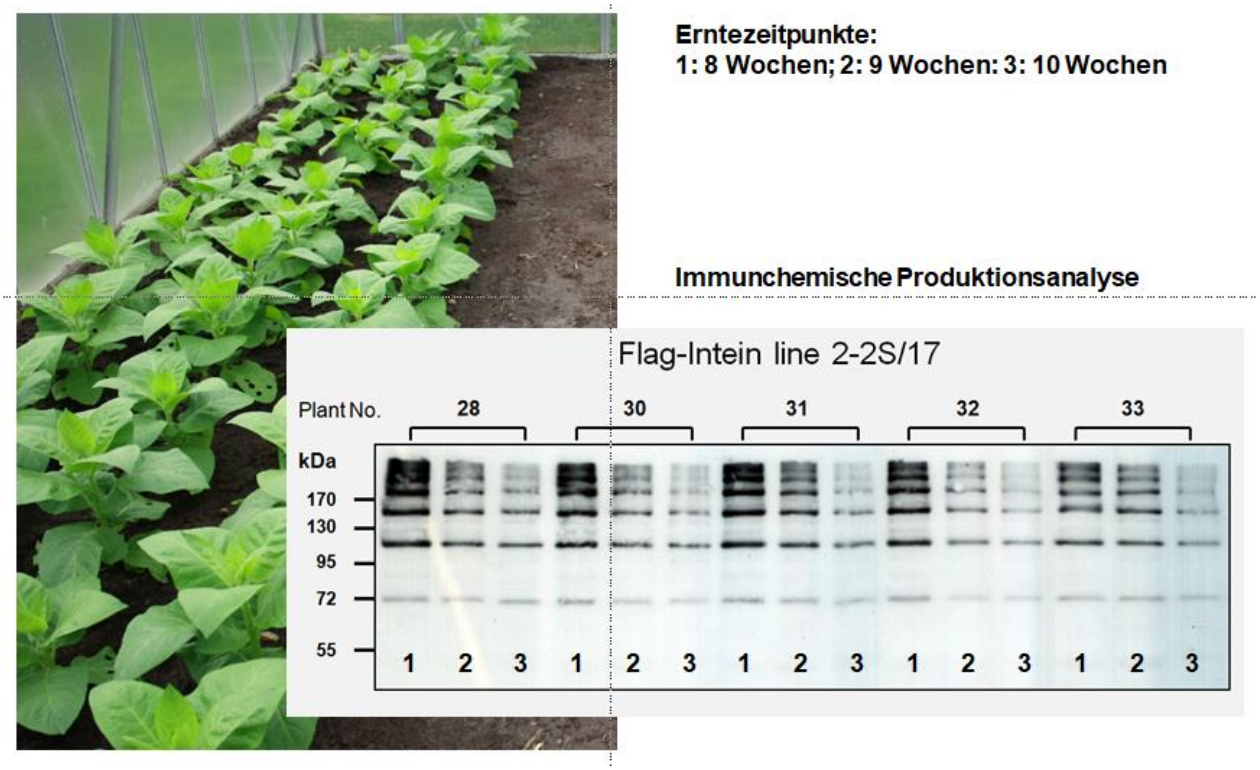

Abb. 9: Bestimmung des optimalen Blatterntezeitpunktes nach Kalthausanbau von transgenen Tabakpflanzen mit FLAG-Multimer-Produktion.

Wie aus Abb. 9 ersichtlich, ist die Optimierung des Erntezeitpunktes gerade bei Tabakblättern sehr wichtig.

Die Reinigung von ELPyliertem MaSp1 erfolgte beispielhaft im kleinen (50g Blattmaterial), im mittlerem (300g Blattmaterial) und in größerem (*pilot scale*, 5-6 kg) Maßstab. Die hier entwickelte „*low tech*"-Reinigungsmethode umfasste die Schritte Hitzebehandlung, Zellzerstörung, Azetonpräzipitation und *Inverse Transition Cyling.* Für den ersten Schritt wurde eine Mikrowellen-Behandlung angewendet (Abb. 10). Die Ergebnisse der Analysen zeigen, dass eine Hitzebehandlung vor Zellaufschluss essentiell für die Erhaltung von Proteinintegrität und –größe ist. Die Mikrowellenbehandlung war hier optimal.

Der Hauptreinigungsschritt war die Azetonbehandlung. Durch zentrifugationsabhängiges „*Inverse Transition Cycling*" (cITC) erfolgte eine weitere wirksame Abtrennung verschiedener Pflanzenproteine (Abb.11). Dabei wurde das zu reinigende Spinnenseiden-ELP-Fusionsprotein bei Erwärmung im Pellet konzentriert, während unter den angeendeten Bedingungen lösliche Verunreinigungen im Überstand verbleiben. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit wurde optimiert. Das beschriebene Protokoll wurde für K-MaSp1-100xELP und Q-MaSp1-100xELP angewendet.- Aus 5,2 bzw. 6,0 kg Tabakblättern wurde jeweils 273 mg K-MaSp1-100xELP bzw. 413 mg Q-MaSp1-100xELP gereinigt. Die Identität des gereinigten Spinnenseidenproteine wurde durch LC-ESI-MS-Analyse der Banden bestätigt. Diese Ergebnisse wurden in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht (HEPPNER, R., N. WEICHERT, A. SCHIERHORN, U. CONRAD & M. PIETZSCH: Low-tech, pilot scale purification of a recombinant spider silk protein analog from tobacco leaves. Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 1687 http://dx.doi.org/10.3390/ijms17101687.)

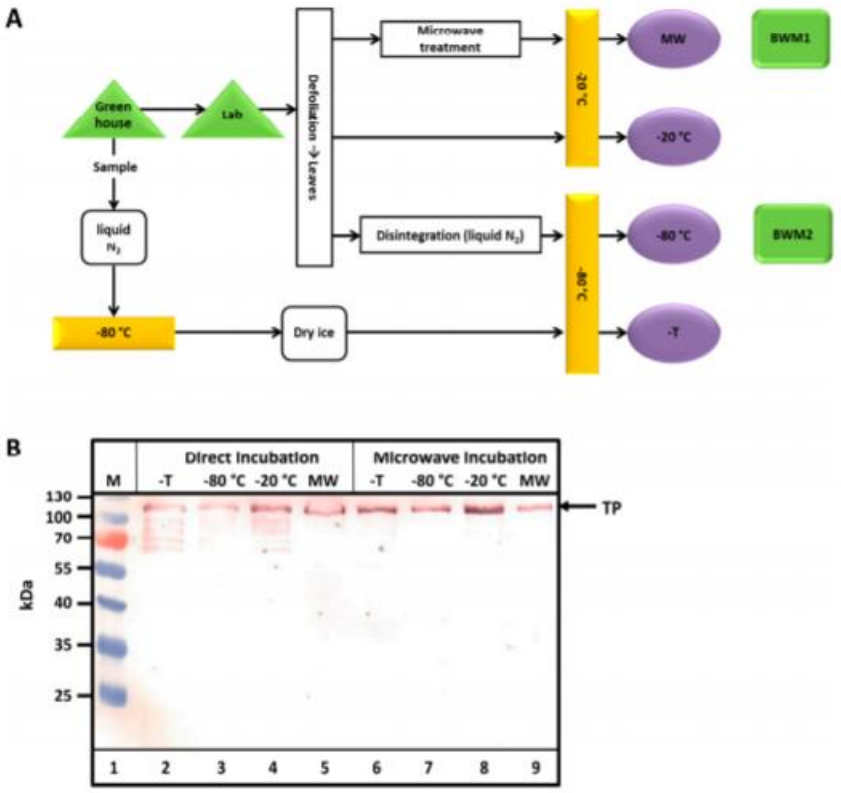

Abb. 10: Verhinderung von Degradation von Spinnenseidenproteinen nach der Ernte durch Mikrowellenbehandlung. A: Schematische Darstellung des Tabakblatt-*processing* nach der Ernte.B: Western blot-Analyse der Proben nach den verschiedenen Behandlungsschritten. TP: transgenes Spinnenseidenprotein.

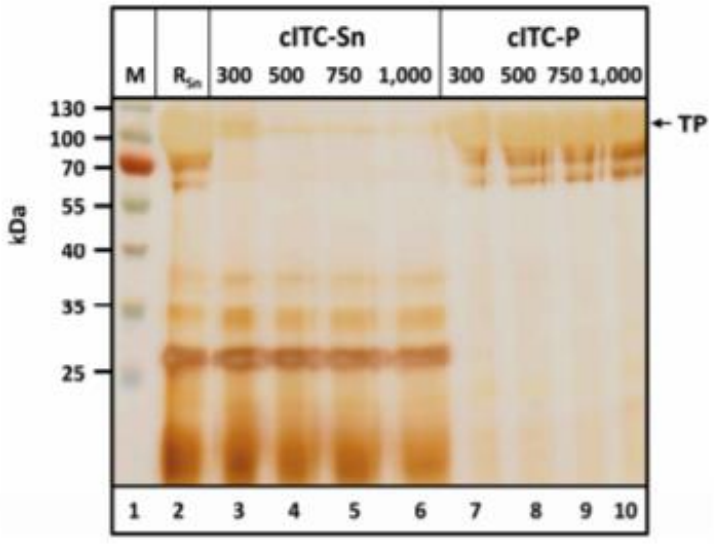

Abb. 11: Reinigung von Q-MaSp1-100xELP durch cITC. cITC-Sn: Überstand, cITC-P: Pellet.

1.1.4 Funktionelle Charakterisierung der Spinnenseidenproteinmultimere

1.1.4.1 Mikro- und nanomechanische Analyse

Die mikromechanischen Analysen erfolgten durch AFM-basierte Nanointendationsexperimente an dünnen Schichten in Kooperation mit Kollegen vom Kollegen vom Fraunhofer-Institut für

Microstruktur von Materialien und Systemen (IMWS, siehe weiter oben). Dabei zeigte sich, dass Multimerschichten die höchsten E-Module (*elastic penetration modulus)* aufwiesen (WEICHERT, N., V. HAUPTMANN, M. MENZEL, K. SCHALLAU, P. GUNKEL, T.C. HERTEL, M. PIETZSCH, U. SPOHN & U. CONRAD: Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants. Plant Biotechnol. J. 12 (2014) 265-275 http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12135). Die elastischen Penetrationsmodule (E) wurden auch an Schichten von n(VSO1(MaSp1-Derivat))-100xELP gemessen (Tab.1).

Tab.1: Elastische Penetrationsmoduli rekombinanter Spinnenseidenproteinschichten.

Substance	Elastic penetration modulus E (GPa)
1xVSO1-100xELP	2.73 ± 0.02
2xVSO1-100xELP	3.85 ± 0.02
4xVSO1-100xELP	4.51 ± 0.03
LDPE Riblene®FL30	0.172 ± 0.001

GPa: Gigapascal; ELP: elastin-like peptide.

Der relative Spinnenseidenanteil und/oder das höhere Molekulargewicht erhöhen den elastischen Penetrationsmodul, ein Maß für Festigkeit und Zähigkeit (HAUPTMANN, V., M. MENZEL, N. WEICHERT, K. REIMERS, U. SPOHN & U. CONRAD: *In planta* production of ELPylated spidroin-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers. BMC Biotechnol. 15 (2015) 9 http://dx.doi.org/10.1186/s12896-015-0123-2).
Die Erforschung des Entfaltungsverhaltens von Spinnenseidenproteinderivaten durch Atomic Force Microscopy (AFM) am Force Robot ermöglicht Einsichten in molekulare Aspekte der resultierenden mechanischen Eigenschaften. Hier konnten wir MaSp1-ELP-Drivate genauer untersuchen. Eine entsprechende Veröffentlichung ist in Vorbereitung (M.Menzel, N.Weichert, U.Conrad, F. Kumpfe, T. Henze, J. Kamps, U.Spohn: Nanomechanical investigation of recombinant spider silk proteins, in preparation).

1.1.4.2 Immunologische und zytotoxische Analyse

Für medizinische Anwendungen von Spinneseidenproteinen ist wichtig, dass keine zytotoxischen Effekte auftreten. Des Weiteren sollten auch keine Immunantworten induziert werden, die letztlich in Abstoßungsreaktionen und/oder Autoimmuneaktionen resultieren würden. Wir haben erstmals immunoloische Analysen von synthetischen Spinnenseidenproteinen durchgeführt. Dadurch konnte in Kooperation mit der Klinik für Transplantationsmedizin gezeigt werden, dass Spinnenseidenproteinderivate nicht zytotoxisch und nicht hämolytisch sind. Wir konnten aber auch zeigen, dass eine humorale Immunantwort in Mäusen gegen den ELP-Teil des Fusionsprotein erzeugt wurde. Das erfolgte über Western blot – Analyse als auch über kompetitiven ELISA (Abb. 12).

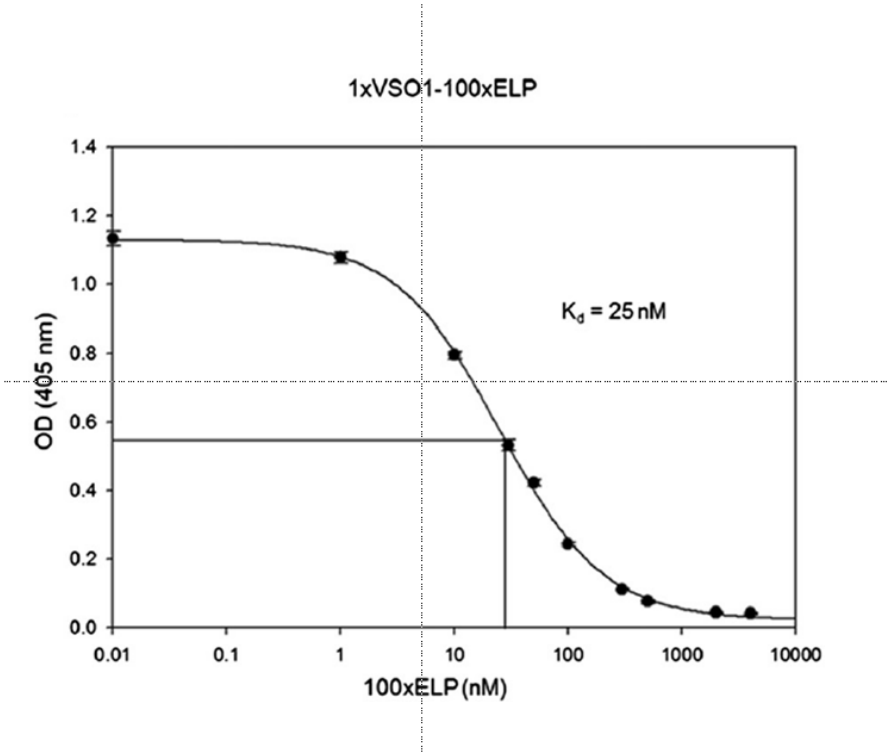

Abb. 12: Analyse der Bindung von Maus-anti VSO1-100x ELP an 100xELP durch kompetitiven ELISA. Festphase: Adsorption von VSO1-100x ELP. Kompetitor: 100xELP. Nachweis durch anti-Maus-ALP und pNPP-Spaltung.

Wir schließen aus diesen Daten, dass Spidroin-basierte Biopolymre humorale Immunantworten induzieren können, die vom Fusionspartner und damit von der gesamten Struktur des Fusionsproteins abhängen. Das ist bei biomedizinischem Einsatz von Fusionsproteinen grundsätzlich zu bedenken. Die Arbeiten wurden gemeinsam publiziert (HAUPTMANN, V., M. MENZEL, N. WEICHERT, K. REIMERS, U. SPOHN & U. CONRAD: *In planta* production of ELPylated spidroin-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers. BMC Biotechnol. 15 (2015) 9 http://dx.doi.org/10.1186/s12896-015-0123-2).

Am Fraunhofer IWMS Halle/S. wurden nach dem etablierten Protokoll Elektroverspinnungen aus Spinnenseidenproteinen und elastinähnlichen Proteinen zur Herstellung von Nanovliesen durchgeführt. Generell wurde natives Bombyx mori-Seidenfibroin als 1:1 Gemisch mit 100xELP bzw. als 1:1 Gemisch mit einem ELPylierten Tragfadenseidenprotein (Q-MaSp1-100xELP bzw. K-MaSp1-100xELP) versponnen. Die Proteingemische, aus denen die Vliesmaterialien versponnen wurden, setzen sich aus jeweils 2 Komponenten zusammen. Die Proteine wurden für das Verspinnen in je 1,2 ml Hexafluoroisopropanol (HFIP) gelöst. Die Proben IPK-S04 und IPK-S05 wurden bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchtigkeiten produziert, was zu Unterschieden in der Fasermorphologie der produzierten Nanofasermatten führte. Die Luftfeuchte von IPK-S05 entsprach der Luftfeuchte, mit der die Proben IPK-S02 und IPK-S03 produziert wurden (Tab.2).

Tab. 2: Elektroverspinnung von Spinnenseidenprotein-Rohseidenprotein-Gemischen

Proben ID	Komponenten der Proteingemische
IPK-S02	140 mg Seidenfibroin, nativ (*B. mori*)

IPK-S03 70 mg Seidenfibroin, nativ (B. mori) + 70 mg Q-MaSp1-100xELP (ELPyliertes synthetisches MaSp1)
IPK-S04 70 mg Seidenfibroin, nativ (B. mori) + 70 mg 100xELP (synthetisches elastin-like polypeptide); hergestellt bei 27,5% rel. Luftfeuchtigkeit
IPK-S05 70 mg Seidenfibroin, nativ (B. mori) + 70 mg 100xELP (synthetisches elastin-like polypeptide); hergestellt bei 37,8% rel. Luftfeuchtigkeit

Die verschiedenen Varianten wurden rasterelektronenmikroskopisch charakterisiert. Unmittelbar nach der Erzeugung der Nanovliese wurden Löslichkeitsexperimente durchgeführt.
Die Vliese erwiesen sich in wässriger Lösung als stabil. Nach Lagerung zeigte sich aber, dass eine Unlöslichkeit in wässrigen Lösungen (Medien aller Art) nicht mehr gegeben war. Daher wurde mit Versuchen zur Vernetzung mit Glutaraldehyd/Formaldehyd begonnen. Diese Experimente erfordern die Reinigung weiterer Spinnenseidenproteine sowie Verspinnungs-/Vernetzungsversuche und werden nach Ende der Projektlaufzeit mit Haushaltsmitteln weitergeführt. Das gilt für Fraunhofer Halle, IPK und Medizinische Hochschule Hannover.

2. Verwertung

Die Ergebnisse bilden die Basis für weiterführende Experimente zur Erzeugung von Scaffolds für künstliche Haut. Hier sind die Arbeiten zur Multimerisierung, insbesondere die Intein-basierte Multimeriserung von großer Bedeutung, da wir hier

- eigene Patentrechte anstreben
- Reinigungsstrategien entwickelt haben
- Containment bei der Pflanzenproduktion anstreben aufgrund der Unmöglichkeit von Freisetzungsversuchen in der EU und insbesondere in Deutschland, dieses Containment aber für medizinische Zwecke auch notwendig sein dürfte.

Eine notwendige nächste Phase sollte in Wechselwirkung mit unseren Partnern die Derivatisierung von Spinnenseidenproteinen beinhalten, um bessere Kompatibilität mit Zellkulturen zu erreichen. Ein Antrag bei Dritten ist in Vorbereitung.

Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten sind bezogen auf künstliche Haut bzw. Hautersatz aus Patientenzellen gut, was die Nachfrage nach solchen Produkten betrifft.

3. Erkenntnisse von Dritten

Hierzu wurde hinsichtlich von Spinnenseidenproteinen aus Pflanzen nichts Relevantes bekannt.

4. Veröffentlichungen

HEPPNER, R., N. WEICHERT, A. SCHIERHORN, U. CONRAD & M. PIETZSCH: Low-tech, pilot scale purification of a recombinant spider silk protein analog from tobacco leaves. Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 1687 http://dx.doi.org/10.3390/ijms17101687.

WEICHERT, N., V. HAUPTMANN, C. HELMOLD & U. CONRAD: Seed-specific expression of spider silk protein multimers causes long-term stability. Front. Plant Sci. 7 (2016) 6 http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00006.

HAUPTMANN, V., M. MENZEL, N. WEICHERT, K. REIMERS, U. SPOHN & U. CONRAD: In planta production of ELPylated spidroin-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers. BMC Biotechnol. 15 (2015) 9 http://dx.doi.org/10.1186/s12896-015-0123-2.

WEICHERT, N., V. HAUPTMANN & U. CONRAD: Transglutamination enables production and characterization of native-sized spider silk-ELP fusion proteins from genetically engineered plants. ISB News Report (2014) 5-8.

WEICHERT, N., V. HAUPTMANN, M. MENZEL, K. SCHALLAU, P. GUNKEL, T.C. HERTEL, M. PIETZSCH, U. SPOHN & U. CONRAD: Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants. Plant Biotechnol. J. 12 (2014) 265-275 http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12135.

HAUPTMANN, V., N. WEICHERT, M. MENZEL, D. KNOCH, N. PAEGE, J. SCHELLER, U. SPOHN, U. CONRAD & M. GILS: Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. Transgenic Res. 22 (2013) 369-377 http://dx.doi.org/10.1007/s11248-012-9655-6.

HAUPTMANN, V., N. WEICHERT, M. RAKHIMOVA & U. CONRAD: Spider silks from plants - a challenge to create native-sized spidroins. Biotechnol. J. 8 (2013) 1183-1192 http://dx.doi.org/10.1002/biot.201300204.

HAUPTMANN, V., M. GILS, U. CONRAD & H.T. PHAN: Methods of producing and purifying polymeric proteins in transgenic plants (Patent). EP 2518081, Granted on 31.10.2012, IPK-Nr. 2011/07 (2012).

HAUPTMANN, V: Heterologe Expression hochmolekularer repetitiver Spinnenseiden-basierter Proteine *in planta* sowie deren mechanische und immunologische Charakterisierung. (PhD Thesis, kumulativ) Halle/S., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I Biowissenschaften (2015) 75 pp.

ANHANG

Teilvorhaben 1: Konstruktion, Produktion und Charakterisierung

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
IPK Gatersleben Leiter Teilprojekt: **Prof. Dr. Udo Conrad**	**FNR 22037511 bzw. 11NR375**

Vorhabenbezeichnung:

Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen

Laufzeit des Vorhabens:

01.07.2012 - 31.01.2017

Berichtszeitraum:

01.07.2012 - 31.01.2017

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

1. Erzeugung von transgenen Tabakpflanzen, die Multimere verschiedener Spinnenseidenproteinderivate mit ausreichend großem Molekulargewicht produzieren

2. Optimierung der Expression in transgenen Pflanzen

3. Erzeugung von linearen Dimeren durch posttranslationale Fusion *in vitro* durch Transglutaminasen

4.Samenspezifische Expression von Spinnenseidenproteinen *

5. Materialwissenschaftliche und mikro/nanomechanische Charakterisierung der erzeugten Proteine, um Zusammenhänge zwischen Sequenzen, Molekulargewichten (Multimerisierungsgrad und Heteromerisierungsgrad) und den mechanischen Eigenschaften herzustellen.

Bearbeitete Arbeitspakete

Folgende Aufgaben wurden in Form von 3 Arbeitspaketen im Teilprojekt 1 bearbeitet:

- Design von Expressionsvektoren zur Produktion Spinnenseidenproteinvarianten als Multimere in Tabakpflanzen; Erzeugung und Charakterisierung hochexprimierender transgener Linien.
- Reinigung von Spinnenseidenproteinen aus Tabakblättern im Labormaßstab.
- Biochemische und materialwissenschaftliche Analysen (Unterauftrag) der

Spinnenseidenproteinmultimere.

- Produktion von Spinnenseidenproteinen in Samen *
- Analyse von Spinnenseidenproteinen aus Samen *
- Elektroverspinnung von Spinnenseidenproteinen/Spinnenseidenprotein-Fibroin-Gemischen *
- Testung der Zytotoxizität und des Zellwachstums auf diesen Nanovliesen *

*Im Aufstockungsantrag

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

1. **Expression multimerer Spinnenseidenproteine in Pflanzen**

Die hohe Repetitivität der Spinnenseidensequenzen verursacht genetische Instabilität und mRNA-Instabilität auch in Pflanzen und daher ist die Größe der offenen Leserahmen begrenzt. Als Lösung bietet sich hier posttranslationale Multimerisierung der exprimierten Proteine an. Im Rahmen dieses Projektes wurden 3 Strategien zur posttranslationalen Multimerisierung von Spinnenseidenproteinderivaten benutzt:

- Dimerisierung durch native nichtrepetitive C-Termini
- Crosslinking durch Transglutaminase
- Intein-vermittelte Multimerisierung (*trans-splicing*)
-

Dimerisierung durch native nichtrepetitive C-Termini

Spinnenseidenproteine wie die „major and minor ampullate spidroins“ oder das Spinnenseidenpretein FLAG enthalten nicht-repetitive C-Termini. Diese C-terminalen Sequenzen sind hochkonserviert. Diese Sequenzen wurden im „spinning dope“ nachgewiesen. Die C-terminale Sequenz des Spinnenseidenprotein FLAG ist nicht repetitiv und enthält Cysteine, die eine Dimerisierung durch Bildung von Schwefeldisulfidbrücken erlauben. Das FLAG protein enthält 2 Cysteine am C-Terminus (Abb.1C). Die Kreuzvernetzung von FLAG-Molekülen durch Disulfidbrücken wird daher vermutet. Da das pflanzliche ER nichtreduzierende Bedingungen sowie eine Menge Disulfidisomerase aufweist, sollte eine Dimerisierung ermöglicht werden. Wir fanden auch eine partielle Dimerisierung, die aber weder durch Mercaptoäthanol noch durch Dithiothreithrol zu beseitigen war.

Crosslinking durch Transglutaminase

Zunächst wurde eine Gensequenz, die auf dem Spinnenseidenprotein MaSp 1 beruhte, jeweils N-terminal entweder mit einem Lysin-Tag (GSGMKETAAARFERNHMDSGS) bzw. mit einem Glutamin-Tag (GSGMAETAAAAFERQHMDSGS) versehen. Diese Tags sollen eine optimale Verknüpfung durch Transglutaminase gewährleisten. Das Konstrukt enthält weiterhin 100xELP („*Elastin-like-Peptide*“)-Sequenzen. Diese ELP-Fusionen verbessern die Expressionshöhe und

ermöglichen die effiziente Reinigung durch ITC. Q-MaSpI-ELP und K-MaSpI-ELP wurden in Blättern transgener Tabakpflanzen produziert und durch ITC gereinigt. Die gereinigten Monomere Q-MaSpI-ELP und K-MaSpI-ELP wurden *in vivo* durch rekombinante Transglutaminase verknüpft. Auf diese Weise wurden sehr viel größere Moleküle erzeugt. Die *cross-linking* – Experimente wurden mit jeweils nur Q-MaSpI-ELP bzw. K-MaSpI-ELP sowie mit einem Mix durchgeführt. Die jeweiligen Monomere enthielten noch weitere Glutamine sowie jeweils ein Lysin innerhalb der KDEL-Sequenz am C-Terminus. Deshalb haben wir keine lineare Dimerisierung über die jeweiligen Enden erwartet, sondern mussten mit kreuzvernetztem Material rechnen. Hochmolekulares Material mit nahezu nativem Molekulargewicht von mindestens 250 kDa konnte erzeugt werden.
Dünne Schichten wurden aus Monomeren und Multimeren erzeugt und durch *Atomic force microscopy* (AFM) sowie durch AFM-basierte Nanointendation untersucht. Dabei zeigte sich, dass Multimerschichten die höchsten E-Module (*elastic penetration modulus)* aufwiesen.

Intein-vermittelte Multimerisierung

Intein-vermittelte Multimerisierung in Blättern

Zur Multimerisierung durch Intein-vermitteltes *trans-splicing* wurde das Spinnenseidenprotein FLAG ausgewählt. FLAG ist das Spinnenseidenprotein der Fangfäden und ermöglicht eine sehr hohe Elastizität. Die komplette Amionosäuresequenz von FLAG ist bekannt. Wir haben eine FLAG-Monomer-Einheit entworfen und sie mit Inteinsequenzen fusioniert. Inteine sind intervenierende Proteinelemente, die autokatalytisch aus *precursor*-Molekülen herausgespalten werden und die flankierenden Proteinsequenzen (Exteine) durch einen Prozess, den man als *protein-splicing* bezeichnet miteinander verbindet. Hier konnten wir das erste Mal überhaupt zeigen, dass hochmolekulare Spinnenseidenproteine (über 250 kDa, native Größe) durch *trans-splicing in planta* erzeugt werden können. Abb. 1 zeigt das Konstrukt, modellhaft den Prozess *in planta* und das Ergebnis. Die Intein-basierte Verknüpfung ermöglicht im Gegensatz zur Multimerisierung durch Transglutaminase die Erzeugung linearer Oligomere („*end-by-end*-“Verknüpfung). Dadurch können neuartige Werkstoffe entstehen.

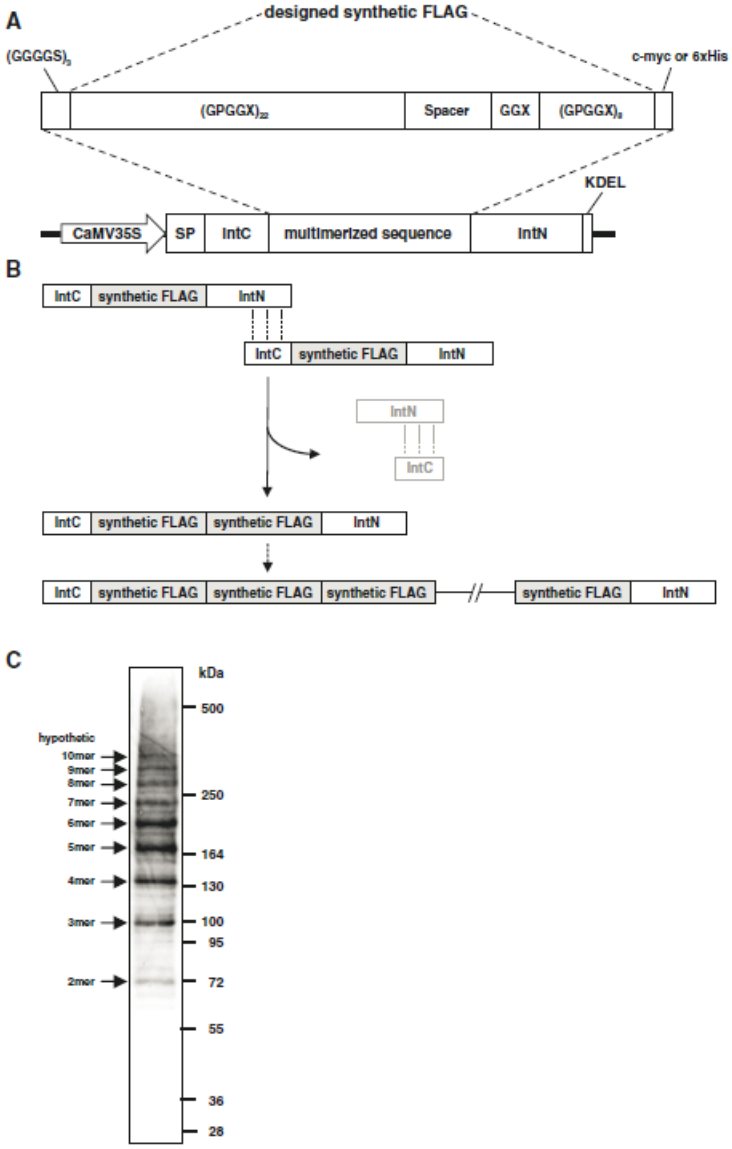

Abb. 1: Design der FLAG-Intein-Expressionskassetten und das Prinzip der Intein-vermittelten FLAG-Multimer-Assemblierung. A: Schematische Übericht der Expressionskassette; CaMV35S, cauliflower mosaic virus 35S konstitutiver Promotor; SP, legumin B4 Signalpeptid; KDEL, ER Retentionsequenz; IntN/IntC, C- und N-terminal Inteinsequenzen des *Synechocystis* sp.DnaB Gens; GPGGXn; GGX/spacer, Motive in Wildtyp FLAG Sequenzen; (GGGGS)3, flexible *spacer*; c-myc-tag (Detektion) , 6xHis-tag (Reinigung). B Multimerisierung der synthetisch FLAG Monomere. C: Western blot Analysedurch 3–13 % SDS-PAGE und ECL-Nachweis.

Intein-vermittelte Multimerisierung in Samen

Samen haben im Verlaufe der Evolution einmalige Eigenschaften entwickelt, die Überleben unter extremen Bedingungen ermöglichen. Für diese Eigenschaften ist die Anwesenheit von Speicherstoffen esentiell. Unter vielen verschiedenen Stoffkomponenten spielen Speicherproteine eine besondere Rolle. Diese Proteine bleiben über lange Dormanzperioden hin intakt. Die stabile Lagerung verschiedener Samenproteine ist daher eine wichtige Voraussetzung für die Erhaltung der Samenfunktionalität. In verschiedenen *Molecular Farming*-Projekten wurden und werden diese

Eigenschaften zur stabilen und lagerfähigen Produktion von interessanten Proteinen in Samen genutzt. Wir haben erfolgreich FLAG-Multimere, erzeugt über Intein-vermitteltes *trans-splicing*, in Tabaksamen produziert. Ein sehr wesentliches Ergebnis war, dass diese transgenen Tabaksamen über ein Jahr bei üblichen Temperaturen gelagert werden konnten und das transgene multimere Protein im Samen stabil blieb (Abb.2). Die Akkumulation von Samenproteinen und der Samenreifungsprozess wurden nicht beeinflusst. Im Rahmen weiterer Arbeiten wurde eine stabile transgene Erbsenlinie mit dem gleichen Konstrukt hergestellt.

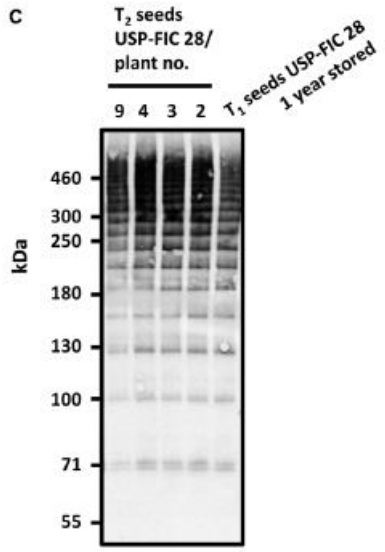

Abb.2: Stabilität von FLAG-Multimeren in Samen. FLAG-Multimere in Samennach einjähriger Lagerung bei 15°C und 49% rel. Luftfeuchtigkeit im Vergleich zu frisch geernteten T2-Tabaksamen nachgewiesen durch Western blot –Analyse.

Erste Western-Blot-Analysen zeigen, dass die Flag-Multimere auch in reifen Erbsensamen nach einjähriger Lagerung stabil sind. Die Konzentration an Flag und die Multimerisierung werden durch die Lagerung nicht beeinflusst.

Funktionelle Charakterisierung der Spinnenseidenproteine

Die mikromechanischen Analysen erfolgten durch AFM-basierte Nanointendationsexperimente an dünnen Schichten in Kooperation mit Kollegen vom Kollegen vom Fraunhofer-Institut für Microstruktur von Materialien und Systemen. Dabei zeigte sich, dass Multimerschichten die höchsten E-Module (*elastic penetration modulus)* aufwiesen. Die elastischen Penetrationsmodule (E) wurden auch an Schichten von n(VSO1(MaSp1-Derivat))-100xELP gemessen. er relative Spinnenseidenanteil und/oder das höhere Molekulargewicht erhöhen den Elastischen Penetrationsmodul, ein Maß für Festigkeit und Zähigkeit.
Für medizinische Anwendungen von Spinneseidenproteinen ist wichtig, dass keine zytotoxischen Effekte auftreten. Des Weiteren sollten auch keine Immunantworten induziert werden, die letztlich in Abstoßungsreaktionen und/oder Autoimmuneaktionen resultieren würden. Wir haben erstmals immunoloische Analysen von synthetischen Spinnenseidenproteinen durchgeführt. Dadurch konnte in Kooperation mit der Klinik für Transplantationsmedizin gezeigt werden, dass

Spinnenseidenproteinderivat nicht zytotoxisch und nicht hämolytisch sind. Wir konnten aber auch zeigen, dass eine humorale Immunantwort in Mäusen gegen den ELP-Teil des Fusionsprotein erzeugt wurde. Wir schließen aus diesen Daten, dass Spidroin-basierte Biopolymre humorale Immunantworten induzieren können, die vom Fusionspartner und damit von der gesamten Struktur des Fusionsproteins abhängen. Das ist bei biomedizinischem Einsatz von Fusionsproteinen grundsätzlich zu bedenken.

Am Fraunhofer IWMS Halle/S. wurden nach dem etablierten Protokoll Elektroverspinnungen aus Spinnenseidenproteinen und elastinähnlichen Proteinen zur Herstellung von Nanovliesen durchgeführt. Generell wurde natives Bombyx mori-Seidenfibroin als 1:1 Gemisch mit 100xELP bzw. als 1:1 Gemisch mit einem ELPylierten Tragfadenseidenprotein (Q-MaSp1-100xELP bzw. K-MaSp1-100xELP) versponnen. Die Proteingemische, aus denen die Vliesmaterialien versponnen wurden, setzen sich aus jeweils 2 Komponenten zusammen. Die Proteine wurden für das Verspinnen in je 1,2 ml Hexafluoroisopropanol (HFIP) gelöst. Die verschiedenen Varianten wurden rasterelektronenmikroskopisch charakterisiert. Unmittelbar nach der Erzeugung der Nanovliese wurden Löslichkeitsexperimente durchgeführt. Die Vliese erwiesen sich in wässriger Lösung als stabil. Nach Lagerung zeigte sich aber, dass eine Unlöslichkeit in wässrigen Lösungen (Medien aller Art) nicht mehr gegeben war. Daher wurde mit Versuchen zur Vernetzung mit Glutaraldehyd/Formaldehyd begonnen. Diese Experimente erfordern die Reinigung weiterer Spinnenseidenproteine sowie Verspinnungs-/Vernetzungsversuche und werden nach Ende der Projektlaufzeit mit Haushaltsmitteln weitergeführt. Das gilt für Fraunhofer Halle, IPK und die Medizinische Hochschule Hannover.

Teilvorhaben 2: Reinigungsoptimierung, Scale up und posttranslationale Multimerisierung

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Leiter Teilprojekt: **Prof. Dr. Markus Pietzsch**	**FNR 22014412 bzw. 12NR144**

Vorhabenbezeichnung:

Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen

Laufzeit des Vorhabens:

01.07.2012 - 31.01.2017

Berichtszeitraum:

01.07.2012 - 31.01.2017

Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Ziel des Teilprojektes waren Untersuchungen zur die Isolierung rekombinanter Spinnenseidenvarianten nativer Größe aus Tabakpflanzen sowie in Erbsen- und Tabaksamen. Das Blattmaterial bzw. die Samen wurden durch den Projektparter IPK Gatersleben bereit gestellt. Die gewonnenen Produkte sollten für materialwissenschaftliche Arbeiten zur Verfügung gestellt werden.

Bearbeitete Arbeitspakete

Zunächst wurde eine Reinigungsmethode für rekombinante Tragfadenseide im Labormaßstab entwickelt und in den Pilotmaßstab übertragen. Dabei konnte die Verwendung preisintensiver Chromatographiematerialien umgangen werden. Stattdessen gelang es, durch Hitze- und Lösungsmittelpräzipitationsschritte ein, auf proteinogenem Level hochreines Produkt zu gewinnen. Weitere ökonomisch sinnvolle Optimierungen betrafen die Verwendung von Leitungswasser als Extraktionsmittel sowie die Reduzierung der insgesamt prozessierten flüssigen Phasen. Die finale Ausbeute betrug 400 mg Produkt aus 6 kg Tabakblättern (69 mg/ $kg_{Biofeuchtmasse}$). Dieses Produkt wurde unter anderem mittels mikrobieller Transglutaminase polymerisiert, um so Proteine nativer Größe und darüber zu erhalten.

Das etablierte Reinigungsverfahren konnte auch verwendet werden, um rekombinante Fangspiralenseide zu gewinnen. Die Ausbeute war mit 10 mg/ $kg_{Biofeuchtmasse}$ deutlich geringer als

für die Tragfadenseide. Weiterhin erfolgten Untersuchungen zur Reinigung rekombinanter Spinnenseidenvarianten aus Erbsensamen. Es wurde festgestellt, dass die in Kaltgewächshäusern produzierten Erbsensamen nur einen geringen Anteil Zielproteine enthielten. Die Etablierung einer Reinigungsmethode wurde daher als ökonomisch nicht sinnvoll bewertet und nicht weiter verfolgt. Außerdem wurde die Isolierung von Zielproteinpolymeren aus Tabaksamen untersucht, die mittels der Inteinstrategie in-vivo hergestellt worden waren.

Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Das vom Projektpartner (IPK Gatersleben) entwickelte Reinigungsverfahren, bezeichnet als mITC (membrane based Inverse Transition Cycling), wurde in der AG Pietzsch erfolgreich etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass direktes Kochen der Blätter und anschließendes Homogenisieren im Mixer vergleichbare Ergebnisse zum Mörsern in flüssigem Stickstoff und anschließendem Kochen liefert. Die Durchführbarkeit der Reinigung wird dadurch verbessert.

Es wurde jedoch erstmalig festgestellt, dass ein erheblicher Anteil des Zielproteins nicht vom Celluloseacetat-Filter eluiert werden kann, sondern darauf adsorbiert bleibt.

Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass die relativ zeitaufwändige Detektion des Zielproteins mittels Western Blot durch eine Silberfärbung eines SDS-PAGE Gels ersetzt werden kann.

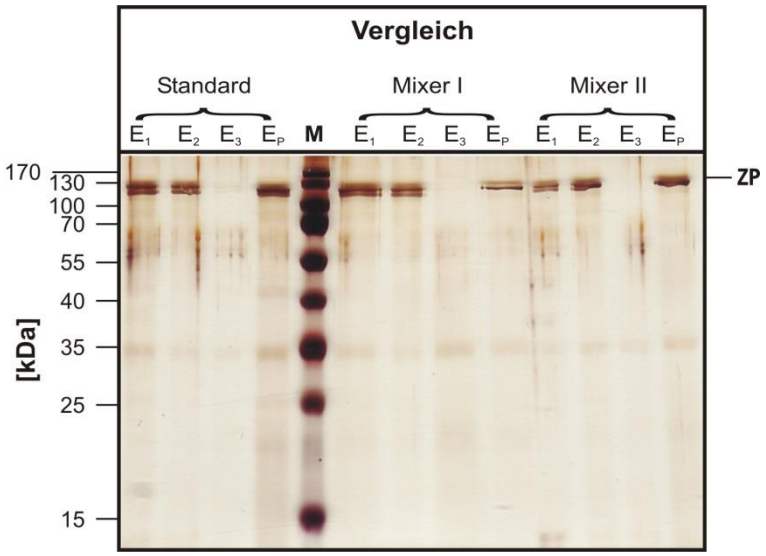

Abb. 1: Extraktion des Zielproteins (ZP: Q-MaSp1-100xELP) nach Mörsern und Kochen („Standard“) bzw. Kochen und Zellaufschluss im Mixer („Mixer I“/ „Mixer II“). Aufgetragen sind je drei Eluatfraktionen nach vorhergehender Abtrennung des Zielproteins durch Filtration. E_1-Eluat 1, E_2-Eluat 2, E_3-Eluat 3, E_P-Eluat-Pool, M-Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder).

1.1.1 Untersuchungen zur Vorbehandlung vor Lagerung und Aufschluss

Im Berichtszeitraum wurden beim Projektpartner 260 kg Tabakblätter geerntet, die unterschiedliche Proteinkonstrukte enthielten (Anzucht AG Conrad, IPK). Das Pflanzenmaterial wurde nach Halle transferiert, unter unterschiedlichen Bedingungen vorbehandelt und dort gelagert. Die Art der Lagerung bzw. Vorbehandlung zeigte keinen Einfluss auf das Zielprotein,

sofern das Material mittels Mikrowelle gekocht worden war (Abb. 2, Bahnen unter „Mikrowelleninkubation“). Ohne diese Mikrowellenbehandlung zeigten sich bei – 20°C und ohne Temperaturbehandlung (-T) deutliche Abbaubanden. Offensichtlich wurden durch die Mikrowellenbehandlung Proteasen inaktiviert.

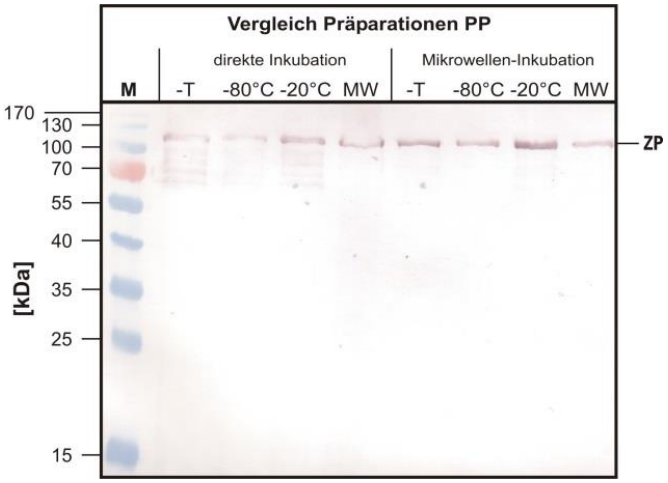

Abb. 2: Proben- und Biomassepräparation zur Verringerung enzymatischer Proteolyse. (A) Probenpräparation: „direkte Inkubation“ / „MW-Inkubation“: Proben wurden nach Präparation der Biomasse und Lagerung vor Inkubation mit Probenpuffer nicht / kurz in einer Mikrowelle erhitzt; „-T“: Blätter direkt nach Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert; „- 80 °C“ / „-20 °C“: Blätter nach Ernte bei -80 °C / -20 °C gelagert; „MW“: Blätter nach Ernte in Mikrowelle inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert. M–PPL-Marker

1.1.2 **Entwicklung einer alternativen Reinigungsstrategie**

Das Standardverfahren, das zur Reinigung von Spinnenseidenproteinen verwendet wird, ist das membrane based Inverse Transition Cycling (mITC). Es wurde festgestellt, das ein Verlust an Zielprotein aufgrund der Adsorption am u. a. verwendeten Celluloseacetat-Filter auftritt. Ein weiterer Nachteil des membranbasierenden Verfahrens besteht darin, dass es nur unter erheblichem Kosten- und Zeitaufwand maßstabsvergrößert werden kann.

Aus diesen Gründen wurde eine Alternativmethode untersucht. Basierend auf vorangegangenen, positiven Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit der Isolierung von Tropoelastin, das, ebenso wie die ELP-tags der Zielproteine, repetitive Sequenzen aus hydrophoben Aminosäuren aufweist, wurde ein fraktionierendes Fällungsverfahren mittels Aceton untersucht. Mit Hilfe der Fällung von proteinogenen Verunreinigungen durch Aceton gelang es, einen vielversprechenden, einfach durchzuführenden, skalierbaren Ansatz zu etablieren.

Nach Einstellung einer Acetonkonzentration von 45 % (v/v) konnte ein Großteil der präzipitierten Wirtszellproteine durch Zentrifugation abgetrennt werden (siehe Abb. 3). Durch Erhöhung der Acetonkonzentration konnte schließlich das Zielprotein gefällt und anschließend abzentrifugiert werden.

Weiter wurde gezeigt, dass die Verwendung von Leitungswasser an Stelle des Aufschlusspuffers (50 mM TRIS-HCl, pH 8) möglich ist, wodurch sich für das Scale-up weitere Vereinfachungen und damit Kosteneinsparungen ergeben. Es wurden pro Ansatz ca. 0,1 g Blattmaterial verarbeitet. Das Standardverfahren zur Reinigung der Spinnenseidenproteine (mITC) konnte dahingehend vereinfacht werden, dass ein Zentrifugationsschritt sowie zwei Filtrationsschritte eingespart werden.

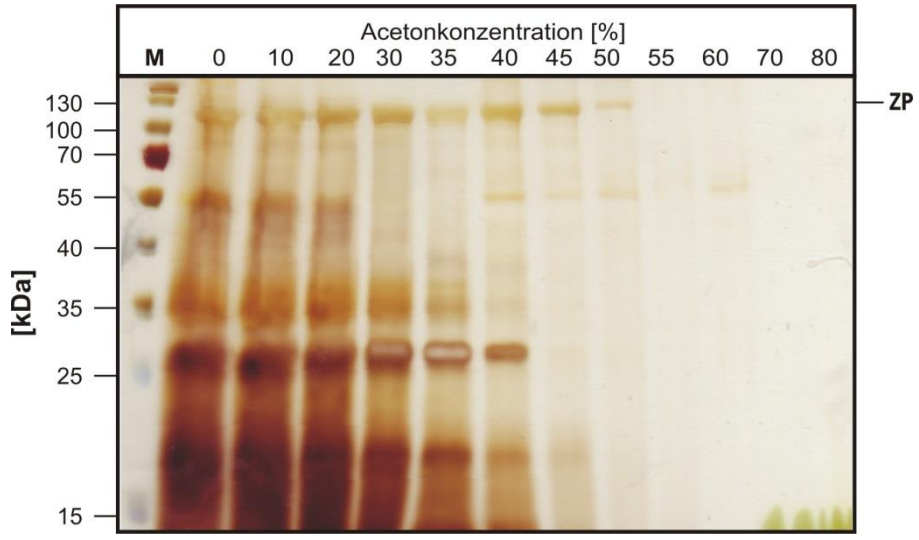

Abb. 3:: Acetonpräzipitation von Wirtszellproteinen und Q-MaSp1-100xELP im Mikromaßstab. 50 g frisch eingefrorene Biofeuchtmasse wurden in 150 mL Extraktionspuffer 1 h bei >90 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis und Zellaufschluss im Haushaltsmixer (10x30 s) wurden 250 µL Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und mit 1 mL dH_2O, dH_2O-Aceton oder Aceton versetzt, um die jeweilige Acetonkonzentration im Versuchsansatz einzustellen. Nach 30-minütiger Inkubation (4 °C) erfolgte die Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (4 °C, 16.100 g, 5 min) mit anschließender Trocknung. Die Überstands- und Pelletproben wurden in 400 bzw. 50 µL Probenpuffer resolubilisiert. M–PPL-Marker; ZP–Zielprotein

1.1.3 **Skalierung der Reinigungsmethode**

Der Maßstab des beschriebenen Ansatzes wurde nun deutlich vergrößert. Dabei konnte gezeigt werden, dass im technischen Maßstab eine Acetonkonzentration von 40 % ausreichend war, um eine deutliche Abscheidung proteinogener Verunreinigungen nach Zentrifugation zu erzielen. Weiterhin gelang die Reduzierung des erforderlichen Volumens Wasser für den Zellaufschluss, bezogen auf die eingesetzte Biomasse, von 3:1 auf 1,5:1. Beide Resultate stellen wichtige ökonomische Faktoren dar.

Nach umfangreichen Optimierungsarbeiten können nun, unter Verwendung von halbtechnischen Apparaten, 5 kg Tabakblätter verarbeitet werden. Zunächst werden die Zellen aufgeschlossen, mit Aceton vorbehandelt und schließlich die Proteine gefällt. Das Proteinpellet wird gewaschen und lyophilisiert. Aus 5 kg Blättern (Feuchtmasse) konnten für MaSp1-Q und MaSp1-K 6 bzw. 8 g lyophilisiertes Rohprodukt isoliert werden.

Um das lyophilisierte Produkt aufzulösen, sind relativ harsche Bedingungen erforderlich (z.B. 6 M Harnstoff). Daher wurde eine detaillierte Analyse zur Charakterisierung des Produktes (u. a. mittels massenspektrometrischer Analyse, Elementaranalyse, Auflösungsverhalten in unterschiedlichen Lösungsmitteln) vorgenommen. Für eine massenspektrometrische Untersuchung (MS) wurde eine Probe per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie sichtbar gemacht. Alle dabei gefundenen Peptide konnten dem Zielprotein zugeordnet werden.

Bei der Elementaranalyse per Verbrennung wurde für das Produkt 25 Masseprozent (m%) Kohlenstoff, 3 m% Wasserstoff und 1 m% Stickstoff nachgewiesen. Diese Verhältnisse der Elemente zueinander sind auch im Zielprotein gegeben (pro Mol: m_C:m_H=370:49, m_C:m_N=370:140). Somit kann auf einen proteingebundenen, mit dieser Methode nicht detektierbaren, Sauerstoffanteil von 11 m% rückgeschlossen werden. In Summe waren somit 40 m% des Produktes als proteinogen nachweisbar.

Die verbleibenden 60 m% wurden in Form von Salzen vermutet. Ihr Nachweis sollte mittels ICP-MS erfolgen. Dabei konnten 12 m% Calciumionen und 2 m% Magnesiumionen detektiert werden. Die für diese Kationen nötigen Gegenionen, wie z.B. Phosphate, konnten mit der gewählten Methode nicht nachgewiesen werden. Im Fall von Phosphaten wären weitere 19 bzw. 8 m% zu erwarten. Somit ist davon auszugehen, dass 80 % des Produktes aus Zielprotein und Salzen bestehen.

1.1.4 **Feinreinigung mittels cITC**

Das Zielprotein konnte durch fraktionierende Acetonpräzipitation aufkonzentriert werden. Die gewonnene Produktmenge war um drei Größenordnungen höher als in der Vergleichsliteratur angegeben. Durch einen nachfolgend durchgeführten Waschschritt konnten 60-70 % verunreinigender Substanzen abgetrennt werden konnten. Die Ausbeute an Produkt erschien dennoch nach wie vor zu hoch. Daher wurde eine Feinreinigung angestrebt. Zu diesem Zweck wurde die Eigenschaft des gesteuerten reversiblen Agglomerationsverhaltens des ELP-*tags* ausgenutzt. Das Produkt wurde in 6 M Harnstoff resolubilisiert und dialysiert. Bei 40 °C erfolgte die Abtrennung des unter den gewählten Bedingungen unlöslichen Zielproteins im Mikromaßstab. Die zur hitzeinduzierten Präzipitation des Zielproteins nötige optimale NaCl-Konzentration war 750 mM.

1.1.5 **Reinigung von Q-/K-MaSp1-100xELP im Pilotmaßstab**

Bisher konnten die fraktionierende Acetonpräzipitation im Pilotmaßstab sowie die Feinreinigung von Q- und K-MaSp1-100xELP im Mikromaßstab gezeigt werden. Nach problemloser Maßstabsübertragung dieser Methode gestaltete sich die Gesamtreinigung des Zielproteins wie in Abb. 4 gezeigt. Beginnend mit dem Zellaufschluss von 6 kg BFM wurde die Suspension (Abb. 4, Bahn 2) filtriert (Bahn 3) und, da noch immer Trübstoffe enthalten waren, zentrifugiert (Bahn 4). Nach Fällung der Wirtszellproteine durch Inkubation mit 40 % (v/v) Aceton (Bahn 5) war das Ergebnis grundsätzlich so wie in vorher gezeigten Versuchen. Durch Inkubation bei c_A=70 % (v/v) wurde das Zielprotein inklusive kontaminierender Proteine vollständig gefällt (Bahn 6). Nach Waschen mit Leitungswasser wurde das Produkt resolubilisiert, zentrifugiert (Bahn 7) und dialysiert

gegen 750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8 (Bahn 8). Der augenscheinliche Verlust des Zielproteins ist nicht real sondern begründet durch mangelnde Detektierbarkeit des Zielproteins mittels Silberfärbung bei hohen NaCl-Konzentrationen in der Probe. Nach cITC verblieben proteinogene Verunreinigungen vollständig im Überstand (Bahn 9), und das Zielprotein konnte im Pellet mit hoher Reinheit aufkonzentriert werden (Bahn 10). Das beschriebene Reinigungsverfahren wurde für beide Zielproteine angewendet. Aus 5,2 bzw. 6 kg BFM2 wurden jeweils 273 mg K-MaSp1-100xELP bzw. 413 mg Q-MaSp1-100xELP isoliert. Dies entspricht Ausbeuten von 53 bzw. 69 mg für das Lysin- und das Glutamin-ge*tag*te MaSp1-100xELP pro kg BFM. Die Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie bei Weichert und Kollegen, die 65-75 mg Zielprotein pro kg BFM berichten. Die insgesamt in einem Lauf gereinigte Menge Spinnenseidenprotein aus Tabak ist die höchste, die aktuell in der Literatur belegt ist.

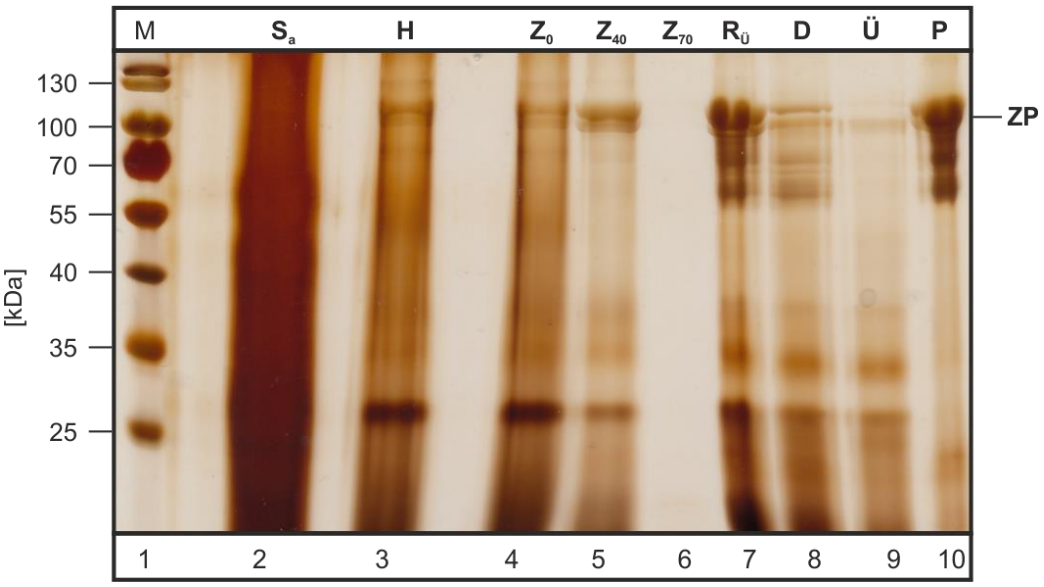

Abb. 4: Reinigung von Q-MaSp1-100xELP im Pilotmaßstab aus *Nicotiana tabacum*-Blättern. 2x3 kg BFM2 (nach Mikrowelleninkubation eingefroren) wurden aufgetaut (16 h, 4 °C), mit Leitungswasser gemischt (je 3 L) und mit einem Table Top Cutter aufgeschlossen (Bahn 2). Die Suspension wurde mittels Filtration (Bahn 3) und Zentrifugation (Bahn 4) geklärt. Fraktionierende Acetonpräzipitation wurde durchgeführt durch Einstellen der Acetonkonzentration auf 40 % (Bahn 5, Z_{40}–Überstand nach Zentrifugation) und 70 % (v/v) (Bahn 6, Z_{70}–Überstand nach Zentrifugation). Das resultierende Pellet wurde mit Leitungswasser gewaschen. Nach Resolubilisierung in 6 M Urea und Zentrifugation wurde der Überstand (Bahn 7) dialysiert gegen 750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 (Bahn 8). Das Zielprotein konnte schließlich *via* cITC von löslichen Kontaminationen Bahn 9) separiert und aufkonzentriert (Bahn 10) werden. M–PPL-Marker; S_a–Suspension a; H–Filtrat der Hydropresse; Z–Überstände nach Zentrifugation mit 0 (Z_0), 40 (Z_{40}) und 70 % (v/v) Aceton (Z_{70}); $R_Ü$–lösliche Fraktion des resolubilisierten und gewaschenen Pellets nach Präzipitation mit 70 % (v/v) Aceton; D–$R_Ü$ dialysiert gegen 750 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; Ü–lösliche Fraktion von D nach cITC; P–Pellet von D nach cITC

1.1.6 **Adaption des Reinigungsverfahrens zur Gewinnung von 1xFlag-100xELP**

Das oben beschriebene Verfahren zur Reinigung von Q-/K-MaSp1-100xELP wurde erfolgreich auf die Reinigung von 1xFlag-100xELP übertragen. Dabei erfolgte eine Optimierung verschiedener Schritte. Das resultierende Verfahren gestaltete sich wie folgt:

1. Zellaufschluss und anschließende Klärung der Suspension durch Filtration
2. Abtrennung nicht retentierter unlöslicher Zellbestandteile mittels Zentrifugation
3. fraktionierende Acetonfällung löslicher Proteine (40 und 50 % (v/v) Aceton)
4. Waschen des resultierenden Pellets mit 2 M NaCl-Lösung, anschließend Abtrennung des nicht gelösten Zielproteins und weiterer unlöslicher Wirtszellproteine mittels Zentrifugation
5. Resolubilisierung des Pellets mit dH_2O und Abtrennung der gelösten Bestandteile, inclusive Zielprotein, mittels Zentrifugation
6. Dialyse des Überstandes gegen 2 M NaCl
7. Erhöhung der Temperatur der Dialyseprobe auf 40 °C
8. Abtrennung des coacervierten Zielproteins mittels Zentrifugation bei 40 °C

Aus 1 kg Tabakblättern konnten so 10 mg 1xFlag-100xELP gewonnen werden.

1.1.7 **Untersuchungen zur Reingiung von Flag-Inteinen aus Erbsensamen**

Ein Ansatz zur Produktion großer Moleküle, bestand aus der inteinvermittelten Polymerisation von Spinnenseidenproteinen (Flag). Die Produktion in Erbsensamen in Kaltgewächshäusern ergab aber nur relativ geringe Zielproduktkonzentration festgestellt werden, so dass die Entwicklung einer Reinigungsstrategie im größeren Maßstab nicht weiter verfolgt wurde.

1.1.8 **Untersuchungen zur Reinigung Flag-Inteinen aus Tabaksamen**

Ein Ansatz zur Produktion großer Moleküle, bestand aus der inteinvermittelten Polymerisation von Spinnenseidenproteinen (Flag). Dabei wurde auf den ELP-tag verzichtet, so daß eine alternative Reinigungsstrategie entwickelt werden musste. In Tabaksamen konnte das Zielprotein mittels Western-blot nachgewiesen werden. Unter Verwendung einer Zentrifugalmühle wurden größere Mengen an Tabaksamen (> 5 g) aufgeschlossen. Dabei wurde ein konstanter Verlust an ca. 2 g Biomasse beobachtet, der bei größeren Mengen weniger ins Gewicht fällt.

Durch zweimalige Inkubation der aufgeschlossenen Tabaksamen mit Aceton wurden Lipide noch vor der Proteinextraktion abgetrennt. Durch die Abtrennung einer der Hauptkontaminationen reduzierte sich das Ausgangsgewicht um ca. 50% (Reinigungsfaktor 2).

Für die Extraktion des Zielproteins aus dem entfetteten Tabaksamenmehl eignet sich ein Tris-HCl-Puffer, vom pH 8.0. Das Zielprotein konnte mit dem Puffer in Lösung gebracht werden. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation entfernt. Bei der Extraktion des Zielproteins (ZP) gingen auch Wirtszellproteine (HCP) in Lösung, die nachfolgend abgetrennt werden müssen.

Für die Separierung von HCP vom ZP wurden mehrere Ansätze verfolgt. Zunächst wurde die Abtrennung mittels Hitzebehandlung untersucht. Bereits nach fünf Minuten bei 90°C war ein Großteil aller HCP ausgefallen. Lediglich zwei Proteine waren als Kontamination noch mittels SDS-PAGE nachweisbar. Das ZP blieb nahezu vollständig in Lösung.

Als zweite Methode wurde versucht, die HCP chemisch mittels Bromcyan zu spalten, da das ZP nur eine einziges Methionin in einem unwichtigen Bereich der intein-Polymere besitzt. Es gelang, sämtliche HCP zu spalten. Insbesondere gelang es, die beiden Proteine zu spalten, die bei der Hitzefällung übrig geblieben waren.

Als dritte Methode wurde die fraktionierende Fällung mittels Aceton etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirtszellproteine bei einer Acetonkonzentration von 50% vollständig präzipitierten. Bei dieser Konzentration blieb das Zielprotein vollständig in Lösung. Eine Präzipitation des ZP konnte bei 80% erreicht werden.

Insgesamt verliefen auch die Versuche zur Isolierung der Zielproteine aus Tabaksamen erfolgreich.

Erfolgskontrollbericht[2]

Teilvorhaben 1: Konstruktion, Produktion und Charakterisierung

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
IPK Gatersleben	**FNR 22037511 bzw. 11NR375**
Vorhabenbezeichnung: **Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen**	
Laufzeit des Vorhabens: **01.07.2012 - 31.01.2017**	
Berichtszeitraum: **01.07.2012 - 31.01.2017**	

1. Beitrag zu den förderpolitischen Zielen

Die von uns erreichten Ergebnisse ermöglichen die Produktion von Proteinen in Pflanzen. Diese Proteine werden zur Erzeugung von Matritzen („*scaffolds*“) für die Kultivierung von Zellen, insbesondere Hautfibroblasten, genutzt. Damit ergeben sich vielfältige Einsatzmöglichkeiten, insbesondere in der Transplantationsmedizin, vorzugsweise bei schweren Verbrennungen. Somit können wichtige Rohstoffe effektiv in Pflanzen, damit als nachwachsende Rohstoffe, hergestellt werden.

2. Erzielte Ergebnisse

Wir verweisen auf den Schlussbericht, Abschnitt II und fassen die erzielten Ergebnisse wie folgt zusammen:

- Spinnenseidenproteinderivate Q-MaSpI-ELP und K-MaSpI-ELP wurden in Blättern transgener Tabakpflanzen produziert und durch ITC gereinigt. Die gereinigten Monomere Q-MaSpI-ELP und K-MaSpI-ELP wurden *in vivo* durch rekombinante Transglutaminase verknüpft. Auf diese Weise wurden sehr viel größere Moleküle erzeugt. Die *cross-linking* –

[2] Siehe auch Merkblatt zum Schlussbericht

Experimente wurden mit jeweils nur Q-MaSpI-ELP bzw. K-MaSpI-ELP sowie mit einem Mix durchgeführt. Die jeweiligen Monomere enthielten noch weitere Glutamine sowie jeweils ein Lysin innerhalb der KDEL-Sequenz am C-Terminus. Deshalb haben wir keine lineare Dimerisierung über die jeweiligen Enden erwartet, sondern mussten mit kreuzvernetztem Material rechnen. Hochmolekulares Material mit nahezu nativem Molekulargewicht von mindestens 250 kDa konnte erzeugt werden. Dünne Schichten wurden aus Monomeren und Multimeren erzeugt und durch *Atomic force microscopy* (AFM) sowie durch AFM-basierte Nanointendation untersucht. Dabei zeigte sich, dass Multimerschichten die höchsten E-Module (*elastic penetration modulus)* aufwiesen.

- Durch Intein-vermitteltes *trans-splicing* wurden hochmolekulare Spinnenseidenmultimere in Blättern und Samen erzeugt.
- Die Spinnenseidenmultimere erwiesen sich in Samen als außerordentlich stabil (1 Jahr stabil bei Samenlagerung bei 15°C und 49% relativer Luftfeuchtigkeit)
- Die mikromechanischen Analysen erfolgten durch AFM-basierte Nanointendationsexperimente an dünnen Schichten. Dabei zeigte sich, dass Multimerschichten die höchsten E-Module (*elastic penetration modulus)* aufwiesen. Der relative Spinnenseidenanteil und/oder das höhere Molekulargewicht erhöhen ebenfalls den elastischen Penetrationsmodul, ein Maß für Festigkeit und Zähigkeit.
- Wir haben erstmals immunoloische Analysen von synthetischen Spinnenseidenproteinen durchgeführt. Dadurch konnte in Kooperation mit der Klinik für Transplantationsmedizin gezeigt werden, dass Spinnenseidenproteinderivat nicht zytotoxisch und nicht hämolytisch sind. Wir konnten aber auch zeigen, dass eine humorale Immunantwort in Mäusen gegen den ELP-Teil des Fusionsprotein erzeugt wurde. Wir schließen aus diesen Daten, dass Spidroin-basierte Biopolymere humorale Immunantworten induzieren können, die vom Fusionspartner und damit von der gesamten Struktur des Fusionsproteins abhängen. Das ist bei biomedizinischem Einsatz von Fusionsproteinen grundsätzlich zu bedenken.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

3.1. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

Für folgende Schutzrechtsanmeldung waren Projektarbeiten wichtig:

HAUPTMANN, V., M. GILS, U. CONRAD & H.T. PHAN: Methods of producing and purifying polymeric proteins in transgenic plants (Patent). EP 2518081, Granted on 31.10.2012, IPK-Nr. 2011/07 (2012).

Insbesondere für für die Reinigung von Intein-vermittelten Multimeren aus Pflanzen ergeben sich nach eventueller Erteilung Nutzungsmöglichkeiten.

3.2. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont)

Zentrale Ziele eines weiterführenden Projekts sind die Entwicklung innovativer Produkte zur Behandlung chronischer Wunden in Form einer resorbierbaren Wundauflage und einer resorbierbaren Wundauflage beladen mit Wirkstoffen und der Möglichkeit zur Aufsiedelung autologer Zellen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden die Klinik für Plastische, Ästhetische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover (PÄHW) und die Arbeitsgruppe Phytoantikörper am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben zusammenarbeiten. In beiden Gruppen wurden in den letzten Jahren wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Zusammenarbeit zum Erreichen des zentralen Projektzieles geschaffen. Mitarbeiter des PÄHW konnten in zahlreichen Studien zeigen, dass natürliche Spinnenseide biokompatibel und nicht zytotoxisch, zelladhäsions-fördernd, gefäßrekrutierend, regenerationsfördernd sowie geeignet für das tissue engineering u.a. von artifizieller Haut ist (Wendt et al. 2011, Roloff et al. 2014, Henecke et al. 2013, Schäfer-Nolte et al. 2014). In weiteren eigenen Vorarbeiten wurden an der PÄHW Methoden etabliert, welche die grundlegende Kultivierung von Hautzellen, Besiedlung von Dermisersatz, plastische Hautgewebegenerierung, Ansätze zur in vivo Testung im murinen Rückenhautkammermodell und Großtier (Schaf) sowie molekularbiologische Modulation adressieren. So wurden Verfahren entwickelt, die es ermöglichen, humane Keratinozyten effizient zu isolieren und ohne Zusatz von xenogenem Serum oder murinem Feeder-Layer zu kultivieren. Die wirtschaftlichen Aussichten sind gut. Allein in Großbritannien leiden 2,2 Millionen Menschen unter chronischen Wunden, verbunden mit jährlichen Therapiekosten von 5,3 Milliarden £ . Für Deutschland bewegen sich die Schätzungen mit 1 bis 4 Millionen Betroffenen ähnlich. Die deutschlandweiten Kosten werden auf bis zu 4 Milliarden € beziffert, Detailbetrachtungen beziffern die durchschnittlichen Kosten für den einzelnen Patienten z.B. bei Ulcus curis auf 7.631 € bis 9.570 € pro Jahr. Allein bei dieser Patientengruppe belaufen sich die Behandlungskosten auf Grund der Zunahme der Diabeteserkrankungen, wie auch der steigenden Lebenserwartung in den Industrienationen, ist in den kommenden Jahren mit einem stetig wachsenden Bedarf an Medizinprodukten zur Behandlung chronischer Wunden zu rechnen. Da durch den Einsatz moderner Wundversorgungsprodukte eine Reduktion der Gesamtkosten trotz höherer Kosten für das Einzelprodukt erwartet wird , ist von einer Bereitschaft der Kostenträger zur Übernahme der Kosten für den Einsatz innovativer Produkte auszugehen. So sprachen sich die Krankenkassen in einer Umfrage unter anderem für eine Stärkung der Förderung der phasengerechten modernen Wundversorgung aus und äußerten die Ansicht, dass moderne Produkte die Gesamtkosten der Therapie verringern werden.

3.3. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont)

Alle wesentlichen Daten wurden in anerkannten internationalen Fachzeitschriften publiziert. Diese Publikationen bilden eine wichtige Grundlage für ein weiterführendes Projekt.

3.4. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Ein Folgeprojekt hat die Entwicklung innovativer Produkte zur Behandlung chronischer Wunden in Form einer resorbierbaren Wundauflage und einer resorbierbaren Wundauflage beladen mit Wirkstoffen und der Möglichkeit zur Aufsiedelung autologer Zellen zum Inhalt. Das erfordert eine Reihe von molekuarbiologischen Arbeiten (Konstruktdesign) inclusive intensiver biochemischer, zellbiologischer und immunologischer Analysen.

Die innovatorischen Schritte zur Ergebnisumsetzung erfolgen über das Ansprechen von Medizinproduktherstellern auf Messen bzw. über unsere Kooperationspartner an der Klinik für Plastische, Ästhetische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Nach Lagerung der erzeugten Vliese zeigte sich, dass eine Unlöslichkeit in wässrigen Lösungen (Medien aller Art) nicht mehr gegeben war. Daher wurde mit Versuchen zur Vernetzung mit Glutaraldehyd/Formaldehyd begonnen. Diese Experimente erfordern die Reinigung weiterer Spinnenseidenproteine sowie Verspinnungs-/Vernetzungsversuche und werden nach Ende der Projektlaufzeit mit Haushaltsmitteln weitergeführt. Das gilt für Fraunhofer Halle, IPK und die Medizinische Hochschule Hannover.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Hier verweisen wir auf unsere relevanten Publikationen:

HEPPNER, R., N. WEICHERT, A. SCHIERHORN, U. CONRAD & M. PIETZSCH: Low-tech, pilot scale purification of a recombinant spider silk protein analog from tobacco leaves. Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 1687 http://dx.doi.org/10.3390/ijms17101687.

WEICHERT, N., V. HAUPTMANN, C. HELMOLD & U. CONRAD: Seed-specific expression of spider silk protein multimers causes long-term stability. Front. Plant Sci. 7 (2016) 6 http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00006.

HAUPTMANN, V., M. MENZEL, N. WEICHERT, K. REIMERS, U. SPOHN & U. CONRAD: In planta production of ELPylated spidroin-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers. BMC Biotechnol. 15 (2015) 9 http://dx.doi.org/10.1186/s12896-015-0123-2.

WEICHERT, N., V. HAUPTMANN & U. CONRAD: Transglutamination enables production and characterization of native-sized spider silk-ELP fusion proteins from genetically engineered plants. ISB News Report (2014) 5-8.

WEICHERT, N., V. HAUPTMANN, M. MENZEL, K. SCHALLAU, P. GUNKEL, T.C. HERTEL, M. PIETZSCH, U. SPOHN & U. CONRAD: Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants. Plant Biotechnol. J. 12 (2014) 265-275 http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12135.

HAUPTMANN, V., N. WEICHERT, M. MENZEL, D. KNOCH, N. PAEGE, J. SCHELLER, U. SPOHN, U. CONRAD & M. GILS: Native-sized spider silk proteins synthesized in planta via intein-based multimerization. Transgenic Res. 22 (2013) 369-377 http://dx.doi.org/10.1007/s11248-012-9655-6.

HAUPTMANN, V., N. WEICHERT, M. RAKHIMOVA & U. CONRAD: Spider silks from plants - a challenge to create native-sized spidroins. Biotechnol. J. 8 (2013) 1183-1192 http://dx.doi.org/10.1002/biot.201300204.

HAUPTMANN, V., M. GILS, U. CONRAD & H.T. PHAN: Methods of producing and purifying polymeric proteins in transgenic plants (Patent). EP 2518081, Granted on 31.10.2012, IPK-Nr. 2011/07 (2012).

HAUPTMANN, V: Heterologe Expression hochmolekularer repetitiver Spinnenseiden-basierter Proteine *in planta* sowie deren mechanische und immunologische Charakterisierung. (PhD Thesis, kumulativ) Halle/S., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I Biowissenschaften (2015) 75 pp.

6. Ausgaben- und Zeitplanung

Die Ausgaben- und Zeitplanung wurde eingehalten.

Erfolgskontrollbericht[3]

Teilvorhaben 2: Reinigungsoptimierung, Scale up und posttranslationale Multimerisierung

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	**FNR 22014412 bzw. 12NR144**
Vorhabenbezeichnung: **Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen**	
Laufzeit des Vorhabens: **01.07.2012 - 31.01.2017**	
Berichtszeitraum: **01.07.2012 - 31.01.2017**	

1. Beitrag zu den förderpolitischen Zielen

Die von uns erreichten Ergebnisse ermöglichen die Produktion und Reinigung von Proteinen in Pflanzen. Diese Proteine werden zur Erzeugung von Matritzen („*scaffolds*“) für die Kultivierung von Zellen, insbesondere Hautfibroblasten, genutzt. Damit ergeben sich vielfältige Einsatzmöglichkeiten, insbesondere in der Transplantationsmedizin, vorzugsweise bei schweren Verbrennungen. Somit können wichtige Rohstoffe effektiv in Pflanzen, damit als nachwachsende Rohstoffe, hergestellt und effektiv gereinigt werden.

2. Erzielte Ergebnisse

Wir verweisen auf den Schlussbericht, Abschnitt II und fassen die erzielten Ergebnisse wie folgt zusammen:

- Das vom Projektpartner (IPK Gatersleben) entwickelte Reinigungsverfahren, bezeichnet als mITC (membrane based Inverse Transition Cycling), wurde in der AG Pietzsch erfolgreich etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass direktes Kochen der Blätter und anschließendes

Homogenisieren im Mixer vergleichbare Ergebnisse zum Mörsern in flüssigem Stickstoff und anschließendem Kochen liefert. Die Durchführbarkeit der Reinigung wird dadurch verbessert.

- Die Art der Lagerung bzw. Vorbehandlung von transgenen Tabakblättern zeigte keinen Einfluss auf das Zielprotein (Spinnenseidenprotein), sofern das Material mittels Mikrowelle gekocht worden war. Ohne diese Mikrowellenbehandlung zeigten sich bei – 20°C und ohne Temperaturbehandlung (-T) deutliche Abbaubanden. Offensichtlich wurden durch die Mikrowellenbehandlung Proteasen inaktiviert.
- Das Standardverfahren, das zur Reinigung von Spinnenseidenproteinen verwendet wird, ist das mITC. Es wurde festgestellt, das ein Verlust an Zielprotein aufgrund der Adsorption am u. a. verwendeten Celluloseacetat-Filter auftritt. Ein weiterer Nachteil des membranbasierenden Verfahrens besteht darin, dass es nur unter erheblichem Kosten- und Zeitaufwand maßstabsvergrößert werden kann. Basierend auf vorangegangenen, positiven Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit der Isolierung von Tropoelastin, das, ebenso wie die ELP-tags der Zielproteine, repetitive Sequenzen aus hydrophoben Aminosäuren aufweist, wurde ein fraktionierendes Fällungsverfahren mittels Aceton untersucht. Mit Hilfe der Fällung von proteinogenen Verunreinigungen durch Aceton gelang es, einen vielversprechenden, einfach durchzuführenden, skalierbaren Ansatz zu etablieren. Nach Einstellung einer Acetonkonzentration von 45 % (v/v) konnte ein Großteil der präzipitierten Wirtszellproteine durch Zentrifugation abgetrennt werden. Durch Erhöhung der Acetonkonzentration konnte schließlich das Zielprotein gefällt und anschließend abzentrifugiert werden.
- Der Maßstab des beschriebenen Ansatzes wurde deutlich vergrößert. Dabei konnte gezeigt werden, dass im technischen Maßstab eine Acetonkonzentration von 40 % ausreichend war, um eine deutliche Abscheidung proteinogener Verunreinigungen nach Zentrifugation zu erzielen. Weiterhin gelang die Reduzierung des erforderlichen Volumens Wasser für den Zellaufschluss, bezogen auf die eingesetzte Biomasse, von 3:1 auf 1,5:1. Beide Resultate stellen wichtige ökonomische Faktoren dar.
- Das oben beschriebene Verfahren zur Reinigung von Q-/K-MaSp1-100xELP wurde erfolgreich auf die Reinigung von 1xFlag-100xELP übertragen. Dabei erfolgte eine Optimierung verschiedener Schritte. Das resultierende Verfahren gestaltete sich wie folgt:

9. Zellaufschluss und anschließende Klärung der Suspension durch Filtration
10. Abtrennung nicht retentierter unlöslicher Zellbestandteile mittels Zentrifugation
11. fraktionierende Acetonfällung löslicher Proteine (40 und 50 % (v/v) Aceton)
12. Waschen des resultierenden Pellets mit 2 M NaCl-Lösung, anschließend Abtrennung des nicht gelösten Zielproteins und weiterer unlöslicher Wirtszellproteine mittels Zentrifugation
13. Resolubilisierung des Pellets mit dH_2O und Abtrennung der gelösten Bestandteile, inclusive Zielprotein, mittels Zentrifugation
14. Dialyse des Überstandes gegen 2 M NaCl
15. Erhöhung der Temperatur der Dialyseprobe auf 40 °C

16. Abtrennung des coacervierten Zielproteins mittels Zentrifugation bei 40 °C

Aus 1 kg Tabakblättern konnten so 10 mg 1xFlag-100xELP gewonnen werden.

- Untersuchungen zur Reinigung Flag-Inteinen aus Tabaksamen führten zu folgenden Ergebnissen:

  Unter Verwendung einer Zentrifugalmühle wurden größere Mengen an Tabaksamen (> 5 g) aufgeschlossen. Dabei wurde ein konstanter Verlust an ca. 2 g Biomasse beobachtet, der bei größeren Mengen weniger ins Gewicht fällt.

  Durch zweimalige Inkubation der aufgeschlossenen Tabaksamen mit Aceton wurden Lipide noch vor der Proteinextraktion abgetrennt. Durch die Abtrennung einer der Hauptkontaminationen reduzierte sich das Ausgangsgewicht um ca. 50% (Reinigungsfaktor 2).

  Für die Extraktion des Zielproteins aus dem entfetteten Tabaksamenmehl eignet sich ein Tris-HCl-Puffer, vom pH 8.0. Das Zielprotein konnte mit dem Puffer in Lösung gebracht werden. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation entfernt. Bei der Extraktion des Zielproteins (ZP) gingen auch Wirtszellproteine (HCP) in Lösung, die nachfolgend abgetrennt werden müssen.

  Für die Separierung von ZP und HCP wurde nach verschiedenen Versuchen die fraktionierende Fällung mittels Aceton etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirtszellproteine bei einer Acetonkonzentration von 50% vollständig präzipitierten. Bei dieser Konzentration blieb das Zielprotein vollständig in Lösung. Eine Präzipitation des ZP konnte bei 80% erreicht werden.

  Insgesamt verliefen auch die Versuche zur Isolierung der Zielproteine aus Tabaksamen erfolgreich.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

3.5. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

-

3.6. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont)

Zentrale Ziele eines weiterführenden Projekts sind die Entwicklung innovativer Produkte zur Behandlung chronischer Wunden in Form einer resorbierbaren Wundauflage und einer resorbierbaren Wundauflage beladen mit Wirkstoffen und der Möglichkeit zur Aufsiedelung autologer Zellen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden die Klinik für Plastische, Ästhetische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover (PÄHW) und die

Arbeitsgruppe Phytoantikörper am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben zusammenarbeiten. Für die AG Pietzsch, Uni Halle, ergeben sich hier für die Zukunft Kooperationsmöglichkeiten, wo die Expertise und die Erfahrungen beim Upscaling produktiv eingebracht werden können.

3.7. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont)

Alle wesentlichen Daten wurden in anerkannten internationalen Fachzeitschriften publiziert. Diese Publikationen bilden eine wichtige Grundlage für weiterführende Projekte/Arbeiten.

3.8. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Ein Folgeprojekt hat die Entwicklung innovativer Produkte zur Behandlung chronischer Wunden in Form einer resorbierbaren Wundauflage und einer resorbierbaren Wundauflage beladen mit Wirkstoffen und der Möglichkeit zur Aufsiedelung autologer Zellen zum Inhalt. Das erfordert eine Reihe von molekuarbiologischen Arbeiten (Konstruktdesign) inclusive intensiver biochemischer, zellbiologischer und immunologischer Analysen. Erst nach diesen Arbeiten wird eine Entwicklung und Anpassung von Reinigungsverfahren sowie Upscaling notwendig.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Ein Ansatz zur Produktion großer Moleküle, bestand aus der inteinvermittelten Polymerisation von Spinnenseidenproteinen (FLAG). Die Produktion in Erbsensamen in Kaltgewächshäusern ergab aber nur relativ geringe Zielproduktkonzentration, so dass die Entwicklung einer Reinigungsstrategie im größeren Maßstab nicht weiter verfolgt wurde. Erbsen lassen sich nur schwierig in Kalthäusern kultivieren. Da keine Chance für eine Freisetzung transgener Pflanzen in Deutschland besteht, streben wir innerhalb einer internationalen Kooperation die Produktion von FLAG in transgenen Sojabohnensamen in einem Land an, wo der Anbau transgener Sojabohnen im Feld möglich ist. Die Expertise der AG Pietzsch wird dann zur Entwicklung einer Reinigungsstrategie benötigt.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Hier verweisen wir auf unsere relevanten Publikationen:

HEPPNER, R., N. WEICHERT, A. SCHIERHORN, U. CONRAD & M. PIETZSCH: Low-tech, pilot scale purification of a recombinant spider silk protein analog from tobacco leaves. Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 1687 http://dx.doi.org/10.3390/ijms17101687.

WEICHERT, N., V. HAUPTMANN, M. MENZEL, K. SCHALLAU, P. GUNKEL, T.C. HERTEL, M. PIETZSCH, U. SPOHN & U. CONRAD: Transglutamination allows production and characterization of native-sized ELPylated spider silk proteins from transgenic plants. Plant Biotechnol. J. 12 (2014) 265-275 http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12135.

HAUPTMANN, V: Heterologe Expression hochmolekularer repetitiver Spinnenseiden-basierter Proteine *in planta* sowie deren mechanische und immunologische Charakterisierung. (PhD Thesis, kumulativ) Halle/S., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I Biowissenschaften (2015) 75 pp. (Prof. Pietzsch war Vorsitzender der Prüfungskommission)

6. Ausgaben- und Zeitplanung

Die Ausgaben- und Zeitplanung wurde eingehalten.

Berichtsblatt - Kurzfassung des Vorhabens [4]

Zuwendungsempfänger: Teilvorhaben 1: Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK)	Förderkennzeichen: 22037511 bzw. 11NR375

Thema: Verbundvorhaben: Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen

Teilvohaben 1: Konstruktion, Produktion und Charakterisierung

Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2012 bis 31.01.2017

Projektbeschreibung:

In diesem Projekt sollte der Zusammenhang zwischen Sequenzmotiven, Proteingröße und den Materialeigenschaften von Spinnenseidenproteinen aus Pflanzen dargestellt werden. Des Weiteren sollte geprüft werden, inwieweit in Tabak in Gazehäusern und im Freiland diese materialwissenschaftlich interessanten Eiweiße effizient hergestellt werden können.

Projektergebnisse:

Spinnenseidenproteinderivate Q-MaSpI-ELP und K-MaSpI-ELP wurden in Blättern transgener Tabakpflanzen produziert und durch ITC gereinigt. Die gereinigten Monomere Q-MaSpI-ELP und K-MaSpI-ELP wurden *in vivo* durch rekombinante Transglutaminase verknüpft und Moleküle mit nahezu nativem Molekulargewicht von mindestens 250 kDa erzeugt. Dünne Schichten wurden aus Monomeren und Multimeren produziert und durch AFM sowie durch AFM-basierte Nanointendation untersucht. Multimerschichten wiesen die höchsten E-Module (elastic penetration modulus) aufwiesen. Der relative Spinnenseidenanteil und/oder das höhere Molekulargewicht erhöhen ebenfalls den elastischen Penetrationsmodul, ein Maß für Festigkeit und Zähigkeit. Durch Intein-vermitteltes trans-splicing wurden hochmolekulare Spinnenseidenmultimere in Blättern und Samen erzeugt. Die Spinnenseidenmultimere erwiesen sich in Samen als außerordentlich stabil. Wir haben erstmals immunologische Analysen von synthetischen Spinnenseidenproteinen durchgeführt. Dadurch konnte in Kooperation mit der Klinik für Transplantationsmedizin in Hannover gezeigt werden, dass Spinnenseidenproteinderivat nicht zytotoxisch und nicht hämolytisch sind. Wir konnten aber auch zeigen, dass eine humorale Immunantwort in Mäusen gegen den ELP-Teil des Fusionsprotein erzeugt wurde. Wir schließen aus diesen Daten, dass Spidroin-basierte Biopolymere humorale Immunantworten induzieren können, die vom Fusionspartner und damit von der gesamten Struktur des Fusionsproteins abhängen. Das ist bei biomedizinischem Einsatz von Fusionsproteinen grundsätzlich zu bedenken.

[4] Für die Projektbeschreibung und die Projektergebnisse jeweils maximal 2.000 Zeichen. Das Berichtsblatt ist bei Verbundvorhaben für jedes Teilvorhaben separat zu erstellen.

Short Project Description [4]

Beneficiary: Teilvorhaben 1: Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK)	Project number: 22037511 bzw. 11NR375
Project title: Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen Teilvohaben 1: Konstruktion, Produktion und Charakterisierung	
Project time: 01.07.2012 bis 31.01.2017	

Project objective:

In this project we tried to investigate the relation between sequence motifs, protein size and the material properties of spider silk proteiuns from plants. We also wanted to prove, if these proteins to be used for innovative new materials could efficiently produced in tobacco grown in cold green houses

Project results:

The spider silk derivatives Q-MaSpI-ELP and K-MaSpI-ELP have been produced in leaves of transgenic tobacco plants and have been purified by ITC. The purified monomers Q-MaSpI-ELP und K-MaSpI-ELP were ligated to each other by transglutaminase and molecules of nearly native moleculary weight of at least 259 kDa were produced. Thin layers have been manufactures from monomers and multimers and their material properties have been investigated by AFM and by AFM-based nanointendation. Layers from multimers showed the highest elastic penetration moduli. The relative spider silk protein content and/or the higher molecular weight also increase the elastic penetration modulus, a measure for hardiness and stiffness. High moleculary weight spider silk protein derivatives have also been produce *in planta* (in leaves and seeds) by intein-mediated trans-splicing. Spider silk protein multimers were extraordinary stabile in seeds. We performed for the first time immunological analyses of synthetic spider silk derivatives/ fusion proteins. Together with the Klinik für Transplantationsmedizin, Hannover we could show, that spider silk protein derivatives do not show cytotoxic and hemolytic activity. We could also show, that the sider-silk-ELP fusion protein elicited a humoral immune response in mice against the ELP part. We conclude from these data, that spidroin-based biopolymers can induce immune reponses dependent on the fusion partner and on the overall structure of the fusion protein. This knowledge should be taken into account by investigating the biomedical use of fusion proteins.

Berichtsblatt - Kurzfassung des Vorhabens [5]

Zuwendungsempfänger: Teilvorhaben 2: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	Förderkennzeichen: FNR 22014412 bzw. 12NR144

Thema: Verbundvorhaben: Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen

Teilvorhaben 2: Reinigungsoptimierung, Scale up und posttranslationale Multimerisierung

Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2012 bis 31.01.2017

Projektbeschreibung:

Hauptziele des Teilprojektes waren Untersuchungen zur die Isolierung rekombinanter Spinnenseidenvarianten nativer Größe aus Tabakpflanzen sowie aus Erbsen- und Tabaksamen. Die gewonnenen Produkte sollten für materialwissenschaftliche Arbeiten zur Verfügung gestellt werden.

Projektergebnisse:

Der Aufschluss der Blätter wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle verbessert. Die mITC –Technologie wurde optimiert. Ein Nachteil des membranbasierenden Verfahrens besteht darin, dass es nur unter erheblichem Kosten- und Zeitaufwand maßstabsvergrößert werden kann. Ein fraktionierendes Fällungsverfahren mittels Aceton wurde angewendet. Mit Hilfe der Fällung von proteinogenen Verunreinigungen durch Aceton gelang es, einen einfach durchzuführenden, skalierbaren Ansatz zu etablieren. Nach Einstellung einer Acetonkonzentration von 45 % (v/v) konnte ein Großteil der präzipitierten Wirtszellproteine durch Zentrifugation abgetrennt werden. Durch Erhöhung der Acetonkonzentration konnte schließlich das Zielprotein gefällt und anschließend abzentrifugiert werden. Der Maßstab des beschriebenen Ansatzes wurde deutlich vergrößert. Im technischen Maßstab war eine Acetonkonzentration von 40 % ausreichend w, um eine deutliche Abscheidung proteinogener Verunreinigungen nach Zentrifugation zu erzielen. Das erforderlichen Volumens Wasser für den Zellaufschluss, konnte, bezogen auf die eingesetzte Biomasse, von 3:1 auf 1,5:1 reduziertwerden. Beide Resultate stellen wichtige ökonomische Faktoren dar. Das oben beschriebene Verfahren zur Reinigung von Q-/K-MaSp1-100xELP wurde erfolgreich auf die Reinigung von 1xFlag-100xELP aus Blättern übertragen. Dabei erfolgte eine Optimierung verschiedener Schritte. Zur Reinigung von Flag-Inteinen aus Tabaksamen wurde durch zweimalige Inkubation der aufgeschlossenen Tabaksamen mit Aceton (Lipidabtrennung), Extraktion mit Tris-HCl-Puffer, pH 8.0 und fraktionierender Fällung mit Aceton eine skalierbare und preiswerte Methode entwickelt.

[5] Für die Projektbeschreibung und die Projektergebnisse jeweils maximal 2.000 Zeichen. Das Berichtsblatt ist bei Verbundvorhaben für jedes Teilvorhaben separat zu erstellen.

Short Project Description [4]

Beneficiary: Teilvorhaben 2: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	Project number: 22014412 bzw. 12NR144
Project title: Produktion, Reinigung und materialwissenschaftliche Charakterisierung von Spinnenseiden, Elastin- und Getreidereserveproteinmultimeren aus transgenen Pflanzen Teilvohaben 2: Reinigungsoptimierung, Scale up und posttranslationale Multimerisierung	
Project time: 01.07.2012 bis 31.01.2017	

Project objective:

Main goals of this project part were investigations to isolate recombinant spider silk protein variants of native size from tobacco plants and from tobacco and pea seeds. The isolated and purified products should be used for material investigations.

Project results:

The exploration of leaves has been improved by heating *via* microwaves. The mITC technology has been optimized. Scale up of mITC causes an tremendous increase of time efforts and of cost. A fractionating precipitation technology by use of acetone has therefore been applied. Proteinogenous inpurities could be successfully removed by acetone precipitation. A simple and scalable technology could thus be established. An acetone concentration of 45 % (v/v) enabled us to remove a major part of host cell proteins by centrifugation. The spider silk proteins could be precipitated and separated by increasing of the acetone concentration. The scale could be easily increased. At a technical scale an Acetone concentration of 40% was sufficient to significantly remove proteinogenous inpurities by centrifugation. The necessary water volumes could be reduced from 3:1 to 1.5:1, related to the biomass used. These results are important economical parameters. This procedure, developed for the purification of Q-/K-MaSp1-100xELP has been successfully adapted for the purification of 1xFlag-100xELP from leaves. Several steps have been optimized. FLAG multimers have been purified fro tobacco seeds by two times incubation with acetone to remove lipids, extraction with Tris-HCl-buffer, pH 8.0 and fractionated acetone precipitation. This led to the development of a scalable and cheap method.