

Identifizierung und biotechnologische Anwendungen Polymer-bindender Peptide

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Joanna Weber
aus Essen

Düsseldorf, Mai 2017

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Michael Feldbrügge

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht. Ich habe zuvor keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Joanna Weber

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2013 bis Dezember 2016 bei evoxx technologies GmbH in Monheim am Rhein unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger durchgeführt.

Das Manuskript zur Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit liegt vor.

J. Weber, D. Petrović, B. Strodel, S.H.J. Smits, S. Kolkenbrock, C. Leggewie, K.-E. Jaeger. Interaction of carbohydrate-binding modules with poly(ethylene terephthalate).

Diese Arbeit fand im Rahmen des Teilprojekts „Funktionalisierung und Veredelung von Funktionsgarnen“ der Allianz „FuPol“ – „Funktionalisierung von Polymeren“ statt und wurde finanziell durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) [„Innovationsinitiative industrielle Biotechnologie“ Förderkennzeichen Phase I 031A227A und Phase II 031B0113A] unterstützt.

Kooperationspartner des Teilprojekts:

evoxx technologies GmbH in Monheim am Rhein

DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V. RWTH Aachen

Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP in Potsdam

Coats Opti Germany GmbH in Rhauderfehn

Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten hat die kommerzielle Nutzung synthetischer Polymere kontinuierlich zugenommen. Polyethylenterephthalat (PET) und Polypropylen (PP) gehören zu den meist produzierten Kunststoffen und werden vorrangig in der Textil- und Verpackungsindustrie verwendet. Aufgrund des hydrophoben Charakters der Materialien sind häufig Oberflächenmodifizierungen für industrielle Anwendungen erforderlich, welche konventionell durch chemische oder physikalische Verfahren realisiert werden. Peptide mit Affinität gegenüber synthetischen Polymeren können hingegen umweltschonende Prozesse sowie vielseitige Funktionalisierungen ermöglichen und waren Untersuchungsobjekte dieser Arbeit. Der Fokus lag hier auf Kunststoff-affinen Peptiden, die mit funktionalen Bausteinen wie Pigmenten zur Färbung von Textilien oder thermoexpandierenden Mikrosphären (TEMs) zur Abdichtung von Nähten auf synthetischen Polymeren verankert werden. Interessante Peptid-Kandidaten sind Kohlenhydrat-bindende Module (CBMs) und antimikrobielle Peptide (AMPs), da sie an natürliche Polymere wie Polysaccharide bzw. Zellmembranen binden. CBMs wurden bereits erfolgreich als PET-bindende Peptide genutzt und an PET-hydrolysierende Enzyme fusioniert, um deren Substrataffinität zu steigern.

In dieser Arbeit wurden zur Identifizierung weiterer PET-Bindepeptide acht CBMs auf der Basis von Struktur- und Sequenzdaten rational ausgewählt, heterolog exprimiert und die PET-Affinität *in vitro* überprüft. Hierzu wurde ein „PET Surface Affinity Assay“ entwickelt, der es ermöglicht die PET-Affinität von Proteinen semi-quantitativ zu evaluieren. In diesem Testverfahren zeigten die fünf CBMs *PpCBM1*, *BaCBM2*, *BsCBM2*, *B/CBM5* und *ucCBM10* eine Affinität zu PET. Insbesondere *BaCBM2* stellte sich als vielversprechender Kandidat für industrielle Anwendungen heraus und fungierte als Modell-Bindepeptid, um die Wechselwirkung zwischen CBMs und PET zu studieren. Die Kombination aus *in silico* und *in vitro* Methoden zeigte, dass exponierte Aromaten des Peptids über π -stacking Interaktionen sowie polare Reste über Wasserstoffbrückenbindungen mit PET interagieren. In einer ersten Machbarkeitsstudie konnte *BaCBM2* erfolgreich zur Funktionalisierung von PET mit TEMs eingesetzt werden. Zudem konnte das Anwendungspotential von *BaCBM2* durch den Einsatz in der Methodenentwicklung zur Detektion von PET-Nanoplastik demonstriert werden.

Durch Projektpartner wurden strukturell unterschiedliche AMPs als PP-Bindepeptide identifiziert und das Funktionalisierungspotential von PP mit einem der Peptide (LCI) gezeigt. Die rekombinante Produktion von LCI im großen Maßstab stellt jedoch durch die antimikrobiellen Eigenschaften eine Herausforderung dar. Um das LCI zur Funktionalisierung von PP in großtechnischen Verfahren anwenden zu können, wurde daher in dieser Arbeit ein passendes, mikrobielles Produktionssystem identifiziert und etabliert. Mit *Pichia pastoris* als Expressionswirt konnten 0,69 g/L LCI erreicht werden. Das rekombinante LCI zeigte weiterhin eine Bindung an PP und konnte beispielhaft zur homogenen Beschichtung von hydrophoben

Oberflächen verwendet werden. Zusammenfassend konnten neue Bindepeptide für vielfältige Anwendungsfelder identifiziert, produziert und charakterisiert werden. Die Identifizierung eines geeigneten Expressionssystems für das PP-Bindepeptid LCI ermöglicht erstmals die Entwicklung eines großtechnischen, Peptid-basierten Verfahrens zur PP-Funktionalisierung. Die Ergebnisse dieser Studie tragen daher zum Fortschritt in der biotechnologischen Anwendung Polymer-bindender Peptide bei.

Summary

The commercial use of synthetic polymers has steadily increased over the past decades. Poly(ethylene terephthalate) (PET) and polypropylene (PP) are amongst the most produced polymers, finding application mainly in textile and packaging industry. Due to their highly hydrophobic properties, surface modifications of the materials are often crucial for industrial applications. Such modifications are conventionally realized by physical or chemical processes. In contrast, peptides with an affinity for synthetic polymers could enable eco-friendly processes as well as versatile functionalizations and were subject of this thesis. Main focus was on plastic-affine peptides that can be anchored on synthetic polymers, together with functional building blocks like pigments for dyeing of textiles or thermo-expansive microspheres (TEMs) for waterproof sealing of seams. Interesting peptide-candidates are carbohydrate-binding modules (CBMs) and antimicrobial peptides (AMPs) as they can bind natural polymers like polysaccharides and cell membranes, respectively. CBMs have already been successfully applied as PET-binding peptides and fused to PET-hydrolyzing enzymes in order to increase substrate affinity.

In this study, additional PET-binding peptides were identified by rationally selecting eight CBMs based on structure- and sequence data. The selected peptides were heterologously expressed and their affinity assessed *in vitro*. To this end, a “PET Surface Affinity Assay” was developed that enables semi-quantitative evaluation of the PET-affinity of proteins. PET-affinity could be shown for CBMs *PpCBM1*, *BaCBM2*, *BsCBM2*, *BICBM5* and *ucCBM10* using this technique. Notably *BaCBM2* turned out to be a promising candidate for industrial applications and was used as a model binding-peptide to investigate CBM-PET interplay. The combined *in silico* and *in vitro* analyses revealed PET interaction of exposed aromatic residues of the peptide via π -stacking interactions and of polar residues via hydrogen bonding. Furthermore, *BaCBM2* could successfully be applied to functionalize PET with TEMs in a first feasibility study and its application potential could be demonstrated during development of a PET-nanoplastic detection method.

Project partners identified structurally diverse AMPs as PP-binding peptides and could show the functionalization potential of PP with one of the peptides (LCI). However, large scale production of recombinant LCI is challenging due to its antimicrobial properties. In order to apply the LCI for functionalization of PP in large scale processes, a suitable microbial expression system was identified and established in this work. Using *Pichia pastoris* as an expression host a yield of 0.69 g/L LCI was obtained. The recombinant LCI still showed PP binding and could be used to homogeneously coat hydrophobic surfaces. Overall, new binding peptides for versatile areas of application could be identified, produced and functionally characterized. The identification of a suitable expression system for the PP-binding peptide LCI furthermore enables the development of a peptide-based PP-functionalization process for

industrial purposes for the first time. Thus, the results of this study contribute to the progress in biotechnological applications of polymer-binding peptides.

Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen ist der gebräuchliche Einbuchstabencode für Aminosäuren.

°C	Grad Celsius	CME	Zellulosemischester
µF	Mikrofarad	DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
µg	Mikrogramm	dH₂O	Deionisiertes Wasser
µL	Mikroliter	DNA	Desoxyribonukleinsäure
µM	Mikromolar	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
λ	Wellenlänge	DSP	<i>Downstream-Process</i>
λ_{EM}	Emissionswellenlänge	DSSP	<i>Define Secondary Structure of Proteins</i>
λ_{EX}	Anregungswellenlänge	DTT	Dithiothreitol
Ω	Ohm	E.	<i>Escherichia</i>
Å	Ångström	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Abb.	Abbildung	eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ad	lateinisch: zu, hinzu	engl.	englisch
AMP	Antimikrobielles Peptid	et al.	lateinisch: und andere
Amp^R	Ampicillin-Resistenz	fs	Femtosekunde(n)
APS	Ammoniumperoxodisulfat	FZ	Forschungszentrum
AS	Aminosäure(n)	g	Gramm
AU	<i>Arbitrary Unit</i>	GMQE	<i>Global Model Quality Estimation</i>
B.	<i>Bacillus</i>	h	Stunde(n)
BCCP	<i>Biotin Carboxyl Carrier Protein</i>	Hyg^R	Hygromycin-Resistenz
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	in	computersimuliert
		silico	
bp	Basenpaare	in vitro	außerhalb des lebendigen Organismus
BSA	Rinderserumalbumin	IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
bzw.	beziehungsweise	IR	Infrarot
C-	Carboxy-	ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Cam^R	Chloramphenicol-Resistenz	K	Kelvin
CAZy	<i>Carbohydrate-Active EnZyme</i>	Kan^R	Kanamycin-Resistenz
CBM	Kohlenhydrat-bindendes Modul	kb	Kilobasen
cm	Zentimeter	kcal	Kilokalorie

K_d	Dissoziationskonstante	ps	Picosekunde(n)
kDa	Kilodalton	pv.	pathogene Variante
kHz	Kiloherz	PVDF	Polyvinylidenfluorid
kV	Kilovolt	Rg	<i>Radius of gyration</i>
L	Liter	RMSD	<i>Root-Mean-Square-Deviation</i>
M	molar	RT	Raumtemperatur
mA	Milliampere	s	Sekunde(n)
mbar	millibar	S.	<i>Saccharomyces</i>
MBP	Maltose-Bindeprotein	SDS	Natriumdodecylsulfat
MD	<i>Molecular Dynamics</i>	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
mg	Milligramm	sp	Signalpeptid
min	Minute(n)	SUMO	<i>Small Ubiquitin like MODifier</i>
mL	Milliliter	T.	<i>Trichoderma</i>
mM	millimolar	Tab.	Tabelle
ms	Millisekunde(n)	TAE	Tris-Acetat-EDTA
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>	TEM	Thermoexpandierende Mikrosphäre
N-	Amino-	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
nm	Nanometer	U	<i>Unit(s)</i> (Enzymeinheit)
N/m	Newton/Meter	uc	<i>uncultured</i>
nmol	Nanomol	ün	über Nacht
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	Upm	Umdrehungen pro Minute
ns	Nanosekunde(n)	UV	Ultraviolett
OD	Optische Dichte	V	Volt
P.	<i>Pichia</i>	vgl.	vergleiche
PBM	Polyhydroxyalkanoat-bindendes Modul	v/v	Volumenprozent
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	W	Watt
PDB	Protein-Datenbank	WCW	<i>Wet Cell Weight</i>
PET	Polyethylenterephthalat	WT	Wildtyp
pmol	picomol	w/v	Gewichtsprozent
PP	Polypropylen	x g	x-fache Gravitationskraft

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
INHALTSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Synthetische Polymere	1
1.1.1 Polyethylenterephthalat und Polypropylen	1
1.1.2 Funktionalisierung synthetischer Polymere	1
1.1.3 Kunststoffe in der Umwelt.....	5
1.2 Polymer-bindende Peptide	7
1.2.1 Kohlenhydrat-bindende Module.....	7
1.2.2 Antimikrobielle Peptide	11
1.2.2.1 Charakterisierung und Wirkmechanismus.....	11
1.2.2.2 Das antimikrobielle Peptid LCI	13
1.2.2.3 Rekombinante Expression von antimikrobiellen Peptiden	14
1.3 Ziele der Arbeit.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits	18
2.1.1.1 Chemikalien	18
2.1.1.2 Enzyme, Kits und Größenstandards.....	18
2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen	19
2.1.2.1 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	20
2.1.2.2 Medien zur Kultivierung von <i>P. pastoris</i>	20
2.1.2.3 Medien zur Kultivierung von <i>T. reesei</i>	20
2.1.3 Oligonukleotide	21
2.1.4 Vektoren	24
2.1.4.1 In dieser Arbeit generierte Plasmide zur Synthese von LCI.....	25
2.1.4.2 In dieser Arbeit generierte Plasmide zur Synthese von CBMs	29
2.1.5 Stämme	36
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
2.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration	37
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....	37
2.2.3 Amplifizierung von DNA (PCR).....	38

2.2.4	Sequenzierung von DNA	38
2.2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	38
2.3	Mikrobiologische Methoden	39
2.3.1	Mikrobiologische Arbeiten mit <i>E. coli</i>	39
2.3.1.1	Zellkultivierung von <i>E. coli</i>	39
2.3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	40
2.3.2	Mikrobiologische Arbeiten mit <i>B. subtilis</i>	41
2.3.2.1	Zellkultivierung von <i>B. subtilis</i>	41
2.3.2.2	Transformation von <i>B. subtilis</i>	41
2.3.3	Mikrobiologische Arbeiten mit <i>P. pastoris</i>	41
2.3.3.1	Zellkultivierung von <i>P. pastoris</i>	41
2.3.3.2	Transformation von <i>P. pastoris</i>	42
2.3.3.3	Fermentation von <i>P. pastoris</i> im <i>Fed-Batch</i> Verfahren und Probenaufbereitung	43
2.3.4	Mikrobiologische Arbeiten mit <i>T. reesei</i>	44
2.3.4.1	Zellkultivierung von <i>T. reesei</i>	44
2.3.4.2	Transformation von <i>T. reesei</i>	44
2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
2.4.2	Präzipitation von Proteinen	45
2.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.4.4	Spezifischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	46
2.4.4.1	Western Blot	46
2.4.4.2	Dot Blot	47
2.4.5	Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung	47
2.4.6	Proteinrückfaltung aus Einschlusskörpern	48
2.4.7	Inteinspaltung	49
2.4.7.1	Abspaltung aktiver Proteinaggregate	49
2.4.7.2	Protein <i>Trans</i> -Spleißen	49
2.4.8	Aufreinigung von Proteinen	50
2.4.9	„PET Surface Affinity Assay“	51
2.4.10	Rasterkraftmikroskopie zur Bestimmung von Schichtdicken	52
2.4.11	Tryptophan- <i>Quenching</i>	53
2.4.12	<i>MicroScale</i> Thermophorese	54
2.4.13	Verfahren zur Funktionalisierung von PET mit TEMs	55
2.4.14	Methode zur Detektion von PET-Nanopartikeln in wässrigen Systemen	55
2.4.15	Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase	56
2.5	Chemische Methoden	57
2.5.1	Herstellung von PET-Nanopartikeln	57
2.6	Bioinformatische Methoden	57
2.6.1	<i>Molecular Dynamic</i> -Simulationen	57

2.6.1.1	MD-Simulationen von CBMs in Wasser	58
2.6.1.2	Konstruktion einer PET-Oberfläche für MD-Simulationen.....	58
2.6.1.3	MD-Simulation von CBMs an der PET-Oberfläche	59
2.6.2	Computerprogramme und Datenbanken.....	59
3	ERGEBNISSE	61
3.1	Studien zu CBMs als Bindepeptide an PET	61
3.1.1	Zusammenstellung von CBMs als PET-Bindekandidaten.....	61
3.1.2	Expression der CBM-Kandidaten	65
3.1.2.1	CBM-Expression und -Aufreinigung aus <i>E. coli</i>	65
3.1.2.2	Verwendung verschiedener Expressionssysteme zur Synthese von <i>BaCBM2</i>	67
3.1.3	Entwicklung eines „PET Surface Affinity Assays“	70
3.1.4	PET-Anbindungsstudien mit den CBM-Kandidaten	72
3.1.5	Wechselwirkungen zwischen ausgewählten CBMs und PET	74
3.1.5.1	MD-Simulation von <i>TrCBM1</i> , <i>BaCBM2</i> und <i>BaCBM5</i> an der PET-Oberfläche.....	74
3.1.5.2	Einfluss von Tryptophan-Resten	76
3.1.6	Rationale Peptidmodifizierung zur Steigerung der PET-Affinität.....	77
3.1.7	Anwendung des PET-bindenden Peptids <i>BaCBM2</i>	82
3.1.7.1	Funktionalisierung von PET mit TEMs	82
3.1.7.2	Detektion von PET-Nanopartikeln in wässrigen Systemen	85
3.2	Studien zu LCI als Bindepeptid an PP	89
3.2.1	Identifizierung eines geeigneten Produktionssystems	89
3.2.2	Fermentation und <i>Downstream-Processing</i> zur Produktion von LCI	93
3.2.3	Überprüfung der Anwendbarkeit von LCI aus <i>P. pastoris</i> als Ankerpeptid zur Funktionalisierung von PP	96
4	DISKUSSION.....	101
4.1	Charakterisierung PET-bindender Peptide	101
4.2	Wechselwirkungen zwischen CBMs und PET	104
4.3	Nachweis und Quantifizierung von gebundenen Peptiden an synthetischen Polymeren	106
4.4	Produktion der PP- und PET-bindenden Peptide.....	110
4.5	Anwendungspotential der PP- und PET-bindenden Peptide	117
4.6	Ausblick.....	121
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	123
6	ANHANG	148
	DANKSAGUNG	154

1 Einleitung

1.1 Synthetische Polymere

1.1.1 Polyethylenterephthalat und Polypropylen

Polyethylenterephthalat (PET) und Polypropylen (PP) sind thermoplastische Kunststoffe (= formbar bei Wärme) und gehören zu den am häufigsten genutzten synthetischen Polymeren des täglichen Lebens (Maddah, 2016; Wei und Zimmermann, 2017a). PET gilt zur Zeit als das meist produzierte synthetische Polyester, dessen Monomere aus Terephthalsäure und Ethylenglycol bestehen (Abb. 1.1 A) (Pellis et al., 2016; Wei und Zimmermann, 2017b). Hauptsächlich wird PET genutzt um daraus Fasern, Filme und Harze herzustellen, welche in der Textil- und Elektroindustrie, für medizinische Geräte sowie für Verpackungen von Lebensmitteln und Getränken eingesetzt werden (Pellis et al., 2016; Zimmermann und Billig, 2011). Das Polymer kann eine amorphe oder teilkristalline Struktur aufweisen und ist durch eine hohe Festigkeit und Härte gekennzeichnet (Köpnick et al., 2012; Wei und Zimmermann, 2017a). Außerdem weist es eine starke mechanische Belastbarkeit, eine hohe chemische Resistenz und eine geringe Gasdurchlässigkeit auf (Köpnick et al., 2012; Webb et al., 2013). PP ist ein petrochemisches Polymer, welches sich aus monomeren Einheiten von Propylen zusammensetzt (Abb. 1.1 B). Es besitzt eine sehr geringe Dichte und hat eine teilkristalline Struktur (Michler, 2008). Ähnlich wie PET ist PP beständig gegenüber Chemikalien und Hitze sowie mechanisch stark belastbar (Maddah, 2016; Webb et al., 2013). Da es zudem auch kostengünstig ist, findet das Material Anwendung in einer Vielzahl verschiedener Bereiche (Liang et al., 1998; Shubhra et al., 2013). Vorrangig werden aus PP Spritzguss-Produkte sowie Fasern und Filme produziert, die beispielsweise in Verpackungen, Haushaltswaren oder der Automobilindustrie verwendet werden (Andrady und Neal, 2009; Maddah, 2016; Srivastava und Srivastava, 2014).

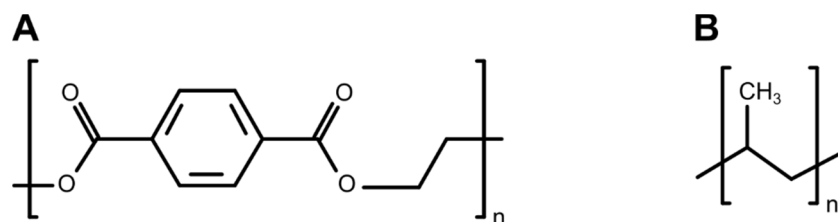


Abb. 1.1: Strukturformeln von Polyethylenterephthalat (A) und Polypropylen (B).

1.1.2 Funktionalisierung synthetischer Polymere

Synthetische Polymere, darunter auch PET und PP haben einen stark hydrophoben Charakter. Dieser kann in vielen Anwendungsbereichen einen großen Nachteil darstellen, da die Oberflächen kaum benetzbar und nur schwer zu funktionalisieren sind (Pellis et al., 2016;

Vertommen et al., 2005). Durch Modifizierung der Oberfläche ist es jedoch möglich, die Hydrophilität zu erhöhen und somit die Verarbeitbarkeit der Materialien zu verbessern (Zimmermann und Billig, 2011). Beispielsweise kann Farbe besser ins PET-Gewebe aufgenommen werden, wenn die Oberfläche hydrophiler ist (Kim und Song, 2006). Ein weiteres Beispiel ist, dass antistatische Eigenschaften sowie die Benetzbarkeit von Polyestern durch eine kontrollierte Hydrolyse der Oberfläche verbessert werden können (Andersen et al., 1999; Hsieh et al., 2003). Auch im Prozess der Bio-Beschichtung von synthetischen Polymeren zur Anwendung in der Mikroelektronik- oder Verpackungsindustrie stellt die Hydrophilisierung der Oberflächen einen entscheidenden Schritt dar (Guebitz und Cavaco-Paulo, 2008). Um die Oberfläche von synthetischen Polymeren zu modifizieren, wurden bereits diverse chemische und physikalische Methoden beschrieben. Hierzu zählen Plasmabehandlungen zur Einführung von hydrophilen Gruppen, der Einsatz von chemischen Veredlern, die auf hydrophilen carboxyl-enthaltenden Polymeren basieren sowie eine alkalische oder saure Hydrolyse (Brueckner et al., 2008; Guebitz und Cavaco-Paulo, 2008; McCord et al., 2002; Negulescu et al., 2000; Soane et al., 2008; Tkavc et al., 2013). Diese konventionellen Techniken können jedoch eine Vielzahl von Nachteilen aufweisen. Sie können die Umwelt durch den Einsatz von aggressiven Chemikalien stark belasten, zu Verlust in Festigkeit und Gewicht führen und das Ausmaß der Materialmodifikation ist oft nur schwer zu kontrollieren (Battistel et al., 2001; Chan et al., 1996; Eberl et al., 2009; Shukla et al., 1997). Überdies können die Verfahren energieaufwendig, unspezifisch, kostspielig oder aufwendig in der Durchführung sein (Battistel et al., 2001; Chan et al., 1996; Eberl et al., 2009; Shukla et al., 1997; Zeronian und Collins, 1989).

Als alternative Oberflächenmodifizierung von Polyestern, insbesondere von PET wurde die enzymatische Hydrolyse durch Lipasen, Esterasen und Cutinasen beschrieben, welche polare Gruppen an der Polymeroberfläche einführen (Billig et al., 2010; Brueckner et al., 2008; Eberl et al., 2008; Eberl et al., 2009; Fischer-Colbrie et al., 2004; Herrero Acero et al., 2011; Kanelli et al., 2015; Kleeberg et al., 2005; Mueller, 2006; Poultney et al., 2012; Ribitsch et al., 2012; Roth et al., 2014). Vorteile solcher biokatalytischen Modifikationen sind, dass diese unter milden Reaktionsbedingungen, spezifisch und auf die Polymeroberfläche beschränkt, durchgeführt werden können, sodass die Haupteigenschaften und die mechanische Stabilität nicht verändert werden (Pellis et al., 2016; Vertommen et al., 2005; Wavhal und Balasubramanya, 2011; Zimmermann und Billig, 2011). Um die Aktivität der Enzyme und damit die PET-Hydrolyse zu steigern, wurden unterschiedliche Ansätze beschrieben. Durch rationales Enzym-*Engineering* wurde beispielsweise das aktive Zentrum sowie die umgebende Region von Cutinasen zur Steigerung der Substratbindung modifiziert (Araújo et al., 2007; Silva et al., 2011). In weiteren Studien wurde die Thermostabilität der Enzyme durch gerichtete Mutagenese erhöht (Kawai et al., 2014; Then et al., 2015; Then et al., 2016). Bei Temperaturen

nahe der Glasübergangstemperatur von PET ($T_g > 65^\circ\text{C}$) steigt die Mobilität der amorphen Teile des Polymers, wodurch diese für das Enzym zugänglicher werden (Wei und Zimmermann, 2017b). Daher können Enzyme mit hoher Stabilität in diesem Temperaturbereich zu einer gesteigerten PET-Hydrolyse führen. Darüber hinaus tragen verbesserte Adsorptionseigenschaften durch Veränderung der Oberfläche sowie durch Fusion von Hydrophobinen oder Bindemodulen, darunter sowohl Kohlenhydrat-bindende Module (CBMs) als auch Polyhydroxyalkanoat-bindende Module (PBMs) zur gesteigerten Polymerhydrolyse bei (Araújo et al., 2007; Espino-Rammer et al., 2013; Herrero Acero et al., 2013; Perz et al., 2015; Ribitsch et al., 2013; Ribitsch et al., 2015; Zhang et al., 2013).

Gegenstand der Forschung innerhalb des Projekts „Funktionalisierung von Polymeren“ („FuPol“-Projekt) ist eine weitere und völlig neue Strategie der Modifizierung von synthetischen Polymeren, bei der über Polymer-bindende Peptide funktionale Bausteine bei Raumtemperatur und in wässriger Lösung auf die Materialoberfläche aufgebracht werden sollen. Insbesondere im Bereich der Textilveredelung und -färbung könnte solch eine Technologie Anwendung finden und ein ökologischer Lösungsansatz für verschiedene Problemstellungen sein. Da konventionelle Produktionsprozesse zur Funktionalisierung von Garnen sehr energie- und wasserintensiv sind, ist die Entwicklung von umweltfreundlicheren und wirtschaftlicheren Verfahren, die zudem keine großen Überschüsse an Funktionalisierungsmitteln erfordern, von großem Interesse.

Beispielsweise stellen Nähte bei wasserdichten Textilien wie Schuhen, Zelten oder Jacken eine Schwachstelle dar, da Wasser durch die beim Nähvorgang entstandenen Einstichlöcher eindringen kann (Perera und Mauretti, 2010). Durch die Verwendung von Industrienähgarnen, deren Fasern mit thermoexpandierenden Mikrosphären (TEMs) veredelt wurden, können hingegen die Nadellöcher verschlossen werden, da sich die TEMs durch Hitzebehandlung ausdehnen und so die Naht abdichten (Perera und Mauretti, 2010). TEMs sind kleine (Mikrometer-große), expansive Kapseln, die aus einer äußeren Polymerhülle und Kohlenwasserstoff im Inneren bestehen (Abb. 1.2 A). Sie können in einem initialen, nicht-expandierten oder in einem expandierten Zustand vorliegen (Abb. 1.2 B). Die Hülle ist typischerweise ein gasdichtes, thermoplastisches Polymer oder Copolymer und schließt komprimiert flüssigen Kohlenwasserstoff ein (Samel, 2007). Sobald die Umgebungstemperatur über die Glasübergangstemperatur des Polymers steigt, wird das Polymer weicher und der Kohlenwasserstoff geht in den gasförmigen Zustand über (Loomis et al., 2013). Dabei nimmt das Volumen des Kohlenwasserstoffs stark zu, der interne Druck steigt und die flexible Polymerhülle dehnt sich aus (Roxhed et al., 2006). Der Expansionsvorgang findet so lange statt, bis sich ein Gleichgewicht zwischen dem Druck im Inneren und der Spannung der Polymerhülle einstellt (Samel, 2007). Bei Abkühlung der Kapsel verbleibt diese in der

expandierten Form, da das thermoplastische Polymer wieder erhärtet (Roxhed et al., 2006). Somit ist die Expansion des TEMs irreversibel.

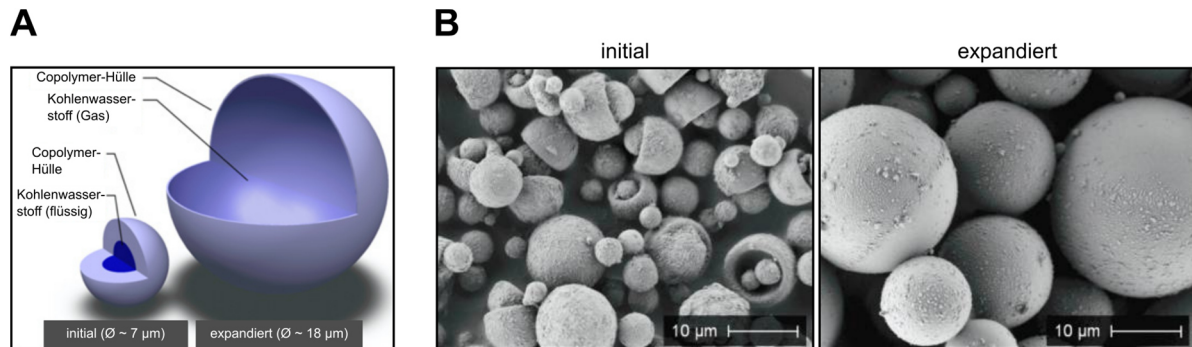


Abb. 1.2: Thermoexpandierende Mikrosphären.

(A) Schnittmodell. **(B)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen vor und nach Expansion. Zu sehen ist der Expancel® Mikrosphären-Typ 461DU20 von AkzoNobel N.V. (Amsterdam, Niederlande) mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $7,1 \pm 1,9 \mu\text{m}$ im initialen Zustand und $17,8 \pm 3,8 \mu\text{m}$ im expandierten Zustand. Die Abbildungen A und B sind modifiziert nach Loomis et al. (2013).

Eine Fixierung der TEMs auf der Textilfaser über Polymer-bindende Peptide würde eine Auftragung bei Raumtemperatur erlauben und so das intrinsische Problem umgehen, dass die Kapseln nicht bei hohen Temperaturen verarbeitet werden können („FuPol“-Projekt). Neben TEMs sind weitere funktionale Bausteine für die Textilveredelung denkbar. Unter anderem könnten perfluorierte Carbonsäuren über Polymer-bindende Peptide auf Garne aufgetragen werden, sodass auch die Nähte von Textilien mit anschmutzungshemmender Ausrüstung versehen werden könnten („FuPol“-Projekt). Derzeitige Prozesse sind kostspielig, durch hohe Prozesstemperaturen energieaufwendig und erfordern eine intensive Aufbereitung des Produktionsabwassers (Schindler und Hauser, 2004). Ebenso könnte die Technologie eingesetzt werden, um Textilfasern mit Fluoreszenzmarkern zu bestücken, welche als Sicherheitsmerkmal eine Unterscheidung zwischen Originalprodukt und Fälschung zulassen („FuPol“-Projekt). Auch könnten Polymer-bindende Peptide in der Entwicklung einer neuartigen Färbemethode von Kunstfasern Anwendung finden. Kunstfasern aus PP können mit klassischen Techniken nicht oder nur unvollständig gefärbt werden. Farbstoffe sind lösliche Farbmittel und werden vorwiegend zum Färben von Textilien, Papier und Leder eingesetzt (Gürses et al., 2016). Da der Zugang von Farbstoffen zu PP durch den nicht-polaren, aliphatischen Charakter sowie der Kristallinität stark eingeschränkt ist, kann dieses synthetische Polymer durch die konventionelle Methode im Färbebad nicht gefärbt werden (Marcinčin, 1999; Ujhelyiova et al., 2007). Pigmente charakterisieren sich hingegen als unlösliche Farbmittel und werden direkt in das Anwendungsmedium eingearbeitet (Broadbent, 2001; Marcinčin, 1999). Diese Alternative wird zum Beispiel häufig zum Einfärben von Lacken, Kosmetika oder aber auch Kunststoffen verwendet (Bartholomey, 2015; Herbst und Hunger, 2004; Schiek, 1980). Die Pigmente werden in organische und anorganische Pigmente

untergliedert, wobei organische Pigmente im Gegensatz zu anorganischen Pigmenten nicht hitzestabil, dafür heller und intensiver sind (Marcinčin, 1999; Schiek, 1980). Aufgrund der erforderlichen hohen Prozesstemperaturen bei Kunststoffen ist der Einsatz von Pigmenten stark eingeschränkt (Herbst und Hunger, 2004). PP kann beispielsweise im Schmelzspinnverfahren gefärbt werden (Herbst und Hunger, 2004; Marcinčin, 1999). Bei dieser Technik wird das PP geschmolzen (Schmelztemperatur 175°C), dann durch eine Spinnndrüse gepresst (Spinnntemperatur 240–300°C) und erstarrt anschließend beim Abkühlen (Herbst und Hunger, 2004). Pigmente, welche in diesem Hoch-Temperatur-Verfahren eingesetzt werden, müssen somit eine außerordentliche Hitzestabilität aufweisen. PP-Fasern werden daher nur selten in der Textilindustrie verwendet (The Fiber Year 2015: World Survey on Textiles & Nonwovens., 2015). Eine biotechnologische Alternative stellen Polymerbindende Peptide dar, über welche organische, hitzeinstabile Pigmente bei Raumtemperatur auf Kunstfasern gebunden werden könnten („FuPol“-Projekt).

1.1.3 Kunststoffe in der Umwelt

Weltweit steigt die Nutzung von Plastik und viele der Kunststoffabfälle gelangen über die terrestrische Umwelt und Süßgewässer in die Weltmeere (Andrady, 2011; Horton et al., 2017; Koelmans et al., 2015; Tanaka und Takada, 2016). Es wird geschätzt, dass zur Zeit mindestens $5,25 \times 10^{12}$ Plastikpartikel in den Ozeanen schwimmen und die Anzahl mit steigendem Konsum weiter zunimmt (Eriksen et al., 2014). Die Verschmutzung der Umwelt mit Plastikteilen wurde mittlerweile als ein großes Problem für die Qualität von Süß- sowie Meerwasser erkannt und wird daher auch immer häufiger Gegenstand von Forschung und Entwicklung (Koelmans et al., 2015). Im Zuge dessen wird das Plastik nach verschiedenen Kategorien, unter anderem nach der Größe klassifiziert. Allerdings gibt es bisher keine einheitliche Definition. Hier wurde das Mikro- und Nanoplastik jeweils so definiert wie es in der entsprechenden Studie verwendet wurde. Weiter ist zur Orientierung eine mögliche Begriffserklärung aufgeführt: Makroplastik > 25 mm, Mesoplastik 5 mm bis 25 mm, Mikroplastik 20 µm bis 5 mm und Nanoplastik < 20 µm (Wagner et al., 2014). Mikro- und Nanoplastikpartikel entstehen zum einen in der Umwelt durch die Verwitterung von größeren Plastikteilen, deren Prozess sich aus Photodegradation, Biodegradation, thermo-oxidativer Degradation und Hydrolyse zusammensetzt (Andrady, 2011; Gewert et al., 2015; Yoshida et al., 2016; Yousif und Haddad, 2013). Zum anderen werden angefertigte Mikro- und Nanoplastikpartikel aus Konsumgütern über den Abfluss in das Ökosystem eingeführt (Andrady, 2011; Koelmans et al., 2015). Als populäres Beispiel sind hier kleine Plastikpartikel zu nennen, die wegen ihres Peeling-Effekts in Kosmetika eingesetzt werden (Abb.1.3) (Fendall und Sewell, 2009; Gouin et al., 2015). Einmal in die Umwelt gelangt, persistiert das Plastik dort und fragmentiert weiter in kleinere Partikel (Horton et al., 2017; Wei und Zimmermann, 2017b).

Welche Umweltgefahren davon ausgehen und in welchem Ausmaß diese stattfinden, ist nur schwer abzuschätzen (Horton et al., 2017; Koelmans et al., 2015; Wagner et al., 2014). Fest steht, dass Mikroplastik von Organismen aufgenommen wird und sich so in der Nahrungskette anreichert (Abb.1.3). Dies wurde vor allem bei Meerestieren beobachtet (Bugoni et al., 2001; Eriksson und Burton, 2003; Graham und Thompson, 2009; Jemec et al., 2016; Lönnstedt und Eklöv, 2016).

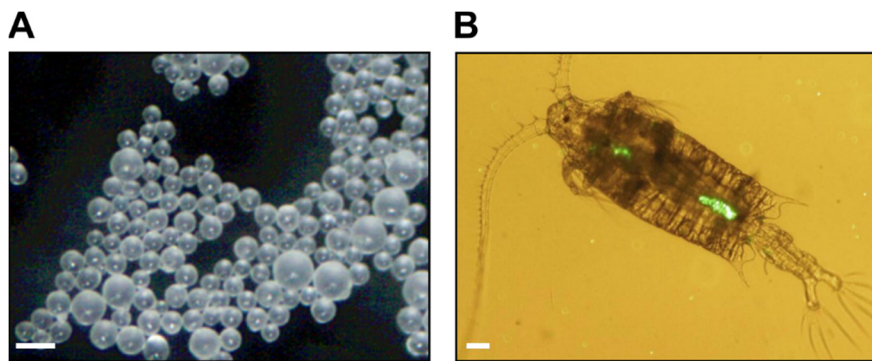


Abb. 1.3: Mikroplastik in Kosmetikprodukten und in Zooplankton.

(A) Polyethylen-Kügelchen. Mikroplastik, das typischerweise in Kosmetikprodukten eingesetzt wird (10–106 µm). Die Abbildung ist modifiziert nach Syberg et al. (2015). (B) Ruderfußkrebs *Centropages typicus* (dorsale Sicht) mit 7,3 µm Polystyren-Kügelchen. Das Plastik wurde durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Die Abbildung ist modifiziert nach Cole et al. (2013). Jeweiliger Maßstab (weiße Linien): 100 µm.

Wahrscheinlich können die Partikel nicht nur lange im Darm verweilen, sondern auch die Darmwand überqueren und in anderen Körperteilen lokalisieren (Browne et al., 2008; von Moos et al., 2012). Die Aufnahme von Mikroplastik kann zu inneren Verletzungen und größeren Entzündungsreaktionen durch toxische Effekte führen (Anderson et al., 2016; von Moos et al., 2012). Dies kann die Vermehrung, das Wachstum oder die Fitness der Individuen negativ beeinflussen (Besseling et al., 2013; Galloway und Lewis, 2016; Horton et al., 2017; Sussarellu et al., 2016). Betroffen sind auch Spezies, welche für viele essentielle Prozesse des Ökosystems wichtig sind, wodurch auch der Nährstoffkreislauf und die Zersetzung beeinflusst sein könnten (Besseling et al., 2013; Horton et al., 2017; Huerta Lwanga et al., 2017). Alarmierend ist die Beobachtung des trophischen Transfers und der Anreicherung von Plastik in der Nahrungskette, da auch Organismen aus niedrigen trophischen Ebenen Plastikpartikel aufnehmen (Avio et al., 2016; Farrell und Nelson, 2013). Neben dem ökologischen Einfluss weist Mikroplastik auch eine chemische Gefahr auf, da die synthetischen Polymere häufig chemische Weichmacher enthalten (Horton et al., 2017). Viele dieser Additive sind toxisch oder gelten als endokrine Disruptoren, die in das Hormonsystem eingreifen (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Oehlmann et al., 2009; Rochman et al., 2013). Man geht davon aus, dass sich diese Chemikalien über die Zeit vom Plastik lösen und dadurch ins Ökosystem gelangen (Avio et al., 2016; Cole et al., 2011). Darüber hinaus kann

Mikroplastik mit organischen und anorganischen Schadstoffen belastet sein (Horton et al., 2017; Lee et al., 2014; Wang et al., 2016; Wang et al., 2017). Dies ist sowohl auf die spezifische Oberfläche und Van-der-Waals-Kräfte, als auch auf eine höhere Affinität von organischen Schadstoffen zu hydrophoben Materialien als zum Meerwasser zurückzuführen (Wang et al., 2016). Wie viele Schadstoffe vom Mikroplastik adsorbiert und auch wieder ausgewaschen werden, ist abhängig von der Textur und der Größe des Partikels (Horton et al., 2017). Dabei steigt das Potential der Partikel mit Chemikalien zu interagieren, je größer die Oberfläche im Verhältnis zum Volumen des Partikels ist (Horton et al., 2017; Mattsson et al., 2015). Demzufolge könnten gerade stark verwitterte Partikel, deren Oberfläche durch Abrieb und Rissbildung vergrößert wurde, viele toxische Komponenten gebunden haben (Horton et al., 2017; Ivar do Sul und Costa, 2014). Insbesondere das Nanoplastik wird wegen seiner großen Oberfläche im Verhältnis zum Volumen als sehr gefährlich eingestuft (Koelmans et al., 2015; Liu et al., 2016; Velzeboer et al., 2014). Zudem könnte Nanoplastik wegen der Partikelgröße biologische Barrieren überqueren sowie in Gewebe eindringen und dort akkumulieren (CONTAM, 2016; Kashiwada, 2006; Mattsson et al., 2015; Salvati et al., 2011). Über das Individuum hinaus besteht die Gefahr, dass Nanoplastik in die chemische Kommunikation zwischen Spezies eingreift und zwischen trophischen Ebenen transferiert wird (Cedervall et al., 2012; Koelmans et al., 2015). Bisher wurden nur wenige Daten über die Akkumulation und die Auswirkung von Nanoplastik auf die aquatische Umwelt gesammelt, jedoch deuten die wenigen Studien schwerwiegende und für die Partikelgröße spezifische Effekte an (Andrady, 2011; Koelmans et al., 2015; Mattsson et al., 2015). Daher besteht ein großes Interesse, den Einfluss von Nanoplastik auf die Umwelt weiter zu erforschen und dafür erforderliche, experimentelle Methoden zu entwickeln (Mattsson et al., 2015). Beispielsweise steht die Entwicklung von analytischen Methoden zur Detektion von Nanoplastik erst am Anfang, sodass Nanoplastik auch noch nicht in Umweltproben, Trinkwasser oder Nahrungsmitteln detektiert werden konnte (CONTAM, 2016; Horton et al., 2017; Koelmans et al., 2015). Demzufolge konnte auch das tatsächliche Vorkommen von Nanoplastik in der Umwelt bisher noch nicht nachgewiesen werden, auch wenn in Fachkreisen kaum Zweifel an dessen Existenz besteht (CONTAM, 2016; Koelmans et al., 2015).

1.2 Polymer-bindende Peptide

1.2.1 Kohlenhydrat-bindende Module

Kohlenhydrat-bindende Module (CBMs) werden definiert als „autonom faltende Aminosäuresequenzen innerhalb von Kohlenhydrat-aktiven Enzymen mit Kohlenhydrat-Bindeaktivität“ (Shoseyov et al., 2006). Zu den Kohlenhydrat-aktiven Enzymen (*Carbohydrate-Active EnZymes*; CAZy) zählen mehrere Enzymklassen, welche den Abbau, die Biosynthese

oder die Modifikation von Kohlenhydraten und Glykokonjugaten katalysieren (Lombard et al., 2014). Viele dieser Biokatalysatoren sind modular aufgebaut und setzen sich aus katalytischen und nicht-katalytischen Einheiten zusammen (Lombard et al., 2014). CBMs sind nicht-katalytische Module und meist am N- oder C-Terminus lokalisiert (Boraston et al., 2004; Shoseyov et al., 2006). Die Module vermitteln die Assoziation von Kohlenhydrat-aktiven Enzymen mit Polysacchariden, indem sie diese erkennen und binden (Boraston et al., 2004). Dadurch bringen und halten sie die katalytische Domäne des Enzyms in der Nähe des Substrats und potenzieren so die katalytische Aktivität (Guillén et al., 2010). Die CBMs führen also die Enzyme zur Substratoberfläche und konzentrieren sie dort (Bolam et al., 1998; Boraston et al., 2004). Daneben können einige CBMs Polysaccharid-Strukturen nicht-katalytisch zerstören und machen dadurch das Substrat für das Enzym zugänglicher (Din et al., 1994b; Gao et al., 2001; Southall et al., 1999). Die Ligandenspezifität der CBMs reicht von (nicht-) kristalliner Cellulose über Chitin zu β -Glucanen, Xylan, Mannan, Galactan und Stärke, wobei hauptsächlich die Topographie der CBM-Bindestelle über die Fähigkeit zur Bindung entscheidet (Boraston et al., 2004; Guillén et al., 2010). Eine zentrale Rolle bei der CBM-Kohlenhydrat Wechselwirkung spielen aromatische Aminosäuren, primär Tryptophane sowie Tyrosine und seltener Phenylalanine, welche hydrophobe Interaktionen mit den Zuckerringen der Polysaccharide eingehen können (Asensio et al., 2013; Boraston et al., 2004; Din et al., 1994a; McLean et al., 2000; Pell et al., 2003; Simpson et al., 2000). Die Diversität in der Bindespezifität und -affinität wird hierbei durch die Positionierung und Orientierung der Aromaten sowie durch *Loop*-Strukturen in der Bindestelle definiert (Boraston et al., 2004). Diese führen typischerweise zu planaren, gewundenen oder *Sandwich*-Interaktionsflächen, welche die jeweilige Struktur des Polysaccharids abbilden (Abb. 1.4).

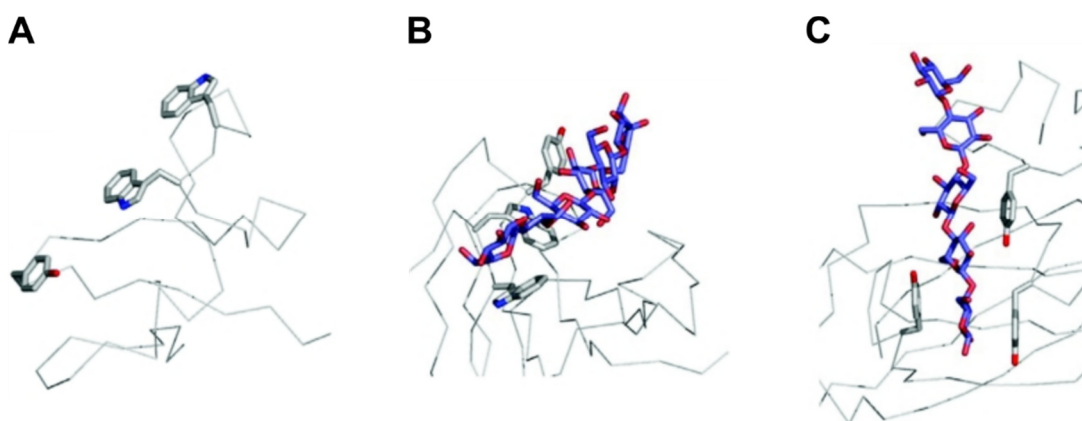


Abb. 1.4: Typische Anordnung aromatischer Aminosäurereste in CBM-Bindestellen.

(A) Planare Interaktionsfläche in CjCBM10. **(B)** Gewundene Interaktionsfläche in PeCBM29-2. **(C)** *Sandwich*-Interaktionsfläche in CfCBM4-2. Graue Striche stellen das C α -Rückgrat dar, aromatische Aminosäurereste der Interaktionsfläche sind in grau hervorgehoben und die gebundenen Oligosaccharide sind in blau dargestellt. Die Abbildung ist modifiziert nach Boraston et al. (2004).

Des Weiteren können Wasserstoffbrückenbindungen an der CBM-Kohlenhydrat Interaktion beteiligt sein, welche sich zwischen Hydroxygruppen der Kohlenhydrate und polaren Resten der CBM-Bindestelle bilden (Asensio et al., 2013; Guillén et al., 2010). CBMs werden anhand einer Reihe verschiedener Kriterien klassifiziert. Über Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz werden CBMs in Familien eingeordnet (Coutinho und Henrissat, 1999). Zurzeit beschreibt die CAZy-Datenbank (<http://www.cazy.org>) 81 verschiedene Familien (Lombard et al., 2014). In Boraston et al. (2004) wurden CBMs zudem in sieben Faltungsfamilien und über Struktur und Funktion in drei Typen unterteilt. Der Typ A beschreibt „*Surface-Binding CBMs*“ und lässt sich klar von den anderen Typen abgrenzen. CBMs der Familien 1, 2a, 3, 5 und 10 werden diesem Typ zugeordnet. Solche CBMs weisen im Speziellen eine Affinität zu unlöslicher, hoch kristalliner Cellulose oder Chitin auf, wohingegen sie lösliche Kohlenhydrate kaum oder gar nicht binden. Charakteristisch ist eine planare Anordnung der aromatischen Aminosäurereste in der Bindestelle, welche komplementär zur flachen Ligandoberfläche ist. Wasserstoffbrückenbindungen scheinen nur eine untergeordnete Rolle in der CBM-Liganden Interaktion zu spielen. CBMs des Typs B binden Polysaccharidketten, wobei der Polymerisationsgrad die Bindefähigkeit beeinflusst. Die Bindestelle erinnert an eine Furche und baut sich aus mehreren Untereinheiten auf, sodass sie sich individuell an die Monomere der Polymerkette anpassen kann. Den Typ C kennzeichnen „*Small Sugar Binding CBMs*“, welche auf ähnliche Weise wie Lektine Mono-, Di- und Trisaccharide binden. Neben hydrophoben Wechselwirkungen haben Wasserstoffbrückenbindungen bei CBMs der Typen B und C einen wesentlichen Einfluss auf die Bindeaffinität und Ligandenspezifität (Notenboom et al., 2001; Pell et al., 2003; Xie et al., 2001).

CBMs werden in der Nomenklatur mit dem Organismus und der Familie angegeben, beispielsweise: *TrCBM1*, CBM der Familie 1 aus *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) (Boraston et al., 2004). Die zuerst identifizierten Cellulose-bindenden Domänen (CBD) werden mittlerweile den CBMs zugeordnet; die Bezeichnung wird jedoch weiterhin für die Beschreibung von Modulen verwendet, welche Cellulose binden (Shoseyov et al., 2006).

Nahezu ubiquitär sind CBMs in Polysaccharid-hydrolysierenden Enzymen von Pflanzenzellwänden vertreten, wobei deren Polysaccharide sehr divers sind und sich sowohl in Typ und Rückgratverbindung als auch durch Modifikationen wie Methylierungen oder Acetylierungen unterscheiden (Boraston, 2005; Fangel et al., 2012; Popper, 2008). Um sich an die Vielfalt der Polysaccharide anpassen zu können, ist die Bindung der CBMs promiskuitiv (Charnock et al., 2002; Obembe et al., 2007). Das bedeutet, dass ein CBM verschiedene Polysaccharide binden kann. Beschriebene Dissoziationskonstanten von CBMs liegen im mikromolaren Bereich; *CtCBM3-BMCC* $K_d = 0,5 \mu\text{M}$ (Georgelis et al., 2012), *ucCBM72-Avicel®* $K_d = 2,1 \mu\text{M}$ (Duan et al., 2016), *CBD_{CbpA}-Avicel®* $K_d = 0,6 \mu\text{M}$ (Goldstein et al., 1993), *TpCBM20-Stärke* $K_d = 0,5 \mu\text{M}$ (Oh et al., 2015) (BMCC; *bacterial microcrystalline cellulose*,

Avicel®; kommerziell erhältliche, mikrokristalline Cellulose). Im Vergleich zu der Biotin-Streptavidin Bindung, welche als stärkste nicht-kovalente, biologische Interaktion bekannt ist und eine Dissoziationskonstante von $K_d \sim 4 \times 10^{-14} \text{ M}$ ($= 0,00000004 \text{ } \mu\text{M}$) hat (Holmberg et al., 2005), ist die Affinität der CBMs zu Kohlenhydraten eher niedrig einzuordnen. Dies deutet darauf hin, dass eine sehr starke CBM-Ligand Bindung nachteilig ist (Boraston et al., 2004; Guillén et al., 2010). Damit die Glykosid-Hydrolasen Zugang zur kompletten Pflanzenzellwand erhalten, ist es wichtig, dass die CBMs das Enzym nicht fest auf ihrem Substrat verankern, sondern dass dieses mobil bleibt und sich über die Oberfläche bewegen kann (Boraston et al., 2004; Jung et al., 2013; Machado et al., 2009; McLean et al., 2000). Teilweise kommen in einem Protein mehrere CBMs vor, welche die Substrataffinität um ein Vielfaches durch kooperative Bindung steigern können (Boraston et al., 2002; Boraston et al., 2007; Gilbert et al., 2002; Guillén et al., 2007).

Die Vielfalt der CBMs in Selektivität und Affinität für verschiedenste Polysaccharide sowie die autonome Faltung des Moduls erlauben eine enorme Bandbreite an biotechnologischen Anwendungen (Levy und Shoseyov, 2002; Oliveira et al., 2015; Shoseyov et al., 2006). CBMs wurden unter anderem in der Bioprozesstechnik, der Zellimmobilisierung, als analytische Werkzeuge in Forschung und Diagnostik, zur Bioremediation oder zur Modifizierung von Enzymcharakteristika und Fasern eingesetzt (Shoseyov et al., 2006). Exemplarisch werden hier einige Studien vorgestellt, welche sich wie in dieser Arbeit mit den Anwendungsfeldern der Bioremediation sowie der Fasermodifizierung beschäftigten. Dies verschafft nicht nur einen Überblick über literaturbeschriebene Anwendungen, sondern untermauert auch das Potential für das Vorhaben dieser Arbeit. CBMs wurden bereits in der Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Entfernung von Schwermetallen aus der Umwelt angewendet. Die auf Cellulose immobilisierte Fusion aus einem CBM und einem synthetischen Phytochelatin konnte zur effizienten Entfernung von Cadmium eingesetzt werden (Xu et al., 2002). CBMs wurden auch in einem System zur Detoxifizierung von Nervenwirkstoffen verwendet (Wang et al., 2002). Dazu wurden Bakterienzellen genetisch so manipuliert, dass sie sowohl Organophosphorus-Hydrolasen als auch CBMs auf der Zelloberfläche präsentierten. Die exponierten CBMs erlaubten eine Immobilisierung der Zellen auf einem Cellulose-Träger und die Enzyme hydrolysierten Organophosphat-Nervenwirkstoffe. Eine zukünftige Applikation solch eines Entgiftungssystems könnte in der Entwicklung von Protektionskleidung aus Baumwolle gegen Nervengas liegen (Shoseyov et al., 2006). Weiter bietet die nicht-hydrolytische Zerstörung von Polysacchariden durch einige CBMs Potential zur Modifikation von Fasern (Din et al., 1991). So wurden isolierte CBMs genutzt, um Polysaccharid-Strukturen anzurauen und dadurch die Färbereigenschaft von Cellulose-Fasern zu verändern (Gilkes et al., 2001). Auch konnte durch Bindung von CBMs auf Baumwollgewebe die Affinität von Farbstoffen erhöht werden (Cavaco-Paulo et al., 1999). In

der Textilindustrie finden sich aber auch noch weitere biotechnologische Anwendungen der CBMs. Waschpulver enthalten beispielsweise viele rekombinante Enzyme wie Amylasen, Proteasen oder Lipasen, die keine native Affinität zu Cellulose-Gewebe aufweisen (Levy und Shoseyov, 2002). Um die Affinität der Waschenzyme zum Textil und zur Verschmutzung zu erhöhen, wurden diese mit CBMs fusioniert (von der Osten et al., 1997). Dadurch konnte die Wirksamkeit der Waschenzyme und die Waschleistung verbessert werden. Neuere Studien befassen sich zudem mit der promiskuitiven Bindung von CBMs zu synthetischen Polymeren, insbesondere zu PET und den verbundenen, potentiellen Anwendungsfeldern. So zeigte eine PET-hydrolysierende Cutinase (Thc_Cut1) aus *Thermobifida cellulosilytica* verbesserte PET-Adsorption in Fusion mit einem CBM der Cellobiohydrolase I (CBM_{CBH1}) aus *T. reesei* (Ribitsch et al., 2013). Infolgedessen konnte eine erhöhte Hydrolyse des synthetischen Substrats detektiert werden, was für viele Anwendungen der Cutinase in der Textilindustrie oder in Verfahren zum PET-Recycling von Interesse ist (Ribitsch et al., 2013). In einer weiteren Studie wurde ein CBM der Cellulase CenA (CBM_{CenA}) aus *Cellulomonas fimi* an eine PET-hydrolysierende Cutinase aus *Thermobifida fusca* fusioniert und die Aktivität des Fusionsproteins durch ortsgerichtete Mutagenese des CBMs erhöht (Zhang et al., 2013).

1.2.2 Antimikrobielle Peptide

1.2.2.1 Charakterisierung und Wirkmechanismus

Die Gruppe der antimikrobiellen Peptide (AMPs) ist sehr vielfältig und wurde bereits in einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen wie Pflanzen, Tieren (Säugetiere einschließlich Menschen, Insekten, Amphibien, Stachelhäuter, Krustentiere, Fische) und Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) entdeckt (Bahar und Ren, 2013; Bulet et al., 1999; Castro und Fontes, 2005; Dubos, 1939; Jenssen et al., 2006; Li et al., 2010a; Ravichandran et al., 2010; Rinaldi, 2002; Rosa und Barracco, 2010). Dort sind sie Teil der angeborenen Immunabwehr, indem sie zytotoxisch auf eindringende Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten wirken (Bahar und Ren, 2013; Zanetti, 2004). Dieses enorme Spektrum der antimikrobiellen Aktivität begründet sich unter anderem durch die große Diversität in den Strukturen der AMPs (Hancock, 2001). Bisher identifizierte AMPs zeigten sowohl α -Helices, β -Faltblätter oder α/β -Strukturen mit stabilisierenden Disulfidbrücken als auch *Loops* oder erweiterte Strukturen (Bahar und Ren, 2013; Pushpanathan et al., 2013). Überdies weisen viele AMPs ungewöhnliche Aminosäuren wie *N*-Methyl-2-bromo-D-tryptophan oder *O*-demethyldolaprolin und strukturelle Motive wie Prolin-Arginin-Prolin-Motive, Glycin-/Cystein-reiche Regionen oder Chitin-Bindemotive auf, welche den AMPs einzigartige, strukturelle Eigenschaften verleihen (Pushpanathan et al., 2013). Des Weiteren spielen die Ladung, Größe, Hydrophobizität und Amphipathie eine wesentliche Rolle für die antimikrobielle Aktivität (Bahar und Ren, 2013;

Hancock et al., 2006; Pushpanathan et al., 2013). Auch die spezifische Toxizität der AMPs lässt sich auf ihren individuellen, strukturellen und physikochemischen Charakter zurückführen (Bahar und Ren, 2013; Pushpanathan et al., 2013). Im Allgemeinen sind AMPs kleiner als 100 Aminosäuren, kennzeichnen sich durch eine positive Nettoladung zwischen +2 und +9 bei neutralem pH und weisen viele hydrophobe Reste auf (Hoskin und Ramamoorthy, 2008; Pushpanathan et al., 2013).

Antibakterielle Peptide sind meist kationisch und greifen die bakterielle Zellmembran an (Bahar und Ren, 2013). Der amphipathische Charakter vieler AMPs erlaubt bei diesem Vorgang sowohl mit den hydrophilen Köpfen als auch mit den hydrophoben Schwänzen der Phospholipide zu interagieren (Jenssen et al., 2006). Antifungale Peptide wirken ebenfalls auf die Zelloberfläche oder auf intrazelluläre Komponenten, wobei sich die pilzliche Zellwand und die bakterielle Zellmembran unterschiedlich zusammensetzen (De Lucca und Walsh, 1999; De Lucca et al., 1998; Lee et al., 1999). Viele antifungale Peptide haben beispielsweise die Fähigkeit Chitin zu binden, da Chitin in pilzlichen Zellwänden vorkommt (Pushpanathan et al., 2012; Yokoyama et al., 2009). Bei dem antimikrobiellen Wirkmechanismus finden initial elektrostatische Interaktionen der AMPs mit negativ geladenen Molekülen auf der Oberfläche von Zielzellen statt. Dies können beispielsweise Lipopolysaccharide bei Gram-negativen Bakterien oder Teichonsäuren bei Gram-positiven Bakterien sein. Für den weiteren Verlauf des Wirkmechanismus werden die AMPs in zwei Gruppen unterschieden. Zum einen gibt es AMPs, welche in die Zellen eindringen und essentielle zelluläre Prozesse wie die Protein-, Nukleinsäure- oder Zellwandsynthese angreifen (Nicolas, 2009). Zum anderen gibt es AMPs, welche die Zellmembran permeabilisieren und zerstören. Dies kann durch die Ausbildung von transienten Poren, durch Störung der Lipiddoppelschicht oder durch Ausdünnung der Membran geschehen (Lohner und Prenner, 1999). Dabei spielt der hydrophobe Teil der AMPs eine entscheidende Rolle, da dieser die Membranpermeabilität des AMPs ermöglicht (Madani et al., 2011). Um die verschiedenen Mechanismen der AMPs zu beschreiben, wurden mehrere Modelle aufgestellt. Im „*Barrel-Stave* Modell“ assoziieren zunächst die AMPs auf der Oberfläche der Membran und fügen sich dann in die Membran ein. Dabei richten sich die nicht-polaren Seitenketten zu den hydrophoben Lipidschwänzen der Lipiddoppelschicht und die hydrophilen Bereiche der Peptide nach innen aus. Auf diese Weise bilden die Peptide Transmembranporen, was eine Zellyse mit Zelltod zur Folge hat (Ehrenstein und Lecar, 1977; Pérez-Payá et al., 1995; Zhang et al., 2001). Im „*Toroidal Pore* Modell“ induzieren die Peptide eine Depolarisierung der Membran, woraufhin die AMPs in die Zellmembran eindringen und eine ringförmige Transmembranpore bilden, bei der die Phospholipidköpfe der Membran zu den Peptiden orientiert sind (Bahar und Ren, 2013; Sengupta et al., 2008). Im „*Carpet* Modell“ bedecken die Peptide kleine Bereiche der Membranoberfläche und bilden einen lokalen Teppich (engl. *carpet*). Ab einer bestimmten Konzentration führt dies zum Einbruch der

strukturellen Integrität, wodurch die Membran zerstört und ebenfalls Zellinhalt freigesetzt wird (Oren und Shai, 1998; Shai, 1995). Die Makropinozytose beschreibt einen möglichen Aufnahmeweg der AMPs, bei dem sich die Plasmamembran einstülpt und dabei Peptide aufnimmt. Im Zytoplasma werden die Peptide dann aus diesen Makropinosomen freigesetzt und können ihre antimikrobielle Aktivität entfalten (Jones, 2007; Madani et al., 2011).

1.2.2.2 Das antimikrobielle Peptid LCI

Das antimikrobielle Peptid LCI wurde erstmals aus *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) A014 isoliert und besitzt eine starke antimikrobielle Wirkung gegen *Pseudomonas solanacearum* und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, den Erreger des Reisblattbrands (Gong et al., 2011; Liu et al., 1990). Das LCI setzt sich aus 47 Aminosäuren zusammen und hat eine molekulare Masse von 5,4 kDa (Zhu et al., 2001). Eine homologe LCI-Sequenz mit 94 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 9,9 kDa wurde außerdem im Genom von *B. amyloliquefaciens* gefunden (Chen et al., 2007; Hu et al., 2010). Die Struktur von LCI aus *B. subtilis* weist vier antiparallele β -Faltblätter auf (Abb. 1.5) und bildet im Gegensatz zu anderen bekannten AMPs mit β -Faltblattstruktur keine Disulfidbrücken aus (Gong et al., 2011). Zudem konnten in der Struktur 23 Wasserstoffbrückenbindungen nachgewiesen werden, die zur hohen Thermostabilität von LCI beitragen (Gong et al., 2011; Liu et al., 1990). Das LCI hat einen hohen Anteil aromatischer Aminosäuren (21,3 %) mit drei Phenylalaninen, vier Tyrosinen und drei Tryptophanen, welche relativ gleichmäßig über die gesamte Peptidsequenz verteilt sind (Abb. 1.5). Die Oberfläche von LCI ist von hydrophoben, negativ und positiv geladenen Bereichen gekennzeichnet (Gong et al., 2011). Studien zum antimikrobiellen Wirkmechanismus wurden, soweit bekannt, noch nicht durchgeführt. Es wird aber vermutet, dass dieser dem „*Toroidal Pore* Modell“ zugeordnet werden kann (Gong et al., 2011). Auch nach ausführlicher Recherche konnte keine Erklärung für die Bezeichnung des Peptids gefunden werden.

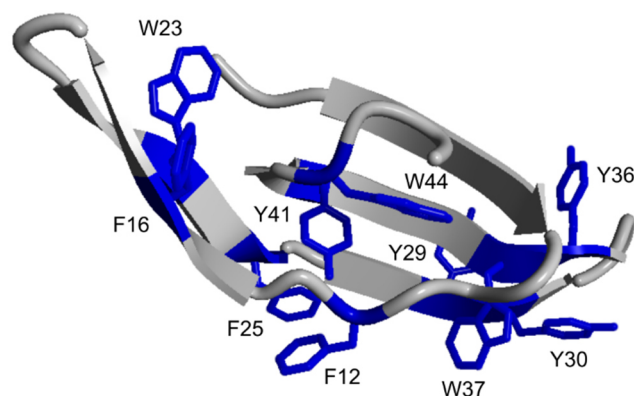


Abb. 1.5: Struktur von LCI aus *B. subtilis*.

Die dreidimensionale Struktur des Peptids stammt aus der RCSB Protein-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (Berman et al., 2000) mit dem PDB-Code 2B9K und wurde durch NMR-Spektroskopie erhalten (Gong et al., 2011). Aromatische Aminosäurereste sind in blau hervorgehoben.

1.2.2.3 Rekombinante Expression von antimikrobiellen Peptiden

Um ausreichende AMP-Mengen für wissenschaftliche Studien sowie für biotechnologische Anwendungen zu erhalten, wurden bereits diverse mikrobielle Expressionssysteme zur Produktion der AMPs untersucht (Ingham und Moore, 2007; Parachin et al., 2012). Diese stellen eine gute Alternative zur Isolation aus dem natürlichen Wirtsorganismus oder zur chemischen Synthese dar, da solche Verfahren häufig durch langwierige und kostspielige Produktionsprozesse limitiert werden (Gaiser et al., 2011; Li und Chen, 2008). Als Expressionswirte werden hauptsächlich Bakterien und Hefen verwendet (Li und Chen, 2008). Unter den bakteriellen Systemen ist insbesondere das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als Wirt zu nennen, da es am häufigsten für die AMP-Produktion eingesetzt wird (Li et al., 2010b; Parachin et al., 2012). Wesentlich dafür ist, dass *E. coli* eine kostengünstige Produktion rekombinanter Proteine durch ein schnelles Wachstum sowie preiswerte Substrate erlaubt und als Modellorganismus zu den am besten untersuchten Bakterien zählt (Baneyx, 1999; Kück, 2005; Yin et al., 2007). Daher sind nicht nur umfangreiche Kenntnisse über die Genetik von *E. coli* vorhanden, sondern auch viele kommerzielle Vektorsysteme und Stämme sowie gut etablierte Techniken zur DNA-Manipulation verfügbar (Sørensen und Mortensen, 2005a). Neben *E. coli* wurden AMPs auch in anderen bakteriellen Wirten wie den Gram-positiven Bakterien *B. subtilis* oder *Propionibacterium freudenreichii* exprimiert (Brede et al., 2005; Chen et al., 2009; Luan et al., 2014; Yu et al., 2013). Die große Herausforderung für eine effiziente Produktion der AMPs in mikrobiellen Expressionswirten bleibt jedoch stets deren antimikrobielle Aktivität (vgl. 1.2.2.1), denn diese richtet sich oft auch gegen den produzierenden Organismus (Gaiser et al., 2011). Daher sollte das entsprechende Produktionssystem die Toxizität der AMPs umgehen können, sodass keine schädlichen oder gar letalen Folgen beim Wirt auftreten (Parachin et al., 2012). Darüber hinaus werden AMPs oft proteolytisch abgebaut und sind anfällig für die Bildung von Aggregaten (Li, 2011). Aufgrund dessen werden AMPs meist in Fusion mit einem *Carrier*-Protein synthetisiert, welches sich durch anionische Eigenschaften charakterisiert und die positive Ladung der AMPs neutralisieren soll (Gaiser et al., 2011; Kim et al., 2006; Parachin et al., 2012). Solche Fusionspartner minimieren nicht nur die Toxizität, sondern erhöhen auch die Löslichkeit und steigern die Expressionsrate (Esposito und Chatterjee, 2006; Gaiser et al., 2011; Ingham und Moore, 2007). Zudem können sie die korrekte Faltung sowie die Bildung von Disulfidbrücken unterstützen (Ingham und Moore, 2007). Populäre Fusionspartner sind SUMO (*Small Ubiquitin like MODifier*), GST (Glutathion S-Transferase), F4 Fragment von PurF, MBP (Maltose-Bindeprotein) oder Thioredoxin (Hara und Yamakawa, 1996; Kim et al., 2008; Lee et al., 2000; Luan et al., 2014; Moon et al., 2006; Morin et al., 2006; Sadr et al., 2017; Schreiber et al., 2017). Im weiteren Herstellungsprozess werden die *Carrier*-Proteine dann enzymatisch oder chemisch abgespalten. Für die AMP-Freisetzung werden meist Bromcyan, der Faktor Xa,

Hydroxylaminhydrochlorid, die Enterokinase oder Thrombin genutzt (Li und Chen, 2008). Eine Alternative bietet die Fusion mit Inteinen. Durch diese Fusion werden die Wirtszellen ebenfalls vor der antimikrobiellen Wirkung der AMPs geschützt; das Intein kann sich jedoch unter geeigneten Bedingungen selbst aus dem Fusionsprotein schneiden (Ingham und Moore, 2007; Li, 2011). Generell weisen Verfahren mit Fusionsproteinen jedoch einige Nachteile auf. Zum einen haben sie immer einen gewissen Verlust des Zielproteins zur Folge, sodass die AMP-Ausbeute teils stark reduziert wird (Parachin et al., 2012). Zum anderen kann der Einfluss der *Carrier*-Proteine je nach AMP unterschiedlich stark ausfallen, sodass die optimale Kombination aus *Carrier*-Protein und AMP jeweils individuell evaluiert werden muss (Parachin et al., 2012; Schreiber et al., 2017). Überhaupt kann die AMP-Ausbeute trotz starker Expression nur moderat sein, da das AMP durch Fusion mit einem verhältnismäßig großen *Carrier*-Protein nur einen kleinen Teil des rekombinanten Proteins ausmacht (Ingham und Moore, 2007). Um die AMP-Ausbeute zu erhöhen, wurden daher erfolgreich Tandem-Expressionen von repetitiven AMP-Einheiten durchgeführt (Kim et al., 2006; Lee et al., 1998; Morin et al., 2006; Wang und Cai, 2007). Weiter konnten Modifizierungen der Proteinsequenzen die Expressionsraten steigern und gleichzeitig die Bandbreite der natürlichen AMP-Aktivität erweitern (Cao et al., 2005; Kang et al., 2008). Wie bei anderen rekombinant hergestellten Proteinen kann auch eine Codon-Optimierung der DNA-Sequenz die heterologe Genexpression unterstützen (Gao et al., 2015; Peng et al., 2004). Neben den bakteriellen Systemen werden die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und vorrangig *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) als Expressionsplattformen für AMPs verwendet (Li und Chen, 2008). Diese ermöglichen posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, die Bildung von Disulfidbrücken sowie die Sekretion rekombinanter Proteine (Cregg et al., 2009; de Bruin et al., 2005; Nielsen, 2013). Durch Letzteres gestaltet sich der Aufreinigungsprozess effizienter und die Übertragung des Produktionssystems auf einen größeren Maßstab einfacher (Nielsen, 2013; Romanos et al., 1992). Wie eine Vielzahl von Studien belegt, scheint im Speziellen die AMP-Produktion in Hefen keine Fusion von *Carrier*-Proteinen zu benötigen, was der Proteinausbeute und dem *Scale-Up* Prozess zu Gute kommt (Basanta et al., 2010; Cipakova und Hostinova, 2005; Gutiérrez et al., 2005; López-García et al., 2010; Zhao und Cao, 2012).

Trotz vieler Studien zur effizienten rekombinanten Produktion einer Vielzahl von AMPs schränken die Herstellungskosten die breite kommerzielle Nutzung noch stark ein (Li, 2011). Zurzeit gibt es weder ein universell einsetzbares Expressionssystem, noch eine Möglichkeit der rationalen Vorhersage für ein passendes System, sodass für jedes AMP ein geeignetes Verfahren neu evaluiert werden muss (Schreiber et al., 2017). Dies in Kombination mit den moderaten Ausbeuten trägt vor allem zu den hohen Kosten bei. Da industrielle Applikationen der AMPs in sehr vielen Bereichen denkbar sind, ist es wichtig in die Forschung und

Entwicklung von Systemen zur AMP-Produktion im großen Maßstab zu investieren (Parachin et al., 2012).

1.3 Ziele der Arbeit

Die Färbung und Veredelung von synthetischen Textilfasern ist aufgrund des stark hydrophoben Charakters der Polymere herausfordernd. Peptide mit Affinität gegenüber diesen Materialien sollen als Anker für funktionale Bausteine fungieren und so umweltschonende Prozesse und vielseitige Funktionalisierungen von Kunststoffen ermöglichen. Da seitens der Industrie und der akademischen Forschung ein großes Interesse an der Entwicklung von umweltfreundlicheren und wirtschaftlicheren Prozessen besteht, wurde die Allianz „FuPol“ – „Funktionalisierung von Polymeren“ mit dem Teilprojekt „Veredelung und Funktionalisierung von Funktionsgarnen“ im Rahmen der „Innovationsinitiative industrielle Biotechnologie“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gebildet. Diese setzt sich sowohl aus industriellen als auch aus akademischen Partnern zusammen und erlaubt so die Durchführung aller notwendigen Schritte von der Identifizierung Polymer-bindender Peptide bis zur Anwendung im Produkt. Schwerpunkte im Rahmen des „FuPol“-Projekts waren die Färbung von PP-Fasern mit organischen Pigmenten und die Veredelung von PET-Fasern mit TEMs. Als potentiell PP-bindende Peptide standen AMPs im Fokus, da sie mit natürlichen Polymeren interagieren (vgl. 1.2.2.1) und bereits Bindestudien von dem AMP Cecropin A aus *Hyalophora cecropia* mit einem synthetischen Copolymer durchgeführt wurden (Noor et al., 2012). Durch das DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V. RWTH Aachen (Prof. Dr. Schwaneberg, „FuPol“-Projektpartner) wurde das Potential von fünf strukturell verschiedenen AMPs als PP-bindende Peptide untersucht, wobei sich das AMP LCI als vielversprechender Kandidat herausstellte (Rübsam et al., 2017). Weiter wurde das Anwendungspotential von LCI als Anker für funktionale Bausteine auf PP demonstriert, indem ein Konjugat aus LCI und einem fluoreszenten Farbstoff auf PP immobilisiert werden konnte (Rübsam et al., 2017). Um im Speziellen das LCI in einem Färbeverfahren von PP-Fasern anwenden zu können, wurde durch das Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP in Potsdam (Prof. Dr. Böker, „FuPol“-Projektpartner) ein Verfahren zur Konjugation von LCI mit organischen Pigmenten entwickelt (vgl. 3.2.3).

Ein Ziel dieser Arbeit war ein geeignetes Produktionssystem für das LCI zu identifizieren und zu etablieren, sodass das LCI im industriellen Maßstab hergestellt und im großtechnischen Färbeverfahren bei Coats Opti Germany GmbH in Rhaderfehn („FuPol“-Projektpartner) eingesetzt werden kann. Dies galt als große Herausforderung für das gesamte Vorhaben, da das LCI antimikrobielle Eigenschaften aufweist und mutmaßlich nur schwer in mikrobiellen Expressionssystemen synthetisiert werden kann.

Als weiteres Ziel dieser Arbeit sollten zunächst PET-bindende Peptide für die Funktionalisierung von PET mit TEMs identifiziert werden. Interessante Kandidaten waren hierbei CBMs, da bereits erste Studien zur unnatürlichen Bindung von CBMs an PET publiziert wurden (Ribitsch et al., 2013; Zhang et al., 2013). In einem weiteren Teil des Projekts sollte die Wechselwirkung zwischen PET-bindenden CBMs und PET untersucht werden, um Varianten mit gesteigerter PET-Affinität generieren zu können. Darüber hinaus sollte in einer ersten Machbarkeitsstudie PET mit TEMs über geeignete PET-bindende CBMs funktionalisiert werden. Hierzu wurde im Zuge des „FuPol“-Projekts durch das Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Prof. Dr. Böker) in Potsdam ein chemisches Verfahren zur Verknüpfung der TEMs mit Polymer-bindenden Peptiden entwickelt (vgl. 3.1.7.1).

Neben der Funktionalisierung von Kunststoffen inspirierte die Affinität von Peptiden gegenüber synthetischen Polymeren weiter, diese in einem analytischen Verfahren zur Detektion von Nanoplastik in wässrigen Systemen einzusetzen. Daher sollten in dieser Arbeit erste Schritte zur Entwicklung einer solchen Methode durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Studie sollten so zur biotechnologischen Anwendung Polymer-bindender Peptiden beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits

2.1.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Alfa Aesar GmbH & Co.KG, AppliChem GmbH, Becton Dickinson and Company AG, BioRad Laboratories, Inc., Carl Roth GmbH & Co.KG, GE Healthcare Europe GmbH, Merck KGaA, New England Biolabs GmbH, Roche AG, Serva Electrophoresis GmbH, Sigma-Aldrich GmbH, Thermo Fisher Scientific, Inc. und VWR International GmbH.

2.1.1.2 Enzyme, Kits und Größenstandards

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Kits und Größenstandards aufgelistet.

Tab. 2.1: Verwendete Enzyme

Name	Anwendung	Firma
Benzonase® Nuklease	DNA-Lyse bei Zellaufschluss	Merck Millipore, Merck KGaA
Endo H	Deglykosylierung von <i>N</i> -glykosylierten Proteinen	New England Biolabs GmbH
Phusion® HF DNA-Polymerase	Amplifizierung von DNA-Molekülen	New England Biolabs GmbH
ProTEV Plus Protease	Hydrolyse von Fusionsproteinen	Promega GmbH
Restriktionsenzyme	Restriktion von DNA-Molekülen	New England Biolabs GmbH
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	Dephosphorylierung von 5' Enden von DNA	New England Biolabs GmbH
<i>Strep</i> -Tactin® AP conjugate	Spezifische Proteindetektion im Western Blot	IBA GmbH
T4 Polynucleotide Kinase	Phosphorylierung von DNA	Thermo Fisher Scientific, Inc.
T4-DNA Ligase	Ligation von DNA-Molekülen	Roche AG

Tab. 2.2: Verwendete Kits

Name	Anwendung	Firma
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA	Thermo Fisher Scientific, Inc.
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit	Zusammenbau mehrerer DNA-Fragmente	New England Biolabs GmbH
innuPREP DOUBLEpure™ Kit	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Amplifikationsprodukten aus PCR-Reaktionsgemischen	Analytik Jena AG
Monolith Anti Photobleach Kit	Verringerung von <i>Photobleaching</i>	NanoTemper Technologies GmbH
Quick Ligation™ Kit	Ligation von DNA-Fragmenten	New England Biolabs GmbH
RC Trial Kit, Typ Spectra/ Por®6 3,5 kDa MWCO	Dialyse von Fermentationsproben	VWR International GmbH

Tab. 2.3: Verwendete Protein- und DNA-Größenstandards

Name	Anwendung	Firma
1 kb DNA Ladder	DNA-Größenstandard in Agarosegelen	New England Biolabs GmbH
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa)	Proteingrößenstandard in Western Blots	Thermo Fisher Scientific, Inc.
PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder (3,4–100 kDa)	Proteingrößenstandard in SDS-Gelen	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Quick-Load® 100 bp DNA Ladder	DNA-Größenstandard in Agarosegelen	New England Biolabs GmbH
Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder (1,7–40 kDa)	Proteingrößenstandard in Western Blots	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Unstained Protein Marker, Broad Range (2–212 kDa)	Proteingrößenstandard in SDS-Gelen	New England Biolabs GmbH

2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardpuffer und -lösungen wurden hergestellt nach Ausubel (2003) und Sambrook et al. (1989). Spezielle Medien, Puffer und Lösungen sind unterhalb der jeweiligen Methode aufgeführt. Medien wurden vor der Verwendung für 20 min bei 121°C autoklaviert. Hitzeinstabile Komponenten wie Antibiotika wurden mit einem CME-Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) steril filtriert.

2.1.2.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli* und *B. subtilis*

E. coli und *B. subtilis* wurden in LB-Flüssigmedium und auf LB-Festmedium kultiviert (Bertani, 1951).

LB (Lysogeny Broth)

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
15 g Agar (für Festmedium)
ad 1 L dH₂O; autoklaviert

Finale Antibiotika-Konzentrationen im Medium

Ampicillin: 100 µg/mL
Chloramphenicol: 34 µg/mL
Kanamycin: 50 µg/mL

2.1.2.2 Medien zur Kultivierung von *P. pastoris*

Medien zur Kultivierung von *P. pastoris* wurden nach dem Benutzerhandbuch des „EasySelect™ *Pichia* Expression Kits“ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) hergestellt. Als Selektionsmarker wurde Zeocin™ (Invitrogen) mit einer Konzentration von 100 µg/mL eingesetzt.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

10 g Hefeextrakt
20 g Pepton
15 g Agar (für Festmedium)
ad 900 mL dH₂O; autoklaviert
Zugabe von:
100 mL 20 % (w/v) Glukose; separat autoklaviert

YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Medium)

10 g Hefeextrakt
20 g Pepton
182,2 g Sorbitol
15 g Agar (für Festmedium)
ad 900 mL dH₂O; autoklaviert
Zugabe von:
100 mL 20 % (w/v) Glukose; separat autoklaviert

BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium)

10 g Hefeextrakt
20 g Pepton
ad 700 mL dH₂O; autoklaviert
Zugabe von:
100 mL 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0; separat autoklaviert
100 mL 13,4 % (w/v) YNB; separat autoklaviert
2 mL 0,02 % (w/v) Biotin; steril filtriert
100 mL 10 % (v/v) Glycerin; separat autoklaviert

BMMY (Buffered Methanol-complex Medium)

10 g Hefeextrakt
20 g Pepton
ad 700 mL dH₂O; autoklaviert
Zugabe von:
100 mL 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0; separat autoklaviert
100 mL 13,4 % (w/v) YNB; separat autoklaviert
2 mL 0,02 % (w/v) Biotin; steril filtriert
100 mL 10 % (v/v) Methanol; steril filtriert

2.1.2.3 Medien zur Kultivierung von *T. reesei*

T. reesei wurde auf ME (Malzextrakt)-Festmedium (Malzextrakt-Bouillon, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) oder auf PD (Kartoffelextrakt-Glukose)-Festmedium (Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) sowie in PD-Flüssigmedium und in

TRMM modifiziert nach Penttilä et al. (1987) kultiviert. Als Selektionsmarker wurde Hygromycin B mit einer Konzentration von 125 µg/mL eingesetzt.

TRMM (*T. reesei* Minimal Medium)

5 g (NH₄)₂SO₄
 10 g KH₂PO₄
 1 g K₂HPO₄
 0,6 g MgSO₄
 ad 880 mL dH₂O; autoklaviert
 Zugabe von:
 20 mL Spurenelementlösung 50x; steril filtriert
 100 mL 20 % (w/v) Laktose; separat autoklaviert

Spurenelementlösung 50x

30 g CaCl₂
 0,25 g FeSO₄ x 7 H₂O
 0,08 g MnSO₄ x H₂O
 0,07 g ZnSO₄ x 7 H₂O
 0,1 g CoCl₂
 0,8 g CuSO₄
 5 g Zitronensäure
 ad 1 L dH₂O; steril filtriert

2.1.3 Oligonukleotide

In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide wurden von der Firma Microsynth AG (Lindau) synthetisiert. In Tab. 2.4 sind Oligonukleotide angegeben, welche für Klonierungen verwendet wurden. Weitere Informationen sind bei den Plasmidbeschreibungen zu finden (2.1.4). In Tab. 2.5 sind Oligonukleotide angegeben, welche für Sequenzierungsreaktionen und Kolonie-PCRs verwendet wurden.

Tab. 2.4: Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Modifizierung
P7	CCTGAGTTTGCATGAGAGCGGC	5' phosphoryliert
P8	ATTATTCGCAATTCCAAGCTAATTCAC	5' phosphoryliert
P13	CATATGGCGTACCCCGGGGAGAACTTG	
P14	TACCGGATCCTCACTTCTCGAACTG	
P18	TAGGCGGGCTAAAAAAATTGTCCGGTAATCTATTATTAATCTGTTCAGCAAT CGGG	
P19	CGTAGAGACTTCTAGACTCGACTTTTACGAGAAAAAAGAAACAAAAAACCTG C	
P20	ACCGGACAATTTTTTTTAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGAGAGCTT CTCAAATGGTATGCGTTTTGACACATC	
P21	GTCGAGTCTAGAAGTCTCTACGGAAATAGCGAG	
P26	GAGCTCCTCGCAGCCTCCGATCAGCCGCCATACGCCCCATTCACCGGATTG ATCAGGCCG	
P28	TAACGGAAGGTGTATGAAGCGAAATGGTGGACGAAAGGCGACCGGCCTGA TCAATCCGG	
P29	CTTCATACACTTTTCCGTAAATGCAACCCGCTCTCCGCCTGTGTATGCGCTC GTCTCTT	
P30	AATTCTGACCAAGCCTGTTTCATATGACGAATGGAAAGAGACGAGCGCATACA	

P31	CAGGCTTGGTCAGAATTCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTA TTTCTAG	
P32	GAGGCTGCGAGGAGCTCGCACCGCCGGCTATGG	
P33	ATGGCTAGTTTTCAATCGTTCGGCATTG	5' phosphoryliert
P34	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC	5' phosphoryliert
P38	TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAG	5' phosphoryliert
P39	CATATGGGCAATCGTTGGTGG	5' phosphoryliert
P48	CCAACCGGCATTGGTAATAACG	5' phosphoryliert
P49	AACGGAGAAATCCCGCCGGGTGGATCAG	5' phosphoryliert
P50	TTCACTTCCTGTAACCACATATCTGGTAATTCCACCGCCCAGGTC	5' phosphoryliert
P51	TGGGCTGCATCGATCGCTCCGGGCAGTTC	5' phosphoryliert
P56	CACTTGCGTCAGGTTTCC	5' phosphoryliert
P57	GCAGACTCCAAAATTTCTTCCAAAATC	5' phosphoryliert
P58	TGCATTGGAAGTGACAGAAAACGTTGCCATATGTATATC	5' phosphoryliert
P59	GGCTCTGGTTACAACCTCTC	5' phosphoryliert
P60	TGCACCGGCATTGGTAATAACG	5' phosphoryliert
P65	GCCATTTGCGCCTGCATTGGTAATAACGTAATGGTTGTTGATTTTGG	5' phosphoryliert
P66	GCAGGCGCAAATGGCGAAATCCCGCCGGGTG	5' phosphoryliert
P70	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC	5' phosphoryliert
P71	TGCGCAACGTTTTCTGTCACTTCC	5' phosphoryliert
P79	GGCGCCGTCGCACAGAGCGCCATTAACTGGTTCAGAGCCCGAATGGTAATT TTGCAG	
P80	GCTTTTGAAGATCCATTTGGTGCCATCCAGAACAAAGCTTGCTGCAAAATTAC CATTCGG	
P81	CCAAATGGATCTTCAAAGCAAATACTATGACAGCAGCAAAGGTTATTGGGTG GG	
P82	GAGCTTCCAGTGTTAGTAGCTTATTTGCGATCCCACACTTCATAAATACCCAC CCAATAACCTTTG	
P83	GAGCTTCCAGTGTTAGTAGCTTATTTCTCAAAGTGGGGTGCGACCATTTGC GATCCCACACTTCATAAATACCCACCAATAACCTTTG	
P84	ACGCGTCGACTTTCAGCCCCAGAGCGGCTTTC	
P85	TGCGGTGACCGGACACCAGAAATGCCTGTTCTG	
P86	CGAGCTCTTTCAGCCCCAGAGCGGCTTTC	
P87	GGAATTCCATATGAGGCGACCCATGACC	
P88	CATATGTGCAGGTGGAGCTTTCAGCCCCAGAGCGGCTTTC	
P89	TCCAAAATTTCTTCCAAAATCAACAACCATTAC	

P90	TTTGAAGAAATTTTGGAGTCCCACACTTGCCTCAGGTTTCCATTGTAATCGA ATTCCAGTTTCCAGTTTTTGGATCGGAG
P91	GGTTACAACCTTCTCCATCGTAATCAAAAACTCTGGTACGACTCCGATCAAAAA CTGG
P92	ATGGAGAAGTTGTAACCAGAGCCCCAATTGGAAGTG
P93	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCAACGTTTTCTGTCACTTCCAATTGGGG C
P94	TTTGAAGAAATTTTGGAGTCCCACACTTGCCTCAGGTTTCCATTGTAATCGA ATTCCAGTTTCCAGTTTTTGGATCGGAG
P95	ATGGAGAAGTTGTAACCACGGCCCCAATTGGAAGTG
P96	GGTTACAACCTTCTCCATCGTAATCAAAAACTCTGGTTGGACTCCGATCAAAAA CTGG
P97	GGTTACAACCTTCTCCATCTGGATCAAAAACTCTGGTTGGACTCCGATCAAAAA CTGG
P105	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAG
P112	CTAGCTAGCGCATGCGCAACGTTTTCTGTCACTTCCAATTGG
P113	CGCGGATCCTTATTTTTCAAATTGCGGATGAGACCATGATCCACCCGGCGGG ATTTCTCC
P114	CTCCGCTCGAGTTATTTTTCAAATTGCGGATGAGACCAACCTGAGGATCCCTT GTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG
P115	ACGCGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
P116	GGGAATTCCATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC

Tab. 2.5: Oligonukleotide für Sequenzierungsreaktionen und Kolonie-PCRs

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Verwendung (Sequenzierung von Plasmiden oder Kolonie-PCR von Stämmen)
P55	CGGGGATATTA AAAAGAG	pEVO37_spX, pEVO+_spX, pEVO+_LV
P81	CCAAATGGATCTTCAAAAGCAAATACT ATGACAGCAGCAAAGGTTATTGGGTGGG	<i>Ici</i> -Gen in <i>Trichoderma</i> -Genom
P103	CAGAAGGAAGCTGCCCTGTC	pPICZαA-Plasmide
P104	GCGGACGCATGTCATGAGATTATTGG	pGAPZαA-Plasmide
P109	CTGTGCTATCAAGTTGGTTCAG	<i>Ici</i> -Gen in <i>Pichia</i> -Genom
P110	CTGTGGGTGGGACCACTTTC	<i>Ici</i> -Gen in <i>Pichia</i> -Genom
P117	CTGTGCTACTTTCTCCGTTAC	Gen von <i>BaCBM2</i> in <i>Pichia</i> -Genom
P118	AACTGTGGATGGGACCAAGAAC	Gen von <i>BaCBM2</i> in <i>Pichia</i> -Genom
pTRseq3	CTGTGCGGCGTACACAAATC	pTRcel7A_fix-Plasmide, <i>Ici</i> -Gen in <i>Trichoderma</i> -Genom
pTRseq4	TCCTCCAGGAGACTTGTACAC	pTRcel7A_fix-Plasmide
pBR3	TCCCCATCGGTGATGTC	pET-22b(+)-Plasmide

pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG	pET-22b(+)-Plasmide
--------	--------------------	---------------------

2.1.4 Vektoren

Plasmide wurden nach Standardtechniken der Molekularbiologie, beschrieben in Ausubel (2003), Gibson et al. (2009) und Sambrook et al. (1989), mittels PCR-Mutagenese oder mittels Gibson Assembly® generiert. Synthetische DNA wurde als Auftragsarbeit durch GeneART® (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) oder GenScript AG (Piscataway, USA) synthetisiert. Die Sequenzierung aller Konstrukte wurde durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Plasmide, welche als Zwischenvektoren bei Klonierungen dienten, werden nicht explizit aufgeführt.

Tab. 2.6: Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
pET-22b(+)	f1 ori, Amp ^R , T7/lac, His-Tag, <i>peB</i> -Signalsequenz	Novagen, Merck KGaA
pET-22b(+)_StrepII	f1 ori, Amp ^R , T7/lac, His-Tag, <i>Strep</i> -tag® II, <i>peB</i> -Signalsequenz	evonx technologies GmbH, unveröffentlicht
pET-15b_His-eGFP	pBR322 ori, Amp ^R , T7/lac, His-Tag, Thrombin-Schnittstelle, Gen für eGFP	Sarkari et al. (2014)
pMAL™-c5X	pMB1 ori, Amp ^R , <i>lacI</i> , <i>malE</i> , Faktor Xa-Schnittstelle	New England Biolabs GmbH
pGAPZαA	pUC ori, Zeocin™-Resistenzkassette, <i>GAP</i> -Promotor, α-Faktor-Signalsequenz, His-Tag, <i>myc</i> -Epitop	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc.
pPICZαA	pUC ori, Zeocin™-Resistenzkassette, 5' AOX1-Promotor, α-Faktor-Signalsequenz, His-Tag, <i>myc</i> Epitop	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc.
pBSMul3	ColE1 ori, <i>repB</i> , Kan ^R , Amp ^R , <i>hapII</i> -Promotor	Brockmeier et al. (2006)
pTRcel7A_fix	pMB1 ori, Amp ^R , Hyg ^R , <i>cbh1</i> -Signalsequenz, <i>cel7A</i> -Promotor (5' Flanke), <i>cel7A</i> -Terminator (3' Flanke)	evonx technologies GmbH, unveröffentlicht
pBEK1_phoA- <i>algL</i>	<i>rep</i> , <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , <i>lac</i> -Promotor, T7-Promotor, Kan ^R , EK1-Expressionskassette, <i>phoA</i> , <i>algL</i> -Signalsequenz aus <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	evonx technologies GmbH, unveröffentlicht
pEVO37_spX	ColE1 ori, <i>repB</i> , Kan ^R , Amp ^R , Phasen-induzierter Promotor, verschiedene Signalpeptidsequenzen	evonx technologies GmbH, unveröffentlicht
pEVO37_LV	ColE1 ori, <i>repB</i> , Kan ^R , Amp ^R , Phasen-induzierter Promotor, Leervektor	evonx technologies GmbH, unveröffentlicht
pEVO+_spX	pEVO37_spX Derivat (Modifikationen siehe pEVO+_spAprE-ppBPN'-3LCI-StrepII), verschiedene Signalpeptidsequenzen	evonx technologies GmbH, unveröffentlicht

2.1.4.1 In dieser Arbeit generierte Plasmide zur Synthese von LCI

pET-22b(+)_LCI_NC

Ausgangsplasmid zur Expression von *lci* mit Hilfe eines Inteins in *E. coli*. Das synthetische Genkonstrukt 1 bestehend aus 5' Met-Cys-StrepII-N_LCI-N_TerThyX_Int-SD-TerThyX_Int_C-LCI_C 3' lag Codon-optimiert für *E. coli* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI/HindIII* in den pET-22b(+)-Vektor (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) integriert. Die synthetische DNA kodiert für die Aminosäuren Methionin (Startcodon) und Cystein (für die Konjugatsynthese), gefolgt von dem *Strep-tag*® II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung, dem N-terminalen Teil von LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243), dem N-terminalen Teil des Inteins *Ter ThyX* (NCBI-Zugangsnummer: ABG51323) (Lin et al., 2013), einer Shine-Dalgarno Sequenz, dem C-terminalen Teil des Inteins *Ter ThyX* und dem C-terminalen Teil von LCI. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *pefB*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli* und fungierte als Ausgangsplasmid zur Klonierung von pET-22b(+)_N_LCI sowie pET-22b(+)_LCI_C.

pET-22b(+)_N_LCI

Plasmid zur Expression von *lci* mit Hilfe eines Inteins in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_LCI_NC generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 1 (vgl. pET-22b(+)_LCI_NC) bestehend aus 5' Met-Cys-StrepII-N_LCI-N_TerThyX_Int 3'. Dazu wurde die Sequenz 5' SD-TerThyX_Int_C-LCI_C 3' über die Restriktionsschnittstelle *XhoI* aus dem Ausgangsplasmid entfernt.

pET-22b(+)_LCI_C

Plasmid zur Expression von *lci* mit Hilfe eines Inteins in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_LCI_NC generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 1 (vgl. pET-22b(+)_LCI_NC) bestehend aus 5' SD-TerThyX_Int_C-LCI_C 3'. Dazu wurde die Sequenz 5' Met-Cys-StrepII-N_LCI-N_TerThyX_Int 3' über die Restriktionsschnittstelle *NdeI* aus dem Ausgangsplasmid entfernt.

pET-22b(+)_3LCI_Operon

Plasmid zur Synthese von drei LCI-Peptiden in *E. coli*, kodiert in einer Operonstruktur. Das synthetische Genkonstrukt 2 bestehend aus 5' Met-Cys-StrepII1-LCI1-SD2-Met-Cys-StrepII2-LCI2-SD3-Met-Cys-StrepII3-LCI3 3' lag Codon-optimiert für *E. coli* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI/BamHI* in den pET-22b(+)-Vektor (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) integriert. Die synthetische DNA kodiert für drei aufeinander folgende Peptide jeweils bestehend aus den Aminosäuren Methionin (Startcodon) und Cystein (für die Konjugatsynthese), gefolgt von dem *Strep-tag*® II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung und

dem LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243). Zwischen den Peptiden 1 und 2 befindet sich die Shine-Dalgarno Sequenz SD2 5' TCGATGAGGTCTTCAG 3' und zwischen den Peptiden 2 und 3 befindet sich die Shine-Dalgarno Sequenz SD3 5' TCGATGAGGTCACAC 3', abgewandelt nach Chen et al. (1994). Um Rekombinationseffekte innerhalb des synthetischen Genkonstrukts 2 zu vermeiden, wurden die Codons zur Translation von *Strep-tag*[®] II und LCI variiert. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *pefB*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pEVO37_spX-ppBPN'-3LCI-StrepII

Plasmid zur Expression eines *lci*-Konkatemers und Sekretion des LCI-Fusionsproteins mit *B. subtilis*. Das synthetische Genkonstrukt 3 bestehend aus 5' ppBPN'-TEV1-Cys-LCI1-TEV2-Cys-LCI2-TEV3-Cys-LCI3-TEV4-StrepII 3' lag Codon-optimiert für *B. subtilis* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *NheI/BamHI* in die pEVO37_spX-Vektoren (evon technologies GmbH, Monheim am Rhein) integriert. Die synthetische DNA kodiert für das Propeptid des Subtilisins „*Bacillus* Protease Novo type“ (BPN') aus *B. amyloliquefaciens* (NCBI-Zugangsnummer: WP_013351733.1). Darauf folgt eine dreifache Wiederholungssequenz, zusammengesetzt aus der TEV-Protease Schnittstelle zur Separation des Fusionsproteins, einem Cystein für die Konjugatsynthese sowie dem LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243). C-terminal befindet sich eine weitere TEV-Protease Schnittstelle und der *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung. Um Rekombinationseffekte innerhalb des synthetischen Genkonstrukts 3 zu vermeiden, wurden die Codons zur Translation der TEV-Protease Schnittstelle sowie von LCI variiert. Das Fusionsprotein wurde zur Sekretion N-terminal an verschiedene Signalpeptide (spX) fusioniert. Hierzu wurde das synthetische Genkonstrukt 3 in verschiedene pEVO37_spX-Vektoren integriert, die sich jeweils in der Signalpeptidsequenz unterscheiden. Weiterhin tragen die Vektoren einen Promotor zur Phasen-induzierten Expression und eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli* sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette (Kan^R) zur Selektion in *B. subtilis*.

pEVO+_spAprE-ppBPN'-3LCI-StrepII

Plasmid zur Expression eines *lci*-Konkatemers und Sekretion des LCI-Fusionsproteins mit *B. subtilis*. Dieses Plasmid basiert auf dem Ausgangsplasmid pEVO37_spX-ppBPN'-3LCI-StrepII mit dem *aprE*-Signalpeptid aus *B. subtilis* (NCBI-Zugangsnummer: CAB12870). Zusätzlich weist das Plasmid einige Modifikationen gegenüber dem Ausgangsplasmid auf. Zum einen wurde die Terminatorsequenz verkürzt. Hierzu wurde eine Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden P7 x P8 (Tab. 2.4) und pEVO37_spAprE-ppBPN'-3LCI-StrepII als *Template*-DNA durchgeführt. Zum anderen wurden mittels Gibson Assembly[®] eine Sequenz

zur Verbesserung der Replikation des Plasmids und der *trpA*-Terminator als Terminator für die Kanamycin-Resistenzkassette integriert sowie Überreste einer Bleomycin-Resistenzkassette entfernt. Für diese genetischen Modifikationen wurde das Plasmid mit den Oligonukleotiden P20 x P21 sowie die Replikationssequenz mit den Oligonukleotiden P18 x P19 und pBSMu3 als *Template*-DNA amplifiziert (Tab. 2.4).

pEVO+_LV

Kontrollvektor bei Expressionen in *B. subtilis*. Der Kontrollvektor basiert auf dem Ausgangsvektor pEVO37_LV und weist diesem gegenüber einige Modifikationen auf. Zum einen wurde die Terminatorsequenz verkürzt. Hierzu wurde eine Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden P7 x P8 (Tab. 2.4) und pEVO37_LV als *Template*-DNA durchgeführt. Zum anderen wurden mittels Gibson Assembly® eine Sequenz zur Verbesserung der Replikation des Vektors und der *trpA*-Terminator als Terminator für die Kanamycin-Resistenzkassette integriert sowie Überreste einer Bleomycin-Resistenzkassette entfernt. Für diese genetischen Modifikationen wurde der Vektor mit den Oligonukleotiden P20 x P21 sowie die Replikationssequenz mit den Oligonukleotiden P18 x P19 und pBSMu3 als *Template*-DNA amplifiziert (Tab. 2.4).

pET-22b(+)_MBP-3LCI-StrepII

Plasmid zur Synthese einer dreifachen LCI-Wiederholungssequenz in Fusion mit MBP in *E. coli*. Das synthetische Genkonstrukt 3 (vgl. pEVO37_spX-ppBPN'-3LCI-StrepII) lag Codon-optimiert für *E. coli* vor und wurde durch Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden P13 x P14 amplifiziert. Dabei wurde die 5' terminale Sequenz ppBPN' deletiert und die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* flankierend integriert. Die amplifizierte DNA kodiert für eine dreifache Wiederholungssequenz, welche sich aus der TEV-Protease Schnittstelle zur Separation des Fusionsproteins, einem Cystein für die Konjugatsynthese sowie dem LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243) zusammensetzt. Darauf folgt eine weitere TEV-Protease Schnittstelle und der *Strep-tag*® II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung. Um Rekombinationseffekte innerhalb des Konstrukts zu vermeiden, wurden die Codons zur Translation der TEV-Protease Schnittstelle sowie von LCI variiert. Das DNA-Amplifikat wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI/BamHI* in den pET-22b(+)-Vektor (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) integriert. Anschließend wurde über die Restriktionsschnittstelle *NdeI* das *malE*-Gen, welches das MBP kodiert, eingefügt. Das *malE*-Gen wurde dazu mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *NdeI* aus dem pMAL™-c5X-Vektor (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) ausgeschnitten. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *pefB*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_StreptII-LCI-I-ELK16

Plasmid zur Synthese von LCI in Fusion mit einem selbst-assemblierenden Peptid zur Bildung aktiver Proteinaggregate in *E. coli* (Wu et al., 2011; Xing et al., 2011). Das synthetische Genkonstrukt 4 bestehend aus 5' StreptII-TEV-Cys-LCI-MxeGyrA_Int-PT_Linkers-ELK16 3' lag Codon-optimiert für *E. coli* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI/XhoI* in den pET-22b(+)-Vektor (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) integriert. Die synthetische DNA kodiert für den Strep-tag® II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung, die TEV-Protease Schnittstelle zur Separation des Fusionsproteins, die Aminosäure Cystein für die Konjugat-synthese, das LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243), das Intein Mxe GyrA (NCBI-Zugangsnummer: U67876) zur autokatalytischen Freigabe des C-Terminus, einen PT-Linker und das selbst-assemblierende Peptid ELK16 (Telenti et al., 1997; Wu et al., 2011; Xing et al., 2011). Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *peI*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pTRcel7A_fix_LCI

Plasmid zur Expression und Sekretion von LCI mit *T. reesei*. Die DNA-Sequenz von LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243) wurde mittels Gibson Assembly® unter Verwendung der Oligonukleotide P79, P80, P81 und P82 in den pTRcel7A_fix-Vektor integriert. Das LCI-Peptid wurde zur Sekretion N-terminal an das *cbh1*-Signalpeptid aus *T. reesei* fusioniert. Das Plasmid trägt eine Hygromycin-Resistenzkassette (Hyg^R) zur Selektion in *T. reesei* sowie eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*. Zur genomischen Integration der Expressionskassette von LCI sowie der Hyg^R über homologe Rekombination in den *cel7A*-Lokus von *T. reesei*, weist das Plasmid flankierend die Promotor- sowie die Terminatorsequenz von *cel7A* auf.

pTRcel7A_fix_LCI-StreptII

Plasmid zur Expression und Sekretion von LCI mit *T. reesei*. Die DNA-Sequenz von LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243) sowie von dem Strep-tag® II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung wurde mittels Gibson Assembly® unter Verwendung der Oligonukleotide P79, P80, P81 und P83 in den pTRcel7A_fix-Vektor integriert. Das LCI-Peptid wurde zur Sekretion N-terminal an das *cbh1*-Signalpeptid aus *T. reesei* fusioniert. Das Plasmid trägt eine Hygromycin-Resistenzkassette (Hyg^R) zur Selektion in *T. reesei* sowie eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*. Zur genomischen Integration der Expressionskassette von LCI-StreptII sowie der Hyg^R über homologe Rekombination in den *cel7A*-Lokus von *T. reesei*, weist das Plasmid flankierend die Promotor- sowie die Terminatorsequenz von *cel7A* auf.

pPICZαA_cLCI-StrepII

Plasmid zur Methanol-induzierten Expression und Sekretion von LCI mit *P. pastoris*. Das synthetische Genkonstrukt 5 bestehend aus 5' cLCI-StrepII 3' lag Codon-optimiert für *P. pastoris* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/XbaI* in den pPICZαA-Vektor (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) integriert. Die synthetische DNA kodiert für die Aminosäure Cystein für die Konjugatsynthese, das LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243) sowie für den *Strep-tag*® II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung. Das Fusionsprotein wurde zur Sekretion N-terminal an die Signalsequenz des α-Faktors aus *S. cerevisiae* fusioniert. Das Plasmid trägt eine Zeocin™-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli* und *P. pastoris*. Zur genomischen Integration des Plasmids über homologe Rekombination in den AOX1-Lokus von *P. pastoris* weist das Plasmid die Promotorsequenz von AOX1 auf. Weiterhin erlaubt diese gezielte Integration des Plasmids eine Methanol-induzierte Expression des LCI-Gens.

pGAPZαA_cLCI-StrepII

Plasmid zur konstitutiven Expression und Sekretion von LCI mit *P. pastoris*. Das synthetische Genkonstrukt 5 (vgl. pPICZαA_cLCI-StrepII) lag Codon-optimiert für *P. pastoris* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/XbaI* in den pGAPZαA-Vektor (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) integriert. Die synthetische DNA kodiert für die Aminosäure Cystein für die Konjugatsynthese, das LCI (NCBI-Zugangsnummer: P82243) sowie für den *Strep-tag*® II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung. Das Fusionsprotein wurde zur Sekretion N-terminal an die Signalsequenz des α-Faktors aus *S. cerevisiae* fusioniert. Das Plasmid trägt eine Zeocin™-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli* und *P. pastoris*. Zur genomischen Integration des Plasmids über homologe Rekombination in den GAP-Lokus von *P. pastoris* weist das Plasmid die GAP-Promotorsequenz auf. Weiterhin erlaubt diese gezielte Integration des Plasmids eine konstitutive Expression des LCI-Gens.

2.1.4.2 In dieser Arbeit generierte Plasmide zur Synthese von CBMs**pET-22b(+)_CfCBM2-BaCBM2_W63Y-BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII**

Ausgangsplasmid zur Klonierung der DNA-Sequenzen von CfCBM2, BaCBM2_W63Y und BsCBM2_W63Y, jeweils verknüpft an die DNA-Sequenz von Bs2-StrepII in pET-22b(+). Das synthetische Genkonstrukt 6 bestehend aus 5' CfCBM2-BaCBM2_W63Y-BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII 3' lag Codon-optimiert für *E. coli* und *B. subtilis* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI/XhoI* in den pET-22b(+)-Vektor (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) integriert. Die synthetische DNA kodiert für die Peptide CfCBM2 (NCBI-Zugangsnummer: AAA23084.1), BaCBM2_W63Y (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287), BsCBM2_W63Y (NCBI-Zugangsnummer: BAM53958), den Fluoreszenzmarker Bs2 (NCBI-

Zugangsnummer: ABN71355.1) und den *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli* und fungierte als Ausgangsplasmid zur Klonierung von pET-22b(+)_BaCBM2_W63Y-Bs2-StrepII und pET-22b(+)_BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII.

pET-22b(+)_BaCBM2_W63Y-Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese von BaCBM2_W63Y (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287) in Fusion mit Bs2-StrepII in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_CfCBM2-BaCBM2_W63Y-BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 6 (vgl. pET-22b(+)_CfCBM2-BaCBM2_W63Y-BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII) bestehend aus 5' BaCBM2_W63Y-Bs2-StrepII 3'. Diese wurde dazu über die Restriktionsschnittstellen *SmaI*/*MscI* ausgeschnitten und nach einer weiteren Restriktion mit *NdeI* in den pET-22b(+)-Vektor (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) über die Restriktionsschnittstellen *NdeI*/*StuI* eingefügt. Anschließend wurde der *Spacer* zwischen der Ribosomenbindestelle und dem Startcodon um drei Aminosäuren verkürzt, indem die Sequenz 5' BaCBM2_W63Y-Bs2-StrepII 3' über die Restriktionsschnittstellen *NdeI*/*XhoI* erneut ausgeschnitten und in den pET-22b(+)-Vektor integriert wurde. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *peI*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese von BsCBM2_W63Y (NCBI-Zugangsnummer: BAM53958) in Fusion mit Bs2-StrepII in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET 22b(+)_CfCBM2-BaCBM2_W63Y-BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 6 (vgl. pET-22b(+)_CfCBM2-BaCBM2_W63Y-BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII) bestehend aus 5' BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII 3'. Dazu wurde die Sequenz 5' CfCBM2-BaCBM2_W63Y 3' über die Restriktionsschnittstellen *Eco53KI*/*MscI* aus dem Ausgangsplasmid entfernt. Zusätzlich wurde der *Spacer* zwischen der Ribosomenbindestelle und den Startcodon des Fusionsproteins um drei Aminosäuren verkürzt. Hierzu wurde eine Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden P38 x P39 und dem Plasmid als *Template*-DNA durchgeführt. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *peI*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_BICBM5-Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese von BICBM5 (NCBI-Zugangsnummer: AAU21943.2) in Fusion mit Bs2-StrepII in *E. coli*. Die kodierende Sequenz für BICBM5 wurde mittels Gibson Assembly[®] unter Verwendung der Oligonukleotide P26, P28, P29, P30, P31 und P32 (Tab. 2.4) in das

Ausgangsplasmid pET-22b(+)_CfCBM2-BaCBM2-BsCBM2-Bs2-StrepII anstelle der Sequenz 5' CfCBM2-BaCBM2-BsCBM2 3' integriert. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *peI*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII

Ausgangsplasmid zur Klonierung der DNA-Sequenzen von ucCBM10, PaCBM10, TrCBM1, PpCBM1 und BaCBM5, jeweils verknüpft an die DNA-Sequenz von Bs2-StrepII in pET-22b(+). Das synthetische Genkonstrukt 7 bestehend aus 5' ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5 3' lag Codon-optimiert für *E. coli* und *B. subtilis* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI/EcoRV* in das Plasmid pET-22b(+)_BICBM5-Bs2-StrepII anstelle der BICBM5-kodierenden Sequenz integriert. Die synthetische DNA kodiert für die Peptide ucCBM10 (NCBI-Zugangsnummer: AAP49340.1), PaCBM10 (NCBI-Zugangsnummer: ACX31080.1), TrCBM1 (NCBI-Zugangsnummer: ADC83999.1), PpCBM1 (NCBI-Zugangsnummer: CAY71902.1) und BaCBM5 (NCBI-Zugangsnummer: AAU21943.2). Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli* und fungierte als Ausgangsplasmid zur Klonierung von pET-22b(+)_ucCBM10-Bs2-StrepII, pET-22b(+)_PaCBM10-Bs2-StrepII, pET-22b(+)_TrCBM1-Bs2-StrepII, pET-22b(+)_PpCBM1-Bs2-StrepII und pET-22b(+)_BaCBM5-Bs2-StrepII.

pET-22b(+)_ucCBM10-Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese von ucCBM10 (NCBI-Zugangsnummer: AAP49340.1) in Fusion mit Bs2-StrepII in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 7 (vgl. pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII) bestehend aus 5' ucCBM10 3'. Dazu wurde die Sequenz 5' PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5 3' über die Restriktionsschnittstellen *SmaI/EcoRV* aus dem Ausgangsplasmid entfernt. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *peI*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_PaCBM10-Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese von PaCBM10 (NCBI-Zugangsnummer: ACX31080.1) in Fusion mit Bs2-StrepII in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 7 (vgl. pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII) bestehend aus 5' PaCBM10 3'. Dazu wurde über die Restriktionsschnittstelle *SacI* die Sequenz 5' TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5 3'

und über die Restriktionsschnittstelle *NdeI* die Sequenz 5' ucCBM10 3' aus dem Ausgangs-plasmid entfernt. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *peI*B-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_TrCBM1-Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese von *TrCBM1* (NCBI-Zugangsnummer: ADC83999.1) in Fusion mit Bs2-StrepII in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 7 (vgl. pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10- rCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII) bestehend aus 5' TrCBM1 3'. Dazu wurde über die Restriktionsschnittstelle *StuI* die Sequenz 5' PpCBM1-BaCBM5 3' und über die Restriktionsschnittstelle *NdeI* die Sequenz 5' ucCBM10-PaCBM10 3' aus dem Ausgangs-plasmid entfernt. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *peI*B-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_PpCBM1-Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese von *PpCBM1* (NCBI-Zugangsnummer: CAY71902.1) in Fusion mit Bs2-StrepII in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 7 (vgl. pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII) bestehend aus 5' PaCBM1 3'. Dazu wurde über die Restriktionsschnittstellen *MscI*/*SnaBI* die Sequenz 5' BaCBM5 3' und über die Restriktionsschnittstelle *NdeI* die Sequenz 5' ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1 3' aus dem Ausgangsplasmid entfernt. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *peI*B-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_BaCBM5-Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese von *BaCBM5* (NCBI-Zugangsnummer: AAU21943.2) in Fusion mit Bs2-StrepII in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII generiert und trägt eine verkürzte Sequenz des synthetischen Genkonstrukts 7 (vgl. pET-22b(+)_ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1-BaCBM5-Bs2-StrepII) bestehend aus 5' BaCBM5 3'. Dazu wurde über die Restriktionsschnittstelle *NdeI* die Sequenz 5' ucCBM10-PaCBM10-TrCBM1-PpCBM1 3' aus dem Ausgangsplasmid entfernt. Zur cytoplasmatischen Synthese des

Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *pe/B*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_Bs2-StrepII

Plasmid zur Synthese des Fluoreszenzmarkers Bs2 (NCBI-Zugangsnummer: ABN71355.1) in Fusion mit dem *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) in *E. coli*. Das Expressionsplasmid wurde durch Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden P33 x P34 (Tab. 2.4) und pET-22b(+)_BICBM5-Bs2-StrepII als *Template*-DNA generiert. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *pe/B*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_BaCBM2-eGFP-StrepII

Plasmid zur Synthese von BaCBM2 (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287) in Fusion mit eGFP-StrepII (NCBI-Zugangsnummer: AFA52654) in *E. coli*. Die DNA-Sequenz von eGFP wurde durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide P114 x P115 (Tab. 2.4) und pET-15b_His-eGFP als *Template*-DNA amplifiziert. Dabei wurde 3' terminal die Sequenz, kodierend für den *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) angefügt. Über die Restriktionsschnittstellen *Sall*/*Xho*I wurde die amplifizierte DNA in pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII anstelle der DNA-Sequenz von Bs2 integriert. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *pe/B*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_eGFP-StrepII

Plasmid zur Synthese des Fluoreszenzmarkers eGFP (NCBI-Zugangsnummer: AFA52654) in Fusion mit dem *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) in *E. coli*. Die DNA-Sequenz von eGFP wurde durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide P114 x P116 (Tab. 2.4) und pET-15b_His-eGFP als *Template*-DNA amplifiziert. Dabei wurde 3' terminal die Sequenz, kodierend für den *Strep-tag*[®] II angefügt. Über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I/*Xho*I wurde die amplifizierte DNA in pET-22b(+)_Bs2-StrepII anstelle der DNA-Sequenz von Bs2 integriert. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *pe/B*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_spAlgL-phoA-StrepII

Plasmid zur Synthese und periplasmatischen Sekretion der Alkalischen Phosphatase PhoA (NCBI-Zugangsnummer: AKD90625.1) in *E. coli*. Die DNA-Sequenz 5' spAlgL-phoA 3' wurde durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide P86 x P87 (Tab. 2.4) und pBEK1_phoA-algL als *Template*-DNA amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *Sac*I/*Nde*I in pET-22b(+)_StrepII integriert. Das Protein PhoA weist dadurch N-terminal die *algL*-Signalsequenz aus *Pseudomonas putida* KT2440 zur Sekretion ins Periplasma und C-terminal

den *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung auf. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_spAlgL-phoA-BaCBM2-StrepII

Plasmid zur Synthese und periplasmatischen Sekretion der Alkalischen Phosphatase PhoA (NCBI-Zugangsnummer: AKD90625.1) in Fusion mit *BaCBM2* (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287) in *E. coli*. Zunächst wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII über die Restriktionsschnittstelle *SalI* die DNA-Sequenz von Bs2 entfernt. Anschließend wurde die DNA-Sequenz 5' spAlgL-phoA 3' durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide P87 x P88 (Tab. 2.4) und pBEK1_phoA-*algL* als *Template*-DNA amplifiziert und über die Restriktionsschnittstelle *NdeI* in das Plasmid integriert. Das Fusionsprotein weist dadurch N-terminal die *algL*-Signalsequenz aus *Pseudomonas putida* KT2440 zur Sekretion ins Periplasma und C-terminal den *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung auf. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_BaCBM2-phoA-StrepII

Plasmid zur Synthese von *BaCBM2* (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287) in Fusion mit der Alkalischen Phosphatase PhoA (NCBI-Zugangsnummer: AKD90625.1) in *E. coli*. Die *phoA*-Sequenz wurde durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide P84 x P85 (Tab. 2.4) und pBEK1_phoA-*algL* als *Template*-DNA amplifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstelle *SalI* in pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII anstelle der DNA-Sequenz von Bs2 integriert. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins weist das Plasmid keine Signalsequenz auf. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pET-22b(+)_cBaCBM2-StrepII

Plasmid zur Synthese von *cBaCBM2* (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287) in *E. coli*. Zur Generierung dieses Plasmids wurde aus dem Ausgangsplasmid pET-22b(+)_cBaCBM2-Bs2-StrepII (Tab. 2.7) die DNA-Sequenz von Bs2 über die Restriktionsschnittstelle *SalI* entfernt. Das Peptid weist am N-Terminus die Aminosäure Cystein für die Konjugatsynthese und am C-Terminus den *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung auf. Zur cytoplasmatischen Synthese des Fusionsproteins fehlt dem Plasmid die *pefB*-Signalsequenz. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli*.

pEVO+_spX-cBaCBM2-StrepII

Plasmid zur Synthese und Sekretion von *cBaCBM2* (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287) mit *B. subtilis*. Die Sequenz 5' cBaCBM2-StrepII 3' wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden P112 x P113 (Tab. 2.4) und pET-22b(+)_cBaCBM2-StrepII als *Template*-DNA amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NheI/BamHI* in die pEVO+_spX-Vektoren (evoxx

technologies GmbH, Monheim am Rhein) integriert. Die amplifizierte DNA kodiert für die Aminosäure Cystein für die Konjugatsynthese, das *BaCBM2* und den *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung. Das Peptid wurde zur Sekretion N-terminal an verschiedene Signalpeptide (spX) fusioniert. Hierzu wurde die amplifizierte DNA in verschiedene pEVO+_spX-Vektoren integriert, die sich jeweils in der Signalsequenz unterschieden. Weiterhin tragen die Vektoren einen Promotor zur Phasen-induzierten Expression und eine Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^R) zur Selektion in *E. coli* sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette (Kan^R) zur Selektion in *B. subtilis*.

pPICZαA_cBaCBM2-StrepII

Plasmid zur Methanol-induzierten Expression und Sekretion von *cBaCBM2* (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287) mit *P. pastoris*. Das synthetische Genkonstrukt 8 bestehend aus 5' *cBaCBM2*-StrepII 3' lag Codon-optimiert für *P. pastoris* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/XbaI* in den pPICZαA-Vektor (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) integriert. Die synthetische DNA kodiert für die Aminosäure Cystein für die Konjugatsynthese, das *BaCBM2* sowie für den *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung. Das Peptid wurde zur Sekretion N-terminal an die Signalsequenz des α-Faktors aus *S. cerevisiae* fusioniert. Das Plasmid trägt eine Zeocin[™]-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli* und *P. pastoris*. Zur genomischen Integration des Plasmids über homologe Rekombination in den *AOX1*-Lokus von *P. pastoris* weist das Plasmid die Promotorsequenz von *AOX1* auf. Weiterhin erlaubt diese gezielte Integration des Plasmids eine Methanol-induzierte Expression des Zielgens.

pGAPZαA_cBaCBM2-StrepII

Plasmid zur konstitutiven Expression und Sekretion von *cBaCBM2* (NCBI-Zugangsnummer: ACQ50287) mit *P. pastoris*. Das synthetische Genkonstrukt 8 bestehend aus 5' *cBaCBM2*-StrepII 3' lag Codon-optimiert für *P. pastoris* vor und wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/XbaI* in den pGAPZαA-Vektor (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) integriert. Die synthetische DNA kodiert für die Aminosäure Cystein für die Konjugatsynthese, das *BaCBM2* sowie für den *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen) zur Aufreinigung. Das Peptid wurde zur Sekretion N-terminal an die Signalsequenz des α-Faktors aus *S. cerevisiae* fusioniert. Das Plasmid trägt eine Zeocin[™]-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli* und *P. pastoris*. Zur genomischen Integration des Plasmids über homologe Rekombination in den *GAP*-Lokus von *P. pastoris* weist das Plasmid die *GAP*-Promotorsequenz auf. Weiterhin erlaubt diese gezielte Integration des Plasmids eine konstitutive Expression des Zielgens.

Tab. 2.7: Plasmide mit Punktmutationen

Neue Plasmidbezeichnung	Punktmutation	Oligonukleotid	Ausgangsplasmid (Template-DNA bei PCR)
pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII (entspricht der wildtypischen Peptidsequenz)	Y63W	P48 x P49	pET-22b(+)_BaCBM2_W63Y-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BaCBM2_W9A-Bs2-StrepII	W9A	P58 x P59	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BaCBM2_W44A-Bs2-StrepII	W44A	P56 x P57	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BaCBM2_W63A-Bs2-StrepII	W63A	P49 x P60	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BaCBM2_W9A_W44A_W63A-Bs2-StrepII	W9A_W44A_W63A	P65 x P66	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BaCBM2_S11R_D45N-Bs2-StrepII	S11R_D45N	P89, P105, P91, P93, P94, P95	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BaCBM2_T24W-Bs2-StrepII	T24W	P89, P105, P90, P92, P93, P96	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BaCBM2_V18W_T24W-Bs2-StrepII	V18W_T24W	P89, P105, P90, P92, P93, P97	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BaCBM2_S11R_V18W_T24W_D45N-Bs2-StrepII	S11R_V18W_T24W_D45N	P89, P105, P93, P94, P95, P97	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_BsCBM2-Bs2-StrepII (entspricht der wildtypischen Peptidsequenz)	Y63W	P50 x P51	pET-22b(+)_BsCBM2_W63Y-Bs2-StrepII
pET-22b(+)_cBaCBM2-Bs2-StrepII	Integration eines Cysteins hinter das Startcodon	P70 x P71	pET-22b(+)_BaCBM2-Bs2-StrepII

2.1.5 Stämme

Tab. 2.8: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
<i>B. subtilis</i> TEB1030	<i>B. subtilis</i> 168 <i>his nprE aprE bpf ispl lipA lipB</i>	Eggert et al. (2003)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5</i>-T7p07 <i>ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i>[*]]_{K-12}(λ^S)</i>	Stratagene AG
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pLysS]	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5</i>-T7p07 <i>ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i>[*]]_{K-12}(λ^S) pLysS[T7p20 <i>ori</i>_{p15A}](Cam^R)</i>	Stratagene AG
<i>E. coli</i> Rosetta™ 2 (DE3) [pRARE2]	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5</i>-T7p07 <i>ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i>[*]]_{K-12}(λ^S) pLysSRARE2[T7p20 <i>ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW mefT leuW proL ori</i>_{p15A}](Cam^R)</i>	Novagen, Merck KGaA

<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10 Tet^R</i>]	Stratagene AG
<i>P. pastoris</i> X-33	Wildtyp	Thermo Fisher Scientific, Inc.
<i>T. reesei</i> QM6a	Wildtyp	ATCC® 13631™

Tab. 2.9: In dieser Arbeit generierte Stämme

Stamm	Genotyp
<i>P. pastoris</i> X-33-BaCBM2 ^{AOX1}	<i>P. pastoris</i> X-33, pPICZαA_cBaCBM2-StrepII in AOX1-Lokus integriert
<i>P. pastoris</i> X-33-BaCBM2 ^{GAP}	<i>P. pastoris</i> X-33, pGAPZαA_cBaCBM2-StrepII in GAP-Lokus integriert
<i>P. pastoris</i> X-33-ctrl ^{AOX1}	<i>P. pastoris</i> X-33, pPICZαA in AOX1-Lokus integriert
<i>P. pastoris</i> X-33-ctrl ^{GAP}	<i>P. pastoris</i> X-33, pGAPZαA in GAP-Lokus integriert
<i>P. pastoris</i> X-33-LCI ^{AOX1}	<i>P. pastoris</i> X-33, pPICZαA_cLCI-StrepII in AOX1-Lokus integriert
<i>P. pastoris</i> X-33-LCI ^{GAP}	<i>P. pastoris</i> X-33, pGAPZαA_cLCI-StrepII in GAP-Lokus integriert
<i>T. reesei</i> QM6a-LCI ^{cel7A}	<i>T. reesei</i> QM6a, Expressionskassette von LCI und Hyg ^R in <i>cel7A</i> -Lokus integriert
<i>T. reesei</i> QM6a-LCI-StrepII ^{cel7A}	<i>T. reesei</i> QM6a, Expressionskassette von LCI-StrepII und Hyg ^R in <i>cel7A</i> -Lokus integriert

2.2 Molekularbiologische Methoden

Standardtechniken der Molekularbiologie wie die Restriktion von DNA, die Modifikation von DNA-Enden und die Ligation wurden modifiziert nach Ausubel (2003) und Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Dabei eingesetzte Enzyme und Kits (2.1.1.2) wurden nach Angaben der Hersteller verwendet. Zur Verknüpfung mehrerer DNA-Fragmente wurde das „NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit“ von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) eingesetzt.

2.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Um DNA-Konzentrationen quantitativ zu bestimmen, wurde ein „NanoDrop™ 2000“ Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) verwendet. Die photometrische Messung der DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotient A_{260}/A_{280} mit einem Optimum von zwischen 1,8 und 2,0 ermittelt.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli* und *B. subtilis* wurde unter Verwendung des „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits“ (Tab. 2.2) isoliert. Um Plasmid-DNA aus *B. subtilis* zu isolieren, wurde Schritt 1 des Kits abgewandelt, indem das gelöste Zellpellet mit 100 µg Lysozym versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert wurde.

2.2.3 Amplifizierung von DNA (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) im „Mastercycler® ep gradient S“ (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt (Saiki et al., 1985). Ein Standard-PCR Ansatz ist unten angegeben. Das jeweilige PCR-Programm wurde nach Angaben des DNA-Polymerase-Herstellers und in Abhängigkeit von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, den eingesetzten Oligonukleotiden sowie der eingesetzten *Template*-DNA modifiziert.

Standard-PCR Ansatz

1–5 ng *Template*-DNA
 40 nmol dNTPs
 50 pmol je Oligonukleotid
 5x Phusion® HF Reaktionspuffer
 2 U Phusion® HF DNA-Polymerase (Tab. 2.1)
 1 % Dimethylsulfoxid

Kolonie-PCR

Für Kolonie-PCRs von *P. pastoris* wurde Zellmaterial der zu testenden Kolonie in 50 µL dH₂O resuspendiert und anschließend thermal aufgeschlossen (10 min bei 95°C; 1 h bei -80°C; 10 min bei 95°C). In den PCR-Ansatz wurde 1 µL dieser Zellsuspension als *Template*-DNA eingesetzt. Für Kolonie-PCRs von *T. reesei* wurde Zellmaterial der zu testenden Kolonie direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Mutagenese-PCR

Um gezielt DNA-Fragmente nahe des 5'- oder 3'-Terminus zu verändern, wurde eine PCR mit Mutagenese-Oligonukleotiden durchgeführt. Für einzelne Basenaustausche wurde eine Mutagenese-PCR nach dem Protokoll des „QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kits“ (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn) durchgeführt.

2.2.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten wurden mit Hilfe der Clone Manager Professional 9 Software (2.6.2) durchgeführt.

2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Abhängig von den zu erwartenden DNA-Fragmentgrößen wurden die Konzentration der Agarose im Gel sowie der eingesetzte DNA-Größenstandard (Tab. 2.3) ausgewählt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x

TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V. Zur Detektion der Banden wurde das Agarosegel anschließend mit dem Geldokumentationssystem „G:BOX“ der Firma Syngene (Cambridge, England) mit UV-Strahlen belichtet. Bei der präparativen Auftrennung von DNA wurde das Agarosegelstück mit der zu isolierenden DNA ausgeschnitten und die im Gel enthaltene DNA mit dem „innuPREP DOUBLEpure™ Kit“ von Analytik Jena AG (Jena) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

50x TAE-Puffer

2 M Tris

1 M Essigsäure

50 mM EDTA

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Mikrobiologische Arbeiten mit *E. coli*

2.3.1.1 Zellkultivierung von *E. coli*

E. coli Zellen wurden in LB- oder TB-Flüssigmedium und auf LB-Festmedium mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C kultiviert. Die Anzucht von *E. coli* in Flüssigmedium erfolgte bei 180 Upm in einem Erlenmeyerkolben mit einem Verhältnis von Kulturvolumen zu Kolbenvolumen von 1:10. Für die IPTG-induzierte Expression wurde eine *E. coli* BL21 (DE3) Kultur bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,5 mit IPTG (0,05–1 mM) induziert und für weitere 20 h bei 25°C oder 30°C inkubiert. Für die auto-induzierte Expression wurden *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] Zellen in 500 mL LB-Flüssigmedium, versetzt mit 10 mL 50 x M-Puffer und 10 mL 50 x 5052-Puffer in einem 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane für 3 h bei 37°C und 180 Upm und anschließend über Nacht bei 25°C und 120 Upm kultiviert (Studier, 2005). Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mit dem Spektralphotometer „Ultrospec™2100 pro UV/Visible“ (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm und dem verwendeten Medium als Referenz bestimmt. Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli* wurden 700 µL üN-Kultur mit 300 µL 86 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

50 x M-Puffer

222 g Na₂HPO₄

170 g KH₂PO₄

133 g NH₄Cl

35 g Na₂SO₄

ad 1 L dH₂O; autoklaviert

50 x 5052-Puffer

250 mL 100 % (v/v) Glycerin

25 g Glukose

100 g α-Laktose-Monohydrat

ad 1 L dH₂O; autoklaviert

TB (Terrific Broth)

12 g Trypton
24 g Hefeextrakt
4 mL 100 % (v/v) Glycerin
ad 900 mL dH₂O; autoklaviert
Zugabe von:
100 mL TB-Salze; autoklaviert

TB-Salze

0,17 M KH₂PO₄
0,72 M K₂HPO₄

2.3.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen sowie der Transformation mit Plasmid-DNA wurde die RbCl-Methode (Hanahan, 1983) verwendet. Für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen wurde eine LB-Vorkultur mit einer entsprechenden frischen Einzelkolonie angeimpft und üN bei 180 Upm und 37°C inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 100 mL LB-Flüssigmedium, versetzt mit 1 mL 1 M MgCl₂ sowie 1 mL 1 M MgSO₄, mit 1 mL der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die Kultur wurde zu je 50 mL aliquotiert und zentrifugiert (20 min, 3200 x g, 4°C). Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in je 25 mL eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (20 min, 3200 x g, 4°C) und die Zellpellets in je 5 mL eiskaltem TMF-Puffer resuspendiert. Abschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 mL sterilem 86 %-igem (v/v) Glycerin sowie die Aliquotierung der Zellsuspensionen à 100 µL zur Lagerung bei -80°C.

Die Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA wurde durch einen Hitzeschock durchgeführt. Dazu wurden 100 µL chemisch-kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit zirkulärer Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Es wurden entweder der gesamte Ligationsansatz, 2 µL eines Gibson Assembly® Ansatzes oder 1 µL isolierte Plasmid-DNA aus *E. coli* eingesetzt. Nach dem Hitzeschock (42°C, 30 s) wurden die Zellen in 950 µL SOC-Medium aufgenommen und je nach Antibiotikaresistenz zwischen 30 min und 2 h bei 37°C und 180 Upm geschüttelt. Zur Selektion wurde die Zellsuspension dann auf LB-Festmedium, versetzt mit entsprechendem Antibiotikum, ausplattiert.

TMF-Puffer

100 mM CaCl₂
50 mM RbCl₂
40 mM MnCl₂

SOC-Medium

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl₂
10 mL 1 M MgCl₂
10 mL 1 M MgSO₄
ad 980 mL dH₂O; autoklaviert
Zugabe von:
20 mL 20 % (w/v) Glukose; autoklaviert

2.3.2 Mikrobiologische Arbeiten mit *B. subtilis*

2.3.2.1 Zellkultivierung von *B. subtilis*

B. subtilis Zellen wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Festmedium mit Kanamycin versetzt bei 37°C kultiviert. Die Anzucht von *B. subtilis* in Flüssigmedium erfolgte bei 180 Upm in einem Erlenmeyerkolben mit einem Verhältnis von Kulturvolumen zu Kolbenvolumen von 1:10. üN-Kulturen wurden mit einer frischen Einzelkolonie vom Festmedium angeimpft. Hauptkulturen wurden mit einer üN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und für 24 h kultiviert. Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mit dem Spektralphotometer „Ultrospec™ 2100 pro UV/Visible“ (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm und dem verwendeten Medium als Referenz bestimmt. Zur dauerhaften Lagerung von *B. subtilis* wurden 700 µL üN-Kultur mit 300 µL 86 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.3.2.2 Transformation von *B. subtilis*

Die Transformation von *B. subtilis* mit Plasmid-DNA wurde über die natürliche Kompetenz nach einer modifizierten Methode von Anagnostopoulos und Spizizen (1961) und Young und Spizizen (1961) durchgeführt. Dazu wurde eine frische *B. subtilis* Einzelkolonie in 3 mL Paris-Medium über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 3 mL Paris-Medium mit 60 µL der üN-Kultur inokuliert und für genau 3 h 15 min kultiviert. Die Kultur wurde dann in 0,5 mL Aliquots aufgeteilt und nach Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA für weitere 3 h bis 5 h kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Selektionsagar ausplattiert.

Paris-Medium

10 mL Phosphat-Citrat-Puffer; autoklaviert
 5 mL 20 % (w/v) Glukose; autoklaviert
 2 mL 1 M K-Glutamat; autoklaviert
 200 µL 0,11 % (w/v) Fe_(III)NH₄-Citrat; steril filtriert
 5 mL 2 % (w/v) Casaminoaciden; autoklaviert
 2 mL 0,1 % (w/v) Tryptophan; steril filtriert
 300 µL 1 M MgSO₄; autoklaviert
 75,5 mL dH₂O; autoklaviert

Phosphat-Citrat-Puffer

0,6 M K₂HPO₄
 0,4 M KH₂PO₄
 30 mM Na₃-Citrat

2.3.3 Mikrobiologische Arbeiten mit *P. pastoris*

2.3.3.1 Zellkultivierung von *P. pastoris*

P. pastoris wurde nach Angaben des Benutzerhandbuchs „EasySelect™ *Pichia* Expression Kit“ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) kultiviert. Die Zellen wurden in YDP-Flüssigmedium oder auf YDP-Festmedium mit Zeocin™ (Invitrogen) versetzt bei 28°C

kultiviert. *P. pastoris* wurde zur Methanol-induzierten Expression in BMMY-Medium und zur konstitutiven Expression in BMGY-Medium angezogen. Die Durchmusterung von Transformanten erfolgte im 96-Well Mikrotiterplatten-Format. Hierzu wurde eine Hauptkultur aus 800 µL BMGY- oder BMMY-Medium in einer *Deepwell*-Mikrotiterplatte (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit 50 µL einer Vorkultur inokuliert und bei 800 Upm für 4 Tage geschüttelt. Für die Vorkultur wurden 150 µL BMGY-Medium in einer Mikrotiterplatte (F-Bottom, clear, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit einer frischen Einzelkolonie angeimpft. Die Anzucht von *P. pastoris* im Erlenmeyerkolben erfolgte bei 225 Upm mit einem Verhältnis von Kulturvolumen zu Kolbenvolumen von 1:10. üN-Kulturen wurden mit einer frischen Einzelkolonie vom Festmedium angeimpft. Hauptkulturen wurden mit einer üN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 inokuliert und für 4 Tage kultiviert. Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mit dem Spektralphotometer „Ultrospec™ 2100 pro UV/Visible“ (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm und dem verwendeten Medium als Referenz bestimmt. Zur dauerhaften Lagerung von *P. pastoris* wurden 500 µL üN-Kultur mit 200 µL 86 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.3.3.2 Transformation von *P. pastoris*

Die Transformation von *P. pastoris* mit Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation nach Angaben des Benutzerhandbuchs „EasySelect™ *Pichia* Expression Kit“ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) durchgeführt. Zunächst wurden 5 mL YPD-Medium mit einer frischen Einzelkolonie von *P. pastoris* X-33 angeimpft und üN bei 30°C kultiviert. Eine Hauptkultur aus 500 mL YPD-Medium wurde dann mit 0,1 bis 0,5 mL der üN-Kultur inokuliert und üN bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3 bis 1,5 angezogen. Nach Zentrifugation der Zellen (5 min, 1500 x g, 4°C) wurde das Pellet in 500 mL eiskaltem, sterilem dH₂O resuspendiert. Die Prozedur wurde mit 250 mL eiskaltem, sterilem dH₂O sowie mit 20 mL und 1 mL eiskaltem 1 M Sorbitol wiederholt. Anschließend wurden je 80 µL der Zellsuspension mit 10 µg SacI-linearisierter pPICZα-DNA oder mit 10 µg BspHI-linearisierter pGAPZαA-DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 1,5 kV, 200 Ω, 50 µF und einer Zeitkonstante von 10 ms unter Verwendung des „ECM® 630 Elektroporators“ (BTX® Harvard Apparatus, Holliston, USA) behandelt. Die Zellsuspension wurde direkt mit 1 mL 1 M eiskaltem Sorbitol vermischt und für 2 h bei 30°C inkubiert. Zur Selektion wurden die Zellen dann auf YPDS-Festmedium, versetzt mit Zeocin™ (Invitrogen), ausplattiert und für 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.3.3.3 Fermentation von *P. pastoris* im *Fed-Batch* Verfahren und Probenaufbereitung

Die Fermentation von *P. pastoris* wurde in dem Bioreaktor „LabFors 3“ mit 7,5 Liter Totalvolumen der Firma Infors AG (Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Dazu wurden 1,35 L *Batch*-Medium im Fermenter autoklaviert und mit 150 mL steril filtrierter $(\text{NaPO}_3)_6$ -Lösung (250 g/L) sowie 6,5 mL autoklavierter Spurenelementlösung unter sterilen Bedingungen versetzt (Oehler et al., 1998; Zhang et al., 2000). Während der Fermentation wurde über eine externe Pumpe Antischaum (Struktol SB420, Schill + Seilacher „Struktol“ GmbH, Hamburg), 1:10 verdünnte Spurenelementlösung sowie die *Feed*-Lösung automatisiert zugeführt. Durch einen PID (*proportional-integral-derivative*)-Regler wurden die Temperatur bei 28°C sowie der pH-Wert mittels 4 M Phosphorsäure und 10 %-iger (w/v) Ammoniak-Lösung bei pH 5,0 konstant gehalten (Zhang et al., 2007). Als Vorkultur wurde eine frische Einzelkolonie von *P. pastoris* in 100 mL YPG-Medium angeimpft und üN bei 28°C und 200 Upm kultiviert. Der Fermenter wurde dann mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,5 inokuliert. Der Fermentationsprozess setzte sich aus zwei Phasen zusammen. In der ersten Phase, der sogenannten *Batch*-Phase fand keine Zugabe der *Feed*-Lösung statt, da das Glycerin des *Batch*-Mediums als Kohlenstoffquelle für die Zellen fungierte. Sobald das Glycerin verstoffwechselt war, begann die zweite Phase, die sogenannte *Fed-Batch*-Phase, welche sich eindeutig an einem schnellen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks erkennen ließ. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Zugabe der *Feed*-Lösung mit Glukose als neue Kohlenstoffquelle sowie die Zugabe der Spurenelementlösung eingeleitet. Der Zulauf erfolgte linear (Zulauf_{lin}) oder exponentiell mit linearem Zulauf nach 9 h (Zulauf_{exp}) (Faust, 2014; Maurer et al., 2006; Sonnleitner und Chmiel, 2011). Zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentationen wurden die Feuchtzellmasse (WCW) aus 10 mL Fermenterbrühe gravimetrisch in Doppelbestimmung und die OD_{600} mit dem „Ultrospec™ 2100 *pro* UV/Visible“ (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) photometrisch in Dreifachbestimmung gemessen. 1 g WCW/L entspricht ~ 0,27 g Zelltrockenmasse/L und ~ 1 OD_{600} (Jacobs et al., 2010).

Zur Aufarbeitung der Kulturüberstände wurden diese mit einem Acrodisc® Spritzenvorsatzfilter (0,8 µm/ 0,2 µm Supor® Membran, Pall Corporation AG, Port Washington, USA) steril filtriert. Die Dialyse der Proben wurde mit dem „RC Trial Kit“ (Tab. 2.2) nach Angaben des Herstellers für 2 Tage bei 4°C in 10 mM Tris/HCl pH 8 durchgeführt. Zur Lyophilisierung wurden Proben bei -20°C eingefroren und dann in der Gefriertrocknungsanlage „Christ® Alpha 1–4 LSC“ (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) gefriergetrocknet.

Batch-Medium	Spurenelementlösung	Feed-Lösung
27,3 g K ₂ SO ₄	6,0 g CuSO ₄	1,8 L 79,4 % (w/v) Glukose; autoklaviert
13,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄	0,08 g NaI	100 mL 20 % (w/v) KCl; autoklaviert
1,77 g CaSO ₄ x 2 H ₂ O	3,0 g MnSO ₄ x H ₂ O	50 mL 25,8 % (w/v) MgSO ₄ ; autoklaviert
22,35 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	50 mL 1,4 % (w/v) CaCl ₂ ; autoklaviert
60 mL 100 % (v/v) Glycerin	0,02 g H ₃ BO ₃	12 mL 20 % (w/v) Biotin; steril filtriert
ad 1,35 L H ₂ O	0,92 g CoCl ₂ x 6 H ₂ O	
	20 g ZnCl ₂	YPG-Medium
	65 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10 g Hefeextrakt
	0,2 g Biotin	20 g Pepton
	5 mL 96 % (w/v) H ₂ SO ₄	10 g Glycerin
	ad 1 L dH ₂ O; autoklaviert	ad 1 L dH ₂ O; autoklaviert

2.3.4 Mikrobiologische Arbeiten mit *T. reesei*

2.3.4.1 Zellkultivierung von *T. reesei*

T. reesei wurde in PD-Flüssigmedium oder auf PD-Festmedium bei 28°C kultiviert. Zur Sporenbildung wurde *T. reesei* auf ME-Festmedium bei 28°C inkubiert. Für Expressionskulturen wurde *T. reesei* zunächst auf ME-Festmedium angezogen. Die dabei generierten Sporen wurden in 2 mL sterilem PD-Flüssigmedium aufgenommen und zur Inokulation von 10 mL PD-Flüssigmedium eingesetzt (üN, 28°C, 150 Upm). Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur aus 100 mL TRMM angeimpft und für 7 Tage bei 28°C und 150 Upm kultiviert. Zur dauerhaften Lagerung von *T. reesei* wurden 700 µL 86 % (v/v) Glycerin mit 500 µL Sporen, welche in PD-Flüssigmedium von ME-Festmedium abgeschwemmt wurden, gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.3.4.2 Transformation von *T. reesei*

Die Transformation von *T. reesei* mit linearisierter Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation von Sporen modifiziert nach Penttilä et al. (1987) durchgeführt. Für die Sporenbildung wurden *T. reesei* Zellen auf ME-Festmedium bei 28°C inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Sporen geerntet, in dem diese in 8 mL sterilem dH₂O aufgenommen wurden. Die Sporensuspension wurde zentrifugiert (18000 x g) und einmal mit sterilem, eiskaltem dH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Sporenpellet in sterilem, eiskaltem 1,1 M Sorbitol zweimal gewaschen und in 200 µL 1,1 M Sorbitol resuspendiert. Für die Transformation wurden 75 µL dieser Sporensuspension mit 10 µg *Psil*-linearisierter Plasmid-DNA vermengt und mit dem „ECM® 630 Elektroporator“ (BTX® Harvard Apparatus, Holliston, USA) bei 1,8 kV, 200 Ω, 25 µF und einer Zeitkonstante von 10 ms behandelt. Der Reaktionsansatz wurde in YEPD aufgenommen und mit dem vierfachen Volumen 1,1 M Sorbitol gemischt. Zur Regenerierung wurden die Zellen üN bei 28°C und 500 Upm inkubiert und dann auf PD-Festmedium, versetzt

mit Hygromycin B, ausplattiert. Nachdem die Zellen ein Mycel ausgebildet hatten, wurde dieses mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und auf frischen PD-Festmedium, versetzt mit Hygromycin B, überführt. Mittels Kolonie-PCR (2.2.3) wurden Kolonien auf die genomische Integration der Expressionskassette überprüft.

YEPD

10 g Hefeextrakt
20 g Pepton
10 g Glukose
ad 1L H₂O

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Standard diente eine definierte BSA-Konzentrationsreihe (0 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL). Für die Messungen wurden jeweils in Doppelbestimmung 50 µL Probe bzw. Standard mit 200 µL Roti® Quantlösung, verdünnt nach Herstellerangaben (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe), in eine Mikrotiterplatte (F-Bottom, clear, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei $\lambda = 595$ nm im Mikrotiterplattenreader „SpectraMax 250“ (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardgeraden bestimmt.

2.4.2 Präzipitation von Proteinen

Proteine wurden mittels Trichloressigsäure aus Kulturüberständen von *B. subtilis* modifiziert nach Peterson (1977) gefällt. Dazu wurden Proben mit 0,1 Volumen 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 0,1 Volumen 70 % (w/v) Trichloressigsäure und eine weitere Inkubation der Proben für 10 min bei RT. Nach einer Zentrifugation (15 min, 18000 x g) wurde das Pellet mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen und bei 50°C getrocknet.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dazu wurden 12,5 %- oder 14 %-ige Gele sowie 4–20 % Mini-PROTEAN® TGX™ Gele (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, USA) verwendet. Vor der SDS-PAGE wurden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt. Zur

Abschätzung der molekularen Masse von Proteinen wurden verschiedene Proteingrößenstandards (Tab. 2.3) verwendet. Die SDS-PAGE wurde in 1 x SDS-Laufpuffer (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) in der Gelapparatur „Mini PROTEAN® Tetra Electrophoresis System“ (BioRad Laboratories, Inc.) bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Coomassie-Lösung gefärbt. SDS-Gele mit aufgetrennten Proteinen < 15 kDa wurden vor der Färbung für 30 min in Fixierlösung inkubiert.

4x SDS-Probenpuffer	Coomassie-Lösung	Fixierlösung
250 mM Tris/HCl, pH 6,8	125 mL Isopropanol	40 % (v/v) Methanol
40 % (v/v) Glycerin	50 mL Essigsäure	10 % (v/v) Essigsäure
4 % (w/v) SDS	25 mL 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau – R250	
0,02 % (w/v) Bromphenolblau	300 mL dH ₂ O	
0,2 M DTT		

12,5 % -iges Gel		14 % -iges Gel	
Sammelgel	Trenngel	Sammelgel	Trenngel
1,7 mL 30 % (w/v)	8,3 mL 30 % (w/v)	1,25 mL 40 % (w/v)	7 mL 40 % (w/v)
Acrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid 37, 5:1)	Acrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid 37, 5:1)	Acrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid 19:1)	Acrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid 19:1)
1,25 mL 1 M Tris/HCl (pH 6,8)	5 mL 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1,25 mL 1 M Tris/HCl (pH 6,8)	5 mL 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
7 mL dH ₂ O	6,7 mL dH ₂ O	7,45 mL dH ₂ O	7,4 mL dH ₂ O
100 µL 10 % (w/v) SDS	200 µL 10 % (w/v) SDS	100 µL 10 % (w/v) SDS	200 µL 10 % (w/v) SDS
20 µL TEMED	40 µL TEMED	20 µL TEMED	40 µL TEMED
25 µL 10 % (w/v) APS	50 µL 10% (w/v) APS	25 µL 10 % (w/v) APS	50 µL 10% (w/v) APS

2.4.4 Spezifischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

2.4.4.1 Western Blot

Nach der SDS-PAGE (2.4.3) wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch einen Elektrotransfer auf eine „Roti® PVDF-Membran“ (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) unter Verwendung einer „Mini Trans-Blot Cell“ Apparatur (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) übertragen (Towbin et al., 1979). Dazu wurde die PVDF-Membran für wenige Sekunden in Methanol aktiviert und dann in Transferpuffer (Dunn, 1986) gelegt. In der Blot-Kammer wurde eine Lage Whatman-Papier (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) auf einen Schwamm gelegt, die zuvor in Transferpuffer getränkt wurden. Auf das Whatman-Papier wurde das SDS-Gel, darüber die aktivierte PVDF-Membran und darauf erneut Whatman-Papier sowie ein Schwamm gelegt. Die Blot-Kammer wurde in die Blot-Apparatur gestellt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde für 15 min bei 150 mA und für weitere 20 min bei 300 mA durchgeführt. Der spezifische Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgte dann nach der *Strep-tag*® II Technologie (IBA GmbH,

Göttingen). Hierzu wurde die PVDF-Membran für 1 h bei RT in TBST-Puffer mit 3 % (w/v) BSA (Biotin-frei) blockiert. Daraufhin wurde die PVDF-Membran dreimal mit TBST-Puffer für 5 min gewaschen und dann mit 10 mL TBST-Puffer, versetzt mit 2,5 µL *Strep*-Tactin® gekoppelter Alkalischer Phosphatase für 1 h bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit TBST- und TBS-Puffer (je zweimal für 1 min) wurde die chromogene Detektion von Proteinen durch Inkubation der PVDF-Membran in 20 mL Reaktionspuffer, versetzt mit 60 µL BCIP und 10 µL NTB, durchgeführt. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit dH₂O gestoppt.

Transfer-Puffer	TBS-Puffer	TBST-Puffer	Reaktionspuffer
10 mM NaHCO ₃	50 mM Tris/HCl, pH 7,4	50 mM Tris/HCl, pH 7,4	100 mM Tris/HCl, pH 8,8
3 mM Na ₂ CO ₃	140 mM NaCl	140 mM NaCl	100 mM NaCl
20 % (v/v) Methanol		0,1 % (w/v) Tween-20	5 mM MgCl ₂

BCIP: 5 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in Dimethylformamid

NTB: 7,5 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70 % (v/v) Dimethylformamid

2.4.4.2 Dot Blot

Durch einen Dot Blot wurden Proteinproben ohne vorherige gelelektrophoretische Auftrennung direkt auf einer „Roti® PVDF-Membran“ (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) modifiziert nach Kafatos et al. (1979) immobilisiert. Dazu wurden Kulturüberstände von *P. pastoris* aus einem 96-Well Mikrotiterplatten-Format (2.3.3.1) mittels eines 96-Kanalpipettiersystems (PlateMaster®, Gilson Inc., Middleton, USA) auf eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran transferiert. Nachdem die Proben auf der PVDF-Membran getrocknet waren, erfolgte der spezifische Nachweis von Proteinen nach der *Strep*-tag® II Technologie (IBA GmbH, Göttingen). Die weitere Vorgehensweise ist im Abschnitt 2.4.4 beschrieben. Zur quantitativen Auswertung der Signalstärken wurde die Software ImageJ (2.6.2) verwendet (Schindelin et al., 2015).

2.4.5 Zellaufschluss und Rohextraktgewinnung

In Abschnitt 2.3.1.1 gewonnene *E. coli* Zellen, die pLysS- oder pRARE2-Vektoren trugen, wurden nach Lagerung bei -20°C in 20 mL W_{NP}- oder in W_{TEA}-Puffer resuspendiert und aufgetaut. Durch dabei entstehende Membranschädigungen wurde das Zell-eigene Lysozym freigesetzt, welches zur Auto-Lyse der Zellen beitrug. Zur Vermeidung von starker Viskosität der Suspension aufgrund von ebenfalls freigesetzter DNA wurde der Suspension die Benzonase® Nuclease (Tab. 2.1) nach Angaben des Herstellers hinzugefügt. Anschließend wurde ein Ultraschallaufschluss zum vollständigen Zellaufschluss unter Verwendung des „Sonoplus Sonication Homogenisators“ (Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin) bei einer Pulsstärke zwischen 30 % und 50 %, Zyklus 5 für 3 x 5 min durchgeführt. Nach jedem

Beschallungszyklus wurde das Proteingemisch für 5 min auf Eis inkubiert. Der Rohextrakt wurde durch Zentrifugation (30 min, 39000 x g, 4°C) gewonnen.

Das Protokoll zum Zellaufschluss und zur Rohextraktgewinnung von *E. coli* BL21 (DE3) Zellen (ohne pLysS- oder pRARE2-Vektoren) wurde leicht modifiziert. Ein Volumen pelletierte Zellen wurden in 3 Volumen 100 mM Tris/HCl pH 7 aufgenommen. Die Zugabe der Benzonase® Nuklease erfolgte nicht. Für den Ultraschallaufschluss von Proben mit Volumina < 3 mL wurde die Beschallung auf 2 x 1 min mit einer Pulsstärke von maximal 30 % herabgesetzt. Der Rohextrakt enthielt die lösliche Fraktion und wurde durch Zentrifugation (15 min, 20000 x g, 4°C) gewonnen. Zur Analyse der unlöslichen Fraktion wurde das Pellet in 6 M Harnstoff (gleiches Volumen wie das des Rohextrakts) gelöst.

In Abschnitt 2.3.3.1 gewonnene *P. pastoris* Zellen wurden nach Angaben des Benutzerhandbuchs „EasySelect™ *Pichia* Expression Kit“ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) aufgeschlossen. Das bei -20°C gelagerte Zellpellet aus 1 mL Kultur wurde aufgetaut und in 100 µL Aufschlusspuffer aufgenommen. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Säure-gewaschenen Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) hinzugegeben. Die Probe wurde in acht wiederholenden Einheiten für 30 s mit Hilfe eines „Vortex-Schüttlers VV3“ (VWR International GmbH, Darmstadt) stark geschüttelt und für 30 s auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Rohextrakt durch Zentrifugation (10 min, 18000 x g, 4°C) gewonnen.

W_{NP}-Puffer

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
Auf pH 8,0 eingestellt

W_{TEA}-Puffer

20 mM Triethanolamin
300 mM NaCl
Auf pH 8,0 eingestellt

Aufschlusspuffer

50 mM NaH₂PO₄
1 mM EDTA
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
5 % (v/v) Glycerin
Auf pH 7,4 eingestellt

2.4.6 Proteinrückfaltung aus Einschlusskörpern

Proteine aus Einschlusskörpern wurden modifiziert nach Anleitungen aus dem „QuickFold™ Protein Refolding Kit“ (Athena Environmental Sciences, Inc., Baltimore, USA) und aus dem „Pro-Matrix™ Protein Refolding Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) denaturiert und anschließend erneut gefaltet. Dazu wurden *E. coli* Zellen (< 500 mg), aus IPTG-induzierter Expression (2.3.1.1) in 2 mL 100 mM Tris/HCl pH 7 aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (2.4.5). Nach Zentrifugation (30 min, 20000 x g, 4°C) wurde das Pellet zweimal mit 1,5 mL Waschpuffer gewaschen. Zur Denaturierung wurde das Pellet in 2 mL/g_{Pellet} Denaturierungspuffer resuspendiert und üN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (30 min, 20000 x g, 4°C) und der Überstand in Denaturierungspuffer ohne DTT in einem Endvolumen von 3,5 mL verdünnt. Für die Renaturierung wurden 50 µL dieser Proteinlösung zu jeweils 950 µL Rückfaltungspuffer A bzw. B gegeben und für 18 h bei 4°C inkubiert.

Waschpuffer	Denaturierungspuffer	Rückfaltungspuffer
4 M Harnstoff	8 M Guanidinihydrochlorid	18 mM NaCl
0,5 M NaCl	10 mM Tris/HCl	0,8 mM KCl
1 mM EDTA	10 mM DTT	0,9 M Guanidinihydrochlorid
2,4 mM Natrium-Desoxycholsäure	Auf pH 8,0 eingestellt	0,8 M L-Arginin
50 mM Tris/HCl		20 mM Tris/HCl
Auf pH 8,0 eingestellt		Auf pH 7,5 eingestellt
		A) + 5 mM DTT
		B) + 2 mM Glutathion
		+ 0,4 mM Glutathion-Disulfid

2.4.7 Inteinspaltung

2.4.7.1 Abspaltung aktiver Proteinaggregate

Die Abspaltung aktiver Proteinaggregate wurde modifiziert nach Wu et al. (2011) und Xing et al. (2011) durchgeführt. Dazu wurde das Pellet von *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET-22b(+)]_StreptII-LCl-I-ELK16 Zellen, das bei der Rohextraktgewinnung (2.4.5) erhalten wurde und unlösliche Proteine aufweisen sollte, zweimal mit 20 mL B1-Puffer gewaschen. Danach wurde das Pellet in B3-Puffer resuspendiert und die Konzentration auf 10 bzw. 50 OD₆₀₀ Kultur/mL eingestellt. Für die Intein-vermittelte Abspaltung von Proteinaggregaten wurde die Suspension für 24 h bei 4°C bzw. RT inkubiert. Durch Zentrifugation (30 min, 20000 x g, 4°C) wurde dann die lösliche von der unlöslichen Fraktion getrennt. Die lösliche Fraktion sollte das Zielprotein StreptII-LCl enthalten, während das Proteinaggregat ELK16 sowie das Intein in der unlöslichen Fraktion verbleiben sollte. Für die Abspaltung aktiver Proteinaggregate wurden verschiedene Zusammensetzungen der Puffer B1 und B3 verwendet.

B1-Puffer	B3-Puffer	
20 mM Tris/HCl	B1.A Puffer	B1.B Puffer
500 mM NaCl	1) + 40 mM DTT	1) + 40 mM DTT
1 mM EDTA	2) + 40 mM DTT	2) + 40 mM DTT
A) Auf pH 8,5 eingestellt	+ 5 % (v/v) Glycerin	+ 5 % (v/v) Glycerin
B) Auf pH 6,0 eingestellt	3) + 40 mM DTT	3) + 40 mM DTT
	+ 5 % (v/v) Glycerin	+ 5 % (v/v) Glycerin
	+ 40 mM β-Mercapto-ethanol	+ 40 mM β-Mercapto-ethanol

2.4.7.2 Protein *Trans*-Spleißen

Die *in vitro* Assemblierung von Proteinen durch Intein *Trans*-Spleißen erfolgte modifiziert nach Lin et al. (2013). Unter Zugabe von 250 mM NaCl und 1 mM DTT wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein aus Rohextrakten (2.4.5) von *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET-22b(+)]_N_LCl]

bzw. - [pET-22b(+)_LCI_C] zusammengeführt und bei 25°C für 10 min, 20 min, 40 min und 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (2.4.3) gestoppt.

2.4.8 Aufreinigung von Proteinen

Die Aufreinigung von Proteinen aus *E. coli* Rohextrakten (2.4.5) und *B. subtilis* Kulturüberständen (2.3.2.1) wurde mit der *Strep-tag*® II Technologie (IBA GmbH, Göttingen) und mittels Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Aufreinigung von Proteinen mit der *Strep-tag*® II Technologie erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde die Probe in 10 mL Schritten auf eine mit Waschpuffer (Tab. 2.10) äquilibrierte „*Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge*“ (1 mL) (Qiagen GmbH, Hilden) im Wechsel mit Waschpuffer geladen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 20 mL Waschpuffer wurden die Proteine mit 5 mL Elutionspuffer (Tab. 2.10) eluiert. Bei einem unzureichendem Aufreinigungsgrad der Probe wurde diese zusätzlich mittels Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung des ÄKTApurifier™ (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) vor der *Strep-tag*® II Aufreinigung aufgereinigt. In einem ersten Schritt wurde die Proteinlösung mit einer „5 mL HiTrap Desalting“ Säule (GE Healthcare) entsalzt. In einem zweiten Schritt wurde die Proteinlösung dann auf eine in W_{IC} -Puffer äquilibrierte „1 mL HiTrap Capto Q“ Säule (GE Healthcare) im Wechsel mit dem W_{IC} -Puffer geladen. Nach einem weiteren Waschschrift mit W_{IC} -Puffer wurden die Proteine mit einem steigenden E_{IC} -Puffergradient eluiert und durch einen UV-Detektor verfolgt. Zur Umpufferung und Aufkonzentrierung der Proteinproben wurden Vivaspin®6 Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 10 kDa, Sartorius AG, Göttingen) verwendet. Proteine wurden in 20 mM Tris/HCl pH 7 bei 4°C gelagert.

W_{TEA} -Puffer

20 mM Triethanolamin
300 mM NaCl
Auf pH 8,0 eingestellt

W_{NP} -Puffer

50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
Auf pH 8,0 eingestellt

W_{IC} -Puffer

50 mM Triethanolamin
Auf pH 7,5 eingestellt

E_C -Puffer

50 mM Zitronensäure
100 mM Na_2HPO_4
300 mM NaCl
25 mM d-Desthiobiotin
Auf pH 5,2 eingestellt

E_{NP} -Puffer

50 mM NaH_2PO_4
800 mM NaCl
25 mM d-Desthiobiotin
Auf pH 4,0 eingestellt

E_{IC} -Puffer

50 mM Triethanolamin
1 M NaCl
Auf pH 7,5 eingestellt

Puffer wurden zur Entfernung von Schwebeteilchen mit einem CME-Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22 μm (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) filtriert und bei 4°C gekühlt.

Tab. 2.10: Aufreinigung rekombinanter Proteine

Protein	Methode zur Anreicherung	Waschpuffer	Elutionspuffer
BaCBM2-Bs2-StrepII und modifizierte Varianten	<i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{NP} -Puffer	E _{NP} -Puffer, 2 mL 0,1 M NaOH
BaCBM2-eGFP-StrepII	<i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{NP} -Puffer	E _{NP} -Puffer, 2 mL 0,1 M NaOH
B/CBM5-Bs2-StrepII	<i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{TEA} -Puffer	E _C -Puffer
TrCBM1-Bs2-StrepII	ÄKTA + <i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{TEA} -Puffer	E _C -Puffer
PpCBM1-Bs2-StrepII	ÄKTA + <i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{TEA} -Puffer	E _C -Puffer
BsCBM2-Bs2-StrepII	<i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{TEA} -Puffer	E _C -Puffer
BaCBM5-Bs2-StrepII	ÄKTA + <i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{TEA} -Puffer	E _C -Puffer
ucCBM10-Bs2-StrepII	ÄKTA + <i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{TEA} -Puffer	E _C -Puffer
PaCBM10-Bs2-StrepII	ÄKTA + <i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{TEA} -Puffer	E _C -Puffer
Bs2-StrepII	<i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{NP} -Puffer	E _{NP} -Puffer
PhoA-Fusionsproteine	<i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{NP} -Puffer	E _{NP} -Puffer, 2 mL 0,1 M NaOH
ppBPN'-3LCI-StrepII	<i>Strep-tag</i> [®] II Technologie	W _{TEA} -Puffer	E _C -Puffer

2.4.9 „PET Surface Affinity Assay“

Zum semi-quantitativen Nachweis von Proteinen auf PET-Folien wurde in dieser Arbeit der „PET Surface Affinity Assay“ entwickelt. Die Methode basiert auf der Detektion von gebundenen Proteinen auf einer PET-Folie über den Affinitätstag *Strep-tag*[®] II (IBA GmbH, Göttingen). Hierzu wurde eine 50 µm dicke, transparente, biaxial-orientierte PET-Folie (Goodfellow, Inc., Huntingdon, Großbritannien) verwendet. Zunächst wurde die PET-Folie in 10 % (w/v) SDS für 10 min und in dH₂O für 2 x 10 min gewaschen, um Verunreinigungen der PET-Folie zu entfernen. Definierte Konzentrationen aufgereinigter Proteine wurden dann in einem Volumen von 2,5 µL auf die PET-Folie getropft und für 20 min bei RT inkubiert, sodass die Proteine an die PET-Folie binden konnten. Die Verdünnung der Proben erfolgte in 20 mM Tris/HCl pH 7. Bevor die PET-Folie für 3 x 5 min mit TBST-Puffer gewaschen wurde, wurden die Proben von der PET-Folie abpipettiert, damit die Proteine nicht an weiteren Stellen der PET-Folie binden konnten. Danach wurde die an *Strep-Tactin*[®] gekoppelte Alkalische Phosphatase (Tab. 2.1) nach Angaben des Herstellers in TBST-Puffer für 1 h bei RT eingesetzt. In diesem Schritt sollte das *Strep-Tactin*[®] der Alkalischen Phosphatase an den *Strep-tag*[®] II binden, welcher mit den an die PET-Folie gebundenen Proteinen fusioniert war. Anschließend wurde durch Waschschrte mit TBST- und TBS-Puffer (jeweils 2 x 1 min)

ungebundene Phosphatase entfernt. Parallel wurde eine Roti®-PVDF Membran (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) für wenige Sekunden in Methanol aktiviert und danach in 20 mL Reaktionspuffer, versetzt mit 60 µL BCIP und 10 µL NTB, getränkt. Für die chromogene Detektion von PET-gebundenen Proteinen wurde die PVDF-Membran auf die PET-Folie gelegt. Dadurch konnte die Phosphatase, welche an PET-Bindeproteine gebunden war, ihr Substrat umsetzen. Dieses wurde auf der PVDF-Membran immobilisiert und wies so indirekt PET-gebundene Proteine nach. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit dH₂O gestoppt. Zur densitometrischen Analyse der PVDF-Membran wurde die Software ImageJ (2.6.2) verwendet (Schindelin et al., 2015). Für den modifizierten „PET Surface Affinity Assay“ (vgl. 3.2.3), wurde anstatt der PET-Folie eine 40 µm dicke, transparente PP-Folie (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) verwendet.

TBS-Puffer	TBST-Puffer	Reaktionspuffer
50 mM Tris/HCl, pH 7,4	50 mM Tris/HCl, pH 7,4	100 mM Tris/HCl, pH 8,8
140 mM NaCl	140 mM NaCl	100 mM NaCl
	0,1 % (w/v) Tween-20	5 mM MgCl ₂

NTB: 7,5 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70 % (v/v) Dimethylformamid

BCIP: 5 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in Dimethylformamid

2.4.10 Rasterkraftmikroskopie zur Bestimmung von Schichtdicken

Die Schichtuntersuchung von rekombinantem LCI auf Siliziumwafern mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops wurde in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Prof. Dr. Böker) in Potsdam von Benjamin Stomps und Marc Zimmermann durchgeführt („FuPol“-Projektpartner). Dazu wurden polierte Siliziumwafer (Orientierung (100), p-Typ Bor, spezifischer Widerstand > 1 Ωcm, CrysTec GmbH, Berlin) in ungefähr 1 x 1 cm² große Stücke gebrochen und mit einem SnowJet™ (Tectra GmbH, Frankfurt am Main) gereinigt. Um die Oberfläche der Siliziumwafer für die Funktionalisierung vorzubereiten, wurden diese in einem Plasmaofen (PlasmaFlecto 10, Plasma Technology GmbH, Herrenberg-Gültstein) für 60 s bei 300 W und 0,2 mbar Luft als Reaktionsgas behandelt. Danach wurden die Siliziumwafer in einen Exsikkator über eine Petrischale mit 1 mL Triethoxyoctylsilan gelegt und der Druck im Exsikkator für 30 min auf 50 mbar reduziert. Nach 72 h der Funktionalisierung im geschlossenen Exsikkator wurden die Siliziumwafer aus dem Exsikkator entnommen und bei 80°C für 2 h getrocknet. Im Anschluss wurden die Siliziumwafer im Ultraschallbad in reinst Ethanol für 10 min gereinigt und wieder getrocknet. Zur Überprüfung der Funktionalisierung wurde der Kontaktwinkel von Wasser auf den Siliziumwafern unter Verwendung des „OCA 15EC“ (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt) gemessen. Das LCI-Lyophilisat (2.3.3.3) wurde im Schnappdeckelglas in Reinstwasser Typ 1 (Milli-Q® Reinstwassersystem, Merck KGaA, Darmstadt) gelöst, sodass

1 mL einer 75 µg/mL LCI-Lösung generiert wurde. Die funktionalisierten Siliziumwafer wurden jeweils für 3 h bei RT einzeln und flach in die LCI-Lösung gelegt, dann im Wasserbad gewaschen und über Nacht bei RT getrocknet. Zur Bestimmung der Schichtdicke wurde der LCI-Film mit einer Kanüle angeritzt und an der entstandenen Kante im trockenen Zustand mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (Dimension Icon, Bruker Corporation, Billerica, USA) vermessen. Verwendet wurde eine Bruker-Spitze Modell OTESPA (Resonanzfrequenz 278–357 kHz; Federkonstante 12–103 N/m) und als Modus wurde „Tapping Mode in Air“ gewählt. Nach der Vermessung wurden die LCI-Filme mit einem nicht-ionischen Tensid gewaschen. Dazu wurden die Siliziumwafer für 5 min bei RT einzeln und flach in ein Schnappdeckelglas mit 1 mL einer 1 mM Triton X-100 Lösung gelegt. Die Siliziumwafer wurden in einem Wasserbad gewaschen und über Nacht bei RT getrocknet. Daraufhin wurde die Schichtdicke der LCI-Filme erneut unter Verwendung des Rasterkraftmikroskops mit den gleichen Einstellungen bestimmt. Bei Kontrollversuchen wurden nicht-funktionalisierte Siliziumwafer eingesetzt.

2.4.11 Tryptophan-Quenching

Zur Ermittlung von Tryptophan-*Quenching* bei Proteinen durch PET-Nanopartikel wurden drei Versuchsreihen (gekennzeichnet mit a, b, c) durchgeführt. Für die Messung der einzelnen Versuchsreihen wurden aufgereinigte Proteinlösung mit *BaCBM2-Bs2-StrepII* (2.4.8) sowie 1 mg/mL PET-Nanopartikel (2.5.1) verwendet.

- (a) Zugabe von PET-Nanopartikeln in 5 ng Schritten à 5 µL zu 10 µg *BaCBM2-Bs2-StrepII* in 1 mL 20 mM Tris/HCl pH 7
- (b) Zugabe von PET-Nanopartikeln in 5 ng Schritten à 5 µL zu 1 mL 20 mM Tris/HCl pH 7
- (c) Zugabe von dH₂O in 5 µL Schritten zu 10 µg *BaCBM2-Bs2-StrepII* in 1 mL 20 mM Tris/HCl pH 7. Diese Versuchsreihe fungierte als Kontrolle, um den Verdünnungseffekt zu ermitteln.

Die Durchführung erfolgte in Küvetten aus Quarzglas, die während einer Messreihe nicht bewegt wurden. Nach jeder Zugabe wurde die Suspension für 30 s bei 20°C rührend im Spektrofluorometer „Fluorolog[®]“ (Horiba Scientific AG, Kyoto, Japan) inkubiert. Tryptophane wurden dann bei $\lambda_{\text{EX}} = 280 \text{ nm}$ angeregt und das Emissionsspektrum zwischen $\lambda_{\text{EM}} = 300\text{–}400 \text{ nm}$ aufgenommen (Ghisaidoobe und Chung, 2014; Teale und Weber, 1957). Für die Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 354 \text{ nm}$ jedes Messpunkts verwendet. Die normalisierte Änderung der Fluoreszenz (z %) wurde wie folgt berechnet:

$(a) - (b) = x$	Subtraktion der Fluoreszenz von PET-Nanopartikeln
$x \cdot \text{Volumen} = y$	Verdünnung durch Zugabe von PET-Nanopartikeln
$y \% - (c) \% = z \%$	Subtraktion der Änderungen der Tryptophan-Fluoreszenz ohne PET-Nanopartikel

2.4.12 *MicroScale* Thermophorese

Die Methode der *MicroScale* Thermophorese ermöglicht die Quantifizierung von biomolekularen Interaktionen ohne Immobilisierung der Interaktionspartner. Grundlagen für die Methode sind, dass die Thermophorese von Molekülen von ihrer Größe, der Ladung sowie der Hydrathülle abhängig ist und dass über die Fluoreszenz eines Fluoreszenz-markierten Interaktionspartners dessen Bewegung in einem Temperaturgradienten verfolgt werden kann (Jerabek-Willemsen et al., 2014). Für die Thermophorese-Messungen wurde der „Monolith NT.115“ (NanoTemper Technologies GmbH, München) verwendet und der Versuchsaufbau nach dem „User Starting Guide for the Monolith NT.115“ des Herstellers erarbeitet. Dabei wurden zunächst die Konzentration des Fluoreszenz-markierten Interaktionspartners, die LED-Stärke (terminiert die Fluoreszenzstärke), die geeigneten Kapillaren und die Zusammensetzung des Puffers ermittelt. Im Anschluss daran wurde das Thermophorese-Experiment unter Einsatz des zweiten Interaktionspartners durchgeführt. Zur Herstellung eines Temperaturgradienten wird der IR-Laser über einen definierten Zeitraum eingeschaltet, wobei die Stärke des IR-Lasers die Stärke der Thermophorese festsetzt. In dieser Phase kann eine thermophoretische Bewegung des Fluoreszenz-markierten Interaktionspartners aus dem erhitzten Probevolumen detektiert werden. Daraufhin erfolgt eine Zeitspanne von 5 s, in denen der IR-Laser ausgeschaltet ist und die Rückdiffusion der Moleküle stattfindet. Die Fluoreszenzintensität wird vor, während und nach dem Einsatz des IR-Lasers gemessen und zeichnet den thermophoretischen Verlauf der Moleküle auf. In Abhängigkeit von einer Bindung verändert sich das thermophoretische Verhalten von Molekülen und führt zu veränderten thermophoretischen Verläufen. Daher wird der nicht Fluoreszenz-markierte Interaktionspartner in verschiedenen Verdünnungen zu dem Fluoreszenz-markierten Interaktionspartner titriert und die graduelle Änderung der Thermophorese aufgezeichnet. Für die Analyse der Daten wurde die Software MO.Affinity Analysis (NanoTemper Technologies) verwendet.

Tab. 2.11: Parameter bei *MicroScale* Thermophorese-Messungen

Parameter	Einstellung
Fluoreszenz-markierter Interaktionspartner	BaCBM2-Bs2-StreptII, Bs2-StreptII, BaCBM2-eGFP-StreptII, eGFP-StreptII
Nicht Fluoreszenz-markierter Interaktionspartner	PET-Nanopartikel
Kapillaren	Standard-treated oder premium-coated
Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05 % (w/v) Tween-20
Filter	Blau/ Grün
LED-Stärke [%]	15, 20, 25, 30, 50, 70
IR-Laser Stärke [%]	20, 30, 40, 50, 60, 80
Zeitspanne IR-Laser an	20 s oder 30 s

2.4.13 Verfahren zur Funktionalisierung von PET mit TEMs

Die Funktionalisierung von PET mit TEMs wurde in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Prof. Dr. Böker) in Potsdam mit Benjamin Stomps durchgeführt („FuPol“-Projektpartner). Für die Konjugatsynthese der TEMs (Expancel® Mikrosphären-Typ 031DU40, AkzoNobel N.V., Amsterdam, Niederlande) mit aufgereinigtem *cBaCBM2-Bs2-StrepII* (2.4.8) wurde eine zur Pinner-Reaktion ähnliche Synthese durchgeführt (Pinner, 1890; Smith und March, 2007). Diese wird durch die Zugabe von Säure (HCl) aktiviert. Bei der Reaktion reagiert der Kohlenstoff von Nitrilgruppen auf der Oberfläche der TEMs mit dem Schwefel von Cystein-Resten der *cBaCBM2-Bs2-StrepII* Moleküle. Unter Abspaltung von NH_4^+ entsteht eine kovalente Bindung zwischen dem Schwefel- und dem Kohlenstoffatom. Zur Vorbereitung der Reaktion wurden die TEMs mit dH_2O gewaschen, um überschüssiges $\text{Mg}(\text{OH})_2$ zu entfernen und anschließend bei RT getrocknet. Für die Reaktion wurden 13,1 mg TEM in dH_2O aufgenommen und der pH-Wert mit HCl auf pH 3 eingestellt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 μg *cBaCBM2-Bs2-StrepII*. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 mL unter Rühren bei RT für 21 h durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde der pH-Wert mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Der Kontrollansatz enthielt 13,1 mg TEM mit 10 mL dH_2O und wurde äquivalent zur Probe behandelt. Um ungebundenes *cBaCBM2-Bs2-StrepII* aus der Probe zu entfernen, wurde ein Amicon® Zentrifugalkonzentrator (MWCO 100 kDa, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt) verwendet. Die Probe wurde in dH_2O aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Zur Funktionalisierung von PET mit den TEMs wurde eine PET-Folie (vgl. 2.4.9) zuerst mit 10 % (w/v) SDS und dann mit dH_2O gewaschen. Auf die trockene PET-Folie wurden 10 μL der oben beschriebenen Probe sowie 10 μL der Kontrolle aufgetragen und für 20 min bei RT auf der PET-Folie inkubiert. Anschließend wurden die Proben abpipettiert und die PET-Folie mit dH_2O gespült. Die funktionalisierte PET-Folie wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops „Leica DMI8“ (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) untersucht.

2.4.14 Methode zur Detektion von PET-Nanopartikeln in wässrigen Systemen

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode ermöglicht den Nachweis von PET-Nanopartikeln in wässrigen Testlösungen und basiert auf der chromogenen Detektion von Proteinen, die das Nanoplastik gebunden haben. Zunächst wurde eine PVDF-Membran mit 13 mm Durchmesser und einer Porengröße von 0,2 μm (Pall Corporation AG, Port Washington, USA) für 1 h in TBST-Puffer mit 3 % (w/v) BSA (Biotin-frei) blockiert, um unspezifische Bindungen der Membran zu vermeiden. Die Membran wurde anschließend 3 x 5 min in TBS-T gewaschen und dann in einen Spritzenvorsatzfilter-Halter mit 13 mm Durchmesser (Sartorius AG, Göttingen) eingesetzt. Parallel dazu wurden 10 μg aufgereinigtes Fusionsprotein

PhoA-*BaCBM2*-StreptII mit PET-Nanopartikeln ($\leq 140 \mu\text{g}$) (2.5.1) in 1 mL 10 mM Tris/HCl pH 7 für 15 min inkubiert, sodass das *BaCBM2* des Fusionsproteins mit den PET-Nanopartikeln assoziieren konnte. Die Suspension wurde dann mit einer Spritze durch die Membran im Spritzenvorsatzfilter-Halter gedrückt. Danach wurde die Membran aus der Halterung entnommen und in zwei Waschschritten à 1 min in TBS-T bzw. TBS gewaschen. Für die chromogene Detektion der an die PET-Nanopartikel gebundenen Fusionsproteine wurde die Membran für 2 min in 20 mL Reaktionspuffer, versetzt mit 60 μL BCIP und 10 μL NTB inkubiert. Dabei setzte die Alkalische Phosphatase PhoA des Fusionsproteins ihr chromogenes Substrat um. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Membran für 30 s in 20 mM Phosphorsäure gelegt. Die densitometrische Auswertung der Membranen wurde mit der Software ImageJ (2.6.2) durchgeführt (Schindelin et al., 2015).

TBS-Puffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,4
140 mM NaCl

TBST-Puffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,4
140 mM NaCl
0,1 % (w/v) Tween-20

Reaktionspuffer

100 mM Tris/HCl, pH 8,8
100 mM NaCl
5 mM MgCl_2

NTB: 7,5 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70 % (v/v) Dimethylformamid

BCIP: 5 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in Dimethylformamid

2.4.15 Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase

Die katalytische Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch die Umsetzung von *para*-Nitrophenylphosphat zu *para*-Nitrophenol und anorganischem Phosphat spektral-photometrisch ermittelt (Torriani und Rothman, 1961). Dazu wurden 10 μL aufgereinigtes Fusionsprotein (PhoA-*BaCBM2*-StreptII, *BaCBM2*-PhoA-StreptII oder PhoA-StreptII) zu 190 μL vorgewärmter Substratlösung gegeben und bei einer Wellenlänge von 410 nm bei 37°C im Mikrotiterplattenreader „SpectraMax 250“ (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA) gemessen. Die Absorptionszunahme des gelben *para*-Nitrophenols wurde über 200 s oder 300 s mit Messintervallen von 6 s verfolgt. Um die Proben im linearen Bereich der Aktivitätskurve zu messen, wurden diese in 100 mM Tris/HCl Puffer pH 8,0 entsprechend verdünnt. Als Kontrolle wurde Puffer gemessen und der Absorptionswert von dem der Probe subtrahiert. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase in U/mg ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) wie folgt berechnet:

$$\text{U/mg} = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V}{d \cdot \epsilon \cdot v \cdot c}$$

$\Delta E/\text{min}$: Änderung der Absorption bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ pro Minute

V: Gesamtvolumen des Ansatzes (200 μL)

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ ($14,4 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

d: Lichtweg durch die Lösung (0,595 cm)

v: Probevolumen (10 μL)

c: Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]

Substratlösung

100 mM Tris/HCl pH 8,0

1 mM MgCl_2

5 mM *para*-Nitrophenylphosphat

2.5 Chemische Methoden

2.5.1 Herstellung von PET-Nanopartikeln

Die Herstellung von PET-Nanopartikeln erfolgte modifiziert nach Pütz (2006) und Welzel et al. (2002). 100 mg PET wurden in 10 mL 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-Propanol gelöst und in eine Bürette überführt. Die Lösung wurde dann unter starkem Rühren bei 1000 Upm mittels eines Überkopfrührers (RZR 2051, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) in einen im Eisbad gekühlten Zwei-Rundhalskolben, gefüllt mit 100 mL dH_2O , getropft. Ausgefallenes Polymer wurde mit einem Faltenfilter mit einer Partikelretention von 2 μm bis 3 μm (Filterpapier 305, VWR International GmbH, Darmstadt) herausgefiltert. Organisches Lösungsmittel wurde für 3 Tage bei RT verdampft und durch Einkonzentrieren der Suspension mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) entfernt. Die Konzentration der PET-Nanopartikel wurde in Fünffachbestimmung durch Wiegen von trockener PET-Masse aus 5 x 1 mL Suspension ermittelt und auf 1 mg/mL eingestellt.

Die Bestimmung von Partikelgrößen der PET-Nanopartikel erfolgte in Kooperationsarbeit. Zum einen wurden am Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Arbeitsgruppe Goycoolea an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster die Partikelgrößen mit Hilfe eines Zeta-Sizers auf 105 nm $\pm$ 0,6 nm bestimmt. Zum anderen wurden die Partikel am DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V. RWTH Aachen („FuPol“-Projektpartner) von Benjamin Stomps mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht und Partikelgrößen zwischen 44 nm und 110 nm gemessen. Die hergestellten PET-Nanopartikel ähnelten daher den in der Literatur Beschriebenen, welche einen Durchmesser von 50–100 nm (Pütz, 2006) und 100–300 nm (Welzel et al., 2002) aufwiesen.

2.6 Bioinformatische Methoden

2.6.1 Molecular Dynamic-Simulationen

Molecular Dynamic (MD)-Simulationen wurden in Kooperation mit dem Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie (Jun.-Prof. Dr. Strodel) am FZ Jülich von Dušan Petrović durchgeführt. Die hier beschriebenen Methoden sind zum Teil wörtlich aus dem Manuskript „Interaction of carbohydrate-binding modules with poly(ethylene terephthalate)“ (J. Weber, D. Petrović, B. Strodel, S.H.J. Smits, S. Kolkenbrock, C. Leggewie, K.-E. Jaeger) übernommen.

Die Programme VMD 1.9.1 (Humphrey et al., 1996), GROMACS 4.6.7 (Van Der Spoel et al., 2005), DSSP (Kabsch und Sander, 1983), MATLAB R2015b, Python 2.7 und PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6 Schrödinger, LCC) wurden zur Analyse der Daten verwendet.

2.6.1.1 MD-Simulationen von CBMs in Wasser

Für die MD-Simulation jedes CBMs in Wasser wurde jeweils die initiale Konformation verwendet, welche durch Homologiemodellierung mit SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014) generiert wurde (vgl. 3.1.1). Zunächst wurden die Topologien der CBMs mit dem CHARMM27-Kraftfeld (Mackerell et al., 2004) erstellt und mit TIP3P-Wasser (Jorgensen et al., 1983) in einer kubischen Box solvatisiert. Mit Hilfe der PROPKA3-Analyse (Olsson et al., 2011) wurden die Protonierungszustände ermittelt und allen titrierbaren Resten wurde ein für pH 7 entsprechender Zustand zugewiesen, da die CBMs *in vitro* in Tris/HCl pH 7 Puffer gelagert und angewendet wurden. Weiterhin wurde die Konzentration von Natriumchlorid auf 40 mM eingestellt und es wurden Disulfidbrücken eingeführt, wenn Schwefelatome zweier Cystein-Reste weniger als 2 Å voneinander entfernt lagen. Nach 2000 Schritten der Energieminimierung wurde das System für 5 ns im NPT-Ensemble mit dem Berendsen-Barostat (Berendsen et al., 1984) äquilibriert. Dabei wurden die Peptidatome von anfänglichen 5 zu 0,5 kcal mol⁻¹ Å⁻² am Ende der Simulation restringiert. Das NPT-Ensemble zeichnet sich durch eine konstante Substanzmenge (N), konstanten Druck (P) und konstante Temperatur (T) aus. Die uneingeschränkte Entwicklung der Moleküldynamik wurde für 100 ns im NVT-Ensemble, gekennzeichnet durch eine konstante Substanzmenge (N), konstantes Volumen (V), sowie einer konstanten Temperatur (T), durchgeführt und die Koordinaten alle 10 ps gespeichert. Um eine konstante Temperatur von 300 K (RT) zu halten, wurde das Langevin-Thermostat eingesetzt. Der maximale Abstand für kurze nicht-gebundene Wechselwirkungen betrug 12 Å, wobei die Schaltfunktion bei 10,5 Å einsetzte. Simulationen wurden mit der Software ACEMD (Harvey et al., 2009), charakterisiert durch einen optimierten GPU (*Graphics Processing Unit*)-Code für Moleküldynamik, durchgeführt. Zur Abbildung einer repräsentativen Struktur jedes CBMs aus der jeweiligen MD-Simulation wurden die RMSD-Daten nach Daura et al. (1999) in *Cluster* unterteilt und eine Struktur extrahiert.

2.6.1.2 Konstruktion einer PET-Oberfläche für MD-Simulationen

Zur Konstruktion einer geordneten PET-Oberfläche wurde eine PET-Kette (x-Achse), bestehend aus fünf monomeren Einheiten auf Grundlage einer in der *P1*-Raumgruppe bestimmten Faserstruktur erstellt (Fu et al., 1993). Um die Bindung von Peptiden an der PET-Oberfläche zu untersuchen, wurde eine Schicht aus acht solcher PET-Ketten gebildet (y-Achse). Fünf solcher Schichten wurden dann übereinander gestapelt (z-Achse) und die

Oberfläche an den x- und y-Achsen ausgerichtet. Die Topologie von PET wurde mit dem CHARMM-Kraftfeld erstellt (Cruz-Chu et al., 2009). Damit ein unendlich langes Polymer entsteht, wurde der letzte (fünfte) Rest jeder PET-Kette mit dem ersten Rest verbunden. Anschließend wurde eine 90 Å hohe Box mit Wasser auf die PET-Oberfläche gesetzt, sodass das finale System ~ 26000 Atome enthielt. Nach 2000 Schritten der Energieminimierung wurde das System durch MD-Simulationen in zwei NPT-Phasen äquilibriert. Zunächst wurden die PET-Atome für 5 ns mit $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$ restringiert. Danach gab es für 10 ns keine Einschränkungen. Für die Modellierung der Bindung von CBMs an PET wurde die letzte PET-Form des äquilibrierten Systems verwendet.

2.6.1.3 MD-Simulation von CBMs an der PET-Oberfläche

Die Simulation von CBM-PET Interaktionen wurde mit den Homologiemodellen von TrCBM1, BaCBM2 und BaCBM5 (vgl. 3.1.1) sowie den entsprechenden Topologien aus Abschnitt 2.6.1.1 durchgeführt. Jedes CBM wurde über der PET-Oberfläche (2.6.1.2) ~ 10 Å entfernt zentral positioniert, wobei die coplanare aromatische Triade jedes CBMs parallel zur PET-Oberfläche orientiert wurde. Weiterhin wurden Wassermoleküle entfernt, die weniger als 2,4 Å von CBM-Atomen lokalisiert waren und die Konzentration von Natriumchlorid wurde auf 40 mM eingestellt. Nach 2000 Schritten der Energieminimierung wurde das System für 2 ns im NPT-Ensemble äquilibriert. Dabei wurden in den ersten 0,5 ns alle CBM-Atome mit $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$ restringiert und die erste 1 ns wurde mit Zeitschritten von 1 fs durchgeführt um eine nahtlose Äquilibration zu ermöglichen. Die Entwicklung der Moleküldynamik wurde für 100 ns im NVT-Ensemble durchgeführt.

2.6.2 Computerprogramme und Datenbanken

Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen

Clone Manager Professional 9 (Sci-Ed, Scientific and Educational Software)

BLAST® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990)

SignalP V4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al., 2011)

NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Gupta und Brunak, 2002)

NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) (Steentoft et al., 2013)

DeepView – Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) (Guex und Peitsch, 1997)

YASARA V15.7.31 (Yet Another Scientific Artificial Reality Application)

VADAR V1.8 (<http://vadar.wishartlab.com/>) (Willard et al., 2003)

Ramachandran Plot Assessment (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) (Lovell et al., 2003)

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold et al., 2006; Biasini et al., 2014; Kiefer et al., 2009)

Literatursuche und Sequenzinformation

NCBI – National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Web of Science™ (<https://login.webofknowledge.com/>)

Carbohydrate-Active Enzymes database (<http://www.cazy.org/>) (Lombard et al., 2014)

Datenanalyse bestimmter Geräte

IRIS V.5.3 (Bioreactor Operation Software, Infors AG, Bottmingen, Schweiz)

SOFTmax pro 3.0 (Microplate Reader Control and Microplate Data Analysis Software, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale USA)

GeneSnap (Geldokumentation Software, Syngene, Cambridge, England)

FluorEssence™ V.3.5 (Fluorescence Software, Horiba Scientific AG, Kyoto, Japan)

MO.Affinity Analysis (MicroScale Thermophoresis Software, NanoTemper Technologies GmbH, München)

UNICORN™ (ÄKTApurifier™ Software, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

NanoDrop 2000 Software (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA)

LAS X (Microscopy Software, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)

Datenanalyse, Schreiben, Abbildungen

Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation)

Inkscape 0.91 (Software Freedom Conservancy)

Prism 7 (Graph Pad System)

ImageJ 1.44 (Scientific Image Analysis)

Chemograph Plus 6.4 (Chemistry Software)

Mendeley V1.17 (Reference Manager)

Webseiten wurden zuletzt am 21.05.2017 aufgerufen.

3 Ergebnisse

3.1 Studien zu CBMs als Bindepeptide an PET

CBMs sind nicht-katalytische Strukturen in Kohlenhydrat-aktiven Enzymen und binden natürlicherweise Polysaccharide (Boraston et al., 2004). Interessanterweise zeigen einige CBMs auch eine Affinität zu PET, einem der meist verwendeten synthetischen Polymere (Ribitsch et al., 2013; Wei und Zimmermann, 2017a; Zhang et al., 2013). PET-bindende Peptide bieten die Möglichkeit neuartige Anwendungsfelder zu erschließen und sollen in der Entwicklung einer Methode zur Textilveredelung von PET-Fasern mit TEMs eingesetzt werden („FuPol“-Projekt). Darüber hinaus sollen sie in der Entwicklung eines Detektionsverfahrens von Nanoplastik in wässrigen Systemen angewendet werden. In dieser Arbeit sollten daher CBMs mit PET-Bindeeigenschaften identifiziert und charakterisiert sowie erste Machbarkeitsstudien zur biotechnologischen Anwendung durchgeführt werden.

3.1.1 Zusammenstellung von CBMs als PET-Bindekandidaten

Zunächst wurden mehrere CBMs als potentielle PET-Bindepartner zusammengestellt (Tab. 3.1, 6.1). Das Hauptkriterium bei der Suche war eine planare Ausrichtung von aromatischen Aminosäureresten auf der Peptidoberfläche, da hydrophobe Interaktionen zwischen den Tryptophan-Resten von CBMs und den Phenylgruppen von PET postuliert wurden (Zhang et al., 2013). In der CAZy-Datenbank (<http://www.cazy.org/>) (Cantarel et al., 2009; Lombard et al., 2014) wurden daher CBMs des Typs A durchmustert und jeweils zwei CBMs der Familien 1, 2, 5 und 10 ausgewählt. Um die Anordnung der Aromaten zu überprüfen, wurde jeweils eine initiale Peptidkonformation durch Homologiemodellierung mit „SWISS-MODEL“ (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Biasini et al., 2014) erstellt und das verlässlichste Homologiemodell, basierend auf der höchsten Sequenzidentität sowie dem höchsten GMQE (*Global Model Quality Estimation*)-Wert für weitere Arbeiten verwendet (Abb. 3.1, 3.2).

Tab. 3.1: Übersicht der ausgewählten CBMs

Name	Organismus	PDB-Code der Strukturvorlage	Sequenzidentität ^a zur Strukturvorlage	GMQE ^b	Peptidlänge [AS]
PpCBM1	<i>P. pastoris</i>	4qi5.1.A	57 %	0,89	29
TrCBM1	<i>T. reesei</i>	4bmf.1.A	69 %	0,73	29
BaCBM2	<i>B. anthracis</i>	3ndy.1.B	38 %	0,75	72
BsCBM2	<i>B. subtilis</i>	2rtt.1.A	37 %	0,64	83
BaCBM5	<i>Burkholderia ambifaria</i>	4hme.1.A	47 %	0,77	45
BiCBM5	<i>B. licheniformis</i>	4hme.1.A	49 %	0,70	56
PaCBM10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1e8r.1.A	73 %	0,96	28
ucCBM10	Metagenom	1e8r.1.A	71 %	0,88	28

^a 30–40 %: Alignment mit vielen Insertionen und Deletionen; > 40 %: Alignment mit wenig Lücken (Xiang, 2006)

^b Werte werden zwischen 0 und 1 angegeben; höhere Werte sprechen für eine höhere Verlässlichkeit

Als weiterer Qualitätsindikator der dreidimensionalen Struktur wurden die Torsionswinkel der Peptidstrukturen mittels Ramachandran Plot (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) analysiert, wobei je nach Peptid zwischen 97 % und 100 % der Aminosäurereste in den statistisch erlaubten oder favorisierten Bereichen lagen (Lovell et al., 2003). Dies deutete an, dass die Wahrscheinlichkeit für Fehler in der Struktur der Homologiemodelle sehr gering war. Um ein verlässliches Homologiemodell zu erhalten, sollten Proteine > 150 AS eine Sequenzidentität > 50 % zur Strukturvorlage aufweisen. Je kürzer die Proteinsequenz ist, desto schwieriger ist eine sichere Strukturvorhersage. Daher sollten Strukturvorhersagen für Proteine < 100 AS mit Sequenzidentitäten < 30 % nicht verwendet werden (Petrović und Zlatović, 2015). Die ausgewählten CBMs der Familien 1 und 10 (Gruppe A) waren sehr kurz (< 30 AS) und zeigten relativ hohe Sequenzidentitäten zwischen 57 % und 73 %. Die CBMs der Familien 2 und 5 (Gruppe B) waren hingegen länger (45–83 AS) und wiesen geringere Sequenzidentitäten (37–49 %) auf. Da alle ausgewählten CBMs folglich zu den kleinen Proteinen (< 100 AS) zählten, wurden die Qualität und Stabilität der erstellten Homologiemodelle zusätzlich durch MD-Simulationen in Wasser (2.6.1.1) untersucht.¹ Außerdem ermöglichte die Methode eine Optimierung der Seitenkettenpositionen. Peptide der Gruppe B charakterisierten sich durch geringe *Root-Mean-Square-Deviation* (RMSD)-Werte von 1 Å bis 3 Å der Proteinrückgrat-atome sowie stabilen *Radius of gyration* (Rg)-Werten über die gesamte Simulation, welche typisch für gefaltete Proteine sind. Der RMSD-Wert gibt an, wie stark die Atompositionen eines Proteins im Raum von der initialen Struktur während des Verlaufs der MD-Simulation abweichen (Kufareva und Abagyan, 2012). Kleine RMSD-Werte deuten auf ähnliche Atompositionen hin und stellen somit einen Indikator für eine stabile Proteinstruktur dar. Der Rg-Wert ist ebenfalls ein Parameter für die Stabilität und korreliert mit der übergeordneten Struktur des Proteins (Lobanov et al., 2008). Im Gegensatz zu den Peptiden der Gruppe B verhielten sich die Peptide der Gruppe A deutlich anders in den MD-Simulationen. Zum einen waren die RMSD-Werte größer als 4 Å und deuteten ein hohes Maß an Bewegung an. Zum anderen fanden lokale Faltungen und Entfaltungen, erkennbar an den schwankenden Rg-Werten, statt. Beispielsweise bildete ucCBM10 während der MD-Simulation eine α -Helix aus, die sich im weiteren Verlauf wieder entfaltete (Abb. 6.1 H). Neben den RMSD- und Rg-Werten wurden die Faltungsprozesse ebenfalls durch Analyse der Sekundärstrukturentwicklung über den gesamten Simulationsverlauf bestätigt (Abb. 6.1). In den Abb. 3.1 und 3.2 sind die CBM-Strukturen aus der Homologiemodellierung sowie jeweils eine repräsentative Struktur aus der MD-Simulation abgebildet. Jede durch Homologiemodellierung erstellte CBM-Struktur zeigte eine exponierte, aromatische Triade, deren Reste planar orientiert waren. MD-Simulationen bestätigten dies für Peptide der Gruppe B, da die

¹ Die MD-Simulationen wurden in Kooperation mit dem Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie (Jun.-Prof. Dr. Strodel) am FZ Jülich von Dušan Petrović durchgeführt.

simulierten Strukturen gut mit den durch Homologiemodellierung erstellten Strukturen übereinstimmten. Bei den Peptiden der Gruppe A war es hingegen nicht möglich, eine finale Struktur in den MD-Simulationen zu bestimmen, da die Peptide sehr flexibel waren. Die Ausrichtung der exponierten, aromatischen Reste hatte sich hier teilweise deutlich gegenüber der Struktur aus der Homologiemodellierung verändert (vgl. ucCBM10).

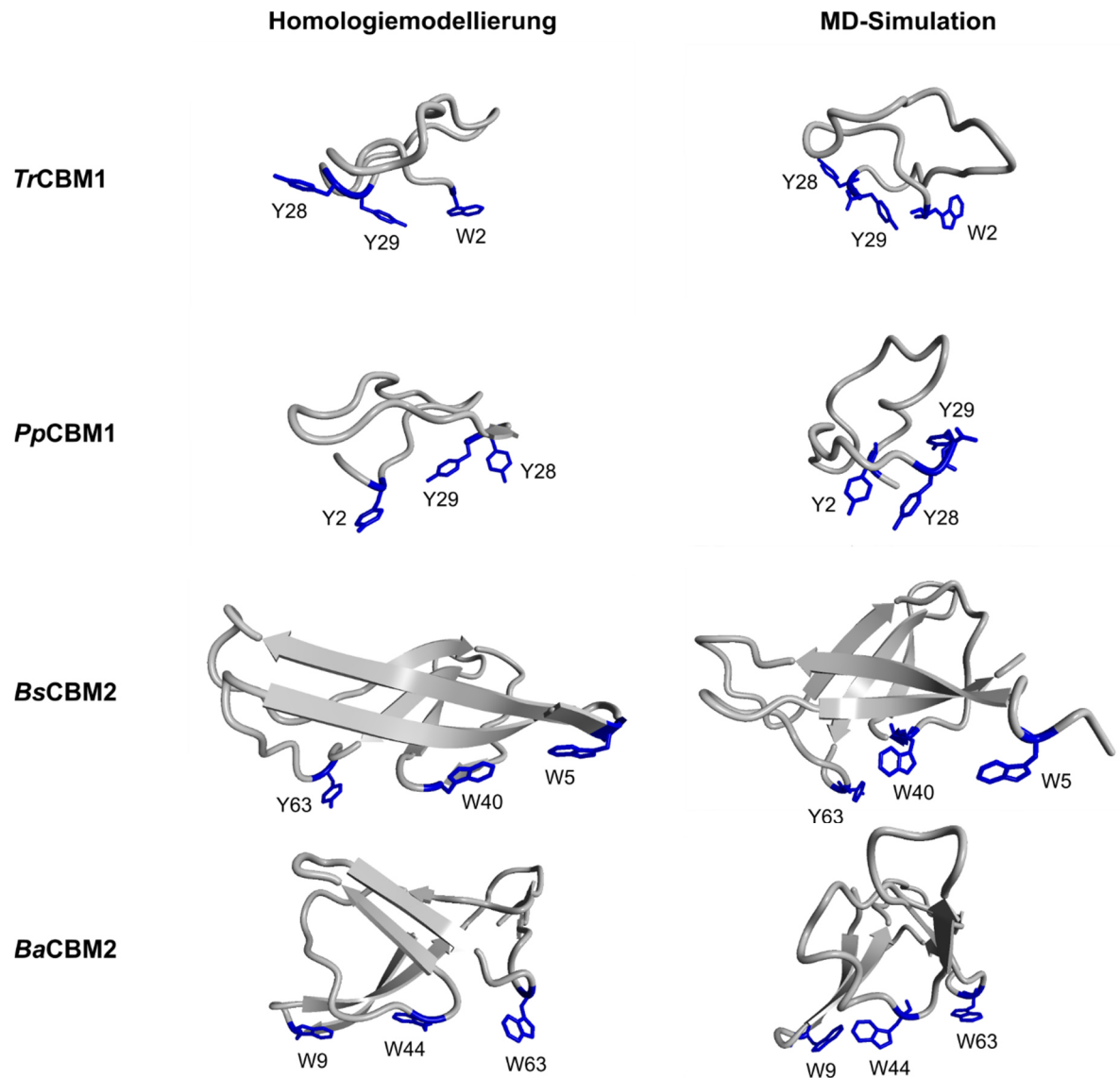


Abb. 3.1: Strukturvorhersage der CBMs (Familien 1 und 2) nach Homologiemodellierung und MD-Simulation.²

Jedes CBM wies drei aromatische Aminosäurereste auf, die an der Peptidoberfläche exponiert und je nach Vorhersagemethode unterschiedlich ausgeprägt planar angeordnet waren. Diese aromatischen Triaden sind in blau hervorgehoben. *BsCBM2* wurde mit dem Aminosäureaustausch W63Y untersucht.

² Repräsentative Strukturen der MD-Simulationen wurden in Kooperation mit dem Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie (Jun.-Prof. Dr. Strodel) am FZ Jülich von Dušan Petrović erstellt.

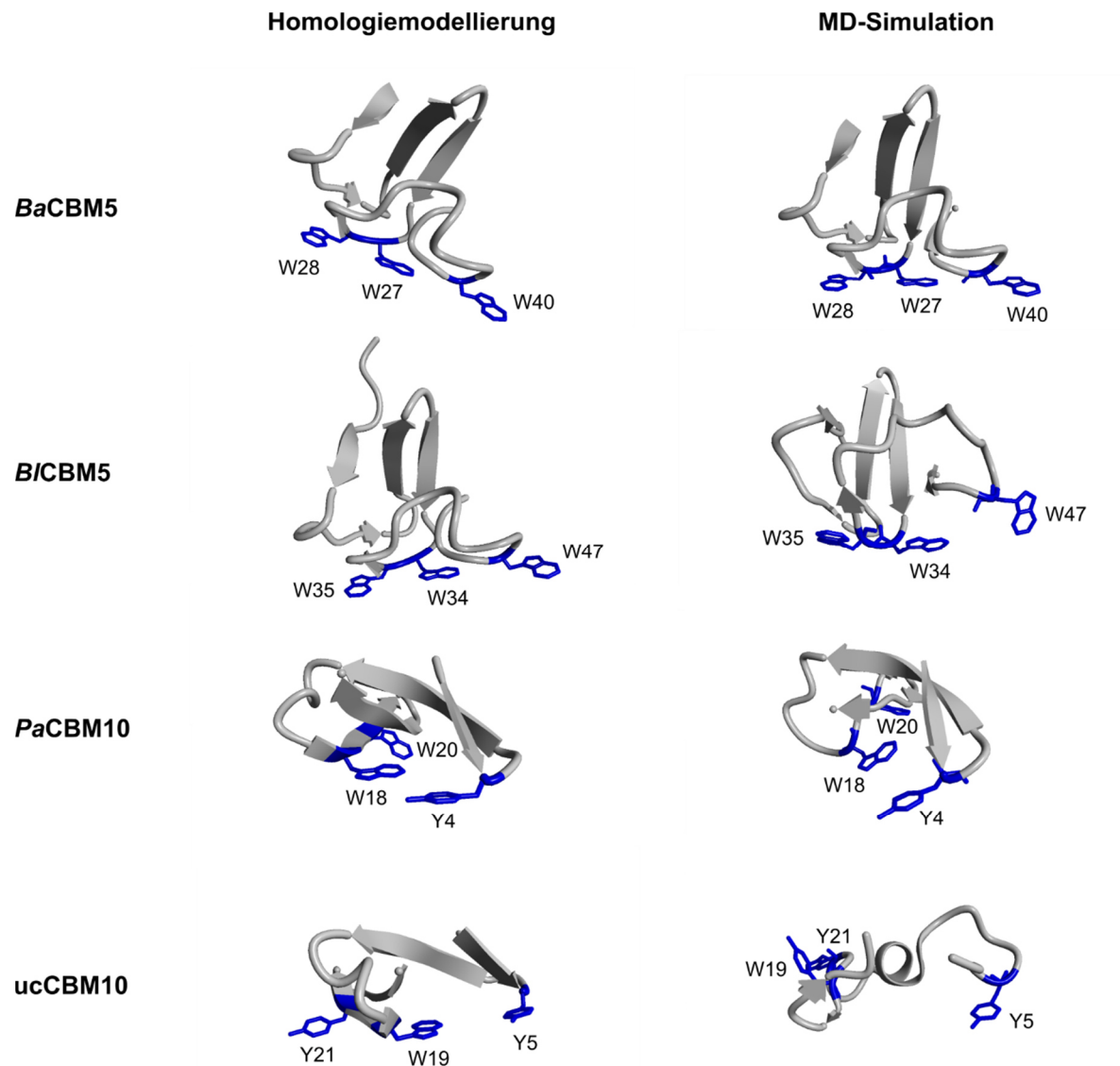


Abb. 3.2: Strukturvorhersage der CBMs (Familien 5 und 10) nach Homologiemodellierung und MD-Simulation.³

Jedes CBM wies drei aromatische Aminosäurereste auf, die an der Peptidoberfläche exponiert und je nach Vorhersagemethode unterschiedlich ausgeprägt planar angeordnet waren. Diese aromatischen Triaden sind in blau hervorgehoben.

Es wurden acht CBMs als potentielle PET-Bindepartner durch *in silico* Analysen identifiziert: *TrCBM1*, *PpCBM1*, *BaCBM2*, *BsCBM2*, *BaCBM5*, *B/CBM5*, *ucCBM10* und *PaCBM10*. Laut Homologiemodellierung und MD-Simulation wiesen diese ausgewählten CBMs jeweils drei aromatische Aminosäurereste auf, die an der Peptidoberfläche exponiert und (unterschiedlich ausgeprägt) planar angeordnet waren.

³ Repräsentative Strukturen der MD-Simulationen wurden in Kooperation mit dem Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie (Jun.-Prof. Dr. Strodel) am FZ Jülich von Dušan Petrović erstellt.

3.1.2 Expression der CBM-Kandidaten

3.1.2.1 CBM-Expression und -Aufreinigung aus *E. coli*

Um *in vitro* Untersuchungen mit den ausgewählten CBMs bezüglich deren Anbindung an PET durchzuführen, wurden diese rekombinant in *E. coli* hergestellt. Dazu wurden die synthetischen Gene der CBMs Codon-optimiert für *E. coli* und jeweils in den pET-22b(+)-Vektor kloniert (2.1.4.2). Jedes CBM wurde C-terminal zur schnellen, optischen Detektion an den Fluoreszenzmarker Bs2 (evoglow®-Bs2; evovx technologies GmbH, Monheim am Rhein/ EcFbFP (Drepper et al., 2007; Drepper et al., 2010)) sowie zur spezifischen Detektion und Aufreinigung an den Affinitätstag *Strep-tag*® II (in Genkonstrukten und Proteinen „StrepII“ genannt) fusioniert. Als Kontrolle wurde das Plasmid pET-22b(+)_Bs2-StrepII kloniert.

Tab. 3.2: Plasmide zur heterologen Expression der ausgewählten CBM-Gene sowie Kontrollplasmide und molekulare Masse der Fusionsproteine

CBM	Plasmid	Molekulare Masse der Fusionsproteine [kDa]
<i>Pp</i> CBM1	pET-22b(+)_ <i>Pp</i> CBM1-Bs2-StrepII	21,1
<i>Tr</i> CBM1	pET-22b(+)_ <i>Tr</i> CBM1-Bs2-StrepII	21,2
<i>Ba</i> CBM2	pET-22b(+)_ <i>Ba</i> CBM2-Bs2-StrepII	25,9
<i>Bs</i> CBM2	pET-22b(+)_ <i>Bs</i> CBM2-Bs2-StrepII	26,6
<i>Ba</i> CBM5	pET-22b(+)_ <i>Ba</i> CBM5-Bs2-StrepII	23,1
<i>Bi</i> CBM5	pET-22b(+)_ <i>Bi</i> CBM5-Bs2-StrepII	23,8
<i>Pa</i> CBM10	pET-22b(+)_ <i>Pa</i> CBM10-Bs2-StrepII	20,8
<i>uc</i> CBM10	pET-22b(+)_ <i>uc</i> CBM10-Bs2-StrepII	21,8
-	pET-22b(+)_Bs2-StrepII	16,8
-	pET-22b(+)	-

Nach der Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] Zellen mit den Plasmiden wurden diese im Autoinduktionsmedium kultiviert, um die Gene der Fusionsproteine zu exprimieren. Mittels SDS-PAGE konnte in keinem der Rohextrakte aufgeschlossener *E. coli* Zellen eine Überexpressionsbande der CBM-Fusionsproteine detektiert werden (Abb. 3.3 A). Durch eine weiterführende Western Blot Analyse konnte jedoch jeweils lösliches CBM-Fusionsprotein im Rohextrakt spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 3.3. B). Bei gleich eingesetzter Gesamtproteinmasse zeigten sich deutliche Unterschiede in der Menge der CBM-Fusionsproteine. Beispielsweise wiesen die Spuren der *Tr*CBM1- und *Ba*CBM5-Fusion kaum Zielprotein auf, wohingegen besonders viel Zielprotein in den Spuren der *Pp*CBM1- und *Ba*CBM2-Fusion zu finden war. Zudem waren teilweise oberhalb der erwarteten Laufhöhe Banden zu sehen, welche auf Dimere hinwiesen. In den Spuren der *Pa*CBM10- und *uc*CBM10-Fusion wurden jeweils zwei Zielproteinbanden detektiert, die auf einen Abbau der Zielproteine hindeuteten. In der Kontrollspur mit Gesamtprotein aus *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET-22b(+)] Rohextrakt war ebenfalls im Molekulargewichtsbereich der CBMs eine schwache Bande bei ca. 22 kDa

zu erkennen, welche wahrscheinlich dem BCCP (*Biotin Carboxyl Carrier Protein*) mit 22,5 kDa aus *E. coli* zugeordnet werden kann. BCCP ist ein biotinyliertes Protein, das eine hohe Affinität zu Streptavidin und *Strep-Tactin*® zeigt und daher bei Verwendung der *Strep-tag*® II Technologie sowohl nachgewiesen als auch bei Aufreinigungen angereichert werden kann (Skerra und Schmidt, 2000).

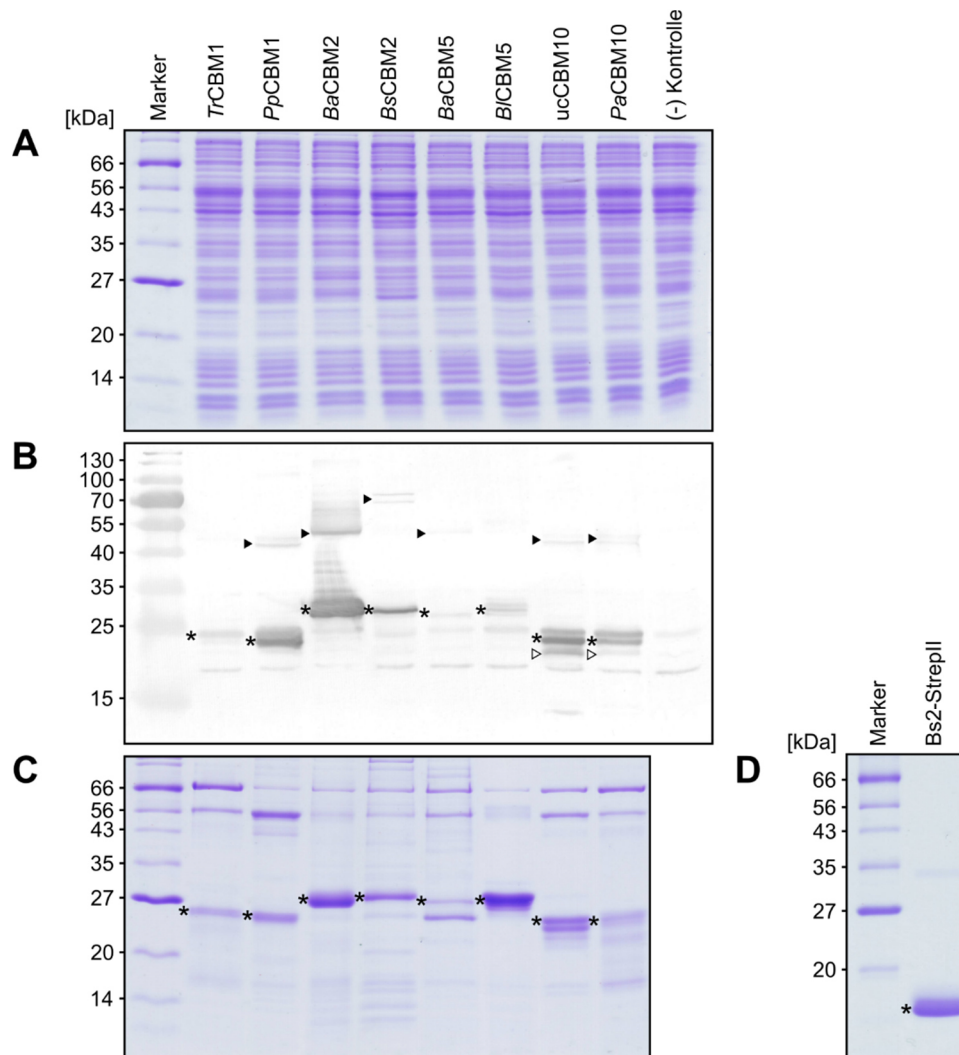


Abb. 3.3: Expression und Aufreinigung der CBM-Fusionsproteine.

(A) SDS-Gel mit CBM-Fusionsproteinen im Rohextrakt. Aufgetragen wurden jeweils 7 µg denaturiertes Gesamtprotein. **(B)** Western Blot mit CBM-Fusionsproteinen im Rohextrakt. In der SDS-PAGE wurden jeweils 15 µg denaturiertes Gesamtprotein aufgetrennt. Die spezifische Detektion der Proteine erfolgte über den *Strep-tag*® II. Sterne markieren CBM-Fusionsproteine mit Volllänge, gefüllte Dreiecke markieren Proteine, welche auf Dimere zurückzuführen sein könnten und ungefüllte Dreiecke markieren Proteine, welche auf degradierte Proteine zurückzuführen sein könnten. **(C)** SDS-Gel mit aufgereinigten Proteinfractionen der CBM-Fusionsproteine. Aufgetragen wurden jeweils 2 µg denaturiertes Protein der Aufreinigung. Sterne markieren die CBM-Fusionsproteine in Volllänge. **(D)** SDS-Gel mit aufgereinigter Proteinfraction des Kontrollproteins Bs2-StrepII. Es wurden 3 µg denaturiertes Protein der Aufreinigung aufgetragen. Der Stern markiert das Kontrollprotein in Volllänge. **(A–C)** Die Probenbezeichnung steht jeweils für eine entsprechende Proteinfraction aus *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] mit einem pET-22b(+)-Plasmid, welches das angegebene CBM in Fusion mit Bs2-StrepII kodiert. In der Spur „(-) Kontrolle“ wurde Rohextrakt aus *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET-22b(+)] aufgetragen.

Die anschließende Aufreinigung der CBM-Fusionsproteine (2.4.8) gestaltete sich herausfordernd, da die CBMs aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften stark affin gegenüber dem Sepharose-Trägermaterial der *Strep*-Tactin®-Matrix in der Aufreinigungssäule waren und mutmaßlich unspezifische Interaktionen mit anderen Proteinen aus *E. coli* eingingen. Die Fusionsproteine *BaCBM2*-Bs2-StrepII und *B/CBM5*-Bs2-StrepII konnten dennoch in zufriedenstellender Reinheit über den *Strep*-tag® II angereichert werden. Für die Elution waren aber ein Puffer mit saurem pH-Wert (E_{NP} - bzw. E_C -Puffer) sowie ein weiteres Spülen mit einer basischen Lösung (0,1 M NaOH) nötig. Um äquivalente Ergebnisse für die anderen CBM-Fusionsproteine zu erzielen, wurden diese zusätzlich über Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. In Abb. 3.3 C sind die aufgereinigten Proteinfractionen nach gelelektrophoretischer Auftrennung dargestellt. Jede Probe wies eine deutliche Anreicherung des Volllängen-Fusionsproteins auf, wobei sich die Reinheitsgrade unterschieden. Weiterhin wurden bei jeder Probe zwei Proteinbanden auf Höhe von ~ 56 kDa und ~ 66 kDa detektiert, welche vermutlich auf Proteine zurückzuführen sind, die mit allen untersuchten CBMs unspezifisch interagierten. Als Kontrollprotein wurde Bs2-StrepII analog zu den CBM-Fusionsproteinen synthetisiert und über den *Strep*-tag® II aufgereinigt (Abb. 3.3 D).

Alle Gene der rational ausgewählten CBMs konnten heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Trotz der zur Aufreinigung hinderlichen, biochemischen Eigenschaften der CBMs, konnte jedes Fusionsprotein in zufriedenstellender Reinheit aufgereinigt werden, sodass die potentiellen PET-Bindepeptide in weiterführenden Untersuchungen eingesetzt werden konnten.

3.1.2.2 Verwendung verschiedener Expressionssysteme zur Synthese von *BaCBM2*

Wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben, hat das PET-bindende *BaCBM2* (vgl. 3.1.4) Potential biotechnologisch angewendet zu werden. Daher ist ebenfalls ein optimiertes Expressionssystem für *BaCBM2* von industriellem Interesse. Aus diesem Grund wurde die Synthese von *BaCBM2* in verschiedenen Expressionssystemen untersucht. Anders als in Abschnitt 3.1.2.1 wurde das *BaCBM2* ohne Fluoreszenzmarker synthetisiert, da dieser für die Anwendungen nicht benötigt wird und einen potentiellen Störfaktor darstellt. Zudem wurde an den N-Terminus ein Cystein für chemische Verknüpfungsreaktionen integriert (vgl. 3.1.7.1). Demzufolge ergab sich das Genkonstrukt c*BaCBM2*-StrepII, welches jeweils Codon-optimiert in *B. subtilis*, *P. pastoris* und *E. coli* heterolog exprimiert wurde.

Für die Expression und Sekretion in *B. subtilis* wurden zehn pEVO+_spX-c*BaCBM2*-StrepII Plasmide kloniert (2.1.4.2), die sich jeweils durch eine andere Signalpeptidsequenz (spX) zur Sekretion unterschieden. Nach der Transformation von *B. subtilis* mit den Plasmiden wurden

die Klone in Doppelbestimmung kultiviert und jeweils die zellfreien Kulturüberstände analysiert. Das rekombinante Zielprotein konnte nicht durch SDS-PAGE Analyse, sondern nur durch die wesentlich sensitivere Western Blot Methode bei 7 der 10 Klone detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutete an, dass sich *B. subtilis* unter den untersuchten Bedingungen nicht zur Produktion des Peptids cBaCBM2-StrepII im größeren Maßstab eignet.

Ein weiterer Ansatz war, das Peptid durch die Hefe *P. pastoris* zu synthetisieren und zu sekretieren. Dazu wurden die Stämme *P. pastoris* X-33-BaCBM2^{AOX1} und *P. pastoris* X-33-BaCBM2^{GAP} generiert (Tab. 2.9), welche die DNA-Sequenz von cBaCBM2-StrepII im AOX1-Lokus zur Methanol-induzierten Expression bzw. im GAP-Lokus zur konstitutiven Expression genomisch integriert hatten. Der AOX1-Promotor induziert eine sehr starke Expression der AOX1-kodierten Alkohol-Oxidase 1, welche die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd in der methylo trophen Hefe katalysiert (Cereghino und Cregg, 2000). Der GAP-Promotor kontrolliert hingegen die Expression der GAP-kodierten Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase auf einem hohen basalen Niveau (Waterham et al., 1997). Das Genkonstrukt konnte durch beide Stämme exprimiert und das Genprodukt spezifisch im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Weiter wies die Peptidsequenz von BaCBM2 zwei N-Glykosylierungsstellen auf und die tatsächliche N-Glykosylierung konnte durch ein Deglykosylierungsexperiment nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte das Peptid nach Behandlung mit der Endo-Glykosidase H (Tab. 2.1) im SDS-Gel mittels Coomassie Brilliant Blau angefärbt werden, wohingegen es im glykosylierten Zustand nicht detektiert werden konnte. Um zu überprüfen, ob die Glykosylierung einen Einfluss auf die PET-Bindung von BaCBM2 hat, wurden die Proben in dem in dieser Arbeit entwickelten „PET Surface Affinity Assay“ (vgl. 3.1.3) untersucht (Daten nicht gezeigt). Da kaum ein Output-Signal zu sehen war, konnte geschlussfolgert werden, dass die Glykosylierung die PET-Affinität von BaCBM2 stark beeinträchtigte. Die PET-Affinität konnte jedoch durch Deglykosylierung des Peptids gesteigert werden.

Des Weiteren wurde die Expression des Genkonstrukts cBaCBM2-StrepII in *E. coli* untersucht. Dazu wurde das Konstrukt in pET-22b(+) integriert (2.1.4.2) und *E. coli* BL21 (DE3) damit transformiert. *E. coli* BL21 (DE3) [pET-22b(+)_cBaCBM2-StrepII] Zellen sowie die Kontrolle *E. coli* BL21 (DE3) [pET-22b(+)_StrepII] wurden mit IPTG induziert und bei verschiedenen Temperaturen kultiviert. Anschließend wurden die löslichen und die unlöslichen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. In der löslichen Fraktion konnte bei keiner Probe Zielprotein detektiert werden. Stattdessen konnte dieses in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.4 A). Besonders viel Zielprotein wies die Probe auf, deren Zellen mit 0,3 mM IPTG induziert wurden. Mit Hilfe des aufgetragenen BSA-Standards konnte hier eine Zielproteinausbeute von 56 mg/L ermittelt werden.

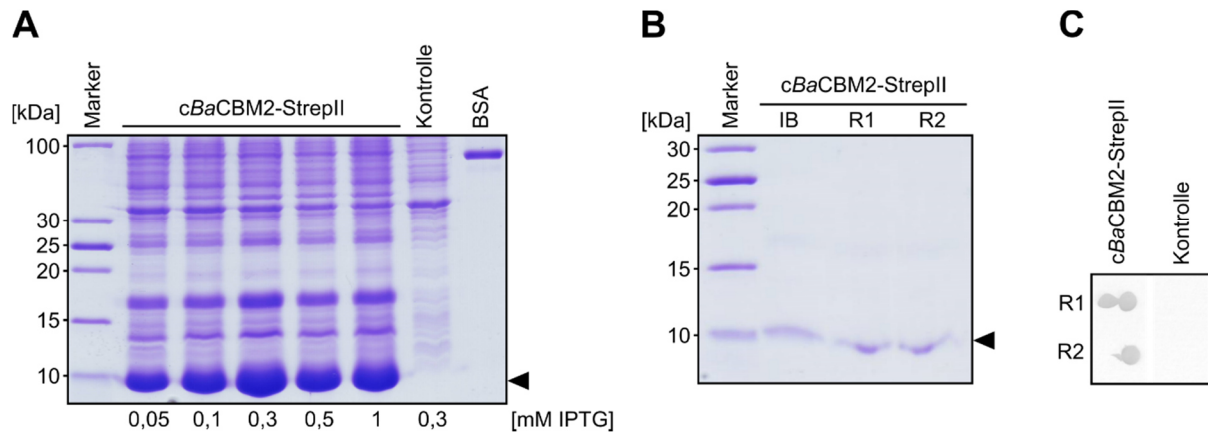


Abb. 3.4: Produktion von cBaCBM2-StrepII mit *E. coli*.

(A) SDS-Gel mit cBaCBM2-StrepII in der unlöslichen Fraktion. Zur Expression des cBaCBM2-StrepII Peptids wurden *E. coli* BL21 (DE3) [pET-22b(+)_cBaCBM2-StrepII] Zellen zunächst bei 37°C angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden diese mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert und bei 25°C weiter kultiviert. Analog dazu wurde die Kontrolle (*E. coli* BL21 (DE3) [pET-22b(+)_StrepII]) mit 0,3 mM IPTG induziert und kultiviert. Aufgetragen wurde jeweils die unlösliche Fraktion mit dem Volumen entsprechend für 7 µg Gesamtprotein aus dem Rohextrakt sowie 1 µg BSA. Der schwarze Pfeil markiert cBaCBM2-StrepII (10 kDa). **(B)** SDS-Gel mit cBaCBM2-StrepII in Einschlusskörpern und renaturiert. Zur Expression des cBaCBM2-StrepII Peptids wurden *E. coli* BL21 (DE3) [pET-22b(+)_cBaCBM2-StrepII] Zellen zunächst bei 37°C angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden diese mit 0,3 mM IPTG induziert und bei 25°C weiter kultiviert. IB: Aufgetragen wurde die unlösliche Fraktion aus 7 µg Pellet. R1: Aufgetragen wurden die mit DTT renaturierten Proteine aus der unlöslichen Fraktion aus 7 µg Pellet. R2: Aufgetragen wurden die mit Glutathion-Disulfid/ Glutathion renaturierten Proteine aus der unlöslichen Fraktion aus 7 µg Pellet. Der schwarze Pfeil markiert cBaCBM2-StrepII (10 kDa). **(C)** Untersuchung der PET-Affinität der renaturierten cBaCBM2-StrepII Peptide. Im „PET Surface Affinity Assay“ wurden 2,5 µL der mit DTT renaturierten cBaCBM2-StrepII Probe (R1) sowie der mit Glutathion-Disulfid/ Glutathion renaturierten cBaCBM2-StrepII Probe (R2) eingesetzt. Zur Kontrolle wurden 2,5 µL der renaturierten Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3) [pET-22b(+)_StrepII] aufgetragen. Dargestellt sind Ausschnitte der Output-Signale einer Membran.

Um das Peptid cBaCBM2-StrepII aus der unlöslichen Fraktion für Anwendungen verfügbar zu machen, wurde eine Proteinrückfaltung aus Einschlusskörpern (2.4.6) durchgeführt. Das SDS-Gel in Abb. 3.4 B zeigt die unlösliche Fraktion „IB“ sowie zwei renaturierte Proben „R1“ (mit DTT renaturiert) und „R2“ (mit Glutathion-Disulfid/ Glutathion renaturiert) aus der gleichen Menge an Zellpellet. Die Renaturierung war erfolgreich, da in den Spuren „R1“ und „R2“ Protein detektiert wurde und dieses auf Höhe der Einschlusskörper aus der unlöslichen Fraktion lief. Eine densitometrische Auswertung der Proteinbanden zeigte, dass über 90 % der unlöslichen Peptide renaturiert werden konnten. Zudem wurden diese Proteinfractionen im „PET Surface Affinity Assay“ (2.4.9) angewendet, bei dem die PET-Affinität der renaturierten Peptide qualitativ nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.4 C).

Mit jedem der untersuchten Systeme konnte das cBaCBM2-StrepII Peptid produziert werden, jedoch ergaben sich für jedes System Vor- und Nachteile (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Übersicht der *BaCBM2*-Synthese in verschiedenen Organismen

Organismus	Vorteil	Nachteil
<i>B. subtilis</i>	Bakterielles System, das Zielprotein ins Medium sekretiert	Geringe Zielproteinausbeute
<i>P. pastoris</i>	Sekretiert Zielprotein ins Medium, deglykosyliertes Zielprotein bindet an PET	Zielprotein wird glykosyliert, Glykosylierung beeinträchtigt PET-Affinität, Deglykosylierung notwendig
<i>E. coli</i>	Hohe Zielproteinausbeute, renaturiertes Zielprotein bindet an PET	Zielprotein befindet sich in Einschlusskörpern, Renaturierung notwendig

3.1.3 Entwicklung eines „PET Surface Affinity Assays“

Um das PET-Bindungspotential der CBM-Kandidaten (vgl. 3.1.1.) *in vitro* zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit der sogenannte „PET Surface Affinity Assay“ (Abb. 3.5) entwickelt. Die Methode ermöglicht den semi-quantitativen Nachweis von PET-Bindeproteinen auf PET-Folien und basiert auf der Detektion von gebundenen Proteinen über ihren Affinitätstag *Strep-tag*® II. Bei der Durchführung (2.4.9) werden zunächst definierte Mengen des zu untersuchenden, aufgereinigten Proteins in gleichem Volumen auf eine gereinigte PET-Folie aufgetragen. Nach einer definierten Inkubationszeit wird das Volumen wieder abgenommen, da sonst noch ungebundene PET-Bindeproteine in den nachfolgenden Schritten an weiteren Stellen der PET-Folie binden könnten. Dann werden durch Waschschr

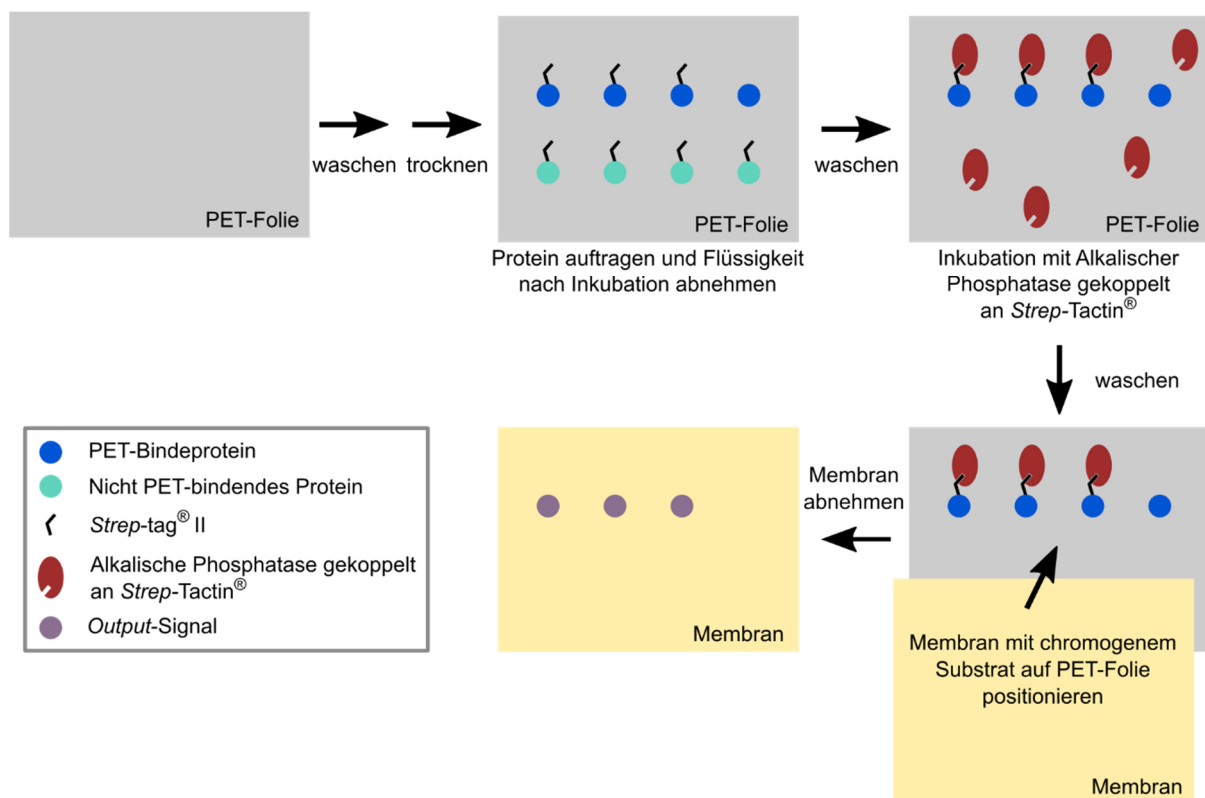


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des „PET Surface Affinity Assays“.

Proteine entfernt. Zum spezifischen Nachweis immobilisierter PET-Bindeproteine wird eine Alkalische Phosphatase eingesetzt, die über ein gekoppeltes *Strep*-Tactin® den C-terminalen Tag der PET-Bindeproteine bindet. Anschließend wird eine PVDF-Membran, welche zuvor in chromogenem Substrat getränkt wurde, auf der präparierten PET-Folie positioniert. Die an den PET-Bindeproteinen gebundene Alkalische Phosphatase kommt dadurch mit dem Substrat in Kontakt und setzt dieses zu einem sichtbaren Produkt um, welches auf der PVDF-Membran fixiert bleibt (*Output*-Signal).

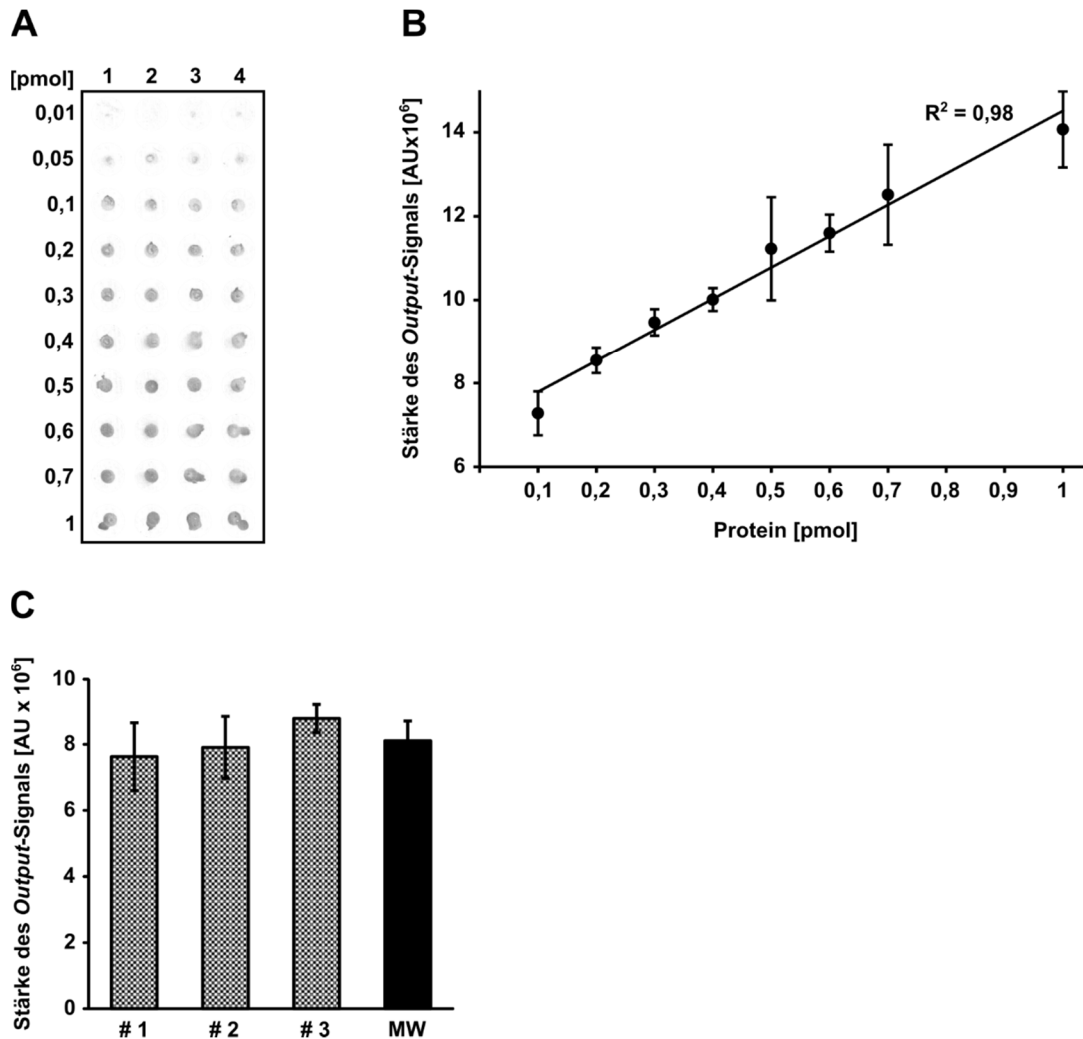


Abb. 3.6: Etablierung des „PET Surface Affinity Assays“.

(A) *Output*-Signale des „PET Surface Affinity Assays“. Ansteigende Mengen des aufgereinigten CBM-Fusionsproteins *BaCBM2-Bs2-StrepII* wurden in Vierfachbestimmung im „PET Surface Affinity Assay“ auf einer PET-Folie angewendet. Um Hintergrundsignale für die densitometrische Auswertung zu entfernen, wurde jeder Probestandpunkt ausgeschnitten. **(B)** Quantifizierung der *Output*-Signale aus (A). Die Stärke der *Output*-Signale wurde densitometrisch ermittelt und korrelierte linear mit der eingesetzten Proteinmenge zwischen 0,1 pmol und 1 pmol. **(C)** Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Drei aufgereinigte Proteinfractionen von *BaCBM2-Bs2-StrepII* (#1–#3) wurden in Sechsfachbestimmung mit je 0,1 pmol im „PET Surface Affinity Assay“ appliziert. Die Stärke der *Output*-Signale wurde densitometrisch ermittelt und die Mittelwerte graphisch dargestellt. Aus #1–#3 wurde ein Mittelwert (MW) mit einer Standardabweichung von 7,5 % errechnet.

Am Beispiel des Fusionsproteins *BaCBM2-Bs2-StrepII* wurde der „PET Surface Affinity Assay“ entwickelt. In Abb. 3.6 A ist exemplarisch ein Ergebnis dargestellt und zeigt Ausschnitte einer PVDF-Membran mit *Output*-Signalen von *BaCBM2-Bs2-StrepII*, das in verschiedenen Mengen in Vierfachbestimmung appliziert wurde. Es war deutlich zu erkennen, dass die *Output*-Signale bei geringeren Mengen schwächer waren als bei höheren Mengen. Weiter zeigte die densitometrische Auswertung der Membran eine lineare Korrelation zwischen der eingesetzten Menge des PET-Bindeproteins im Bereich von 0,1 pmol bis 1 pmol und der Stärke des *Output*-Signals (Abb. 3.6 B). Die Anwendung von mehr als 1 pmol des PET-Bindeproteins führte zu keiner weiteren linearen Steigerung und könnte auf eine Sättigung des *Output*-Signals zurückzuführen sein. Um die *Output*-Signale verschiedener Proteine miteinander vergleichen zu können, wurde überprüft, wie stark die *Output*-Signale dreier biologischer Replikate voneinander abwichen. Dazu wurden drei unabhängig aufgereinigte Proteinfractionen von *BaCBM2-Bs2-StrepII* jeweils mit gleicher Proteinmenge in Sechsfachbestimmung auf einer PET-Folie angewendet. Die *Output*-Signale wurden quantifiziert und die Mittelwerte der Proteinfractionen miteinander verglichen (Abb. 3.6 C). Diese wichen um $\pm 7,5 \%$ voneinander ab. Demzufolge deuten *Output*-Signale anderer zu untersuchender Proteine, die um mehr als 7,5 % von diesem Mittelwert abweichen auf wesentliche Unterschiede in der Bindeaffinität verglichen mit *BaCBM2-Bs2-StrepII* hin. Neben der Entwicklung des „PET Surface Affinity Assays“ zeigten die Versuche außerdem, dass das Fusionsprotein *BaCBM2-Bs2-StrepII* an PET bindet.

Der entwickelte „PET Surface Affinity Assay“ ermöglicht, in einem schnellen und unkomplizierten Verfahren qualitative und semi-quantitative Aussagen über die PET-Affinität von Proteinen zu treffen. Die Methode basiert auf dem spezifischen Nachweis von gebundenen Proteinen über ihren Affinitätstag auf einer PET-Folie. Die detaillierte Vorgehensweise ist in Abschnitt 2.4.9 beschrieben.

3.1.4 PET-Anbindungsstudien mit den CBM-Kandidaten

Nachdem alle Gene der *in silico* ausgewählten CBM-Kandidaten (vgl. 3.1.1) erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden konnten und es im weiteren Verlauf möglich war, jedes der rekombinanten Fusionsproteine durch angepasste Aufreinigungsprotokolle anzureichern (vgl. 3.1.2.1), wurden die Peptide auf ihre PET-Affinität hin untersucht. Um PET-affine Peptide zu identifizieren, wurden die CBM-Kandidaten in dem entwickelten „PET Surface Affinity Assay“ (vgl. 3.1.3, 2.4.9) appliziert. Dazu wurden die aufgereinigten Proteinfractionen der CBM-Fusionsproteine (CBM-Bs2-StrepII) sowie die der Negativkontrolle (Bs2-StrepII) auf eine PET-Folie aufgetragen. Herausfordernd war, ein geeignetes Schema zur Auftragung zu finden, da sich sowohl die Qualität der Aufreinigungen als auch die Molekulargewichte der Zielproteine, insbesondere das der Negativkontrolle zu den Fusionsproteinen unterschieden. Um eine

annähernde Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden die Proben in äquimolaren Mengen eingesetzt. Für die Berechnung wurde das Molekulargewicht des Volllängenproteins verwendet und vernachlässigt, dass sich teilweise noch weitere Proteine in der aufgereinigten Fraktion befanden. Der Versuch wurde in Triplikaten und mit steigenden Proteinmengen durchgeführt und zeigte stets die gleiche Tendenz. Wie exemplarisch in Abb. 3.7 zu sehen, wurde bei fünf der acht Fusionsproteine ein *Output*-Signal detektiert. Da die Negativkontrolle kein *Output*-Signal aufwies, konnte geschlussfolgert werden, dass die CBMs dieser fünf Fusionsproteine die Fähigkeit haben an das synthetische Polymer PET zu binden. Die Stärke der *Output*-Signale bei den PET-bindenden Fusionsproteinen variierte und deutete Unterschiede in den PET-Affinitäten an. Die abweichenden Reinheitsgrade der eingesetzten Proteinfractionen ließen in diesem Fall jedoch nur eine vorläufige Bewertung der quantitativen PET-Affinität zu. Zweifellos konnte durch diese Untersuchung hingegen eine qualitative Vorauswahl getroffen werden. Hierbei konnten CBMs in PET-bindende und nicht-bindende Peptide klassifiziert werden. *TrCBM1*, *BaCBM5* und *PaCBM10* zeigten keine PET-Bindung unter den beschriebenen Bedingungen. Ob die PET-Affinität der drei Peptide unterhalb der Detektionsgrenze lag oder ob sie PET überhaupt nicht binden, konnte in diesem Versuchsaufbau nicht unterschieden werden. Hingegen konnten *PpCBM1*, *BaCBM2*, *BsCBM2*, *B/CBM5* und *ucCBM10* als PET-bindende CBMs verifiziert werden. Das Ergebnis bestätigte somit die rationale CBM-Auswahl. Auffällig war zudem das starke *Output*-Signal von *BaCBM2*-Bs2-StreptII, was auf eine hohe PET-Affinität des CBMs hindeutete. In Kombination mit der relativ starken Expression (Abb. 3.3) erwies sich *BaCBM2* als vielversprechendster PET-Bindekandidat und wurde für weitere Studien verwendet.

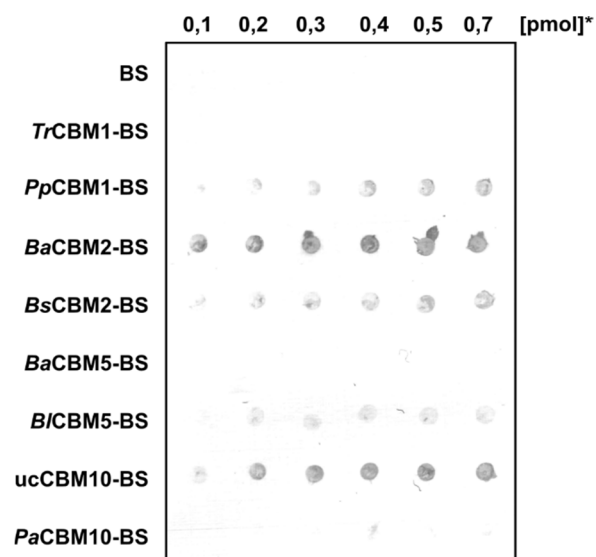


Abb. 3.7: Evaluierung der PET-Affinität von CBM-Kandidaten.

Im „PET Surface Affinity Assay“ wurden jeweils verschiedene Mengen der CBM-Fusionsproteine sowie des Kontrollproteins aus aufgereinigten Proteinfractionen eingesetzt. Dargestellt ist eine repräsentative Membran mit den *Output*-Signalen. Bs2-StreptII ist mit „BS“ abgekürzt. * Für die Berechnung konnte die unterschiedliche Qualität der aufgereinigten Proteinfractionen nicht berücksichtigt werden.

Durch Anwendung des entwickelten „PET Surface Affinity Assays“ konnten fünf der acht CBM-Kandidaten mit potentieller PET-Affinität als tatsächliche PET-bindende Peptide identifiziert werden. Insbesondere konnte *BaCBM2* als sehr gut geeignetes PET-Bindepeptid bestätigt werden.

3.1.5 Wechselwirkungen zwischen ausgewählten CBMs und PET

3.1.5.1 MD-Simulation von *TrCBM1*, *BaCBM2* und *BaCBM5* an der PET-Oberfläche

Um die Wechselwirkungen zwischen CBMs und PET *in silico* zu untersuchen, wurden *TrCBM1*, *BaCBM2* und *BaCBM5* als repräsentative CBMs aus drei verschiedenen Familien ausgewählt und an einer geordneten PET-Oberfläche simuliert (2.6.1.3). Eine Abbildung einer typischen Simulationsbox ist im Anhang zu finden (Abb. 6.2).⁴

Die Aminosäuren W27/W28/W40 von *BaCBM5* bildeten eine aromatische Triade und vermittelten π -*stacking* Interaktionen mit den Phenylgruppen von PET. Die Peptidstruktur war rigide (RMSD < 2 Å) und aufgrund intrinsischer, geometrischer Eigenschaften interagierten nur wenige Reste mit der PET-Oberfläche (Abb. 3.8 A, Abb. 6.3). Obwohl einige polare und geladene Reste nahe der PET-Oberfläche waren, hat keine der Seitenketten eine optimale Anordnung gefunden, um stabile Wasserstoffbrückenbindungen mit der PET-Oberfläche einzugehen. Die Energie blieb konstant hoch über den gesamten Simulationsverlauf (Abb. 3.8 B). Hierbei ist anzumerken, dass die Energie kleiner (negativer) ist, je stärker eine Bindung ist. Der bRMSD-Wert drückt aus, wie stark die Abweichung aller Atomkoordinaten vom letzten Ausschnitt der Simulation ist. Ein niedriger Wert deutet eine besonders stabile Konformation an. Da die hier ermittelten, niedrigen bRMSD-Werte nicht mit einer niedrigen Energie korrelierten, ließ dies den Schluss zu, dass zwar eine stabile Konformation, jedoch keine Bindung an PET vorlag. Demnach stimmten die Ergebnisse der MD-Simulation mit den *in vitro* Messungen überein, bei denen keine PET-Bindung von *BaCBM5* detektiert wurde (vgl. 3.1.4).

BaCBM2 ist im Vergleich zu *BaCBM5* nur etwas größer, weist aber eine deutlich andere Zusammensetzung der Aminosäuren auf, was zu wesentlichen Unterschieden in der PET-Interaktion führte. Hier bildeten die Aminosäuren W9/W44/W63 die aromatische Triade, wobei sich zunächst W9 und W44 sowie die umgebenden, polaren Aminosäuren der PET-Oberfläche näherten (Abb. 3.8 A, Abb. 6.4). Hierbei bildeten sie sowohl π -*stacking* Interaktionen als auch Wasserstoffbrückenbindungen aus. Durch diese initiale Bindung mit PET wurde eine Konformationsänderung in *BaCBM2* induziert, welche zusätzlich den simultanen Zugang von

⁴ Die MD-Simulationen wurden in Kooperation mit dem Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie (Jun.-Prof. Dr. Strodel) am FZ Jülich von Dušan Petrović durchgeführt.

W63 und N64 an die PET-Oberfläche ermöglichte. Dieser zweite Bindungsschritt bei ~ 25 ns verringerte die Energie signifikant. Niedrige bRMSD-Werte in Kombination mit einer niedrigen Energie deuteten hier auf eine starke PET-Bindung hin. Dies spiegelte sich in einer hohen Steigung des Energietrichters wider, während eine geringe Steigung wie bei *BaCBM5* auf eine geringe PET-Bindung hinwies (Abb. 3.8 B).

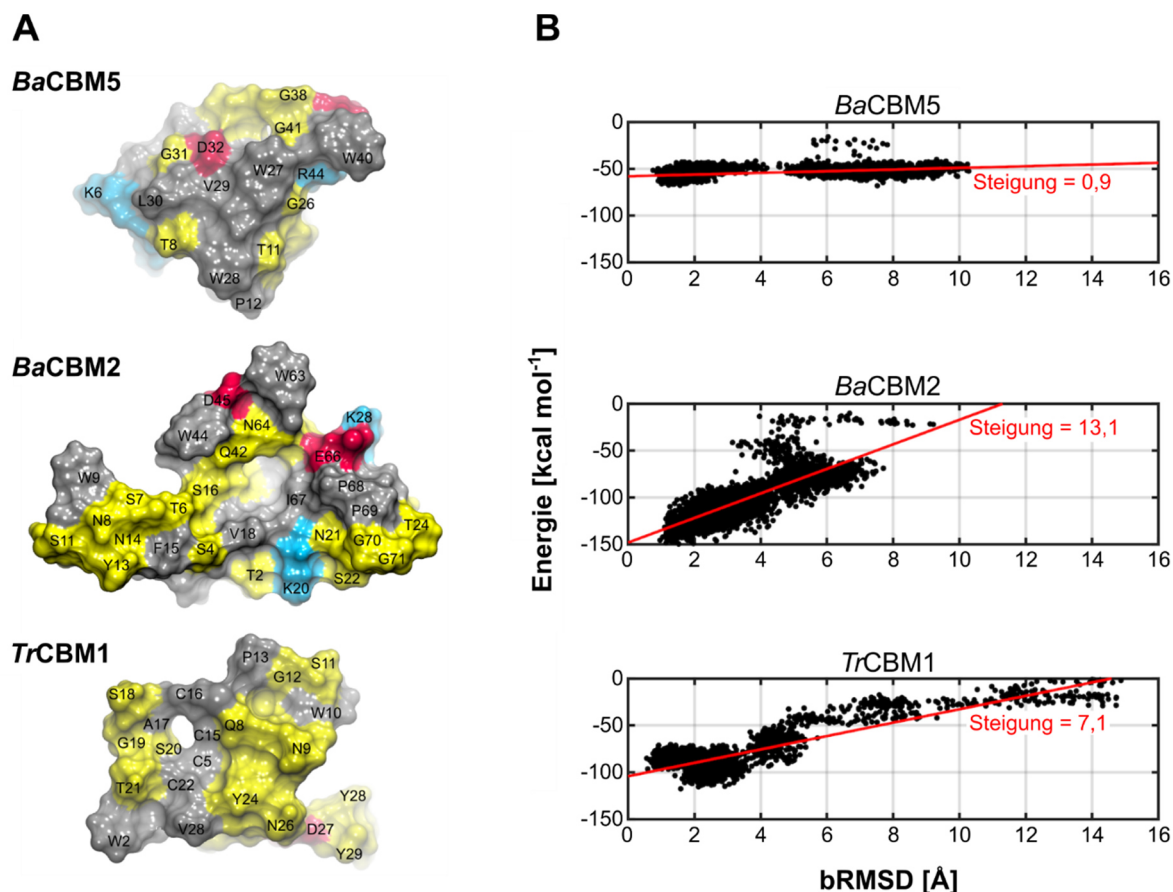


Abb. 3.8: MD-simierte Wechselwirkungen von *BaCBM5*, *BaCBM2* und *TrCBM1* an der PET-Oberfläche.⁵

(A) Computerbasierte Vorhersage von Resten mit direktem Kontakt zu PET. Zu sehen sind die Proteine aus dem Blickwinkel der PET-Oberfläche. Hydrophobe Reste sind grau, polare Reste gelb, saure Reste rot und basische Reste blau dargestellt. (B) Trichterförmige CBM-PET Energielandschaften. Jeder schwarze Punkt stellt die Abweichung aller Atomkoordinaten vom letzten Ausschnitt der Simulation dar (bRMSD). Die Energie ist die Summe der beteiligten Van-der-Waals- und elektrostatischen Kräfte. Die Steigung der Energietrichter ist jeweils in Rot dargestellt.

Bei *TrCBM1* war die aromatische Triade (W2/Y28/Y29), welche durch die Homologie-modellierung vorhergesagt wurde, nicht in π -stacking Interaktionen mit PET involviert. Obwohl Y28 und Y29 zunächst nah an der PET-Oberfläche waren, lösten sich diese wieder schnell von PET. Nach einer strukturellen Neuordnung von *TrCBM1* bildete sich eine neue aromatische Triade bestehend aus W2/W10/Y24. Dabei war W10 von PET zu weit entfernt,

⁵ Die Abbildungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie (Jun.-Prof. Dr. Strodel) am FZ Jülich von Dušan Petrović erstellt.

um starke π -*stacking* Interaktionen mit PET zu bilden. Im Gegensatz zu der sehr hydrophoben Kontaktoberfläche von *BaCBM5* oder der gleichmäßig hydrophoben und polaren Oberfläche von *BaCBM2*, stellte sich die Kontaktfläche von *TrCBM1* als stark polar dar (Abb. 3.8 A, Abb. 6.5). Wie die graphische Darstellung der Energie in Abb. 3.8 B zeigt, war die Bindung von *TrCBM1* und PET nicht so stark wie die von *BaCBM2* und PET. Während der Energietrichter von *TrCBM1* dem von *BaCBM2* ähnelte, war die Steigung flacher. Darüber hinaus war *TrCBM1* in Wasser (ohne PET-Oberfläche) sehr flexibel und es fehlte eine klar definierte Form und Sekundärstruktur. Abgesehen von der transienten Helix zwischen 40 ns und 50 ns, konnten keine stabilisierenden, intramolekularen Interaktionen identifiziert werden (Abb. 6.6 A). Die Präsenz der PET-Oberfläche hingegen induzierte eine Konformationsänderung in *TrCBM1*. Im PET-gebundenen Zustand faltete *TrCBM1* ein stabiles β -Faltblatt, resultierend aus π -*stacking* Interaktionen von W2 und Y24 mit der PET-Oberfläche (Abb. 6.6 B). Trotz der Wechselwirkungen von *TrCBM1* mit PET, die in den MD-Simulationen vorhergesagt wurden, konnte *in vitro* keine PET-Bindung unter den verwendeten, experimentellen Bedingungen beobachtet werden (vgl. 3.1.4).

Die untersuchten CBMs unterschieden sich *in silico* deutlich in ihrer Wechselwirkung mit PET. Während *TrCBM1* eine stark polare und *BaCBM5* eine hydrophobe Kontaktfläche zu PET aufwies, zeigte *BaCBM2* ein ausgewogenes Verhältnis von hydrophoben und polaren Kontaktflächen. Die hohe Steigung des Energietrichters von *BaCBM2* deutete eine starke PET-Bindung an. An der CBM-PET Wechselwirkung waren sowohl π -*stacking* Interaktionen als auch Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt.

3.1.5.2 Einfluss von Tryptophan-Resten

Um die Hypothese zu verifizieren, dass Tryptophan-Reste der CBMs an der Interaktion mit PET beteiligt sind, wurde eine Tryptophan-*Quenching* Methode (2.4.11) unter Verwendung des PET-Bindepeptids *BaCBM2* (vgl. 3.1.4) und PET-Nanopartikeln etabliert. Die Tryptophan-Fluoreszenz von Proteinen wird stark von der Polarität der Umgebung beeinflusst und Vorgänge, welche sich auf die lokale Umgebung des Indolrings auswirken, können das Emissionsmaximum verschieben sowie die Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz verändern (Ghisaidoobe und Chung, 2014; Möller und Denicola, 2002). Solche Vorgänge können Veränderungen der Proteinkonformation, die Bindung von Untereinheiten und Liganden oder eine Denaturierung sein (Möller und Denicola, 2002). Hier wurde die Tryptophan-Fluoreszenz von aufgereinigtem *BaCBM2*-Bs2-StreptII (3.1.2.1) bei kontinuierlicher Zugabe von PET-Nanopartikeln (in Suspension mit dH₂O; 2.5.1) gemessen. Zur Auswertung wurde zum einen die Eigenfluoreszenz der PET-Nanopartikel bei steigender Konzentration berücksichtigt. Zum anderen wurde die Tryptophan-Fluoreszenz von aufgereinigtem *BaCBM2*-Bs2-StreptII bei kontinuierlicher Zugabe von dH₂O dokumentiert, um auch den Verdünnungseffekt durch

Zugabe der PET-Nanopartikel einzuberechnen. Auf diese Weise ließ sich die detektierte Änderung in der Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz auf Tryptophan-*Quenching* zurückführen. Die graphische Analyse der Daten stellt die normalisierte Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Menge an PET-Nanopartikeln dar (Abb. 3.9). Je mehr PET-Nanopartikel sich in der Proteinlösung befanden, desto stärker änderte sich die normalisierte Tryptophan-Fluoreszenz, bis es zu einer Sättigung bei ≥ 60 ng PET kam. Dieses experimentelle Ergebnis deutete an, dass Tryptophan-Reste des *BaCBM2*-Fusionsproteins mit PET-Nanopartikeln interagierten. Darüber hinaus konnte mit Hilfe dieser Methode eine Dissoziationskonstante K_d von 25,44 $\mu\text{g/L}$ ermittelt werden.

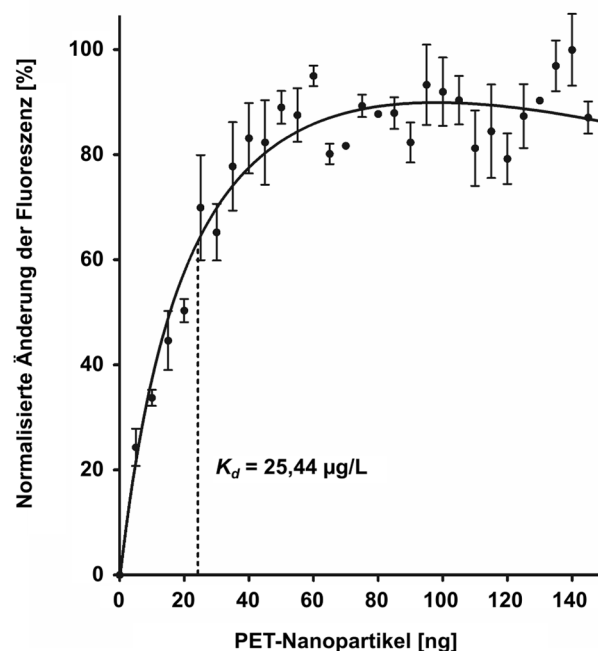


Abb. 3.9: Tryptophan-*Quenching* von *BaCBM2*-Bs2-StreptII durch PET-Nanopartikel.

Die gestrichelte Linie gibt den kalkulierten K_d von 25,44 $\mu\text{g/L}$ an. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung ist in Abschnitt 2.4.11 zu finden.

Die Wechselwirkung zwischen dem *BaCBM2*-Fusionsprotein und PET konnte über Tryptophan-*Quenching* gemessen werden und deutete an, dass Tryptophan-Reste des *BaCBM2*-Fusionsproteins mit PET-Nanopartikeln interagierten. Zudem ermöglichte die Methode eine Dissoziationskonstante von dem PET-Bindeprotein und dem synthetischen Polymer zu bestimmen.

3.1.6 Rationale Peptidmodifizierung zur Steigerung der PET-Affinität

Im Hinblick auf die biotechnologische Anwendung von Polymer-bindenden Peptiden sollte die PET-Affinität eines in Abschnitt 3.1.4 identifizierten PET-Bindepeptids synthetisch gesteigert werden. Hierfür wurde *BaCBM2* ausgewählt und Varianten basierend auf Erkenntnissen aus Abschnitt 3.1.5 zunächst *in silico* konstruiert. Anhand der Kontaktkarte (Abb. 6.4) wurde

ermittelt, welche Aminosäuren nahe der aromatischen Triade (W9/W44/W63) von *BaCBM2* ebenfalls mit PET interagierten. Solche Aminosäuren wurden dann entweder durch Tryptophane oder polare Aminosäuren ersetzt, um zusätzliche π -stacking Interaktionen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen zu ermöglichen. In einer weiteren Variante wurde W63 gegen ein Tyrosin getauscht, da der Austausch W68Y in CBM_{CenA} in Fusion mit einer Cutinase zu einer erhöhten Bindung von PET und hydrolytischen Aktivität führte (Zhang et al., 2013). Dies wurde auf neu gebildete Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Tyrosin und PET zurückgeführt (Zhang et al., 2013). Weiter bestätigte dies das Ergebnis der MD-Simulationen dieser Arbeit (vgl. 3.1.5.1), dass neben den π -stacking Interaktionen noch weitere Kräfte an der CBM-PET Wechselwirkung beteiligt sind. Hier wurde untersucht, ob der Effekt des Austauschs in CBM_{CenA} mit der aromatischen Triade W14/W50/W68 auf *BaCBM2* mit der aromatischen Triade W9/W44/W63 übertragen werden kann. Insgesamt wurden fünf Varianten (als Varianten_{opt} bezeichnet) mit folgenden Aminosäureaustauschen konstruiert: (1) T24W, (2) V18W_T24W, (3) S11R_D45N, (4) S11R_V18W_T24W_D45N und (5) W63Y.⁶ Um darüber hinaus den Einfluss der aromatischen Triade auf die PET-Bindung nachzuweisen, wurden Varianten mit potentiell geringerer PET-Affinität konstruiert (als Varianten_{red}

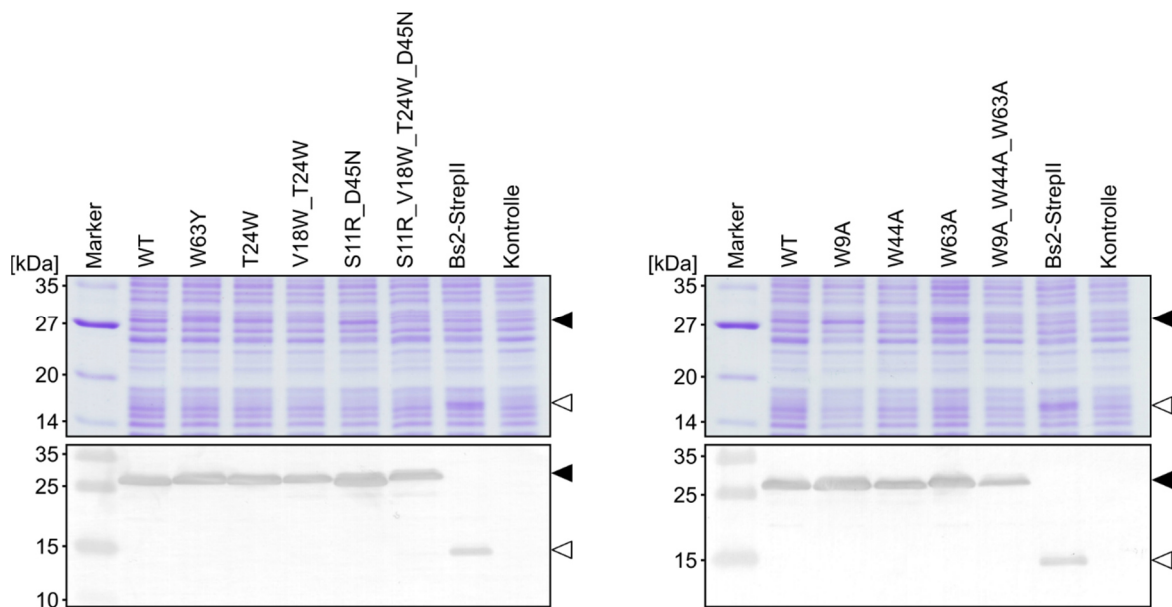


Abb. 3.10: SDS-Gele (oben) und Western Blots (unten) mit Varianten des *BaCBM2*-Fusionsproteins sowie Bs2-StrepII im Rohextrakt.

Aufgetragen wurden jeweils 7 μ g (SDS-Gel) bzw. 15 μ g (Western Blot) denaturiertes Gesamtprotein. In der Spur „Kontrolle“ wurde Rohextrakt aus *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET-22b(+)] aufgetragen. Die spezifische Detektion der Proteine im Western Blot erfolgte über den Strep-tag® II. Die Probenbezeichnung steht jeweils für eine entsprechende Proteinfraction aus *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] mit pET-22b(+)_*BaCBM2*-Bs2-StrepII (WT), mit den angegebenen Austauschen in *BaCBM2* oder mit pET-22b(+)_Bs2-StrepII (Bs2-StrepII). Schwarze Pfeile markieren das *BaCBM2*-Fusionsprotein sowie dessen Varianten (~ 26 kDa) und weiße Pfeile markieren Bs2-StrepII (16,8 kDa).

⁶ Die *in silico* Konstruktion der *BaCBM2*-Varianten 1–4 wurde in Kooperation mit dem Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie (Jun.-Prof. Dr. Strodel) am FZ Jülich von Dušan Petrović durchgeführt.

bezeichnet). Dazu wurden die Tryptophane der aromatischen Triade durch Alanine ersetzt: (1) W9A, (2) W44A, (3) W63A und (4) W9A_W44A_W63A. Alanin ist eine schwach polare Aminosäure, welche bereits in CBM-Varianten zur Aufklärung der strukturellen Basis für die Affinität von CBMs zu Polysacchariden eingesetzt wurde (Bharali et al., 2007; Cai et al., 2011; Strobel et al., 2015).

Zur Generierung der *BaCBM2*-Varianten wurden gezielt Mutationen in das Expressionsplasmid pET-22b(+)_*BaCBM2*-Bs2-StrepII (Tab. 2.7) eingeführt und *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] mit den Plasmiden transformiert. Alle Gene konnten erfolgreich durch Kultivierung der Transformanten im Autoinduktionsmedium exprimiert werden und die rekombinanten Proteine spezifisch mittels Western Blot Analysen im Rohextrakt der aufgeschlossenen *E. coli* Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Dagegen wurde bei der Negativkontrolle mit Rohextrakt von *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET-22b(+)] kein Protein detektiert. Wie SDS-Gele in Abb. 3.11 zeigen, war es außerdem möglich, alle Varianten mit dem etablierten Aufreinigungsprotokoll für das wildtypische *BaCBM2*-Fusionsprotein (WT) (2.4.8) aufzureinigen. Neben den CBM-Fusionsproteinen mit einer kalkulierten molekularen Masse von ~ 26 kDa, war in jeder Spur noch eine weitere Bande zu erkennen, welche auf das BCCP (22,5 kDa) aus *E. coli* zurückgeführt werden könnte (vgl. 3.1.2.1). Des Weiteren wiesen die Spuren der aufgereinigten Proteinfraktionen von Varianten mit den Austauschen T24W, V18W_T24W und S11R_V18W_T24W_D45N schwache Banden unterhalb des Volllängenproteins auf. Diese liefen auf gleicher Höhe wie die Bande des aufgereinigten Kontrollproteins Bs2-StrepII und deuteten daher eine Abspaltung von Bs2-StrepII an.

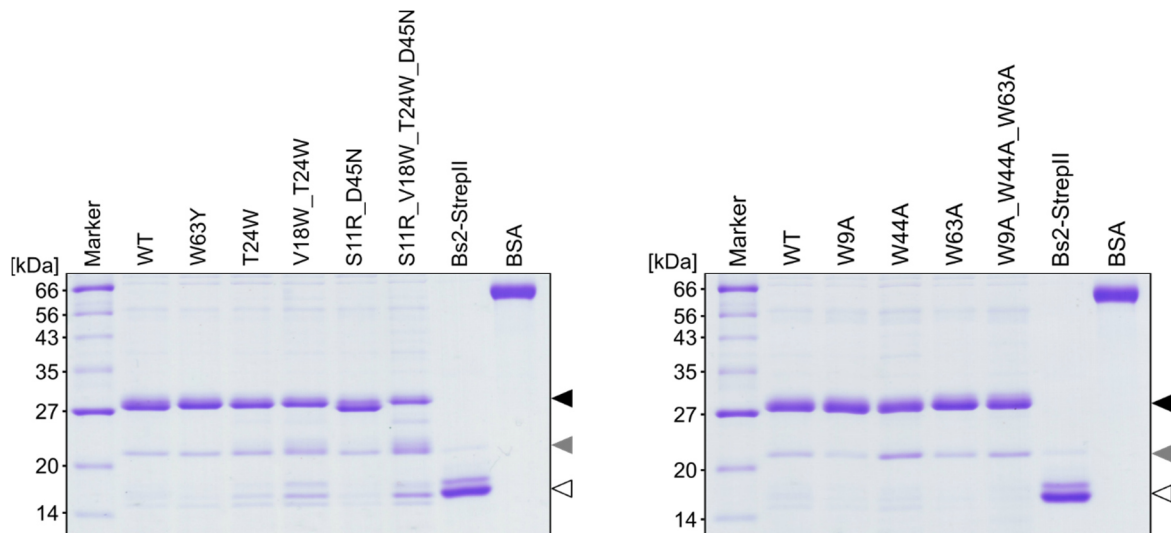


Abb. 3.11: SDS-Gele mit Varianten des *BaCBM2*-Fusionsproteins sowie Bs2-StrepII in aufgereinigten Proteinfraktionen.

Aufgetragen wurden jeweils 2 µg denaturiertes Protein der aufgereinigten Proteinfraktion sowie in der letzten Spur 2 µg BSA. Die Probenbezeichnung steht jeweils für eine entsprechende Proteinfraktion aus *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] mit pET-22b(+)_*BaCBM2*-Bs2-StrepII (WT), mit den angegebenen Austauschen in *BaCBM2* oder mit pET-22b(+)_Bs2-StrepII (Bs2-StrepII). Schwarze Pfeile markieren das *BaCBM2*-Fusionsprotein und dessen Varianten (~ 26 kDa), weiße Pfeile markieren Bs2-StrepII (16,8 kDa) und graue Pfeile markieren das BCCP aus *E. coli* (22,5 kDa).

Als Nächstes wurden die PET-Affinitäten der *BaCBM2*-Varianten im „PET Surface Affinity Assay“ (2.4.9) verglichen. Um die Varianten_{opt}, die Varianten_{red}, den WT (*BaCBM2*-Bs2-StrepII) sowie die Kontrolle (Bs2-StrepII) trotz unterschiedlicher Molekulargewichte untereinander vergleichen zu können, wurden äquimolare Mengen in vier technischen Replikaten auf PET-Folien aufgetragen. Für die Berechnung wurde das Molekulargewicht des Volllängenproteins verwendet und vernachlässigt, dass sich noch weitere Proteine in der aufgereinigten Fraktion befanden. Jedes Experiment wurde als Duplikat durchgeführt und führte zu Ergebnissen mit gleicher Tendenz. In Abb. 3.12 sind jeweils normierte Mittelwerte der densitometrisch ausgewerteten *Output*-Signale eines Versuchs dargestellt und in Relation zum WT gesetzt, dessen *Output*-Signale in vorangegangenen Untersuchungen eine Standardabweichung von $\pm 7,5\%$ bei Vergleich dreier aufgereinigter Proteinfractionen zeigte (vgl. 3.1.3). Demnach unterschieden sich zwei der Varianten_{opt} neben der Negativkontrolle deutlich vom WT, da sie in der *Output*-Signalstärke um mehr als $7,5\%$ vom WT abwichen. Interessanterweise war eine dieser Varianten *BaCBM2*_S11R_D45N-Bs2-StrepII und deutete eine gesteigerte PET-Affinität an. Hingegen wies keine der Tryptophan- bzw. Tyrosin-Austausch-Varianten ein stärkeres *Output*-Signal auf. Das *Output*-Signal der Variante *BaCBM2*_V18W_T24W-Bs2-StrepII war sogar um mehr als $7,5\%$ schwächer als das vom WT. Wie erwartet, war auch die *Output*-Signalstärke aller Varianten_{red} deutlich geringer als die vom WT, wobei sich die Werte der Varianten mit Einzelaustauschen ähnelten und der Wert der Kombinationsvariante einen synergistischen Effekt aufzeigte. Hieraus konnte geschlussfolgert

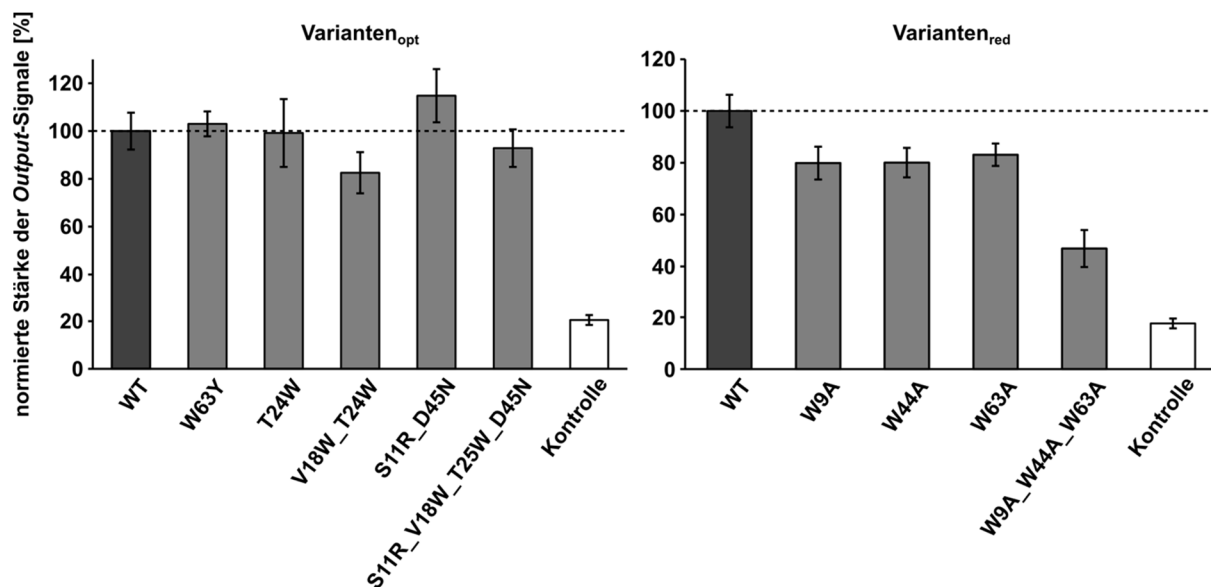


Abb. 3.12: Vergleich der PET-Affinität von Varianten des *BaCBM2*-Fusionsproteins.

Im „PET Surface Affinity Assay“ wurden jeweils 0,1 pmol der aufgereinigten Proteinfractionen des *BaCBM2*-Fusionsproteins (WT), von dessen Varianten und von Bs2-StrepII (Kontrolle) in Vierfachbestimmung eingesetzt. Die *Output*-Signale wurden densitometrisch quantifiziert, auf die Signalstärke des WT normiert und graphisch dargestellt. Die angegebene Probenbezeichnung der Varianten steht jeweils für die Aminosäureaustausche in *BaCBM2*. Die gestrichelte Linie markiert die Signalstärke vom WT.

werden, dass die PET-Affinität der Varianten_{red} gegenüber dem WT verringert war. Dieses Ergebnis stimmte mit den Erkenntnissen aus Abschnitt 3.1.5 überein und bestätigte, dass die nativen, exponierten Tryptophane des *BaCBM2* an der PET-Bindung beteiligt sind. Anhand der Daten aus dem „PET *Surface Affinity Assay*“ konnten also erste Tendenzen in der PET-Affinität von *BaCBM2*-Varianten ermittelt werden.

Um die Ergebnisse durch eine andere Messmethode zu bestätigen, wurde die *MicroScale* Thermophorese (2.4.12) angewendet, bei der Protein-Ligand Interaktionen über das thermophoretische Verhalten eines Fluoreszenz-markierten Interaktionspartners gemessen werden können. In diesem Fall wurde dazu das Flavin-basierte Fluoreszenzprotein Bs2 verwendet, welches bereits fusioniert an alle *BaCBM2*-Varianten vorlag und nun erstmals in *MicroScale* Thermophorese-Experimenten eingesetzt wurde. Für die Etablierung des Messsystems wurde die WT-Sequenz von *BaCBM2* verwendet. Zunächst wurde festgestellt, dass das Fluoreszenzspektrum von Bs2 (Drepper et al., 2007) nicht optimal zu dem Filterset des Messgeräts passt. Zudem kann das Fluoreszenzspektrum nicht durch eine Veränderung des pH-Werts oder der Ionenstärke verschoben werden (persönliche Mitteilung, Thomas Drepper, Institut für Molekulare Enzymtechnologie am FZ Jülich). Um trotzdem bei Proteinkonzentration von 50 nM bis 200 nM eine ausreichende Fluoreszenzintensität für die Messung zu erreichen, war eine hohe LED-Stärke (50–70 %) nötig. Diese führte allerdings zu einem sehr starken *Photobleaching* infolgedessen keine Auswertung möglich war. Die Verwendung eines neueren Gerätemodells mit sensitiverem Detektor und leicht verändertem Filterspektrum konnte das *Photobleaching* etwas verringern, jedoch das System nicht grundlegend stabilisieren. Der Einsatz eines „Monolith Anti Photobleach Kit's“ verstärkte das *Photobleaching*. In einem weiteren Ansatz wurde die LED-Stärke reduziert (15–20 %) und gleichzeitig mehr Protein (0,4–1 µM) eingesetzt, um auf diese Weise das *Photobleaching* zu reduzieren. Dies ist unproblematisch, solange die Proteinkonzentration unter dem K_d -Wert bleibt. Hier war die Proteinkonzentration aber vermutlich höher, da die Ligandenkonzentration, in diesem Fall die der PET-Nanopartikel, mit ≤ 1 mg/mL offenbar nicht mehr gesättigt war. Dies ist für die Messung einer spezifischen Bindung unabdingbar. Bei Erhöhung der Konzentration auf bis zu 4 mg/mL präzipitierten die PET-Nanopartikel und ihre Eigenfluoreszenz war so hoch, dass sie die vom Bs2 überdeckte. Aufgrund der beschriebenen Problematik wurde das Bs2 der CBM-Fusionsproteine durch das breit angewendete eGFP (Tsien, 1998) ersetzt (2.1.4.2), dessen Fluoreszenzspektrum besser zu dem Filter passt. Trotz der Verwendung verschiedener *E. coli* Stämme (*E. coli* BL21 (DE3) [pLysS], *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) [pRARE2]), Medien (LB, TB) und Induktionsparametern (Autoinduktion, IPTG) konnte kaum rekombinantes Zielprotein synthetisiert werden. Die über den *Strep-tag*® II aufgereinigte Proteinfraction enthielt abgebautes Zielprotein und fluoreszierte nicht bei Anregung mit blauem Licht, sodass dieser Fluoreszenzmarker nicht für die Messung der PET-Affinität von *BaCBM2*

verwendet werden konnte. Wie sich herausstellte, erfordert diese Methode zur Bestimmung von PET-Affinitäten verschiedener *BaCBM2*-Varianten viele Schritte bis zur erfolgreichen Etablierung eines stabilen Systems mit reproduzierbaren Ergebnissen. Im Rahmen dieser Arbeit war es zwar nicht möglich die Messmethode vollständig zu etablieren, die Erkenntnisse können aber zur Entwicklung eines stabilen Messsystems beitragen.

Neben der *MicroScale* Thermophorese wurde ebenfalls über das Tryptophan-*Quenching* versucht die PET-Affinität verschiedener Varianten zu quantifizieren, da durch die Methode bereits eine Dissoziationskonstante für den WT ermittelt werden konnte (vgl. 3.1.5.2). Bei Messung der Varianten wurden jedoch Kurvenverläufe ermittelt, die keine Bestimmung von Dissoziationskonstanten zuließen und somit im Vergleich zum WT nicht interpretierbar waren.

Auf rationaler Basis wurden *BaCBM2*-Varianten generiert, welche sowohl eine erhöhte als auch eine verringerte PET-Affinität gegenüber dem WT aufwiesen. Zur Evaluierung der PET-Affinitäten wurden mehrere Methoden getestet. Durch den „PET Surface Affinity Assay“ konnten die PET-Affinitäten semi-quantitativ bestimmt werden, wobei eine Variante (*BaCBM2_S11R_D45N*) eine erhöhte PET-Affinität und alle Varianten_{red} eine geringere PET-Affinität als der WT zeigten. Darüber hinaus wurden initiale Schritte zur Etablierung der *MicroScale* Thermophorese als Quantifizierungsmethode für CBM-PET Interaktionen durchgeführt. Ein stabiles Messsystem konnte hier jedoch noch nicht entwickelt werden. Auch durch das Tryptophan-*Quenching* konnte die PET-Affinität der Varianten nicht quantifiziert werden.

3.1.7 Anwendung des PET-bindenden Peptids *BaCBM2*

3.1.7.1 Funktionalisierung von PET mit TEMs

Ein mögliches Anwendungsfeld von PET-bindenden Peptiden stellt die Veredelung von Textilfasern mit funktionalen Bausteinen wie TEMs dar (vgl. 1.1.2, „FuPol“-Projekt). Zur Entwicklung eines Verfahrens für diese Funktionalisierung wurde hier erstmals das PET-bindende *BaCBM2* (vgl. 3.1.4) als Verbindungsstück zwischen dem synthetischen Polymer und den expansiven Kapseln angewendet. Um die TEMs mit dem Peptid zu verknüpfen, wurde durch „FuPol“-Projektpartner (Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP in Potsdam, Prof. Dr. Böker, Benjamin Stomps) eine Synthesereaktion entwickelt, in der die TEMs über eine nukleophile Substitution, ähnlich zur Pinner-Reaktion, an das Peptid geknüpft werden können. Diese Konjugatsynthese kann unter Abspaltung von NH_4^+ zwischen Nitrilgruppen auf der Oberfläche von TEMs und Schwefelatomen von Cystein-Resten der Peptide stattfinden (Abb. 3.13).

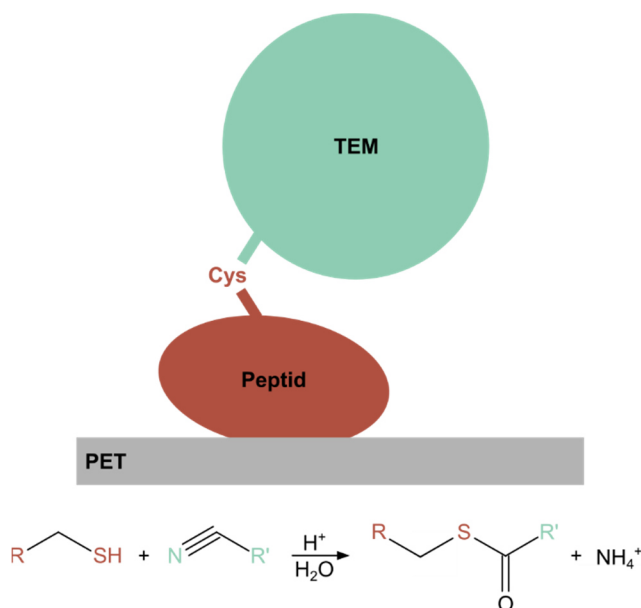


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Funktionalisierung von PET mit TEMs und Reaktion der Konjugatsynthese.

Durch Integration eines Cysteins in das Cystein-freie Protein *BaCBM2-Bs2-StrepII* (hier an den N-Terminus) war es möglich, den Ort der Verknüpfung gezielt zu bestimmen. Daher wurde zunächst *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] mit dem modifizierten Plasmid pET-22b(+)_{cBaCBM2-Bs2-StrepII} (Tab. 2.7) transformiert. Für die Expression wurden die Zellen im Autoinduktionsmedium kultiviert und das Zielprotein aus dem Rohextrakt aufgeschlossener *E. coli* Zellen aufgereinigt. Da die Konjugatsynthese einen sauren pH-Wert erfordert, wurde geprüft, ob eine Inkubation von *cBaCBM2-Bs2-StrepII* bei pH 3 die PET-Affinität verringert oder das Protein degradiert. Dazu wurde das aufgereinigte Protein für mehrere Stunden bei pH 3 gelagert und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Danach wurde der pH-Wert in diesen Proben wieder auf pH 7 eingestellt. Der Kontrollansatz enthielt ebenfalls das aufgereinigte Protein, wurde jedoch bei pH 7, statt bei pH 3 behandelt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (2.4.3) und „PET Surface Affinity Assay“ (2.4.9) untersucht. Das SDS-Gel zeigte, dass das Protein durch Lagerung bei pH 3 nicht degradiert wurde, da keine der untersuchten Proben Abbaubanden unterhalb der Zielproteinbande (26 kDa) aufwiesen (Abb. 3.14 A). Auch war im „PET Surface Affinity Assay“ keine Veränderung der PET-Affinität des Proteins nach Behandlung bei pH 3 ersichtlich (Abb. 3.14 A).

Als Nächstes wurden die TEMs mit Hilfe der auf der Pinner-Reaktion basierenden Verknüpfungsreaktion kovalent an das aufgereinigte *cBaCBM2-Bs2-StrepII* gebunden (2.4.13).⁷ Um den Erfolg der Synthese zu überprüfen, wurde ein *Proof-of-Principle* der PET-Funktionalisierung mit TEMs durchgeführt. Das Konjugat (TEM-*cBaCBM2-Bs2-StrepII*) sowie

⁷ Die Verknüpfungsreaktion wurde in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Prof. Dr. Böker) in Potsdam von Benjamin Stomps durchgeführt („FuPol“-Projektpartner).

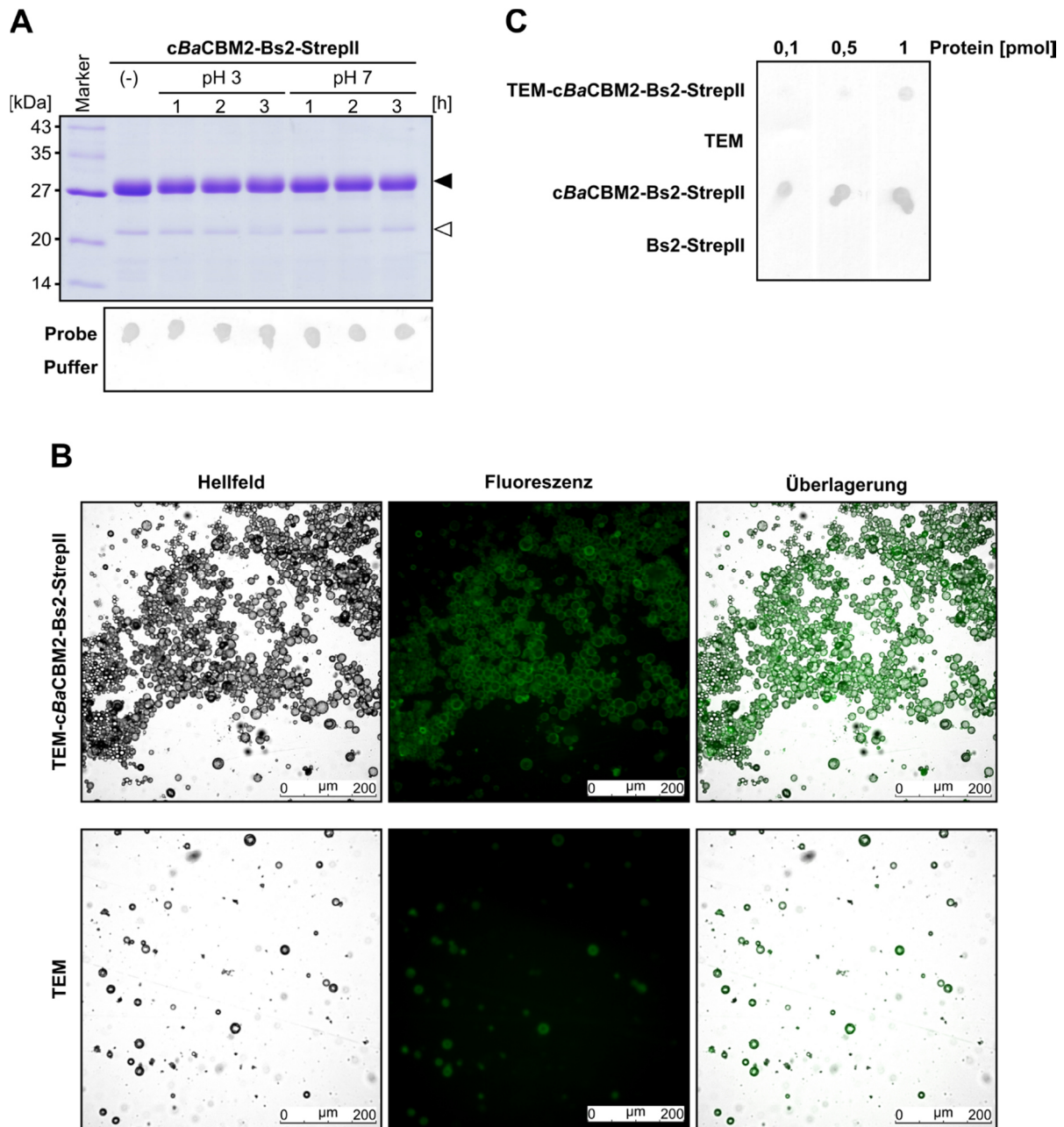


Abb. 3.14: Funktionalisierung von PET mit TEMs.

(A) Untersuchung von *cBaCBM2-Bs2-StrepII* nach Inkubation in saurem pH. Das aufgereinigte Protein *cBaCBM2-Bs2-StrepII* wurde bei RT jeweils für 3 h bei pH 3 bzw. bei pH 7 (Kontrolle) inkubiert. Stündlich wurde eine Probe entnommen und der pH-Wert wieder auf pH 7 eingestellt. Als weitere Kontrolle wurde unbehandeltes *cBaCBM2-Bs2-StrepII*, als „(-)“ bezeichnet analysiert. Im SDS-Gel (oben) wurden jeweils 3 μg Protein der Proben aufgetragen. Der schwarze Pfeil markiert *cBaCBM2-Bs2-StrepII* (26 kDa) und der weiße Pfeil BCCP aus *E. coli* (22,5 kDa). Im „PET Surface Affinity Assay“ (unten) wurde jeweils 1 pmol (in 2,5 μL) Protein bzw. 2,5 μL des jeweiligen Puffers zur Kontrolle eingesetzt. Dargestellt ist die Membran mit den *Output*-Signalen. **(B)** Mikroskopieaufnahmen von funktionalisiertem PET mit TEMs.⁸ TEM-*cBaCBM2-StrepII* (Konjugat) bzw. TEMs ohne Protein (Kontrolle) wurden auf eine gereinigte PET-Folie aufgetragen und die PET-Folie nach 20 min Inkubation mit dH₂O gespült. Bei der Mikroskopie wurden die PET-Folien jeweils mit Durchlicht (Hellfeld) bzw. mit einem DAPI-Filter (Fluoreszenz) betrachtet. Zu sehen ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt der PET-Folien. **(C)** Untersuchung der PET-Affinität des Konjugats. Im „PET Surface Affinity Assay“ wurden

⁸ Die Mikroskopieaufnahmen wurden in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Prof. Dr. Böker) in Potsdam von Benjamin Stomps erstellt („FuPol“-Projektpartner).

jeweils 0,1 pmol, 0,5 pmol und 1 pmol Protein des Konjugats TEM-cBaCBM2-StrepII sowie verschiedener Kontrollen eingesetzt. Da die Kontrolle „TEM“ kein Protein enthielt, wurden die gleichen Verdünnungen wie beim Konjugat aufgetragen. Dargestellt sind Ausschnitte der *Output*-Signale einer Membran.

die Negativkontrolle (TEM ohne Protein) wurden auf gereinigte PET-Folien aufgetragen. Nach einer definierten Inkubationszeit wurden die PET-Folien gespült und mikroskopiert (Abb. 3.14 B). Auf beiden PET-Folien wurden TEMs beobachtet, wobei deren Partikelgröße mit den Herstellerangaben zu nicht-expandierten TEMs von 10 µm bis 16 µm übereinstimmte. Bei Vergleich der Aufnahmen war zu erkennen, dass sich bei dem Konjugat wesentlich mehr TEMs auf der PET-Oberfläche befanden als bei der Kontrolle. Zudem waren die TEMs des Konjugats im Gegensatz zu denen der Kontrolle nicht gleichmäßig auf der PET-Oberfläche verteilt, sondern traten agglomeriert auf. Die TEMs des Konjugats wiesen demnach ein verändertes Verhalten gegenüber den TEMs der Kontrolle auf und ließen den Schluss auf eine erfolgreiche Synthese zu. Über die Fluoreszenz des Fluoreszenzmarkers Bs2 war es nicht möglich, Protein-gebundene TEMs von ungebundenen TEMs zu unterscheiden, da die TEMs ebenfalls fluoreszierten. Trotzdem lieferten die Mikroskopiebilder den erfolgreichen Machbarkeitsbeweis der Funktionalisierung von PET mit TEMs unter Verwendung des PET-bindenden Peptids BaCBM2.

Zusätzlich wurde mittels des „PET Surface Affinity Assays“ nachgewiesen, dass das an TEM-gebundene cBaCBM2-Bs2-StrepII weiterhin an PET binden konnte (Abb. 3.14 C). Es fiel jedoch auf, dass bei dem Konjugat (TEM-cBaCBM2-Bs2-StrepII) ein schwächeres *Output*-Signal als bei der Kontrolle (cBaCBM2-Bs2-StrepII ohne TEM), bei gleicher applizierter Proteinmenge detektiert wurde. Ob die TEMs selbst keine Affinität zu PET aufwiesen, konnte aus diesem Versuch nicht geschlussfolgert werden, da die TEMs keinen *Strep-tag*® II zur Detektion trugen.

In dieser ersten Machbarkeitsstudie konnte BaCBM2 erfolgreich zur Funktionalisierung von PET mit TEMs angewendet werden. Das Fusionsprotein cBaCBM2-Bs2-StrepII konnte über eine nukleophile Substitutionsreaktion an TEMs gebunden werden. Die Bedingungen der chemischen Reaktion hatten keinen Einfluss auf die PET-Affinität und führten nicht zum Abbau des Proteins. An TEM-gebundenes cBaCBM2-Bs2-StrepII wies weiterhin eine PET-Affinität auf, sodass TEMs über die PET-Bindung des Proteins auf PET fixiert werden konnten.

3.1.7.2 Detektion von PET-Nanopartikeln in wässrigen Systemen

Neben der Funktionalisierung von PET wurde das PET-bindende Peptid BaCBM2 (vgl. 3.1.4) bei der Entwicklung eines analytischen Nachweisverfahrens von Nanoplastik in wässrigen Systemen angewendet. Um das Nanoplastik im Labor nachzustellen, wurden chemisch hergestellte PET-Nanopartikel (Durchmesser ~ 100 nm) (2.5.1) verwendet. Grundidee der zu

entwickelnden Methode war, dass eine wässrige Testlösung unter Zugabe von *BaCBM2* durch eine Filtermembran gedrückt wird. Befinden sich PET-Nanopartikel in der Lösung, werden diese von *BaCBM2* gebunden. An PET-gebundenes *BaCBM2* wird aufgrund der Größe der PET-Nanopartikel auf der Filtermembran zurückgehalten und kann spezifisch nachgewiesen werden. Enthält die Testlösung keine PET-Nanopartikel, wird das *BaCBM2* hingegen durch die Filtermembran gedrückt und kann somit auch nicht auf der Filtermembran detektiert werden.

Für die Umsetzung dieses Biosensors wurde das *BaCBM2* mit der Alkalischen Phosphatase PhoA aus *E. coli* fusioniert, sodass über die Enzymaktivität des Fusionsproteins selbst der spezifische Nachweis erfolgen konnte. Da die Proteinstruktur der Alkalischen Phosphatase Disulfidbrücken enthält, wurde PhoA für eine periplasmatische Lokalisation mit einem Signalpeptid an den N-Terminus von *BaCBM2* fusioniert. In einem weiteren Ansatz wurde PhoA an den C-Terminus von *BaCBM2* zur cytoplasmatischen Synthese fusioniert. Nach Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] mit den Plasmiden pET-22b(+)_spAlgL-phoA-*BaCBM2*-StrepII, pET-22b(+)_ *BaCBM2*-phoA-StrepII und pET-22b(+)_spAlgL-phoA-StrepII (Kontrolle) (2.1.4.2), wurden die Gene der Fusionsproteine exprimiert und die Proteine über den *Strep*-tag® II aus den entsprechenden *E. coli* Rohextrakten aufgereinigt.

Um die Fusionsproteine im Biosensor einsetzen zu können, wurden zunächst die Enzymaktivität (2.4.15) und die PET-Affinität (4.4.9) überprüft (Abb. 3.15). Beide Fusionsproteine wiesen eine Phosphatase-Aktivität auf, wobei die spezifische Enzymaktivität

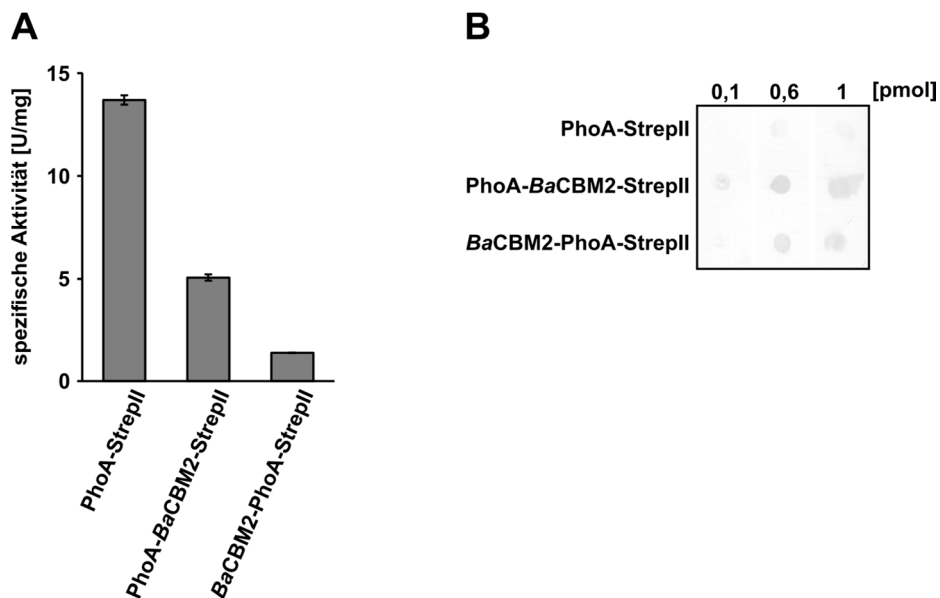


Abb. 3.15: Untersuchung von PhoA-Fusionsproteinen und PhoA aus aufgereinigten Proteinfractionen.

(A) Enzymaktivität. Die katalytische Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch die Umsetzung von *para*-Nitrophenylphosphat zu *para*-Nitrophenol und anorganischem Phosphat spektralphotometrisch ermittelt. Die spezifische Enzymaktivität ist graphisch dargestellt. **(B)** PET-Affinität. Im „PET Surface Affinity Assay“ wurden jeweils 0,1 pmol, 0,6 pmol und 1 pmol Protein aus aufgereinigten Proteinfractionen eingesetzt. Dargestellt sind Ausschnitte der *Output*-Signale einer Membran.

gegenüber PhoA-StrepII verringert war und PhoA-BaCBM2-StrepII eine höhere Aktivität als BaCBM2-PhoA-StrepII aufwies. Unter Verwendung des „PET Surface Affinity Assays“ konnte zudem beiden Fusionsproteinen eine Affinität zu PET nachgewiesen werden. Auch PhoA-StrepII zeigte eine PET-Affinität, die jedoch deutlich schwächer war, als die der Fusionsproteine.

Ein weiterer Bestandteil des Biosensors war das Filtersystem. Nach Austestung verschiedener Membranmaterialien und -halterungen erwies sich die Kombination aus einer PVDF-Membran und einem Spritzenvorsatzfilter-Halter als geeignet, welcher es ermöglichte, die Membran zur Detektion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität aus dem Filterhalter zu entnehmen.

Die Abb. 3.16 A zeigt das erfolgreiche *Proof-of-Principle* des Biosensors, bei dem die aufgereinigten Proteine sowie das beschriebene Filtersystem zur Detektion von PET-Nanopartikeln in einer Testlösung verwendet wurden. Für das Experiment wurden mehrere Proben à 1 mL angesetzt, in denen 10 µg der aufgereinigten Proteine mit jeweils 0 µg bzw. 25 µg PET-Nanopartikeln nach dem in Abschnitt 2.4.14 beschriebenen Protokoll behandelt wurden. Wie erwartet wurde keine Membranfärbung bei Proben ohne PET-Nanopartikel oder mit PhoA-StrepII beobachtet. Hingegen konnte bei Proben mit PET-Nanopartikeln und PhoA in Fusion mit BaCBM2 eine Membranfärbung beobachtet werden. Dies bestätigte das Konzept des analytischen Verfahrens. Der Einsatz von PhoA-BaCBM2-StrepII im Biosensor führte zu einer deutlichen Membranfärbung, sodass sich das Konstrukt in diesem Verfahren zur Detektion von PET-Nanopartikeln eignete. Unter Verwendung des Fusionsproteins BaCBM2-PhoA-StrepII war die Membranfärbung kaum sichtbar. Dies könnte auf die geringe spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase zurückzuführen sein. Auch schien die PET-Affinität von PhoA-StrepII zu gering zu sein, als dass PET damit im Biosensor nachgewiesen werden konnte.

Weiterhin wurde geprüft, ob die Stärke der Membranfärbung abhängig von der PET-Menge in der Testlösung ist. Eine Voraussetzung für den Vergleich verschiedener Proben ist zunächst, dass die Phosphatase-Aktivität gestoppt werden kann, sodass sich die Membranfärbung ab einem definierten Zeitpunkt nicht mehr verändert. Daher wurde untersucht, ob es ausreicht, die Membranfärbung durch Spülen mit H₂O zu stoppen, oder ob die Alkalische Phosphatase inhibiert werden muss. Als Inhibitor eignet sich beispielsweise eine 20 mM Phosphorsäure-Lösung, durch welche die Phosphatase-Aktivität in spektralphotometrischen Untersuchungen inhibiert werden konnte (Abb. 3.16 B). Zur Messung der Membranfärbung wurden zwei Versuchsansätze à 1 mL mit je 10 µg PhoA-BaCBM2-StrepII und 25 µg PET-Nanopartikeln in Dreifachbestimmung nach dem entwickelten Protokoll behandelt, wobei die Membranen entweder mit H₂O oder mit 20 mM Phosphorsäure gespült wurden. Anschließend wurde die Intensität der Membranfärbung zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert. Wie in Abb. 3.16 C graphisch dargestellt ist, stieg die Membranfärbung nach Spülen mit H₂O stetig an, während

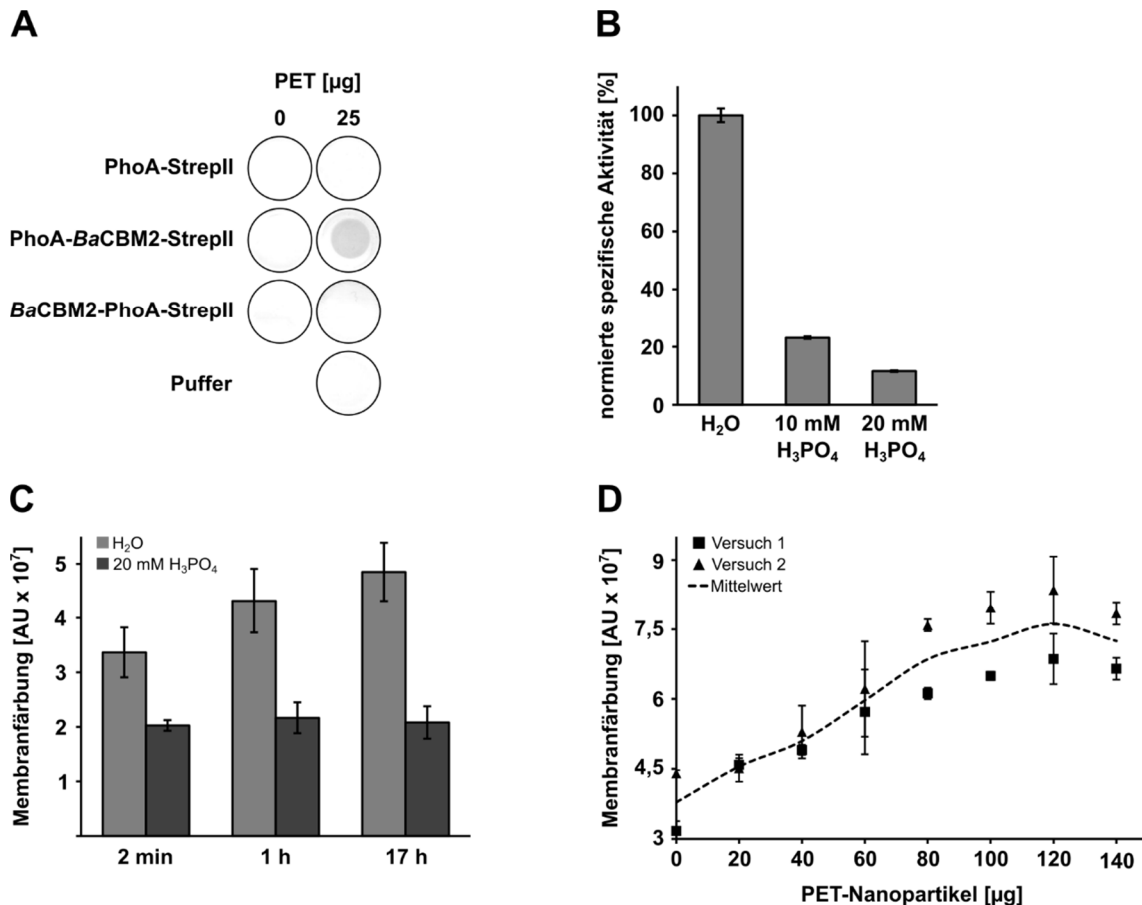


Abb. 3.16: Entwicklung eines Verfahrens zur Detektion von PET in wässrigen Systemen.

(A) Proof-of-Principle des Biosensors. 10 μg der aufgereinigten Proteinfractionen der PhoA-Fusionsproteine sowie von PhoA wurden im Biosensor mit 0 μg bzw. 25 μg PET-Nanopartikeln eingesetzt. Dargestellt ist jeweils die Membran nach Reaktion der Alkalischen Phosphatase. **(B)** Inhibierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität. Die katalytische Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase von PhoA-BaCBM2-StrepII wurde durch die Umsetzung von *para*-Nitrophenylphosphat zu *para*-Nitrophenol und anorganischem Phosphat spektralphotometrisch ermittelt. Zur Inhibierung wurden dem Ansatz 10 mM bzw. 20 mM H₃PO₄ beigefügt. Die spezifischen Aktivitäten wurden auf die nicht-inhibierte Probe normiert und sind graphisch dargestellt. **(C)** Inhibierung der Phosphatase-Aktivität im Biosensor. 10 μg der aufgereinigten Proteinfraction von PhoA-BaCBM2-StrepII wurden in Dreifachbestimmung im Biosensor mit 25 μg PET-Nanopartikeln eingesetzt und die Membranen nach Reaktion der Alkalischen Phosphatase mit H₂O oder 20 mM H₃PO₄ gewaschen. Die Intensität der Membranfärbung wurde jeweils nach 2 min, 1 h und 17 h quantifiziert und ist graphisch dargestellt. **(D)** Messung eines PET-Nanopartikel Gradienten im Biosensor. Im Biosensor wurden 10 μg der aufgereinigten Proteinfraction von PhoA-BaCBM2-StrepII mit verschiedenen Mengen an PET-Nanopartikeln appliziert und die Membranen mit 20 mM H₃PO₄ nach Reaktion der Alkalischen Phosphatase gewaschen (Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt; bei 100 μg PET-Nanopartikeln ist eine Doppelbestimmung gezeigt). Die Intensität der Membranfärbung wurde jeweils quantifiziert und ist graphisch dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert zweier unabhängig durchgeführter Versuche an.

die Membranfärbung nach Spülen mit 20 mM Phosphorsäure konstant blieb. Für den Vergleich der Membranfärbung verschiedener Proben war es folglich nötig, die Phosphatase-Aktivität zu inhibieren. Schließlich wurde untersucht, ob die Intensität der Membranfärbung mit der eingesetzten PET-Menge korreliert. Dazu wurden mehrere Proben à 1 mL mit je 10 μg PhoA-BaCBM2-StrepII und verschiedenen PET-Mengen versetzt und in dem Biosensor eingesetzt. Der Versuch wurde zweimal unabhängig, jeweils mit Proben in technischen

Triplikaten durchgeführt. In Abb. 3.16 D ist die quantitative Auswertung der Membranfärbung zu sehen und zeigt eine ähnliche Tendenz der beiden Versuche. Eine Membranfärbung konnte deutlich ab einer PET-Menge von 20 µg dokumentiert werden. Zudem stieg die Membranfärbung mit geringen Schwankungen linear zur PET-Menge zwischen 20 µg und 120 µg PET an. Demnach war die Intensität der Membranfärbung in einem bestimmten Messbereich direkt proportional zur PET-Menge. Die Methode bietet daher das Potential, unterschiedlich starke Verunreinigen an Nanoplastik bereits im Mikrogramm-Bereich zu detektieren.

Das PET-Bindepeptid *BaCBM2* konnte erfolgreich zur Detektion von PET-Nanopartikeln in wässrigen Testlösungen angewendet werden. In der entwickelten Methode wird das Fusionsprotein *PhoA-BaCBM2-StrepII* verwendet, das sowohl eine Alkalische Phosphatase-Aktivität als auch eine PET-Affinität aufweist. Auf dem jetzigen Entwicklungsstand der Methode sind PET-Nanopartikel unter standardisierten Laborbedingungen ab einem Schwellenwert von 20 µg messbar. In Abschnitt 2.4.14 ist das entwickelte Protokoll für dieses Detektionsverfahren beschrieben.

3.2 Studien zu LCI als Bindepeptid an PP

Im Rahmen des „FuPol“-Projekts sollen Polymer-bindende Peptide zur Funktionalisierung von synthetischen Polymeren eingesetzt werden und so unter anderem ein neuartiges Verfahren zur Färbung von PP-Fasern ermöglichen. Durch „FuPol“-Projektpartner (DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V. RWTH Aachen, Prof. Dr. Schwaneberg) konnte bereits das AMP LCI als PP-bindendes Peptid identifiziert und dessen Potential zur Funktionalisierung von PP demonstriert werden (Rübsam et al., 2017). Als Herausforderung bei der Entwicklung solch eines biobasierten Färbeprozesses galt die Etablierung eines großtechnischen Produktionsverfahrens für das Peptid unter Verwendung eines mikrobiellen Expressionssystems, da das LCI antimikrobielle Eigenschaften aufweist (vgl. 1.2.2). In diesem Teil der Arbeit sollte daher ein geeignetes Herstellungsverfahren für das LCI etabliert sowie die Anwendbarkeit des produzierten LCIs als Ankerpeptid zur Funktionalisierung von PP überprüft werden.

3.2.1 Identifizierung eines geeigneten Produktionssystems

Um ein geeignetes Produktionssystem für das antimikrobielle Peptid LCI zu identifizieren, wurde eine Vielzahl pro- und eukaryotischer Expressionsplattformen angewendet (Tab. 3.4). Zur Detektion und Aufreinigung wurde die Peptidsequenz mit dem *Strep-tag*® II fusioniert. Zusätzlich wurde ein Cystein an den N-Terminus von LCI gehangen, welches für dessen Anwendung als Ankerpeptid zur Funktionalisierung von PP erforderlich ist (vgl. 3.2.3).

Tab. 3.4: Übersicht der verwendeten Expressionssysteme

Details System	Plasmid Stamm	Charakteristika	Ergebnis
Prokaryotisch			
<i>E. coli</i>			
Protein <i>Trans</i> - Spleißen	pET-22b(+)_N_LCI, pET-22b(+)_LCI_C <i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pLysS]	Separate Synthese des N- und C-Terminus von LCI, <i>in vitro</i> Assemblierung der LCI-Termini durch Aktivität des Inteins	Keine Detektion der einzelnen Termini in der löslichen und unlöslichen Fraktion sowie der assemblierten Termini (Western Blot)
MBP	pET-22b(+)_MBP-3LCI- StreptII <i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pLysS]	Expression eines trimeren <i>lci</i> -Konkatemers, um die Proteinmenge zu erhöhen, Fusion mit dem MBP, um die Löslichkeit zu erhöhen und um toxische Effekte von LCI zu umgehen	Detektion des Fusionsproteins in der löslichen und unlöslichen Fraktion im Western Blot, keine Überexpressionsbande im SDS-Gel detektiert
Aktive Protein- aggregate	pET-22b(+)_StreptII-LCI-I- ELK16 <i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pLysS]	Bildung aktiver Proteinaggregate, um toxische Effekte von LCI zu umgehen, Fusion von LCI mit dem selbst- assemblierenden Peptid ELK16, welches durch ein Intein auto-katalytisch abgespalten werden kann	Detektion des Protein- aggregats in der unlöslichen Fraktion, jedoch keine Detektion von abgespaltenem LCI in der löslichen Fraktion (Western Blot)
Operon	pET-22b(+)_3LCI_Operon <i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pLysS]	Expression von drei <i>lci</i> - Sequenzen in einer Operonstruktur zur Erhöhung der Proteinmenge	Keine Detektion von LCI (Western Blot)
<i>B. subtilis</i>	pEVO+_spAprE-ppBPN'- 3LCI-StreptII (finales Konstrukt) <i>B. subtilis</i> TEB1030	Expression eines trimeren <i>lci</i> -Konkatemers, um die Proteinmenge zu erhöhen, Verwendung verschiedener Propeptide als Faltungshelfer, Sekretion des Fusionsproteins in den Kulturüberstand durch Einsatz verschiedener Signalpeptide	Nur ein Konstrukt führte zur Detektion des Zielproteins im Kulturüberstand und im Cytoplasma (Western Blot), Ausbeute im Schüttelkolben: 8,8 µg/L Fusionsprotein nach Aufreinigung, Spaltung des Fusionsproteins durch TEV- Protease nicht erfolgreich
Eukaryotisch			
<i>T. reesei</i>	pTRcel7A_fix_LCI-StreptII <i>T. reesei</i> QM6a-LCI- StreptII ^{cel7A} , pTRcel7A_fix_LCI <i>T. reesei</i> QM6a-LCI ^{cel7A}	Eukaryotischer Organismus (filamentöser Pilz), Sekretion von LCI in den Kulturüberstand	Keine Detektion von LCI (Western Blot)
<i>P. pastoris</i>	pPICZαA_cLCI-StreptII <i>P. pastoris</i> X-33-LCI ^{AOX1} , pGAPZαA_cLCI-StreptII <i>P. pastoris</i> X-33-LCI ^{GAP}	Eukaryotischer Organismus (Hefe), Sekretion von LCI in den Kulturüberstand	Detektion von LCI im SDS- Gel, Ausbeuten im Schüttelkolben: <i>P. pastoris</i> X-33-LCI ^{AOX1} : 32 mg/L <i>P. pastoris</i> X-33-LCI ^{GAP} : 19 mg/L

Die Auswahl der Expressionssysteme erfolgte sowohl nach Charakteristika, welche die Toxizität des antimikrobiellen Peptids umgehen könnten als auch nach dem Potential

möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen. Wie der Tab. 3.4 zu entnehmen ist, wurde das LCI bei der Mehrzahl der untersuchten Expressionssysteme nicht oder nur in geringen Mengen (Detektion im Western Blot) nachgewiesen. Hervorzuheben ist die eukaryotische Expressionsplattform *P. pastoris*, die zu überragend hohen Zielproteinausbeuten im Kulturüberstand führte. Zur Expression und Sekretion von LCI in *P. pastoris* wurde das kommerzielle pGAPZα-/ pPICZα-Vektorsystem verwendet, welches die Sekretion von Proteinen durch Fusion mit dem Signalpeptid des α-Faktors aus *S. cerevisiae* ermöglicht. Dafür wurde das Plasmid pPICZαA_cLCI-StrepII in den AOX1-Lokus von *P. pastoris* zur Methanol-induzierbaren Expression sowie das Plasmid pGAPZαA_cLCI-StrepII in den GAP-Lokus zur konstitutiven Expression integriert (2.3.3.2). Die erfolgreiche genomische Integration wurde stichprobenartig mittels Kolonie-PCR (2.2.3) verifiziert. Um Klone mit multipler Plasmidinsertion zu identifizieren, wurden jeweils 30 Klone der generierten Stämme *P. pastoris* X-33-LCI^{AOX1} und *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} sowie der jeweilige Kontrollstamm *P. pastoris* X-33-ctrl^{AOX1} bzw. *P. pastoris* X-33-ctrl^{GAP} in Doppelbestimmung in *Deepwell*-Mikrotiterplatten kultiviert. Mittels Dot Blot (2.4.4.2) wurde anschließend das rekombinante LCI spezifisch und quantitativ im Kulturüberstand nachgewiesen (Abb. 3.17 A, B). Dabei zeigte sich, dass das *lci*-Gen sowohl unter dem AOX1- als auch unter dem GAP-Promotor exprimiert wurde. Weiter konnte davon ausgegangen werden, dass das LCI in das umgebende Medium sekretiert wurde. Zudem variierte die Signalstärke der detektierten Proteine und deutete unterschiedliche LCI-Mengen im Kulturüberstand an. Bei allen untersuchten *P. pastoris* X-33-LCI^{AOX1} Klonen wurde LCI im Kulturüberstand detektiert, wobei die Klone 5, 20, 25 und 27 nach densitometrischer Auswertung am meisten LCI aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurde nur bei fünf Klonen der untersuchten *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} Klone LCI im Kulturüberstand nachgewiesen. Zur weiteren Analyse wurden ausgewählte Klone auf Basis der Dot Blot Ergebnisse im Schüttelkolben in Doppelbestimmung kultiviert. Die SDS-PAGE Analysen der Kulturüberstände zeigten in fast allen Spuren eine deutliche Zielproteinbande bei ca. 10 kDa, welche dem rekombinanten LCI mit einer kalkulierten molekularen Masse von 6,88 kDa entsprachen (Abb. 3.17 C, D). Dies konnte durch Western Blot Analysen nachgewiesen werden (Abb. 3.17 E). Um die LCI-Menge in den Kulturüberständen quantitativ zu bestimmen, wurden die LCI-Banden in den SDS-Gelspuren densitometrisch ausgewertet. Für die Berechnung der LCI-Ausbeuten wurde jeweils der Mittelwert aus der Doppelbestimmung eines Klon gebildet und mit dem BSA-Standard verglichen. Beim Stamm *P. pastoris* X-33-LCI^{AOX1} wies Klon 5 die höchste LCI-Ausbeute mit 32 mg/L auf und Klon 9 zeigte beim Stamm *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} die höchste LCI-Ausbeute mit 19 mg/L. Damit führten sowohl die konstitutive als auch die Methanol-induzierte Expression zu relativ hohen LCI-Ausbeuten. Obwohl *P. pastoris* X-33-LCI^{AOX1} Klon 5 über 50 % mehr LCI produzierte als *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} Klon 9, wurde Letzterer für weitere Arbeiten verwendet, da das konstitutive

System aus sicherheits- und verfahrenstechnischen Gründen besser auf einen größeren Maßstab übertragen werden konnte (vgl. 4.4).

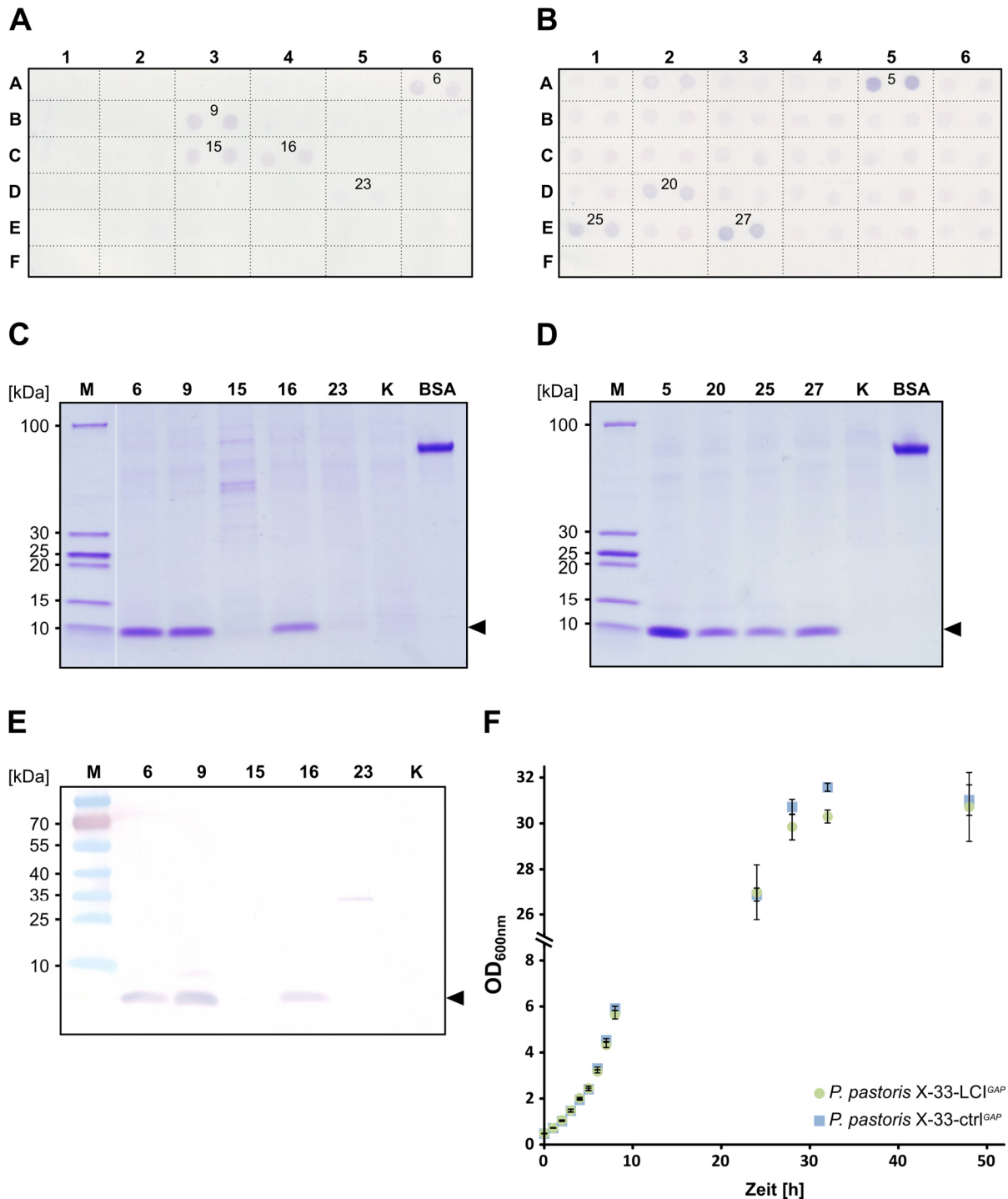


Abb. 3.17: *P. pastoris* als Expressionsplattform für LCI.

(A) Dot Blot mit LCI in Kulturüberständen von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP}. 30 *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} Klone (A1–E6) sowie drei *P. pastoris* X-33-ctrl^{GAP} Klone (F1–F3) wurden im 96-Mikrotiterplattenformat kultiviert (28°C, 96 h, BMGY-Medium). Nach Zentrifugation wurden jeweils 4 µL des Kulturüberstandes im Dot Blot eingesetzt. Die spezifische Detektion der Proteine erfolgte über den Strep-tag® II. Gestrichelte Linien grenzen jeweils zwei Proben ein, die einem Klon in Doppelbestimmung zugehörig sind. Beschriftete Klone wurden in weiterführenden Arbeiten verwendet. **(B)** Dot Blot mit LCI in Kulturüberständen von *P. pastoris* X-33-LCI^{AOX1}. 30 *P. pastoris* X-33-LCI^{AOX1} Klone (A1–E6) sowie drei *P. pastoris* X-33-ctrl^{AOX1} Klone (F1–F3) wurden im 96-Mikrotiterplattenformat kultiviert (28°C, 96 h,

BMMY-Medium). Nach Zentrifugation wurden jeweils 4 µL des Kulturüberstandes im Dot Blot eingesetzt. Die spezifische Detektion der Proteine erfolgte über den *Strep*-tag® II. Gestrichelte Linien grenzen jeweils zwei Proben ein, die einem Klon in Doppelbestimmung zugehörig sind. Beschriftete Klone wurden in weiterführenden Arbeiten verwendet. **(C)** SDS-Gel mit LCI in Kulturüberständen von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP}. *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} Klone (6, 9, 15, 16 und 23) sowie die Kontrolle *P. pastoris* X-33-ctrl^{GAP} (K) wurden im Schüttelkolben kultiviert (28°C, 96 h, BMGY-Medium). Aufgetragen wurden jeweils 7 µg denaturiertes Gesamtprotein des Kulturüberstands sowie 2 µg BSA. Der schwarze Pfeil markiert das cLCI-StrepII (6,88 kDa). M: Marker. **(D)** SDS-Gel mit LCI in Kulturüberständen von *P. pastoris* X-33-LCI^{AOX1}. *P. pastoris* X-33-LCI^{AOX1} Klone (5, 20, 25 und 27) sowie die Kontrolle *P. pastoris* X-33-ctrl^{AOX1} (K) wurden im Schüttelkolben kultiviert (28°C, 96 h, BMMY-Medium). Aufgetragen wurden jeweils 7 µg denaturiertes Gesamtprotein des Kulturüberstands sowie 2 µg BSA. Der schwarze Pfeil markiert das cLCI-StrepII (6,88 kDa). M: Marker. **(E)** Western Blot mit LCI in Kulturüberständen von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP}. In der SDS-PAGE wurden jeweils 15 µg denaturiertes Gesamtprotein getrennt. Die spezifische Detektion der Proteine erfolgte über den *Strep*-tag® II. Der schwarze Pfeil markiert das cLCI-StrepII (6,88 kDa). M: Marker. **(F)** Wachstumskurve von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} und *P. pastoris* X-33-ctrl^{GAP}. Die Klone wurden jeweils in Dreifachbestimmung im Schüttelkolben kultiviert (28°C, 50 h, BMGY-Medium) und die OD₆₀₀ zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

Um zu überprüfen, ob sich das antimikrobielle LCI toxisch auf den Organismus *P. pastoris* auswirkt, wurden Wachstumsverläufe von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} (Klon 9) und dem Kontrollstamm *P. pastoris* X-33-ctrl^{GAP} jeweils in Dreifachbestimmung aufgenommen (Abb. 3.17 F). Weder beim exponentiellen Wachstum, noch beim Übergang in die stationäre Phase konnte ein signifikanter Unterschied im Wuchsverhalten zwischen den beiden untersuchten Stämmen festgestellt werden. Das LCI hatte daher dem Wuchsverhalten nach zu urteilen keine offensichtliche, toxische Wirkung auf *P. pastoris*.

Die eukaryotische Expressionsplattform *P. pastoris* eignet sich zur Herstellung des antimikrobiellen Peptids LCI. Bereits im Schüttelkolben-Maßstab konnten unter dem konstitutiven Promotor 19 mg/L LCI sowie unter dem Methanol-induzierten Promotor 32 mg/L LCI erreicht und spezifisch im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

3.2.2 Fermentation und *Downstream-Processing* zur Produktion von LCI

Zur Produktion von LCI im größeren Maßstab wurden Fermentationen mit *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} Klon 9 durchgeführt sowie der *Downstream-Process* (DSP) etabliert (2.3.3.3). Einerseits wurde auf diese Weise überprüft, ob das in Abschnitt 3.2.1 ermittelte Produktionssystem für das LCI auf einen größeren Produktionsmaßstab übertragen werden kann und ob sich zusätzlich die LCI-Ausbeute durch verbesserte Wuchsbedingungen steigern lässt. Andererseits wurden weitere Erkenntnisse für den Verfahrensprozess zur industriellen Herstellung von LCI gewonnen und größere LCI-Mengen für erste Anwendungstests bereitgestellt. Um bereits in den ersten Fermentationen verschiedene Parameter im Hinblick auf eine Optimierung anzulegen, wurden zwei *Fed-Batch* Verfahren durchgeführt, welche sich im Zulaufprofil der *Fed-Batch* Phase unterschieden (Zhang et al., 2007). Da die Zugabe der *Feed*-Lösung neben dem Erhaltungsstoffwechsel und dem Wachstum auch der Produktbildung dient, kann das Zulaufverfahren die volumetrische Produktivität beeinflussen

und stellt eines der wichtigsten Faktoren für einen erfolgreichen Prozess dar (Berlec und Štrukelj, 2013; Maurer et al., 2006; Shojaosadati et al., 2008). Bei dem Profil „Zulauf_{in}“ wurde die *Feed*-Lösung linear zugeführt, wohingegen diese beim „Zulauf_{exp}“ zunächst exponentiell (für 9 h) und dann linear hinzugegeben wurde. In Abb. 3.18 A und B sind die Verläufe der beiden Fermentationen graphisch dargestellt. Bei beiden Verläufen wurde ein sprunghafter Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) nach ca. 21 h (*Feed-Peak*) durch den Verbrauch von Glycerin als Kohlenstoffquelle im *Batch*-Medium initiiert. Dies leitete die *Fed-Batch* Phase mit den unterschiedlichen Zuläufen der *Feed*-Lösung ein, durch die Glukose als Kohlenstoffquelle den Zellen zugeführt wurde. Trotz des Risikos der toxischen Ethanol-Bildung, wurde der weitere Prozess pO_2 -limitiert durchgeführt, da eine hypoxische *Fed-Batch* Phase bei Expressionen unter dem *GAP*-Promotor zu einer gesteigerten, spezifischen und volumetrischen Produktivität der Protein-sekretierenden Zellen führen kann (Baumann et al., 2008). Die Basenzugabe korrelierte mit dem Zellwachstum und fungierte als Stickstoffquelle und Titrationsmittel. Während den Fermentationen wurden regelmäßig Kulturproben entnommen, um die Zelldichte über die OD_{600} sowie die Feuchtzellmasse (WCW) zu verfolgen und um die LCI-Menge in den Kulturüberständen mittels SDS-PAGE Analysen zu quantifizieren. Obwohl sich die Fermentationsstrategien unterschieden, wiesen beide Kulturen ein sehr ähnliches Wuchsverhalten auf (Abb. 3.18 C). Bis zum *Feed-Peak* bei 21 h befanden sich die Zellen in der Anwachsphase, was sich nicht nur in der OD_{600} und der Feuchtzellmasse, sondern auch in der Basenzugabe widerspiegelte. Mit Beginn der *Fed-Batch* Phase war ein deutliches Wachstum der Zellen zu verzeichnen, das ab einer Feuchtzellmasse von ~ 400 g/L stagnierte. Bei Beendigung der Fermentation wurde eine OD_{600} von 382 (Zulauf_{exp}) bzw. von 386 (Zulauf_{in}) gemessen. Weiterhin wiesen beide Kulturen sehr ähnliche Feuchtzellmassen von 394 g/L (Zulauf_{exp}) und 400 g/L (Zulauf_{in}) auf. Durch SDS-PAGE Analyse der Kulturüberstände wurde die produzierte LCI-Menge zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentationen verfolgt, wie es in Abb. 3.18 D beispielhaft für die Fermentation mit dem Zulaufprofil „Zulauf_{in}“ gezeigt wird. In jeder SDS-Gel Spur mit einer Fermentationsprobe, ausgenommen die zum Startpunkt der Fermentation, war eine Proteinbande bei ca. 10 kDa zu erkennen, welche auf Basis der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.1 dem rekombinanten LCI zugeordnet werden konnte. Weiterhin zeigte sich, dass erst mit Abnahme der Wachstumsrate in der *Fed-Batch* Phase die LCI-Menge im Kulturüberstand deutlich anstieg. Durch densitometrische Auswertung der Proteinbanden wurde die LCI-Ausbeute zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation quantifiziert. Demnach stieg die LCI-Konzentration im Kulturüberstand stetig bis auf 0,69 g/L (Zulauf_{in}) bzw. 0,59 g/L (Zulauf_{exp}) (Daten nicht gezeigt) an. Die Fermentation mit dem Zulaufprofil „Zulauf_{in}“ führte demnach im Vergleich zum „Zulauf_{exp}“ trotz des sehr ähnlichen Zellwachstums zu einer 17 % höheren LCI-Ausbeute und sollte daher Grundlage für weitere Fermentationen sowie Prozessoptimierungen sein.

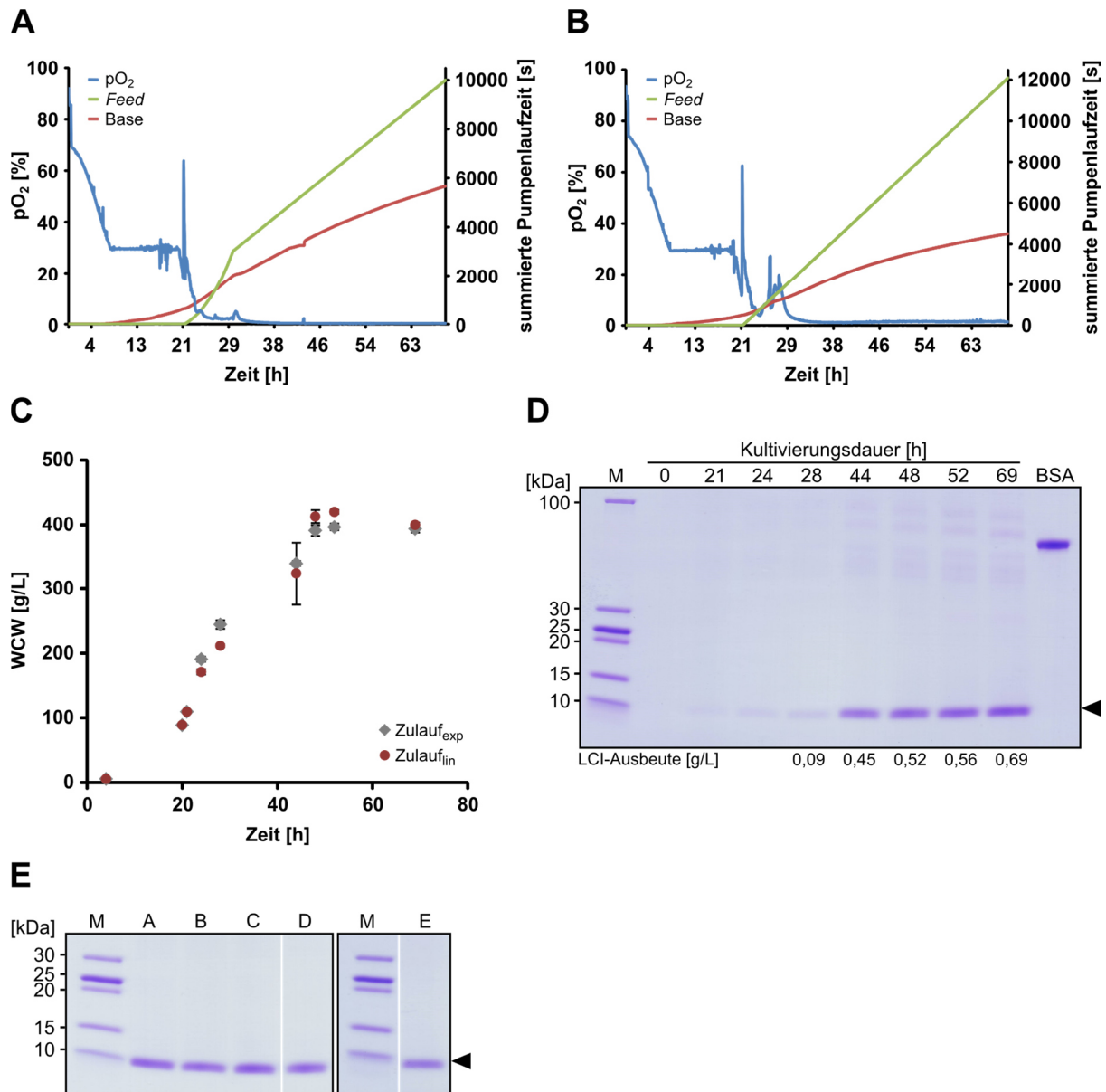


Abb. 3.18: Fermentation und DSP von LCI.

(A) Fermentationsverlauf von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} (Zulauf_{exp}). (B) Fermentationsverlauf von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} (Zulauf_{lin}). (C) Feuchtzellmassen der Fermentationen. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentationen wurden die Feuchtzellmassen (WCW) aus 10 ml Fermenterbrühe gravimetrisch bestimmt. (D) SDS-Gel mit LCI im *Pichia*-Kulturüberstand der Fermentation. Aufgetragen wurden 2 µl der Kulturüberstände von verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation mit dem Zulaufprofil „Zulauf_{lin}“ sowie 1,5 µg BSA. Der schwarze Pfeil markiert das cLCI-StrepII (6,88 kDa). (E) SDS-Gel mit LCI in DSP-Proben. Die Proben A bis D stammen aus dem Kulturüberstand der Fermentation „Zulauf_{lin}“ und Probe E stammt aus dem Kulturüberstand der Fermentation „Zulauf_{exp}“, jeweils nach 69 h Kultivierung. A: unbehandelt, B: steril filtriert, C: steril filtriert und dialysiert, D: steril filtriert, dialysiert und lyophilisiert. E: steril filtriert und lyophilisiert. Aufgetragen wurde jeweils das Volumen, welches 2 µl des Kulturüberstandes entsprach. Der schwarze Pfeil markiert das cLCI-StrepII (6,88 kDa).

Im Anschluss an die Fermentation wurde der weitere Verfahrensprozess der Proben etabliert, sodass das LCI in weiterführenden Anwendungstests (vgl. 3.2.3) eingesetzt werden konnte. Zu beachten war, dass das LCI sehr klein (< 10 kDa) und aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften vielen Materialien gegenüber sehr affin ist. Nach der Zentrifugation der Proben

war zunächst eine Sterilfiltration des Kulturüberstandes obligat, um keine genetisch veränderten Organismen in die Umwelt zu tragen. Wie in Abb. 3.18 E zu sehen, konnten die Proben ohne erkennbaren Verlust des LCIs steril filtriert werden. Zur Aufreinigung des Kulturüberstandes bot sich die Tangentialflussfiltration an, bei der unter Verwendung einer entsprechenden Membran Proteine > 30 kDa großtechnisch abfiltriert werden können. Das Material solcher Membranen ist entweder Polyethersulfon (PES) oder Cellulose-basiert (CME). Die Filtration von Kulturüberständen der LCI-Fermentation unter Verwendung von PES- und CME-Membranen führte jedoch zum kompletten Verlust des LCIs, wodurch eine großtechnische Tangentialflussfiltration nicht eingesetzt werden konnte. Als weiteres Verfahren wurde eine Dialyse des Kulturüberstandes zur Entsalzung und zur Einstellung von Pufferbedingungen durchgeführt. Hier wurde ebenfalls untersucht, ob das LCI an die Membran des Dialyseschlauchs bindet, da dieser aus regenerierter Cellulose bestand. Eine SDS-Gelanalyse der dialysierten Probe zeigte jedoch keinen signifikanten Verlust des LCIs (Abb. 3.18 E). Zur dauerhaften Lagerung der LCI-Proben wurde steril filtrierter und steril filtrierter, dialysierter Fermentationsüberstand lyophilisiert. Die Lyophilisatmasse der dialysierten Probe war im Vergleich zur nicht-dialysierten Probe um ca. 70 % (w/w) verringert und deutete die Entfernung von Verunreinigungen an.

Durch verbesserte Wuchsbedingungen von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} im Bioreaktor konnte die LCI-Ausbeute von 0,019 g/L im Schüttelkolben um das 36-fache auf 0,69 g/L gesteigert werden. In weiteren *Fed-Batch* Fermentationen sollte die *Feed*-Lösung linear zugeführt werden, da dies in einer höheren Proteinausbeute resultierte. Bei der Aufarbeitung der Fermentationsproben sollten Cellulose-basierte- sowie PES-Membranen vermieden werden. Der Fermentationsüberstand konnte ohne Produktverlust steril filtriert, dialysiert und lyophilisiert werden, sodass ausreichende Produktmengen für weiterführende Anwendungstests zur Verfügung gestellt werden konnten.

3.2.3 Überprüfung der Anwendbarkeit von LCI aus *P. pastoris* als Ankerpeptid zur Funktionalisierung von PP

Zur Entwicklung einer neuartigen Färbemethode von PP-Fasern unter Verwendung von LCI als Adhäsionsvermittler für organische Pigmente auf PP („FuPol“-Projekt), wurde hier untersucht, ob sich ebenso das in *P. pastoris* hergestellte LCI (vgl. 3.2.2) als PP-Ankerpeptid eignet.

Eine *in silico* Aminosäure-Sequenzanalyse (2.6.2) zeigte, dass das LCI keine Erkennungsstellen für *N*- oder *O*-Glykosylierungen aufweist. Eine Glykosylierung hätte die Anbindung von LCI an PP stark beeinträchtigen können, wie es für die Interaktion des rekombinanten BaCBM2 aus *P. pastoris* mit PET der Fall war (vgl. 3.1.2.2).

Um die Anbindung von rekombinantem LCI an PP qualitativ nachzuweisen, wurde der „PET Surface Affinity Assay“ (2.4.9), modifiziert durch Verwendung einer PP-Folie mit unterschiedlich gelagerten LCI-Proben, angewendet. Wie in Abb. 3.19 zu sehen, hat das rekombinante LCI aus dem steril filtrierten Kulturüberstand von *P. pastoris* sowohl nach Lagerung bei -20°C, nach zweimonatiger Lagerung bei 4°C als auch nach Lyophilisierung an PP gebunden. Weiterhin zeigte dieser Versuch, dass der in dieser Arbeit entwickelte „PET Surface Affinity Assay“ auf ein anderes synthetisches Polymer (PP statt PET) und andere Proteine (LCI statt CBM) übertragen werden kann.

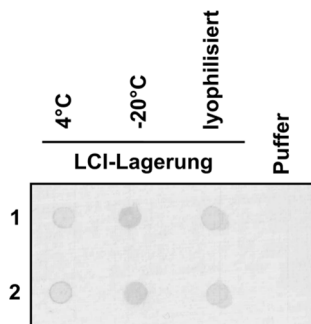


Abb. 3.19: Nachweis über die PP-Affinität des in *P. pastoris* produzierten LCIs.

Im modifizierten „PET Surface Affinity Assay“ wurden unter Verwendung einer PP-Folie jeweils 2,5 µL einer 1:10 verdünnten Probe in Doppelbestimmung angewendet. Das Lyophilisat wurde dazu in einem Volumen aufgenommen, sodass die LCI-Konzentration der in der 4°C- und der -20°C-Probe entsprach. Die Verdünnung erfolgte mit 20 mM Tris/HCl pH 7 (Puffer). Dargestellt ist die Membran mit den *Output*-Signalen.

Zur weiteren Charakterisierung der LCI-Schicht wurde die Schichtdicke von LCI auf funktionalisierten, PP-ähnlichen Siliziumwafern bestimmt (2.4.10).⁹ Diese kennzeichnen sich durch eine extrem flache und harte Oberfläche und ermöglichen die Vermessung von Höhenprofilen weniger Nanometer. Abb. 3.20 A zeigt die erfolgreiche Funktionalisierung eines Siliziumwafers. Die Oberfläche wies keine Verunreinigungen auf und war mit einem gemessenen Kontaktwinkel von 94,6° hydrophob (Yuan und Lee, 2013). Durch die Funktionalisierung der Siliziumwafer mit Triethoxyoctylsilan wurde demnach eine hydrophobe Oberfläche geschaffen, die mit PP mit einem Kontaktwinkel von 95° vergleichbar war (Morra et al., 1989) und erlaubte somit eine Simulation der Anbindung von LCI an PP. Bei der Schichtuntersuchung wurden zwei verschieden präparierte LCI-Lyophilisate untersucht. Das LCI-Lyophilisat A (Probe A) stammte aus steril filtriertem Fermentationsüberstand und das LCI-Lyophilisat B (Probe B) wurde zusätzlich dialysiert. Beide LCI-Proben zeigten adhäsive Eigenschaften gegenüber den funktionalisierten Siliziumwafern. Die Probe A wies eine sehr verunreinigte Schicht auf, welche zum einen an der hohen Schichtdicke von 5,3 nm erkennbar

⁹ Die Bestimmung der Schichtdicke von LCI auf funktionalisierten Siliziumwafern wurde in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Prof. Dr. Böker) in Potsdam von Marc Zimmermann durchgeführt („FuPol“-Projektpartner).

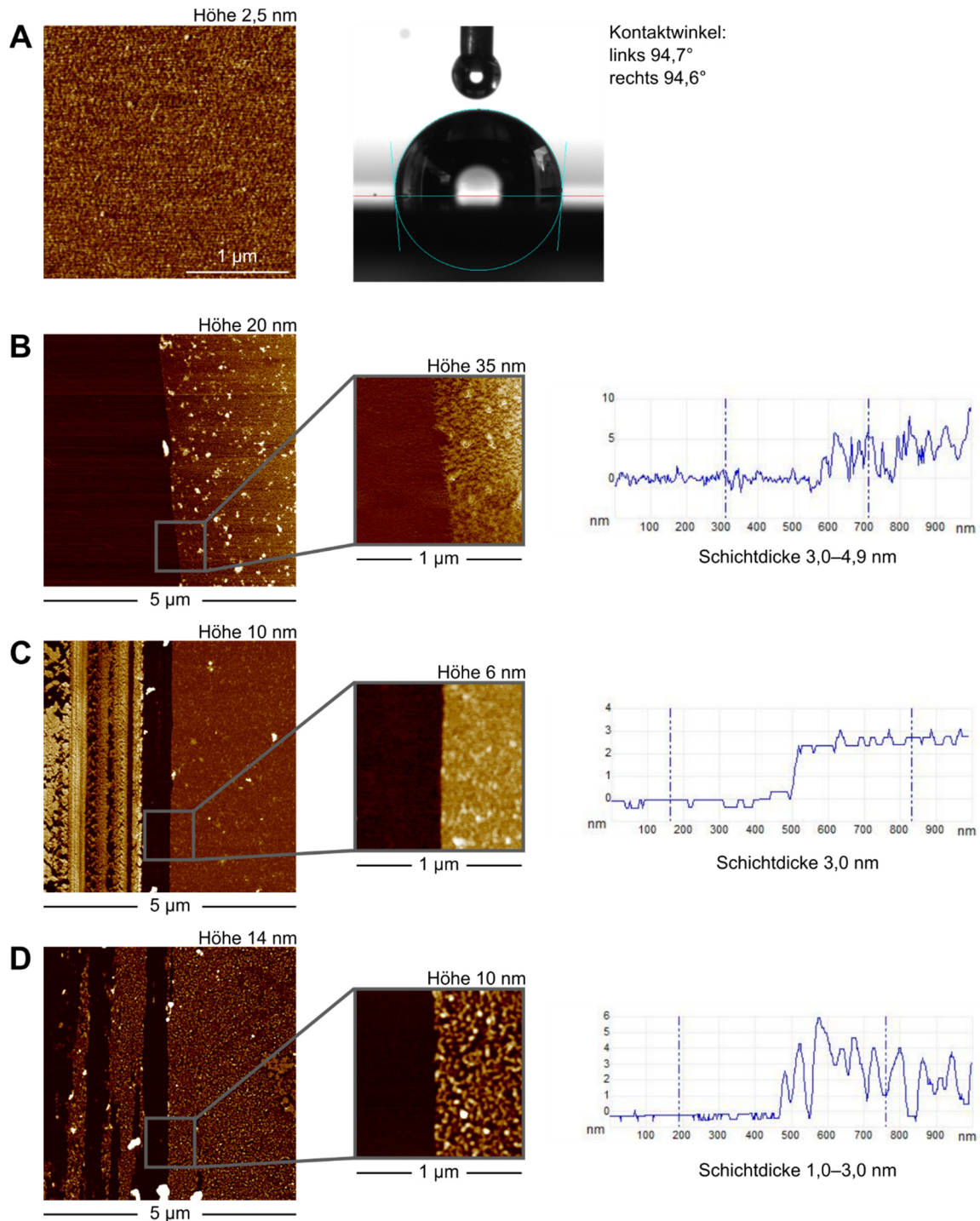


Abb. 3.20: Untersuchung der LCI-Schicht auf funktionalisierten Siliziumwafern.¹⁰

(A) AFM-Bild eines funktionalisierten Siliziumwafers und dessen Kontaktwinkelmessung. (B–C) AFM-Bilder und Höhenprofile von LCI-Proben auf funktionalisierten Siliziumwafern nach einem Waschschrift mit Triton X-100. Aufgetragen wurden die LCI-Lösungen aus lyophilisiertem Fermentationsüberstand (B) und aus lyophilisiertem Fermentationsüberstand nach Dialyse (C). (D) AFM-Bilder und Höhenprofil der Kontrolle. Aufgetragen wurde die LCI-Lösung aus lyophilisiertem Fermentationsüberstand nach Dialyse auf einem nicht-funktionalisierten Siliziumwafer nach einem Waschschrift mit Triton X-100.

¹⁰ AFM-Bilder, Höhenprofile sowie die Kontaktwinkelaufnahme wurden in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Prof. Dr. Böker) in Potsdam von Marc Zimmermann erstellt („FuPol“-Projektpartner).

war und zum anderen stachen Agglomerate aus dem Film heraus (Daten nicht gezeigt). Nach einem Waschschriff zeigte das LCI weiterhin Haftung an dem funktionalisierten Siliziumwafer, jedoch war die Schicht mit einem Höhenprofil von 3,0 nm bis 4,9 nm sehr inhomogen (Abb. 3.20 B). Vermutlich enthielt die Probe A wasserlösliche Verunreinigungen, die während des Waschens herausgelöst wurden und dadurch einen heterogenen Film zurückließen. Im Gegensatz dazu war die LCI-Schicht der Probe B bereits vor dem Waschen mit einem Höhenprofil von 2 nm bis 3 nm flacher als die der Probe A. Dies ließ darauf schließen, dass die Probe B weniger Verunreinigungen enthielt als Probe A. Weiterhin wurde nach dem Waschen eine sehr homogene Schicht mit einer Höhe von 3 nm gemessen (Abb. 3.20 C). Die Effizienz der Funktionalisierung wurde durch einen Kontrollversuch mit LCI-Lyophilisat B und nicht-funktionalisierten Siliziumwafern nachgewiesen (Abb. 3.20 D). In diesem Kontrollversuch konnte gezeigt werden, dass das LCI an den nicht-funktionalisierten Siliziumwafer vergleichsweise schlechter anhaftete als an den funktionalisierten Siliziumwafer. Dies war an den vielen Lücken in der LCI-Schicht und dem heterogenen Höhenprofil von 1 nm bis 3 nm erkennbar. Zusammenfassend zeigten die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen, dass eine Dialyse des Fermentationsüberstands für eine homogene Verteilung von LCI auf einer hydrophoben Oberfläche wichtig ist.

Nach der erfolgreichen Validierung der LCI-Bindung an PP können die in *P. pastoris* produzierten Peptide nun zur weiteren Entwicklung der PP-Färbemethode eingesetzt werden. Im Rahmen des „FuPol“-Projekts wurde durch Kooperationspartner bereits ein chemisches Verfahren zur Verknüpfung der Polymer-bindenden Peptide mit organischen Pigmenten entwickelt (Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP in Potsdam, Prof. Dr. Böker, Benjamin Stomps). Hierbei werden die Pigmente mit Hilfe von Silanen eingekapselt,

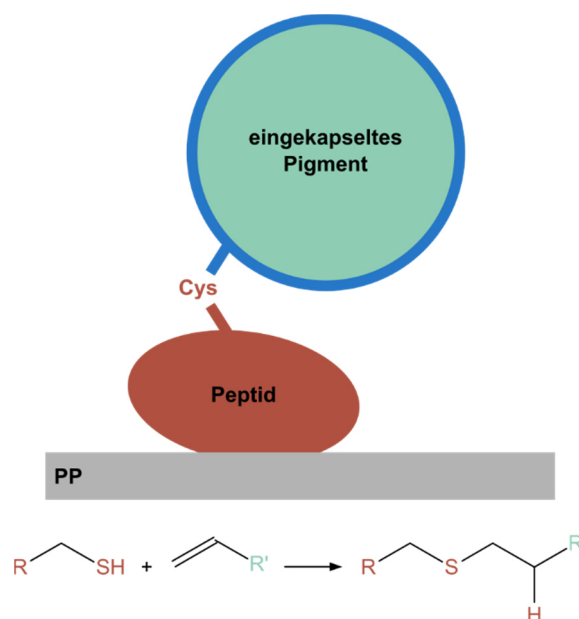


Abb. 3.21: Schematische Darstellung der Funktionalisierung von PP mit Pigmenten und Reaktion der Konjugatsynthese.

um diese anschließend mit Methacryl-Gruppen (Doppelbindungen) zu funktionalisieren. Über die Thiolgruppe des synthetisch integrierten Cysteins am N-Terminus des sonst Cystein-freien LCIs können die präparierten Pigmente dann mittels Thiol-En Klickreaktion kovalent an das Ankerpeptid gebunden werden (Abb. 3.21).

Das in *P. pastoris* rekombinant synthetisierte LCI zeigte eine Affinität zu PP. Da auch das LCI aus einer lyophilisierten Fermentationsprobe an PP gebunden hat, empfiehlt sich eine Lyophilisierung zur dauerhaften Lagerung. Weiter sollte der Fermentationsüberstand dialysiert werden, da solch eine LCI-Probe zu einer homogenen Schicht auf einer hydrophoben Oberfläche führte. Das produzierte LCI eignet sich demnach als Ankerpeptid an PP und kann zur PP-Funktionalisierung mit funktionalen Bausteinen angewendet werden.

4 Diskussion

In den letzten 50 Jahren hat die Verwendung synthetischer Polymere drastisch zugenommen und ist heutzutage aus dem Alltag nicht mehr wegzudenken (Wei und Zimmermann, 2017b). Zu den meist verwendeten Kunststoffen zählen PET und PP, welche vor allem in Verpackungen, Plastikflaschen und der Textilindustrie Anwendung finden (Maddah, 2016; Zimmermann und Billig, 2011). Die Materialien zeichnen eine hohe Widerstandskraft gegenüber chemischen, physikalischen und mechanischen Einflüssen aus (Köpnick et al., 2012; Maddah, 2016). Zugleich stellen diese positiven Attribute aber auch Nachteile dar. Synthetische Polymere, die in die Umwelt getragen wurden, persistieren dort und fragmentieren in immer kleinere Partikel (Horton et al., 2017; Li et al., 2016). Über das Ausmaß und die Folgen, insbesondere von Nanoplastik im Ökosystem kann bisher nur spekuliert werden, denn spezielle Methoden sind zur Beantwortung dieser Fragestellungen nicht ausreichend verfügbar (Koelmans et al., 2015; Mattsson et al., 2015). Neben der Umweltverschmutzung gibt es weitere Herausforderungen im Umgang mit den synthetischen Polymeren. Eine ist der hydrophobe Charakter, welcher die Verarbeitung von Kunststofffasern in der Textilindustrie erschwert (Pellis et al., 2016; Vertommen et al., 2005). So ist die gängige Methode zur Färbung von Textilien mit Farbstoffen in wässrigen Färbebädern für PP nicht anwendbar (Ujhelyiova et al., 2007). Durch hohe Prozesstemperaturen können jedoch Pigmente in das geschmolzene PP eingearbeitet werden (Herbst und Hunger, 2004; Marcinčin, 1999). Hitzeinstabile Pigmente können in diesem Verfahren allerdings nicht eingesetzt werden. Dies stellt vor allem ein Problem für den Einsatz organischer Pigmente dar (Herbst und Hunger, 2004). Auch die Veredelung von PET-Textilfasern mit TEMs, welche durch Expansion Nähte wasserdicht verschließen sollen, erfordert ein Niedrig-Temperatur-Verfahren, sodass diese funktionalen Bausteine nicht schon während der Auftragung auf die Faser expandieren. Interessanterweise gibt es Peptide, welche synthetische Polymere binden und als biotechnologisches Werkzeug in den genannten Feldern eingesetzt werden können (Espino-Rammer et al., 2013; Perz et al., 2015; Ribitsch et al., 2013; Ribitsch et al., 2015; Rübsam et al., 2017; Zhang et al., 2013). Im Rahmen dieses Projekts sollten sie zum einen als Verbindungsstück zwischen synthetischen Polymeren und funktionalen Bausteinen fungieren und somit Verfahren zur Funktionalisierung von Textilfasern bei Raumtemperatur schaffen. Zum anderen sollten sie in der Entwicklung eines analytischen Detektionsverfahrens für Nanoplastik angewendet werden. Daher waren Peptide mit Affinität gegenüber synthetischen Polymeren Hauptgegenstand dieser Arbeit.

4.1 Charakterisierung PET-bindender Peptide

Zur Identifizierung von PET-bindenden Peptiden lag der Fokus in dieser Arbeit auf CBMs, welche Domänen in Kohlenhydrat-aktiven Enzymen darstellen und die Bindung von

Polysacchariden vermitteln. Daneben wurde das CBM_{CenA} aus *Cellulomonas fimi* bereits biotechnologisch angewendet, um die Affinität einer Cutinase aus *Thermobifida fusca* an das synthetische Polymer PET zu erhöhen (Zhang et al., 2013). Das CBM_{CenA} zählt zum Typ A der CBM-Klassifizierung und besitzt drei exponierte, aromatische Aminosäurereste, die neben der Bindung des natürlichen Substrats auch an der Interaktion mit PET beteiligt sind (Din et al., 1994a; Zhang et al., 2013). Um in dieser Studie weitere PET-bindende CBMs zu identifizieren, wurde gezielt nach CBMs gesucht, die ebenfalls wie das CBM_{CenA} eine exponierte, aromatische Triade aufweisen. Für die rationale Auswahl kamen daher CBMs des Typs A in Frage, die sich durch eine planare Anordnung von aromatischen Aminosäureresten an der Oberfläche der Proteinstruktur charakterisieren und unlösliche, hoch kristalline Cellulose oder Chitin binden (Boraston et al., 2004). Es wurden acht CBMs der Familien 1, 2, 5 und 10 zusammengestellt, deren Strukturen laut Homologiemodellierung je drei planar ausgerichtete, exponierte Aromaten aufwiesen. Durch MD-Simulationen in Wasser wurden die Qualität und Stabilität der Homologiemodelle überprüft und die Seitenkettenpositionen optimiert. Die vorhergesagten Strukturen der CBM2- und CBM5-Peptide waren im Wasser stabil und die strukturellen Charakteristika mit anderen Peptiden dieser Größe (50–100 AS) vergleichbar (persönliche Mitteilung, Dušan Petrović, Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie am FZ Jülich, Jun.-Prof. Dr. Strodel). Die Ausrichtung der exponierten Aromaten war kaum verändert und stimmte mit den Strukturen der Homologiemodellierung überein. Die Peptide der CBM1- und CBM10-Familien waren hingegen sehr flexibel und anfällig für drastische Änderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur, was andeutete, dass es für diese Peptide im ungebundenen Zustand in Wasser keine stabile und charakteristische Faltung gibt. Dies war jedoch nicht überraschend, da die Peptide mit weniger als 30 Aminosäuren sehr klein sind. Vermutlich fehlten den Peptiden die umgebenden Domänen des übrigen Enzyms, in dem sie natürlicherweise Vorkommen und welche die CBM-Faltung stabilisieren (Batey et al., 2008; Bhaskara und Srinivasan, 2011). Demzufolge war die Ausrichtung der exponierten Aromaten teilweise stark gegenüber dem Homologiemodell verändert. Ob die rational ausgewählten CBMs tatsächlich an PET binden, wurde durch den in dieser Arbeit entwickelten „PET Surface Affinity Assay“ untersucht, bei dem fünf der acht CBMs als PET-bindende Peptide verifiziert werden konnten. Ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der flach orientierten Aromaten und der PET-Affinität konnte nicht direkt hergestellt werden. Beispielsweise zeigte BaCBM5 eine überdurchschnittlich planare Ausrichtung der aromatischen Triade, wies aber unter den untersuchten Bedingungen keine PET-Affinität auf. Im Gegensatz dazu hatte ucCBM10 an PET gebunden, dessen aromatische Aminosäurereste laut MD-Simulation nicht flach orientiert waren. Eine planare Ausrichtung der exponierten Aromaten allein konnte also nicht direkt als Kriterium zur Eingrenzung von PET-bindenden und nicht-bindenden CBMs angewendet werden. Auffällig war, dass beide ausgewählten CBM-Kandidaten der Familie 2

eine PET-Affinität zeigten und dass das bereits erwähnte CBM_{CenA} ebenfalls zur Familie 2 gehört. Ein vielversprechendes Kriterium CBMs mit PET-Bindeaffinität zu identifizieren, könnte demnach die Zugehörigkeit zur Familie 2 darstellen. Die Einordnung in CBM-Familien erfolgt nach Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz (Boraston et al., 2004; Cantarel et al., 2009). Somit könnte neben der aromatischen Triade die charakteristische Zusammensetzung der Aminosäuren in Familie 2 für die Wechselwirkung mit PET eine entscheidende Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wurden in dieser Studie involvierte Aminosäuren der BaCBM2-PET Interaktion durch MD-Simulationen von BaCBM2 an einer modellierten PET-Oberfläche untersucht (vgl. 4.2). Um die Hypothese zu untermauern, könnten gezielt weitere CBMs der Familie 2 auf ihre PET-Affinität hin untersucht werden. Darüber hinaus stellen antimikrobielle Peptide weitere interessante PET-Bindekandidaten dar. Diese sind ebenfalls mit weniger als 100 Aminosäureresten kleine Peptide und kennzeichnen sich durch eine positive Nettoladung sowie eine amphipathische Struktur (Gaiser et al., 2011; Parachin et al., 2012). Dem antimikrobiellen Peptid LCI konnte bereits eine Affinität zu PP nachgewiesen werden (Rübsam et al., 2017) und es zeigte in dieser Studie ebenfalls eine Affinität zu PET (Daten nicht gezeigt). Das LCI weist innerhalb der kurzen Peptidsequenz relativ viele aromatische Aminosäuren auf (10 von 47 AS): drei Phenylalanine, vier Tyrosine und drei Tryptophane. Ein Teil dieser Aromaten ist exponiert und trägt zum hydrophoben Charakter der Peptidoberfläche bei. Außerdem sind vier exponierte Aromaten (F12, F25, Y30 und W37), ähnlich wie bei den untersuchten CBMs, planar ausgerichtet (Abb. 1.5). Die natürliche Interaktion von antimikrobiellen Peptiden mit ihren Zielzellen umfasst hauptsächlich ionische und hydrophobe Interaktionen (Bahar und Ren, 2013), welche im Fall des LCIs mutmaßlich ebenso mit der amphipathischen Struktur von PET stattfinden können. Daneben kommen noch weitere Peptide als potentielle PET-Bindekandidaten in Frage. Beispielsweise wurde ein PBM der Polyhydroxyalkanoat-Depolymerase aus *Alcaligenes faecalis* an die Cutinase Thc_Cut1 aus *Thermobifida cellulositica* fusioniert und resultierte in einer erhöhten PET-Adsorption des Fusionsenzyms (Ribitsch et al., 2013). Des Weiteren führten sowohl die Inkubation als auch die Fusion von Hydrophobinen mit Thc_Cut1 zur Verbesserung der enzymatischen PET-Hydrolyse (Espino-Rammer et al., 2013; Ribitsch et al., 2015). Hydrophobine sind kleine Cystein-reiche Proteine, die ausschließlich in Pilzen vorkommen und sehr hydrophob sein können (Bayry et al., 2012). Die Proteine können sich spontan zu amphipathischen Monoschichten zwischen hydrophoben und hydrophilen Flächen ausbilden und haften an hydrophoben Oberflächen wie Teflon (Polytetrafluorethylen) (Linder, 2009). Alle vorgestellten Peptide, die eine Affinität zu PET aufweisen, haben kurze Aminosäuresequenzen (< 100 AS) und kennzeichnen sich durch hydrophobe und hydrophile Bereiche, welche sehr gut zu der amphipathischen Struktur von PET passen. Darüber hinaus

charakterisieren sich die hydrophoben Bereiche, der in dieser Arbeit untersuchten PET-Bindepeptide durch auf der Peptidoberfläche exponierte, teils planar ausgerichtete Aromaten.

4.2 Wechselwirkungen zwischen CBMs und PET

Bisher gibt es nur sehr wenige Studien, die sich mit der Anbindung von CBMs an PET beschäftigt haben. Demzufolge ist auch diese nicht-physiologische Interaktion kaum beschrieben und die genaue Wechselwirkung nicht bekannt. In bisherigen Studien wurde das CBM_{CenA} aus *Cellulomonas fimi* sowie das CBM_{CBH1} aus *T. reesei* an Cutinasen fusioniert, welche PET hydrolysieren können. Dies resultierte in einer höheren PET-Hydrolyse durch Steigerung der Affinität zum Polymer (Ribitsch et al., 2013; Zhang et al., 2013). Weiterhin wurde postuliert, dass hydrophobe Interaktionen zwischen aromatischen Aminosäureresten der CBM-Oberfläche und Phenylgruppen von PET stattfinden (Zhang et al., 2013). Um an der CBM-PET Wechselwirkung beteiligte Aminosäurereste und deren lokale Orientierung aufzuklären, wurden in dieser Arbeit MD-Simulationen an einer geordneten PET-Oberfläche von PET-bindenden und nicht-bindenden CBMs auf Basis der Ergebnisse aus dem „PET Surface Affinity Assay“ durchgeführt. Die untersuchten Peptide *BaCBM2* und *BaCBM5* wiesen in *in silico* Studien jeweils eine exponierte, aromatische Triade auf, die an der Interaktion mit PET beteiligt war, wobei diese hauptsächlich durch π -stacking Interaktionen mit den Phenylgruppen des PET vermittelt wurde. Auch in *in vitro* Experimenten mit Einzel- sowie Dreifachaustauschen von Aminosäureresten der aromatischen Triade von *BaCBM2* (W9A/W44A/W63A) konnten die Varianten PET zwar noch immer binden, die PET-Affinität war allerdings deutlich herabgesetzt. Dies bestätigte experimentell, dass Tryptophane eine Rolle bei der Bindung von CBMs an PET spielen. Um dies weiter zu verifizieren, wurde das Phänomen des Tryptophan-Quenchings ausgenutzt. Das Emissionsmaximum und die Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz werden stark von Änderungen der Mikro-Umgebung beeinflusst und können zur Bestimmung von Protein-Ligand Interaktionen eingesetzt werden (Ghisaidoobe und Chung, 2014). Für die Versuche wurde *BaCBM2* ausgewählt, da das Peptid bereits eine PET-Bindung im „PET Surface Affinity Assay“ gezeigt hatte und die MD-Simulationen π -stacking Interaktionen von Tryptophanen mit PET vorhersagten. Die Tryptophan-Quenching Experimente wiesen eine Interaktion des *BaCBM2*-Fusionsproteins mit PET nach, da sich die Tryptophan-Fluoreszenz durch Zugabe von PET-Nanopartikeln änderte. Des Weiteren deutete das Tryptophan-Quenching selbst darauf hin, dass Tryptophane an der Interaktion beteiligt waren. Eine weitere Möglichkeit wäre allerdings auch, dass das Tryptophan-Quenching durch Konformationsänderungen im Protein zustande kam, welche die Mikro-Umgebung der Tryptophane beeinflussten und die Tryptophane selbst nicht mit PET interagierten. Unter Anbetracht der MD-Simulationsdaten von *BaCBM2*, wurde das Tryptophan-Quenching jedoch eher auf π -stacking Interaktionen zwischen den Tryptophan-

Resten und den Phenylgruppen von PET zurückgeführt. Weiterhin ist zu beachten, dass über diese Methode keine Aussage dazu getroffen werden konnte, welche Tryptophane des Fusionsproteins *BaCBM2*-Bs2-StrepII mit PET interagierten. Neben den Tryptophanen von *BaCBM2* wies das Fusionsprotein noch drei weitere Tryptophane auf, wobei sich jeweils eins im *Spacer*, eins im Bs2 und eins im *Strep-tag*® II befand. Da das Kontrollprotein Bs2-StrepII im „PET Surface Affinity Assay“ keine PET-Affinität zeigte, lag die Vermutung nahe, dass die im Tryptophan-Quenching involvierten Tryptophane aus dem *BaCBM2* stammten. Zur Bestätigung könnte das *BaCBM2* beispielsweise mit einem His₆-Tag ohne Fusion des Bs2 gemessen werden oder das Tryptophan-Quenching von Bs2-StrepII ohne *BaCBM2* bestimmt werden. Im letzteren Fall, ist jedoch fragwürdig, wie die Daten sinnvoll mit dem des *BaCBM2*-Fusionsproteins verglichen und ausgewertet werden könnten. Zudem konnte mit Hilfe der Tryptophan-Quenching Methode erstmalig eine Dissoziationskonstante für eine CBM-PET Interaktion ermittelt werden und bietet somit eine Möglichkeit PET-Affinitäten verschiedener CBMs quantitativ miteinander vergleichen zu können. Limitiert wird die Methode jedoch dadurch, dass nicht aus jedem Kurvenverlauf eine Dissoziationskonstante bestimmt werden kann (vgl. 3.1.6). Anzumerken ist auch, dass anders als die geordnete PET-Oberfläche in MD-Simulationen und im „PET Surface Affinity Assay“, die Tryptophan-Quenching Experimente zur Verwendung einer wässrigen Suspension den Einsatz von PET-Nanopartikeln erforderten, welche mutmaßlich durch eine größtenteils amorphe Struktur charakterisiert waren.

Zusätzlich zeigten die MD-Simulationen, dass das Verhältnis von hydrophoben und polaren Interaktionen an der CBM-PET Grenzfläche ein wichtiges Merkmal ist, um zwischen niedrigen und hohen PET-Affinitäten zu unterscheiden. Im „PET Surface Affinity Assay“ konnte weder für *BaCBM5* noch für *TrCBM1* eine Affinität zu PET nachgewiesen werden. Bei *BaCBM5* war die Kontaktfläche vorwiegend hydrophob. Vermutlich war die *BaCBM5*-PET Interaktion für eine permanente PET-Bindung nicht stark genug, worauf auch die in der MD-Simulation gemessene relativ hohe Energie (Abb. 3.8 B) hinwies, sodass *BaCBM5* wahrscheinlich während der Waschschrte im „PET Surface Affinity Assay“ entfernt wurde. Im Fall von *TrCBM1* erwies sich die Kontaktfläche als klein und vorwiegend polar. Dies könnte andeuten, dass *TrCBM1* nicht mit der amphipathischen Struktur von PET kompatibel war, da die Interaktionen zwischen den hydrophilen Resten und den aromatischen Ringen ungünstig waren. Im Gegensatz zu den beiden Extremen *BaCBM5* und *TrCBM1*, wies *BaCBM2* nicht nur eine größere Kontaktfläche auf, sondern auch ein ausgezeichnetes Verhältnis von hydrophoben und polaren Interaktionen. Dies führte zu einer geringen Energie *in silico* (Abb. 3.8 B) und passte sehr gut zu der detektierten PET-Bindung *in vitro*. Auch in der Literatur wurde bereits neben den hydrophoben Interaktionen über die Wichtigkeit von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäureresten von CBMs und Esterbindungen in PET berichtet (Zhang et al., 2013). Hierzu wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Austausch

W68Y in CBM_{CenA} in Fusion mit einer Cutinase, zu einer verbesserten PET-Bindungskapazität des Fusionsproteins durch die Bildung einer neuen Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe von Tyrosin und PET führte (Zhang et al., 2013). Des Weiteren wurde in den MD-Simulationen mit *TrCBM1* festgestellt, dass Konformationsänderungen durch Bindung der PET-Oberfläche stattfinden können, da sich *TrCBM1* von einem unstrukturierten Peptid in Wasser zu einem gefalteten Peptid an der PET-Oberfläche umformte. Dies bestätigte ähnliche Ergebnisse vorheriger Studien, bei denen sich die Proteinstrukturen signifikant unterschieden, je nachdem, ob sie sich in Wasser oder in der Nähe einer Grenzfläche befanden (Mabry et al., 2015; Zhuang et al., 2011). Solch ein Verhalten wie das von *TrCBM1* kann eine große Herausforderung bei der Konstruktion verbesserter CBM-Varianten darstellen, da die Kontaktfläche mit PET bei solchen Peptide nur schwer vorhergesagt werden kann.

4.3 Nachweis und Quantifizierung von gebundenen Peptiden an synthetischen Polymeren

Eine Voraussetzung für die Anwendung von Peptiden, die synthetische Polymere binden, ist die qualitative und quantitative Analyse der Bindeaffinität. Um die Affinität von potentiell PET- oder PP-bindenden Peptiden nachzuweisen sowie die PET-Affinität von generierten Varianten zu quantifizieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden eingesetzt. Diese wurden teilweise neu entwickelt oder speziell für die Fragestellung etabliert und tragen zur Erweiterung des Repertoires an Methoden für die Protein-Polymer Forschung bei. Die Untersuchung von PET-bindenden Peptiden erfolgte in Fusion mit einem Fluoreszenzmarker, der sowohl zur Verfolgung des Peptids während des Aufreinigungsprozesses als auch ohne Peptid als Negativkontrolle diente. Ferner ermöglichte der Fluoreszenzmarker den *Strep-tag*® II bei jedem Konstrukt an die gleiche Aminosäuresequenz anzuhängen, sodass dieser im „PET Surface Affinity Assay“ stets gleich gut für die *Strep-Tactin*® gekoppelte Alkalische Phosphatase zugänglich war.

Auf Grundlage der *Strep-tag*® II-Detektionstechnologie können im „PET Surface Affinity Assay“ (vgl. 3.1.3) markierte Proteine auf synthetischen Oberflächen nachgewiesen werden. Mit einer auf einem ähnlichen Prinzip basierenden Nachweismethode wurde beispielsweise auch die Enzymadsorption einer PET-hydrolysierenden Cutinase untersucht (Ribitsch et al., 2013). Das hier entwickelte Testverfahren des „PET Surface Affinity Assays“ ermöglicht eine hoch spezifische Detektion und eine schnelle Untersuchung einer Vielzahl von Proben. Daher eignet sich die Methode, um die Affinität von zu untersuchenden Proteinen gegenüber synthetischen Polymeren, in diesem Fall PET, mit geringem Aufwand zu evaluieren. Neben der qualitativen Bestimmung können Affinitäten zudem semi-quantitativ eingeordnet werden, da die auf die PET-Folie aufgetragene Proteinmenge proportional zur Intensität des *Output*-Signals auf der Membran ist. Jedoch können *Output*-Signale unterschiedlicher Membranen nicht quantitativ

miteinander verglichen werden. Wie sich herausstellte, eignete sich der Test sehr gut, um in einer ersten Durchmusterung CBM-Kandidaten mit PET-Affinität zu identifizieren und trug daher wesentlich zum Erfolg des Vorhabens bei (vgl. 3.1.4). Die PET-Affinitäten der rational zusammengestellten CBMs verschiedener Familien und Organismen konnten im Rahmen dieses Versuchsaufbaus zwar nicht quantifiziert werden, dies war aber auch für die Ermittlung des geeignetsten Kandidaten nicht erforderlich. Besonders positiv fiel das *BaCBM2*-Fusionsprotein auf, da es nicht nur eine deutliche PET-Affinität im „PET Surface Affinity Assay“ zeigte, sondern zusätzlich eine gute Produzierbarkeit aufwies und im Gegensatz zu anderen CBM-Fusionsproteinen, die auch an PET gebunden haben, stabil vorlag (vgl. *ucCBM10*, Abb. 3.3). Dies kennzeichnete *BaCBM2* als interessanten Kandidaten für die biotechnologische Anwendung in der Industrie, bei der die Verzahnung von Produzierbarkeit, Stabilität und Aktivität essentiell wichtig ist (Adrio und Demain, 2010; Palomares et al., 2004). Ein semi-quantitativer Vergleich von PET-Affinitäten der CBMs würde zunächst die Anreicherung einiger CBM-Fusionsproteine in höheren Konzentrationen erfordern, was eine Herausforderung darstellt. Allerdings würde sich auch dann die Frage stellen, inwiefern die *Output*-Signale des „PET Surface Affinity Assays“ miteinander verglichen werden können und nach welchen Kriterien die Proben aufgetragen werden sollten, da unklar ist, ob nur die Vollängenproteine oder auch abgebaute Peptide (vgl. CBMs der Familie 10) binden. Darüber hinaus müssten die ermittelten PET-Affinitäten durch mehrfache Wiederholungen mit neu aufgereinigten Proteinfractionen verifiziert werden. In diesem Zusammenhang könnten auch größere Mengen der Peptide *TrCBM1*, *BaCBM5* und *PaCBM10*, die hier als „nicht-bindend“ klassifiziert wurden, aufgetragen werden, wodurch womöglich doch eine Affinität zu PET nachweisbar wäre. Für die anwendungsbezogene Fragestellung in dieser Arbeit war dies jedoch irrelevant, da Peptide mit möglichst hoher PET-Affinität identifiziert werden sollten. Neben dem Nachweis von CBMs auf einer PET-Oberfläche konnte der „PET Surface Affinity Assay“ nach leichter Modifizierung des Protokolls ebenfalls dazu genutzt werden, die Affinität von cLCI-StreptII zu PP zu verifizieren. Dies zeigt deutlich die Variabilität der etablierten Methode und erlaubt es die Affinität verschiedener Proteine und Feststoffe zu untersuchen. Nach dem qualitativen Nachweis von PET-Bindeeigenschaften der Peptide stellte die Quantifizierung der PET-Affinität von Varianten eines ausgewählten Peptids eine Herausforderung dar. Als zu untersuchender Kandidat wurde *BaCBM2* herangezogen, da es als vielversprechendstes Bindepeptid zur Funktionalisierung von PET angewendet werden sollte und daher Varianten mit verbesserter PET-Affinität von Interesse waren. Zusätzlich wurden Varianten mit potentiell geringerer PET-Affinität entwickelt, um die Beteiligung der aromatischen Aminosäuren bei der Interaktion mit PET zu validieren. Zunächst wurde der „PET Surface Affinity Assay“ angewendet, welcher semi-quantitative Aussagen über die PET-Affinität der Varianten lieferte. Wie erwartet, wiesen die Varianten_{red} geringere PET-Affinitäten

als der WT auf. Dies stimmte mit den Erkenntnissen aus den MD-Simulationen und dem Tryptophan-*Quenching* Experiment überein, welche auch eine entscheidende Rolle der exponierten Tryptophane bei der Interaktion mit PET zeigten. Eine PET-Affinität war aber dennoch messbar und könnte über polare Interaktionen von hydrophilen Bereichen des CBMs mit PET erklärt werden. Diese traten bei den MD-Simulationen zwischen *BaCBM2* und PET auf (vgl. 3.1.5.1, 4.2) und sind auch für eine effektive Bindung von CBMs der Familie 2a zu kristalliner Cellulose beschrieben (McLean et al., 2000). Unter den Varianten_{opt} konnte die *BaCBM2_S11R_D45N-Bs2-StrepII* Variante mit erhöhter PET-Affinität identifiziert werden. Die ausgetauschten Aminosäuren scheinen wie erwartet als Wasserstoffbrücken-Donoren zu fungiert und auf diese Weise die Interaktion gestärkt zu haben. Die anderen konstruierten Varianten_{opt} wiesen im „PET Surface Affinity Assay“ keine verbesserte PET-Affinität auf. Das Ergebnis der W63Y-Variante steht im Widerspruch zur Literatur, bei der die Fusion aus CBM_{CenA} mit vergleichbarem Austausch und einer Cutinase zu einer erhöhten PET-Hydrolyse aufgrund einer gesteigerten PET-Affinität führte (Zhang et al., 2013). Hier könnte es sein, dass sich die Optimierung nicht auf ein anderes CBM der Familie 2 übertragen lässt, sondern für jedes CBM individuell evaluiert werden muss. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der „PET Surface Affinity Assay“ nicht ausreichend sensitiv zur Detektion solcher geringen Differenzen in der PET-Affinität ist. Bei den weiteren Varianten_{opt} wurden, auf Basis der Kontaktkarte von *BaCBM2* mit PET, Tryptophane in die Aminosäuresequenz eingeführt. Inwiefern die beobachteten, geringeren bzw. nicht erhöhten *Output*-Signale gegenüber dem WT auf eine reduzierte PET-Affinität hindeuteten, war nicht eindeutig zu bestimmen. Die Stabilität der Proteinstrukturen könnte durch die Proteinmodifizierung verändert worden sein und die PET-Affinität negativ beeinflusst haben. Unterstützt wird diese Hypothese durch die SDS-PAGE Analyse mit leichten Abbaubanden in den Proteinfractionen (Abb. 3.11). Weiter könnten die daraus resultierenden, leicht voneinander abweichenden Reinheitsgrade der verglichenen Proben einen Einfluss auf die detektierte Affinität gehabt haben. Um dies zu überprüfen, könnte über andere Aufreinigungsverfahren der Reinheitsgrad der Vollängenproteine erhöht und somit angeglichen werden. Hierzu könnte beispielsweise eine Größenausschlusschromatographie angewendet werden (Hong et al., 2012). Dennoch erlaubte die Untersuchung der *BaCBM2*-Varianten im „PET Surface Affinity Assay“ erste Tendenzen der PET-Affinitäten zu bestimmen. Dies unterstreicht, dass mit dieser Methode einfach und schnell erste Aussagen getroffen werden können. Zugleich konnten so die Grenzen der Methode ermittelt werden. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass für eine angemessene Signalstärke die Proteinlösung sehr stark verdünnt werden muss. Durch Verdünnungsfehler kann somit eine erste Fehlerquelle entstehen. Hinzu kommt, dass die Proteinkonzentrationsbestimmung durch den Bradford-Test womöglich zu ungenau für den schlussendlichen Vergleich von applizierten Mengen im pmol-Bereich ist. Weitere Fehlerquellen können in der densitometrischen Analyse

der *Output*-Signale und der nicht exakt gleichen Inkubationszeit der Proteine auf der PET-Folie liegen. All diese Faktoren sind Messungenauigkeiten, welche zu Schwankungen in den Ergebnissen führen können und höchstwahrscheinlich auch Gründe für die Standardabweichung von 7,5 % bei den *Output*-Signalen von Triplikaten aufgereinigter Proteinfractionen des *BaCBM2*-Fusionsproteins waren. Aufgrund dessen konnten *BaCBM2*-Varianten mit geringeren Unterschieden in der PET-Affinität nicht identifiziert werden.

Um feinere Unterschiede in den PET-Affinitäten zu detektieren, wurde als weitere Messmethode die *MicroScale* Thermophorese herangezogen, welche in dieser Arbeit erstmals für Proteininteraktionsstudien mit PET-Nanopartikeln eingesetzt wurde und daher zunächst die Etablierung eines Messsystems erforderte. Wie sich herausstellte, eigneten sich weder Bs2 noch eGFP als fusionierte Fluoreszenzmarker an *BaCBM2* für die Methode. Bei Bs2 passte das Fluoreszenzspektrum nicht optimal zum Filterset des Messgeräts und bei eGFP war die heterologe Expression des Genkonstrukts *BaCBM2*-eGFP-StrepII schwierig. Ein neuer Ansatz könnte sein, das *BaCBM2* ohne Fusion eines Fluoreszenzproteins zu verwenden, sondern es mit einem für das Filterset passenden Farbstoff, beispielsweise Alexa Fluor® 488, zu markieren. Dieser konnte bereits in mehreren *MicroScale* Thermophorese Studien erfolgreich genutzt werden (Ciric et al., 2015; Jerabek-Willemsen et al., 2011; van den Bogaart et al., 2012). Dadurch könnten nicht nur wesentlich weniger Protein, sondern auch weniger PET-Nanopartikel eingesetzt werden. Zugleich wäre dies von Vorteil, da der Einsatz der PET-Nanopartikelsuspension eine Fehlerquelle des Messsystems darstellen könnte. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich Restlösungsmittel in der PET-Nanopartikelsuspension befand. Dieses könnte bei der Titration in unterschiedlichen Konzentrationen in den einzelnen Messproben zurückgeblieben sein und die Messung beeinflusst haben. Weiterhin könnte die Größenverteilung der PET-Nanopartikel zu inhomogen gewesen sein. Darüber hinaus war es nicht möglich die Proben, wie empfohlen, vor ihrer Messung zu zentrifugieren um potentiell störende Agglomerate zu entfernen, da dann auch die PET-Nanopartikel sedimentierten. Auch Bestandteile des Messpuffers könnten mit den PET-Nanopartikeln reagiert und zu einem instabilen System beigetragen haben. Daher sollte bei der weiteren Etablierung auch die Zusammensetzung des Messpuffers optimiert werden.

Zusätzlich wurde über das Tryptophan-*Quenching* versucht, die PET-Affinität der *BaCBM2*-Varianten zu quantifizieren, da die Methode bereits für den WT etabliert und erstmalig eine Dissoziationskonstante bestimmt werden konnte. Dissoziationskonstanten konnten für die Varianten mit Hilfe dieser Methode jedoch nicht ermittelt werden. Die Interpretation der spektroskopischen Daten war nicht eindeutig und wird auch in der Literatur als Herausforderung beschrieben, da viele Faktoren zu photophysikalischen Veränderungen beitragen können (Ghisaidoobe und Chung, 2014). Das Emissionsmaximum und die Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz werden sehr stark von der Polarität der Mikro-Umgebung

beeinflusst (Ghisaidoobe und Chung, 2014), welche in diesem Messsystem durch die Einführung oder die Entfernung von Tryptophanen verändert wurde. Wie bereits beim „PET Surface Affinity Assay“ angemerkt, könnte auch die individuelle Stabilität der Varianten eine Rolle gespielt haben und sollte in Folgestudien überprüft werden.

Wie sich zeigte, erfordert also die Quantifizierung der PET-Affinität von Peptiden zunächst eine intensive Etablierung von Methoden, wobei neben den in dieser Arbeit angewendeten Techniken noch Weitere zur Beantwortung der Fragestellung getestet werden könnten. Beispielsweise erlaubt die Quarzkristall-Mikrowaage geringe Massenunterschiede des Quarzkristalls (Bsp. durch die Adsorption von Proteinen) über die Veränderung der Resonanzfrequenz zu bestimmen (Sauerbrey, 1959). Auf diese Weise konnten bereits unterschiedliche Massen der Cutinase Thc_Cut1 allein oder in Fusion mit dem CBM_{CBH1} auf PET-beschichteten Kristallen gemessen werden (Ribitsch et al., 2013). Weiter ermöglichen die Biacore® SPR (*Surface Plasmon Resonance*)-Systeme, die Bindungskinetik von einem immobilisierten Ligand auf einer Sensoroberfläche und einem mobilen Analyt zu messen und wurden auch schon zur Charakterisierung von CBMs verwendet (Cockburn et al., 2015; Nielsen et al., 2009; Ruzanski et al., 2013). Dazu könnten die zu untersuchenden CBMs über ihre Amin-/ Carboxylgruppe kovalent an eine Sensoroberfläche gebunden werden und die PET-Nanopartikel als Analyt fungieren. Da jedoch für jede CBM-Variante ein neuer Chip verwendet werden müsste, wäre dies eine kostspielige Methode. Auch die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) wurde bereits zur Untersuchung von CBM-Ligand Bindungen eingesetzt (Boraston, 2005; Cuyvers et al., 2012; Guo und Catchmark, 2013; Zhang et al., 2015). Mit dieser Messmethode kann die Bindungsaffinität und Thermodynamik markierungsfrei und ohne Immobilisierung eines Interaktionspartners bestimmt werden. Sie basiert auf der Messung von Wärme, die bei biomolekularen Wechselwirkungen abgegeben oder aufgenommen wird. Soweit bekannt, wurden PET-Nanopartikel noch nicht mit dieser Methode verwendet, jedoch wurden ITC-Messungen mit Nanopartikeln aus Gold und Titan(IV)-oxid durchgeführt (Joshi et al., 2004; Loosli et al., 2015). Dies lässt vermuten, dass sich die ITC vom technischen Standpunkt aus auch für Messungen mit Nanopartikeln aus PET eignet.

4.4 Produktion der PP- und PET-bindenden Peptide

Für die industrielle Realisierung eines Produkts und so auch für die biotechnologische Anwendung von Peptiden mit Affinität zu synthetischen Polymeren ist der wirtschaftliche Aspekt entscheidend, welcher stark von der Produzierbarkeit der Peptide abhängig ist (Li, 2011; Palomares et al., 2004). Als essentieller Faktor ist hierbei ein geeignetes Expressionssystem zu nennen, mit dem die Peptide in zufriedenstellender Ausbeute hergestellt werden können (Gecchele et al., 2015). Neben der Produktivität sind bei der Wahl

eines geeigneten Systems zusätzliche Anforderungen wie Proteingröße, intrazelluläre Lokalisation bzw. Sekretion oder posttranslationale Modifikationen zu beachten (Berlec und Štrukelj, 2013; Parachin et al., 2012). Außerdem müssen praktikable Aufreinigungs- und Verfahrensprozesse etabliert werden. Aus diesen Gründen wurde nach geeigneten Herstellungsverfahren für das PET-bindende *BaCBM2* sowie für das PP-bindende LCI gesucht und entsprechend etabliert. Die beiden Peptide eint, dass sie klein sind (< 10 kDa) und eine Affinität zu synthetischen Polymeren aufweisen, sodass sie potentiell auch Material im Verarbeitungsprozess binden können. Die Auswahl geeigneter Gefäße kann daher dazu beitragen, den ungewollten Verlust der Peptide zu vermeiden (Goebel-Stengel et al., 2011). Zudem wurde beiden Peptiden zur chemischen Verknüpfung von funktionalen Bausteinen ein Cystein an den N-Terminus sowie zur Detektion und Aufreinigung ein *Strep-tag*® II angehängen.

Zur Identifizierung eines geeigneten Produktionssystems für *BaCBM2* wurde die Expression des Genkonstrukts in drei Organismen untersucht. *B. subtilis* kam als Wirt in Frage, da das *BaCBM2* aus der Gattung *Bacillus* stammt und *B. subtilis* für die Produktion von extrazellulären Proteinen sehr gut etabliert ist (Schallmey et al., 2004). Hierbei können Zielproteine direkt ins Medium sekretiert werden, wodurch ein kurzes DSP ermöglicht wird (Morello et al., 2008). Für die Sekretion von Zielproteinen über den Sec-Weg von *B. subtilis* werden diese an ein Signalpeptid fusioniert, welches für die effiziente Translokation durch die Membran eine zentrale Rolle spielt (Brockmeier et al., 2006). Allerdings variiert die Sekretionseffizienz je nach Signalpeptid und die optimale Kombination aus Signalpeptid und Zielprotein muss stets individuell ermittelt werden (Brockmeier et al., 2006). Da ein globales Instrument zur rationalen Vorhersage eines passenden Signalpeptids bis jetzt nicht beschrieben wurde, muss ein geeignetes Signalpeptid empirisch identifiziert werden (Degering et al., 2010). Daher wurden in diesem Fall zehn Signalpeptide, welche in vorherigen Studien erfolgreich zur Sekretion rekombinanter Proteine eingesetzt wurden, mit der Zielproteinsequenz fusioniert (persönliche Mitteilung, Christian Degering, evoxx technologies GmbH). Unter den untersuchten Bedingungen konnte jedoch keine zufriedenstellende *BaCBM2*-Ausbeute im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Hier könnte eine umfangreichere Durchmusterung von Signalpeptiden durchgeführt werden, um ein passendes Signalpeptid für *BaCBM2* zu finden. Um eine Kennzahl zu nennen, konnte beispielsweise die Sekretion der Protease BPN' aus *B. amyloliquefaciens* nach Durchmusterung von 173 *B. subtilis* Signalpeptiden und 220 *B. licheniformis* Signalpeptiden optimiert werden (Degering et al., 2010). Des Weiteren wurde die Produktion von *BaCBM2* in *P. pastoris* unter Verwendung des kommerziellen pGAPZα-/pPICZα-Vektorsystems untersucht, bei dem Zielproteine durch Fusion mit dem Signalpeptid des α-Faktors aus *S. cerevisiae* sekretiert werden können. Diese Expressionsplattform ist ebenfalls sehr gut untersucht und wird häufig für die Produktion von Proteinen angewendet

(Damasceno et al., 2012; Prielhofer et al., 2013). In diesem Fall stellte sich jedoch heraus, dass das *BaCBM2* auf dem Sekretionsweg glykosyliert wurde und die Glykosylierung die PET-Affinität beeinträchtigte. Ein vergleichbarer Effekt wurde schon für ein CBM der Familie 2 beobachtet, bei dem die Affinität zu kristalliner Cellulose durch den Anhang von *N*- und *O*-Glykanen bei heterologer Expression in *P. pastoris* stark herabgesenkt wurde (Boraston et al., 2001). Zur industriellen Produktion des *BaCBM2* mit *P. pastoris* sollte daher überprüft werden, wie effizient das *BaCBM2* mittels Endo-Glykosidasen deglykosyliert werden kann und ob sich die PET-Affinität von de- und unglykosyliertem *BaCBM2* unterscheidet. Weiterhin gilt zu kalkulieren, ob der Einsatz von Endo-Glykosidasen wirtschaftlich ist. Zur Vermeidung der Glykosylierung könnten die beiden vorhergesagten *N*-Glykosylierungsstellen mutiert werden. Aufgrund der veränderten Aminosäuresequenz müsste dann aber die PET-Affinität erneut bestätigt werden. Eine andere Option wäre, die Expression von *BaCBM2* in dem phytopathogenen Basidiomyceten *Ustilago maydis* durchzuführen, mit dem Zielproteine über einen unkonventionellen Sekretionsweg aus der Zelle exportiert werden können. Dieser umgeht das Endoplasmatische Retikulum, sodass Proteine trotz *N*-Glykosylierungsstellen nicht glykosyliert werden (Feldbrügge et al., 2013; Sarkari et al., 2014; Stock et al., 2012; Terfrüchte et al., 2017). Die Synthese von *BaCBM2* in *E. coli* führte zur Bildung von Einschlusskörpern, welche unlösliche Aggregate aus fehlgefalteten Proteinen ohne biologische Aktivität darstellen und eine Prozedur aus Solubilisierung, Rückfaltung und Aufreinigung erfordern, um aktives Protein zu erhalten (Singh und Panda, 2005; Villaverde und Mar Carrió, 2003). In einer ersten Machbarkeitsstudie konnte hier auf diese Weise gefaltetes und funktionales *BaCBM2* erhalten werden. Die Ausbeute lag bei ca. 56 mg/L Peptid in Einschlusskörpern, wovon über 90 % renaturiert werden konnten. Ähnlich ist die Produktion eines CBMs aus dem humanen Laforin-Protein beschrieben, welches unter Verwendung verschiedenster Expressionswirte und -systeme nicht synthetisiert werden konnte, allerdings löslich und funktional durch die Rückfaltung aus Einschlusskörpern gewonnen werden konnte (Moreira et al., 2010). Die Bildung von Einschlusskörpern bei der CBM-Synthese in *E. coli* war nicht verwunderlich, da gerade stark überexprimierte, heterologe Genprodukte, die zudem einen stark hydrophoben Charakter zeigen, besonders anfällig für die Aggregatbildung sind (Mitraki et al., 1991; Singh und Panda, 2005). Da die Rückfaltung aus Einschlusskörpern auch für industrielle Prozesse gut beschrieben ist und einige Optionen zur Optimierung zur Verfügung stehen (Clark, 2001; Singh und Panda, 2005), bestehen gute Chancen ein optimiertes *E. coli* Produktionssystem für *BaCBM2* zu entwickeln. Darüber hinaus könnte die IPTG-Konzentration und der Zeitpunkt, zu dem es der Kultur zugeführt wird, optimiert werden, da dies wichtige Parameter für den Produktbildungsprozess sind (Berrow et al., 2006; Donovan et al., 1996). Zwar wurde in diesem Fall mit in der Literatur beschriebenen Orientierungswerten gearbeitet, jedoch ist das Induktionsoptimum stets abhängig vom

verwendeten Stamm, dem Expressionsplasmid sowie dem Zielgen (Berrow et al., 2006; Donovan et al., 1996; Rahmen et al., 2015). Kürzlich wurde eine Licht-induzierte Genexpression mit photo-gesperrtem IPTG beschrieben, welche es erlaubt ein Induktionsprofil im Hochdurchsatzformat zu erstellen (Wandrey et al., 2016). Diese Methode könnte dazu eingesetzt werden, die optimalen Induktionsparameter für die Genexpression von *BaCBM2* in *E. coli* zu finden und das Peptid vielleicht auch in der löslichen Form zu erhalten. Darüber hinaus könnte die Löslichkeit der Proteine durch eine niedrigere Kultivierungstemperatur, durch Fusion mit einem Löslichkeitstag (z. B. SUMO-Tag) oder durch die Co-Synthese von Chaperonen erhöht werden (Costa et al., 2014; de Marco et al., 2007; Francis und Page, 2010; Sørensen und Mortensen, 2005b). Aus diesen Gründen sollte die weitere Etablierung eines großtechnischen Herstellungsverfahrens für *BaCBM2* mit *E. coli* als Expressionswirt durchgeführt werden.

Eine weitere Herausforderung war, einen geeigneten Herstellungsprozess auf Basis eines mikrobiellen Expressionssystems für das PP-affine Peptid LCI zu etablieren, da es antimikrobielle Eigenschaften aufweist (Gong et al., 2011; Liu et al., 1990; Parachin et al., 2012). Beschrieben wurden antimikrobielle Aktivitäten gegenüber den zwei Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas solanacearum* und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Liu et al., 1990). Gegenüber *E. coli*, dem meist verwendeten Expressionswirt für AMPs, war keine antimikrobielle Wirkung bekannt und *E. coli* wurde auch schon zur heterologen Expression des *lci*-Gens verwendet. In zwei Studien wurde beschrieben, dass das LCI mit *E. coli* DH5 α in großen Mengen produziert werden konnte (Gong et al., 2011; Zhu et al., 2001). Allerdings wurden weder die Expressionssysteme noch die LCI-Ausbeuten im Detail erläutert. Des Weiteren wurde im Rahmen des „FuPol“-Projekts durch Kooperationspartner das LCI in Fusion mit eGFP in *E. coli* BL21 (DE3) Gold Zellen synthetisiert, sodass ausreichende LCI-Mengen zur Funktionalisierung von PP im Labormaßstab bereit gestellt werden konnten (Rübsam et al., 2017). Das System eignet sich jedoch höchstwahrscheinlich nicht, um größere Mengen des antimikrobiellen Peptids für ein großtechnisches Färbeverfahren zu produzieren. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die LCI-Ausbeute durch ein optimiertes *E. coli* Expressionssystem gesteigert werden kann. Die verwendeten Systeme sollten einerseits die Toxizität durch Protein *Trans*-Spleißen oder Veränderung der Löslichkeit umgehen. Eine Strategie war die Löslichkeit durch Fusion mit dem *Carrier*-Protein MBP zu verbessern, wohingegen die Fusion mit dem selbst-assemblierenden Peptid ELK16 die Proteinaggregation begünstigen sollte (Li, 2011). Andererseits sollten die Systeme zu einer möglichst hohen LCI-Ausbeute führen. Deswegen wurde das MBP mit repetitiven LCI-Sequenzen fusioniert wie es beispielsweise auch schon für das Indolicidin in Fusion mit dem *Carrier*-Protein Thioredoxin gemacht wurde (Morin et al., 2006). Die Anzahl der Wiederholungssequenzen wurde auf drei festgelegt, da hohe Kopienzahlen (über vier) die Expressionsrate vermutlich verursacht durch

Transkriptinstabilität deutlich verringern können (Gaiser et al., 2011; Kim et al., 2006; Li, 2011). Auch wurden mehrere DNA-Sequenzen des *lci*-Gens in einer Operonstruktur exprimiert. Sowohl die Expression in Konkateren als auch die Fusion mit *Carrier*-Proteinen sowie der Einsatz von Intein wurde für die Produktion von AMPs beschrieben und in dieser Arbeit in ähnlicher Form eingesetzt (Hara und Yamakawa, 1996; Kim et al., 2006; Morassutti et al., 2005; Morin et al., 2006; Parachin et al., 2012; Wang et al., 2012). Eine ausreichende LCI-Ausbeute konnte bei diesen Systemen jedoch nicht detektiert werden. Bei jedem System kann über individuelle Ursachen diskutiert werden. In der Gesamtheit deuten die Ergebnisse aber an, dass das *lci*-Gen nicht gut in *E. coli* exprimiert werden kann und dass das Genprodukt sich womöglich auch antimikrobiell gegen den Gram-negativen Organismus *E. coli* richtet. Da das LCI ursprünglich aus *B. subtilis* A014 stammt und keine antimikrobielle Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien beschrieben wurde (Liu et al., 1990), wurde überprüft, ob das LCI mit der oben beschriebenen *B. subtilis* Expressionsplattform synthetisiert und sekretiert werden kann. Um die Zielproteinausbeute zu erhöhen, wurde das *lci*-Gen hierzu in einer trimeren Konkaterstruktur exprimiert, wie es bereits als Strategie zur Produktion einiger AMPs durchgeführt wurde (Kim et al., 2006; Morin et al., 2006; Park et al., 1998). Auf diese Weise konnten 8,8 µg/L multimeres LCI aus dem *Bacillus*-Kulturüberstand aufgereinigt werden. Solch eine Ausbeute ist im Vergleich zu anderen AMPs, deren Gene ebenfalls in konkateren Konstrukten exprimiert wurden, eher niedrig einzuordnen. Durch die Technik konnten beispielsweise in *E. coli* 150 µg/L des monomeren Indolicidins oder 60 mg/L monomeres Lactoferricin produziert werden (Kim et al., 2006; Morin et al., 2006). Die LCI-Ausbeute war nicht ausreichend für die großtechnische Färbung von synthetischen Fasern und kann mehrere Gründe haben. Zur Konstruktion des Konkaters wurden unter Berücksichtigung der *Codon-Usage* synthetische DNA-Sequenzen generiert, bei denen nach Möglichkeit die Codons variiert wurden. Auf diese Weise sollten Rekombinationen zwischen den repetitiven Einheiten vermieden werden, da diese bei der Expression von konkateren Genen auftreten können (Gigova et al., 1989). Hier könnten dennoch unerwünschte Rekombinationen stattgefunden haben. Weiter könnte die *Codon-Usage* für den Stamm problematisch gewesen sein, beispielsweise aufgrund der Häufigkeit der zur Verfügung stehenden tRNAs oder der Bildung von Sekundärstrukturen (Quax et al., 2015). Wie im oberen Abschnitt bereits erwähnt, könnte zudem die Sekretionseffizienz aufgrund unpassender Signalpeptide abgeschwächt worden sein (Brockmeier et al., 2006). Das Ergebnis passte auch zu einer Literaturangabe, in der postuliert wurde, dass der Einsatz von konkateren Strukturen allein (ohne Fusion mit einem *Carrier*-Protein) meist nicht zu hohen Proteinausbeuten führt (Li, 2011). Neben bakteriellen Systemen wurde die Synthese von LCI außerdem in eukaryotischen Expressionsplattformen untersucht, da AMPs sich meistens nur gegen eine Klasse von Mikroorganismen richten (beispielsweise Bakterien oder Pilze) (Bahar

und Ren, 2013). Die Synthese von LCI mit dem filamentösen Pilz *T. reesei* war unter den untersuchten Bedingungen nicht erfolgreich. Um die Expression zu verbessern, könnte zunächst die DNA-Sequenz für *T. reesei* Codon-optimiert werden (Gaiser et al., 2011; Gao et al., 2015). Weiter könnten ein oder mehrere Introns in die DNA-Sequenz eingefügt werden, da diese Strategie die Expressionsrate des antimikrobiellen Defensins in filamentösen Pilzen um mehr als 50 % steigern konnte (Hoegenhaug et al., 2006). Hefen sind neben *E. coli* die populärsten Expressionswirte für AMPs und die Mehrheit der in Hefen rekombinant hergestellten AMPs wurde in *P. pastoris* synthetisiert (Li und Chen, 2008; Parachin et al., 2012). Mit *P. pastoris* war es möglich im Schüttelkolben sowohl durch eine Methanol-induzierte als auch durch eine konstitutive Expression 32 mg/L bzw. 19 mg/L LCI zu erreichen. *P. pastoris* stellte somit das erfolgreichste der untersuchten Expressionssysteme zur Produktion von rekombinantem LCI dar. Darüber hinaus waren auch die LCI-Ausbeuten mit denen anderer in *P. pastoris* produzierten AMPs vergleichbar. Beispielsweise wurden in *P. pastoris* bei induzierter Expression 2,5 mg/L Antifungal Protein (AFP), 20 mg/L Cecropin A (Mdcec) oder 35 mg/L b-Defensin (msBD-1) synthetisiert (Jin et al., 2006; López-García et al., 2010; Zhao und Cao, 2012). Folglich wurde die *Pichia*-Expressionsplattform für die weiterführende Etablierung eines LCI-Herstellungsverfahrens im 7,5 L Fermenter-Maßstab verwendet. Um die Exprimierbarkeit des *lci*-Gens in *P. pastoris* initial zu überprüfen, wurde die Genexpression unter dem induzierbaren AOX1- sowie unter dem konstitutiven GAP-Promotor durchgeführt. Durch ein induzierbares System kann die anfängliche Zunahme der Biomasse ohne Synthese des Zielproteins stattfinden (Prielhofer et al., 2013). Solch eine Trennung von Zellwachstum und Produktionsphase beugt dem potentiell toxischen Effekt der Akkumulation des rekombinanten Proteins auf Wachstum und Zellviabilität vor (Prielhofer et al., 2013). Jedoch ist der Einsatz von Methanol zur Induktion der Genexpression gerade bei Fermentationen im großen Maßstab unvorteilhaft. Methanol ist ein hoch entzündlicher und gesundheitsgefährdender Alkohol, sodass Sicherheitsvorkehrungen für den großtechnischen Einsatz erforderlich sind (Ahmad et al., 2014; Prielhofer et al., 2013). Zudem führt die Verwendung von Methanol während der *Fed-Batch* Phase zu einer hohen Hitzeentwicklung, wodurch effiziente und energieaufwendige Kühlsysteme benötigt werden (Jungo et al., 2007). Weiter ist der Sauerstoffbedarf bei Methanol höher als bei der Oxidation von Glycerin und der Sauerstofftransfer ist gerade bei hohen Zelldichten von *Pichia* im Bioreaktor schwierig (Jenzsch et al., 2004). Aus diesen Gründen wurde für die Fermentationen in dieser Arbeit die konstitutive Expression bevorzugt, zumal die LCI-Ausbeute im Schüttelkolben nur wenig geringer war als die der Methanol-induzierten Expression. Der gegenüber Kontrollen unauffälligen Wachstumskurve nach zu urteilen, wies das antimikrobielle Peptid keine toxische Wirkung gegenüber *P. pastoris* auf. In den durchgeführten Fermentationen konnte das LCI-Produktionssystem erfolgreich auf einen größeren Maßstab übertragen werden und die LCI-

Ausbeute bereits durch initial angelegte Prozessparameter um das 36-fache auf 0,69 g/L gesteigert werden. Durch Optimierung des Fermentationsprozesses könnte die LCI-Ausbeute mutmaßlich nochmals gesteigert werden. Neben der Identifizierung eines geeigneten Zulaufprofils könnten Medium, pH, Sauerstoffeintrag und Temperatur optimiert werden (Looser et al., 2015; Zhang et al., 2007). Auch die Verwendung kontinuierlicher Kultivierungssysteme mit permanenter Produktabtrennung ist hier denkbar (Weilnhammer und Blass, 1994). Anzumerken ist jedoch, dass die eingestellten Parameter bereits zu sehr guten Werten der Feuchtzellmassen (WCW ~ 400 g/L) führten. Diese wurden für das verwendete Medium von bis zu 450 g/L WCW beschrieben (Zhang et al., 2000). Des Weiteren könnte der verwendete Stamm optimiert werden. Überdies sind neben dem *GAP*-Promotor noch weitere starke Promotoren wie der *TEF1*-, der *PGK1*-, der *GCW14*-, der *G1*- und der *G6*-Promotor beschrieben, durch welche Zielgene konstitutiv in *P. pastoris* exprimiert werden können und Potential zur Steigerung der konstitutiven *lci*-Expression bieten (Ahn et al., 2007; de Almeida et al., 2005; Liang et al., 2013; Prielhofer et al., 2013). Vorteilhaft könnte zudem sein, dass das LCI die dominierende Bande in den SDS-Gelen analysierter Kulturüberstände (von Fermentationen und Schüttelkolben-Anzuchten) war und dementsprechend sehr rein vorlag. So gab es auch nur wenig Proteinhintergrund, der in die LCI-Schicht auf PP eingreifen konnte (vgl. 3.2.3). Zu beachten ist jedoch, dass stark glykosylierte Proteine, wie es für sekretierte Proteine von *P. pastoris* der Fall ist, durch Coomassie Brilliant Blau in SDS-Gelen oft nicht angefärbt werden können (De Pourcq et al., 2010; Steinberg, 2009). Durch eine Glykoproteinfärbung nach der „*Periodic Acid-Schiff*“-Methode (Matthieu und Quarles, 1973), wie sie für Kulturüberstände von *P. pastoris* X-33-BaCBM2^{GAP} durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt), könnten weitere Proteine detektiert werden. Hierbei wurden Proteine sichtbar, die größer als 100 kDa waren. Ein ähnlicher Hintergrund wird auch für den Kulturüberstand von *P. pastoris* X-33-LCI^{GAP} vermutet. Um auszuschließen, dass das detektierte LCI durch Zelllyse in das Kulturmedium gelangte, könnte zusätzlich ein spezifischer, immunologischer Nachweis von intrazellulären Markerproteinen wie Aktin oder Tubulin durchgeführt werden. Eine hohe Zelllyse war aber aufgrund der hohen Feuchtzellmassen nicht wahrscheinlich. Für das folgende DSP war es herausfordernd, dass LCI nicht zu verlieren, da es stark affin gegenüber Polymeren und damit auch gegenüber den Materialien im Aufreinigungsprozess war. Durch die Auswahl geeigneter Verarbeitungssysteme (2.3.3.3) war es jedoch möglich, die Fermentationsbrühe ohne erkennbaren Verlust des LCIs aufzubereiten, so dass es zur weiteren Evaluierung als Ankerpeptid für die PP-Funktionalisierung eingesetzt werden konnte. Da sich die Dialyse der Proben als wichtiger Verarbeitungsschritt für eine homogene LCI-Beschichtung von hydrophoben Oberflächen herausstellte, sollte in weiterführenden Arbeiten ein großtechnisches Verfahren zur Entfernung von Verunreinigungen etabliert werden.

4.5 Anwendungspotential der PP- und PET-bindenden Peptide

Die Funktionalisierung von synthetischen Fasern für die Textilindustrie ist durch den hydrophoben Charakter der Materialien herausfordernd (Pellis et al., 2016; Vertommen et al., 2005; Zimmermann und Billig, 2011). Weiter besteht seitens der Industrie ein großes Interesse an der Applikation von funktionalen Bausteinen auf Textilfasern, welche nicht bei hohen Temperaturen verarbeitet werden können. So weist beispielsweise die Veredelung von Fasern mit TEMs die intrinsische Anforderung auf, die TEMs bei Temperaturen unter 80°C (Beispiel: Expancel® Mikrosphären-Typ 031DU40, AkzoNobel N.V., Amsterdam, Niederlande) zu behandeln, da diese sonst schon während des Verarbeitungsprozesses expandieren. Auch organische Pigmente sind hitzeinstabil und nur eingeschränkt bei den erforderlichen Hoch-Temperatur-Verfahren von Kunststoffen einsetzbar (Herbst und Hunger, 2004). Ein neuartiger Ansatz ist daher die Aufbringung solcher funktionalen Bausteine auf Textilfasern mittels biobasierter Verfahren, welche Reaktionen bei Raumtemperatur ermöglichen. Darüber hinaus können so Prozesse umweltfreundlicher und energieeffizienter gestaltet werden. Hierbei ist die Idee, solche problematischen Module über Ankerpeptide mit Affinität zu synthetischen Polymeren an Textilfasern zu binden („FuPol-Projekt“). Allerdings ist auch bei dieser Bio-Funktionalisierung eine chemische Reaktion für die Verknüpfung der funktionalen Bausteine mit den Ankerpeptiden notwendig, welche im Fall der TEM-Peptid Konjugation einen sauren pH und im Fall der Pigment-Peptid Konjugation eine UV-Belichtung erfordert (persönliche Mitteilung, Benjamin Stomps, Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP in Potsdam, Prof. Dr. Böker, „FuPol“-Projektpartner). Daher wurde für die PET-Funktionalisierung im Rahmen dieser Arbeit zunächst gezeigt, dass das einzusetzende PET-bindende Fusionsprotein *cBaCBM2-Bs2-StreptII* den erforderlichen, sauren Reaktionsbedingungen der Konjugatsynthese standhält. Die Konjugatsynthese selbst war erfolgreich und wurde indirekt durch Mikroskopie einer TEM-funktionalisierten PET-Folie überprüft. Die deutlich höhere Anzahl der angehafteten TEMs auf der PET-Folie im Vergleich zu der von TEMs ohne Peptid ließ hier den Rückschluss einer erfolgreichen Verknüpfung zu. Mit diesem Versuch konnte erstmals das Potential von Polymer-bindenden Peptiden zur Fixierung von TEMs auf einer PET-Oberfläche gezeigt werden. Zusätzlich zum mikroskopischen Nachweis könnte die Verknüpfung direkt mittels Ramanspektroskopie untersucht werden, durch welche Veränderungen der Nitrilgruppen oder neuauftretende Peptidbindungen auf der Oberfläche der TEMs gemessen werden könnten (Brandmüller und Moser, 1962). Die beobachtete Agglomeration der TEMs bei Anwendung des Konjugats auf der PET-Folie könnte durch die Ausbildung von Proteindimeren erklärt werden. Das *BaCBM2*-Fusionsprotein lag aufgrund der global verteilten Nitrilgruppen mutmaßlich auf der gesamten TEM-Oberfläche vor und könnte mit weiteren *BaCBM2*-Fusionsproteinen auf der Oberfläche anderer TEMs interagiert haben. Diese Hypothese wird durch eine Western Blot Analyse (Abb. 3.3 B) unterstützt, bei der

höchstwahrscheinlich Dimere von *BaCBM2-Bs2-StrepII* detektiert wurden und somit die Fähigkeit zur Dimerbildung untermauert wurde. Ob die Agglomeration negativ für das Vorhaben ist oder sich sogar als positiver Effekt erweist, sollte in Anwendungsversuchen gezeigt werden. Des Weiteren konnte die Anbindung des Konjugats an PET durch den „PET Surface Affinity Assay“ bestätigt werden. Jedoch zeigte das Konjugat ein wesentlich schwächeres *Output*-Signal als die Kontrolle (nur Fusionsprotein). Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen könnte das Nachweisverfahren beeinträchtigt und der *Strep-tag*® II durch die TEMs nicht mehr so gut für die Alkalische Phosphatase zugänglich gewesen sein. Zum anderen könnte die Proteinmenge, die zum Zeitpunkt der chromogenen Detektion an PET gebunden war, deutlich verringert gewesen sein. Trotz gleich applizierter Proteinmenge könnte die tatsächliche Anzahl der Proteinmoleküle, welche in Kontakt mit PET kamen, reduziert gewesen sein, da viele Proteine auch an anderen Stellen der TEM-Oberfläche positioniert waren. Ein für das Vorhaben weitaus negativerer Effekt könnte außerdem sein, dass sich gebundene Peptide wieder von PET gelöst haben, da die PET-Bindung durch eine sterische Hinderung geschwächt war oder das im Verhältnis zum Peptid wesentlich größere und schwerere TEM mechanisch an der PET-Bindung gezogen hat. Diese Optionen deuten an, dass in der Entwicklungsphase ein optimiertes Mengenverhältnis von Protein zu TEM ermittelt werden sollte. Dies trifft auch für das Verhältnis von Konjugat zu Faser zu. Im weiteren Verlauf sollte außerdem die Wirtschaftlichkeit dieses innovativen Veredelungsverfahrens geprüft und mit dem bestehender Verarbeitungsprozesse verglichen werden. Zum Beispiel ist ein Verfahren beschrieben, in dem die zu funktionalisierenden Fasern durch ein Bad mit Bindemittel und TEMs gezogen werden (Perera und Mauretti, 2010). Anschließend werden in einem zweiten Bad oder bei Extrusion die mit TEM-beschichteten Fasern mit einem thermoplastischen Polymer überzogen (Perera und Mauretti, 2010). Durch Erhitzung dieses Vorläuferprodukts expandieren die TEMs und dehnen den Überzug aus (Perera und Mauretti, 2010). Zusammenfassend konnte durch die Machbarkeitsstudie dieser Arbeit erstmals das Potential PET-affiner CBMs zur Funktionalisierung von PET aufgezeigt und noch ausstehende Untersuchungspunkte des Vorhabens identifiziert werden. Weiter bestätigte die Studie, dass über dieses biologische Verfahren eine PET-Veredelung mit TEMs ohne Expansion der Kapseln bei Raumtemperatur möglich ist. Vorteile der Methode gegenüber dem bestehenden Verfahren sind, dass keine umweltbelastenden Klebstoffe eingesetzt und die Fasern nicht mit einem weiteren synthetischen Polymer überzogen werden müssten.

Ebenso können PP-affine Peptide zur Applikation von funktionalen Bausteinen auf PP eingesetzt und so unter anderem bei der Entwicklung eines ökologischen Färbeverfahrens von PP-Fasern angewendet werden. Im Rahmen des „FuPol“-Projekts kristallisierte sich das AMP LCI als vielversprechendster PP-Bindekandidat für diese Anwendung heraus, da es im

Vergleich zu anderen PP-Bindepeptiden die stärkste Bindung zeigte (Rübsam et al., 2017). Im Hinblick auf die Anwendung war zudem relevant, dass es klein ist und in der nativen Aminosäuresequenz kein Cystein vorkommt, sodass über eine gezielte Cystein-Integration der Ort der chemischen Konjugation von funktionalen Bausteinen bestimmt werden kann. Entscheidend für die weiterführende industrielle Anwendung von LCI war, dass im Rahmen dieser Arbeit ein Expressionssystem (*P. pastoris*) zur Produktion von LCI im größeren Maßstab identifiziert werden konnte. In diesem Zuge war es erforderlich die Anwendbarkeit des in *P. pastoris* synthetisierten LCIs als Ankerpeptid an PP zu verifizieren. Durch einen qualitativen Nachweis von LCI auf einer PP-Folie, in Kombination mit der Messung einer homogenen LCI-Schicht auf einer PP-simulierten Oberfläche erwies sich das hergestellte LCI weiterhin als geeignet. Hierbei zeigte sich, dass der Charakter der LCI-Schicht auf hydrophoben Oberflächen von dem Reinigungsgrad der LCI-Probe abhängig war und eine homogene Beschichtung mit dialysierten LCI-Proben erreicht werden konnte. Inwiefern die Homogenität der LCI-Schicht einen Einfluss auf die PP-Faserfärbung in Bezug auf Pigmentverteilung und Beständigkeit hat, wird in Anwendungsversuchen durch den Industriepartner evaluiert. Zusätzlich könnte überprüft werden, ob die Simulation der PP-Oberfläche allein über den Grad der Hydrophobizität ausreichend war oder ob weitere Oberflächeneigenschaften von PP zur Affinität von LCI beitragen.

Neben der Funktionalisierung von Textilfasern konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass Polymer-bindende Peptide prinzipiell in Nachweisverfahren für Nanoplastik in wässrigen Systemen angewendet werden können. Die hier entwickelte Methode erlaubt Nanoplastik aus PET mit einem Durchmesser von ungefähr 100 nm in einem einfachen Messsystem ohne teures Equipment im Mikrogramm-Bereich zu detektieren und bietet Entwicklungspotential für den Einsatz mit realen Umweltproben. Weiter ist denkbar, dass durch Verwendung von Filtermembranen mit anderen Porengrößen auch Nanoplastikpartikel mit anderen Größen detektiert werden können. Für die Methodenentwicklung wurde mit Nanoplastik gearbeitet, das im Labor künstlich hergestellt wurde. Es bestand aus einem der weltweit meist produzierten sowie in der Umwelt persistierenden Kunststoffe, PET und die Partikelgröße befand sich per Definition von Nanomaterialien (1–100 nm) im Nanomaßstab (Guebitz und Cavaco-Paulo, 2008; Klaine et al., 2012; Maddah, 2016; Wagner et al., 2014; Yoshida et al., 2016). Somit stellte es von der Größe her sehr gut eine Art von Nanoplastik dar, welche mutmaßlich so oder in ähnlicher Form in der Umwelt vorliegt. Der Einsatz genormter Nanopartikel ist auch gängige Praxis für Studien über den Einfluss von Nanoplastik auf Organismen (Della Torre et al., 2014; Ward und Kach, 2009; Wegner et al., 2012). Es ist jedoch zu beachten, dass das in der Umwelt vorliegende Nanoplastik, höchstwahrscheinlich wie das Mikroplastik nicht nur in der Größe, sondern auch in der Form, der Textur und dem Polymertyp sehr divers sein kann (Koelmans et al., 2015; Syberg et al., 2015; Wagner et al., 2014). Daher muss geprüft werden, welche

Arten von Nanoplastik mit diesem System detektiert werden können. Eventuell bietet es sich auch an einen Proteinmix einzusetzen, sodass unterschiedliche Polymere gebunden werden können. Auf dem jetzigen Forschungsstand ist das Methodenspektrum zur Probennahme, Detektion und Quantifizierung von Nanoplastik sehr begrenzt (Mattsson et al., 2015). Etablierte, analytische Methoden zur Detektion von Nanoplastik in Süß- oder Meerwasser sind bisher nicht beschrieben (Koelmans et al., 2015). Es stehen lediglich Methoden zur Verfügung, die bei laboratorischen Untersuchungen von Nanomaterialien im Allgemeinen genutzt werden. Um die Anreicherung und Auswirkungen von Nanoplastik zu erforschen, wurden vor allem die UV/Vis-Spektroskopie, Elektronenmikroskopie, Feld-Fluss-Fraktionierung oder dynamische Lichtstreuungstechniken verwendet (Koelmans et al., 2015; Velzeboer et al., 2014; Wegner et al., 2012). Das hier beschriebene Messsystem steht zwar erst am Anfang der Entwicklung, stellt aber einen vielversprechenden, innovativen Ansatz zur Detektion von Nanoplastik dar und unterstreicht, wie divers Polymer-bindende Peptide eingesetzt werden können.

Über die untersuchten Anwendungen hinaus weisen PP- und PET-affine Peptide Potential auf, in vielen weiteren Bereichen eingesetzt zu werden. Beispielsweise wurde in mehreren Studien die Aktivität von Cutinasen gegenüber Polyestern durch die Fusion von Bindemodulen verbessert (Perz et al., 2015; Ribitsch et al., 2013; Zhang et al., 2013). Hierbei beschränkte sich allerdings die Auswahl an Bindemodulen auf ein oder maximal zwei Peptide. Eine ausgedehnte Studie, die evaluiert, welche Peptide sich besonders gut als PET-Bindemodule eignen, wurde jedoch nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurde eine Reihe an CBMs mit Affinität gegenüber PET identifiziert, welche die Bandbreite an potentiellen Bindemodulen für PET-Esterasen erweitert. Insbesondere BaCBM2 und ucCBM10 würden sich als Fusionspartner anbieten, da sie eine gute PET-Bindung im „PET Surface Affinity Assay“ zeigten. Darüber hinaus könnten Polymer-bindende Peptide, welche zusätzlich eine gewünschte, antimikrobielle Wirkung aufweisen als Beschichtung auf medizinischen Gegenständen Anwendung finden. Die Adhäsion von Bakterien auf Materialien, die im Gesundheitswesen zum Einsatz kommen, stellt ein Problem dar, da sie Biofilm-assoziierte Infektionen auslösen können (Glinel et al., 2009; Hetrick und Schoenfisch, 2006). Immobilisierte AMPs könnten hingegen einer Biofilmbildung vorbeugen, indem sie die Anzahl lebender Mikroorganismen nach Kontakt mit dem beschichteten Material reduzieren (Costa et al., 2011). Ein themenverwandtes Anwendungsfeld könnten die PP- und PET-affinen Peptide in der Entwicklung von innovativen Lebensmittelverpackungen finden. In der Lebensmittelindustrie wächst stetig das Interesse an einer effizienten Lebensmittelkonservierung, der Qualitätserhaltung und der Sicherheit (Malhotra et al., 2015). Speziell Verpackungen, welche die Haltbarkeit verlängern rücken dabei in den Fokus. Peptide mit Affinität gegenüber synthetischen Polymeren könnten zur Beschichtung des Verpackungsmaterials eingesetzt werden, über die dann antimikrobielle Wirkstoffe auf der Verpackungsoberfläche positioniert

werden könnten (Karam et al., 2013). Als letztes Beispiel könnten die Peptide in Klebstoffen eingesetzt werden, um die Haftung an hydrophobe Oberflächen zu verstärken. In der Klebstoffentwicklung spielen Bioklebstoffe sowie die biomimetische Entwicklung von Klebstoffen bereits eine große Rolle und fanden bereits Anwendung in der Entwicklung von „Unter-Wasser-Klebstoffen“ (Kamino, 2013; Kaplan et al., 2003; Stewart, 2011).

4.6 Ausblick

Seitens der Forschung und der Industrie besteht ein großes Interesse an der Bio-Funktionalisierung von synthetischen Polymeren, da sie ein hohes Potential zur Entwicklung neuartiger und zur Verbesserung bestehender Anwendungen bietet. Insbesondere Polymer-bindende Peptide stellen ein nützliches Instrument zur Textilveredelung dar. Um den Einsatz von LCI als Ankerpeptid zur PP-Funktionalisierung weiter zu verbessern, könnten optimierte Varianten mit höherer PP-Affinität generiert werden. Auch Veränderungen des Expressionskonstrukts könnten die Anwendbarkeit verbessern. Hierzu zählt die Entfernung des *Strep-tag*[®] II, der womöglich die PP-Bindung beeinflusst sowie eine Modifikation des N-Terminus. Aufgrund des verwendeten Vektorsystems befanden sich N-terminal des Cysteins zwei weitere Aminosäuren, deren Reste potentiell die Konjugation von LCI mit funktionalen Bausteinen behindern könnten. In diesem Zuge könnte auch die Expression auf ein lizenzfreies Vektorsystem umgestellt werden, sodass die Produktionskosten gesenkt werden. Im Rahmen des „FuPol“-Projekts werden im weiteren Verlauf Färbetests von PP-Fasern beim Industriepartner stattfinden. Dazu werden LCI-Moleküle aus dialysiertem Fermentationsüberstand an chemisch modifizierte Pigmente konjugiert und anschließend auf PP-Gewebe angewendet. Bei der Entwicklung des Färbeprozesses sollte die Optimierung der einzusetzenden Pigment- und Proteinmenge ebenso eine Rolle spielen wie die Qualitätssicherung bezüglich Waschbeständigkeit und mechanischer Belastbarkeit. Weiter steht die Übertragung des Verfahrens auf einen industriellen Maßstab an, bei dem die chemische Konjugation in einen großtechnischen Prozess umgesetzt und die praktikable Anwendung evaluiert werden müssen. Langfristig soll so ein umweltschonendes Färbeverfahren entwickelt werden, welches zudem die Verwendung eines größeren Farbspektrums ermöglicht, da auch Pigmente eingesetzt werden können, welche nicht in klassischen Hoch-Temperatur-Methoden angewendet werden können (Herbst und Hunger, 2004). Auch für die Bio-Funktionalisierung von PET mit TEMs durch PET-affine Peptide stehen noch einige Schritte bis zur Etablierung eines industriellen Prozesses an. Zunächst sollten die eingesetzten PET-Folien ausführlicheren Waschtests unterzogen werden, um ein klareres Bild zwischen konjugierten und nicht-konjugierten TEMs zu erhalten. Außerdem sollte überprüft werden, ob sich die Funktionalisierung der PET-Folien auf PET-Fasern übertragen lässt. Der weitere Entwicklungsprozess erfordert dann die Umsetzung von Konjugation und Peptid-

produktion in ein großtechnisches Verfahren, sodass PET-Fasern im industriellen Maßstab veredelt und verarbeitet werden können. Funktionalisierte Garne sollten dann im Nähvorgang eingesetzt und die Abdichtung der Einstichlöcher durch Expansion der TEMs nach Hitzeeinwirkung kontrolliert werden. Hier sollte auch untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß TEMs durch mechanische Beanspruchung während des Verarbeitungsprozesses von der Faser gelöst werden.

Für die weitere Entwicklung des Biosensors zur Detektion von Nanoplastik sollte die Spezifität des PET-bindenden Peptids erhöht werden. Das eingesetzte Peptid gehört zur Proteinfamilie der CBMs und kann demnach natürliche Polymere (Polysaccharide) binden (Boraston et al., 2004; Shoseyov et al., 2006). Eine hohe Spezifität für synthetische Polymere ist daher insbesondere für den Nachweis von Nanoplastik in Naturgewässern zwingend erforderlich, um natürliche Polymere als Fehlerquelle in der Analyse auszuschließen. Um die Spezifität zu erhöhen, könnte eine zufällige Mutagenese mit der kodierenden DNA-Sequenz durchgeführt werden (Antikainen und Martin, 2005). Generierte Varianten könnten dann in einem Hochdurchsatzverfahren auf die Bindung von PET sowie von natürlichen Polymeren überprüft werden. Solche Varianten, die nur PET binden, wären für das Nachweisverfahren von Nanoplastik in natürlichen Gewässern optimal geeignet. Darüber hinaus stellen mutmaßlich Schwebstoffe in Umweltproben eine Herausforderung dar, da diese den Filter verstopfen könnten. Diese könnten eventuell durch den Einsatz von Vorfiltern entfernt werden.

In dieser Arbeit wurden Methoden und Fachkenntnisse für Peptide mit Affinität gegenüber synthetischen Polymeren entwickelt, welche auch für zukünftige Fragestellungen in der Protein-Polymer-Forschung eingesetzt werden können. Für Interaktionsstudien und zur Vorhersage von Peptiden mit PET-Bindungspotential stellt die MD-Simulation der Peptide an einer simulierten PET-Oberfläche ein nützliches Instrument dar. Daneben kann der entwickelte „PET Surface Affinity Assay“ als schnelle und einfache Methode zur *in vitro* Evaluierung der PET-Affinität von Peptiden eingesetzt werden. Generell stellte sich die Kombination aus *in silico* und *in vitro* Methoden als geeignet für die Identifizierung und Charakterisierung von Peptiden mit PET-Affinität heraus und könnte auf andere Proteine und (synthetische) Polymere übertragen werden.

Zusammenfassend bieten Polymer-bindende Peptide diverse Applikationsmöglichkeiten mit vielversprechendem Potential. Mit Blick auf die Zukunft können Peptide mit Affinität gegenüber synthetischen Polymeren zur Veredelung von Textilfasern als auch in anderen Anwendungsfeldern wie in analytischen Verfahren zur Detektion von Nanoplastik in der Umwelt eingesetzt werden. Unterstützt wird dies durch die Erweiterung der Bandbreite an potentiell geeigneten Peptiden, Aufklärung der Wechselwirkung, dem Potential zur Expression im industriellen Maßstab sowie etablierten Messmethoden. Peptide, die synthetische Polymere binden, haben daher großes Potential in der biotechnologischen Industrie eingesetzt zu werden.

5 Literaturverzeichnis

- Adrio, J.-L. und Demain, A. L.** (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioeng. Bugs* **1**, 116–131.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. und Schwab, H.** (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5301–5317.
- Ahn, J., Hong, J., Lee, H., Park, M., Lee, E., Kim, C., Choi, E., Jung, J. und Lee, H.** (2007). Translation elongation factor 1-alpha gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 601–608.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Anagnostopoulos, C. und Spizizen, J.** (1961). Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**, 741–746.
- Andersen, B. K., Borch, K., Abo, M. und Damgaard, B.** (1999). Method of treating polyester fabrics. US5997584.
- Anderson, J. C., Park, B. J. und Palace, V. P.** (2016). Microplastics in aquatic environments: Implications for Canadian ecosystems. *Environ. Pollut.* **218**, 269–280.
- Andrady, A. L.** (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* **62**, 1596–1605.
- Andrady, A. L. und Neal, M. A.** (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **364**, 1977–1984.
- Antikainen, N. M. und Martin, S. F.** (2005). Altering protein specificity: techniques and applications. *Bioorganic Med. Chem.* **13**, 2701–2716.
- Araújo, R., Silva, C., O'Neill, A., Micaelo, N., Guebitz, G., Soares, C. M., Casal, M. und Cavaco-Paulo, A.** (2007). Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6,6 fibers. *J. Biotechnol.* **128**, 849–857.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. und Schwede, T.** (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinforma.* **22**, 195–201.
- Asensio, J. L., Ardá, A., Cañada, F. J. und Jiménez-Barbero, J.** (2013). Carbohydrate–Aromatic Interactions. *Acc. Chem. Res.* **46**, 946–954.
- Ausubel, F. M.** (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Avio, C. G., Gorbi, S. und Regoli, F.** (2016). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Mar. Environ. Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.012>.
- Bahar, A. A. und Ren, D.** (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543–1575.
- Baneyx, F.** (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411–421.
- Bartholomey, E.** (2015). The Use of Ultramarine Pigments in Cosmetics. *SOFW* **141**, 26–32.

- Basanta, A., Gómez-Sala, B., Sánchez, J., Diep, D. B., Herranz, C., Hernández, P. E. und Cintas, L. M.** (2010). Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3314–3324.
- Batey, S., Nickson, A. A. und Clarke, J.** (2008). Studying the folding of multidomain proteins. *HFSP J.* **2**, 365–377.
- Battistel, E., Morra, M. und Marinetti, M.** (2001). Enzymatic surface modification of acrylonitrile fibers. *Appl. Surf. Sci.* **177**, 32–41.
- Baumann, K., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O., Ferrer, P. und Mattanovich, D.** (2008). Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **100**, 177–183.
- Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M. und Latgé, J. P.** (2012). Hydrophobins – Unique Fungal Proteins. *PLoS Pathog.* **8**, e1002700.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. und Haak, J. R.** (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690.
- Berlec, A. und Štrukelj, B.** (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 257–274.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E.** (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242.
- Berrow, N. S., Büsow, K., Coutard, B., Diprose, J., Ekberg, M., Folkers, G. E., Levy, N., Lieu, V., Owens, R. J., Peleg, Y., et al.** (2006). Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallogr. Sect. D* **62**, 1218–1226.
- Bertani, G.** (1951). STUDIES ON LYSOGENESIS I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300.
- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E. M., van den Heuvel-Greve, M. J. und Koelmans, A. A.** (2013). Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environ. Sci. Technol.* **47**, 593–600.
- Bharali, S., Purama, R. K., Majumder, A., Fontes, C. M. G. A. und Goyal, A.** (2007). Functional characterization and mutation analysis of family 11, Carbohydrate-Binding Module (CtCBM11) of cellulosomal bifunctional cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Indian J. Microbiol.* **47**, 109–118.
- Bhaskara, R. M. und Srinivasan, N.** (2011). Stability of domain structures in multi-domain proteins. *Sci. Rep.* **1**, 40.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., et al.** (2014). SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**, W252–W258.
- Billig, S., Oeser, T., Birkemeyer, C. und Zimmermann, W.** (2010). Hydrolysis of cyclic poly(ethylene terephthalate) trimers by a carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1753–1764.

- Bolam, D. N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M. P., Rixon, J. E., Boraston, A., Hazlewood, G. P. und Gilbert, H. J.** (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem. J.* **331**, 775–781.
- Boraston, A. B.** (2005). The interaction of carbohydrate-binding modules with insoluble non-crystalline cellulose is enthalpically driven. *Biochem. J.* **385**, 479–484.
- Boraston, A. B., Warren, R. A. J. und Kilburn, D. G.** (2001). Glycosylation by *Pichia pastoris* decreases the affinity of a family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi*: a functional and mutational analysis. *Biochem. J.* **358**, 423–430.
- Boraston, A. B., McLean, B. W., Chen, G., Li, A., Warren, R. A. J. und Kilburn, D. G.** (2002). Co-operative binding of triplicate carbohydrate-binding modules from a thermophilic xylanase. *Mol. Microbiol.* **43**, 187–194.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. und Davies, G. J.** (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**, 769–781.
- Boraston, A. B., Ficko-Blean, E. und Healey, M.** (2007). Carbohydrate Recognition by a Large Sialidase Toxin from *Clostridium perfringens*. *Biochemistry* **46**, 11352–11360.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brandmüller, J. und Moser, H.** (1962). *Einführung in die Ramanspektroskopie*. Darmstadt: Steinkopff-Verlag.
- Brede, D. A., Faye, T., Stierli, M. P., Dasen, G., Theiler, A., Nes, I. F., Meile, L. und Holo, H.** (2005). Heterologous production of antimicrobial peptides in *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8077–8084.
- Broadbent, A. D.** (2001). *Basic principles of textile coloration*. Bradford, UK: Society of Dyers & Colourists.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T. und Eggert, T.** (2006). Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J. Mol. Biol.* **362**, 393–402.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M. und Thompson, R. C.** (2008). Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ. Sci. Technol.* **42**, 5026–5031.
- Brueckner, T., Eberl, A., Heumann, S., Rabe, M. und Guebitz, G. M.** (2008). Enzymatic and chemical hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) fabrics. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **46**, 6435–6443.
- Bugoni, L., Krause, L. und Petry, M. V.** (2001). Marine Debris and Human Impacts on Sea Turtles in Southern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 1330–1334.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L. und Hoffmann, D.** (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329–344.
- Cai, S., Zheng, X. und Dong, X.** (2011). CBM3d, a Novel Subfamily of Family 3 Carbohydrate-Binding Modules Identified in Cel48A Exoglucanase of *Cellulosilyticum ruminicola*. *J. Bacteriol.* **193**, 5199–5206.

- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. und Henrissat, B.** (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233–D238.
- Cao, W., Zhou, Y., Ma, Y., Luo, Q. und Wei, D.** (2005). Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **40**, 404–410.
- Castro, M. S. und Fontes, W.** (2005). Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein Pept. Lett.* **12**, 13–18.
- Cavaco-Paulo, A., Morgado, J., Andreus, J. und Kilburn, D.** (1999). Interactions of cotton with CBD peptides. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 639–643.
- Cedervall, T., Hansson, L.-A., Lard, M., Frohm, B. und Linse, S.** (2012). Food Chain Transport of Nanoparticles Affects Behaviour and Fat Metabolism in Fish. *PLoS One* **7**, e32254.
- Cereghino, J. L. und Cregg, J. M.** (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 46–66.
- Chan, C.-M., Ko, T.-M. und Hiraoka, H.** (1996). Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surf. Sci. Rep.* **24**, 1–54.
- Charnock, S. J., Bolam, D. N., Nurizzo, D., Szabó, L., McKie, V. A., Gilbert, H. J. und Davies, G. J.** (2002). Promiscuity in ligand-binding: The three-dimensional structure of a *Piromyces* carbohydrate-binding module, CBM29-2, in complex with cello- and mannohexaose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14077–14082.
- Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R. und Jay, E.** (1994). Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4953–4957.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., et al.** (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1007–1014.
- Chen, X., Zhu, F., Cao, Y. und Qiao, S.** (2009). Novel Expression Vector for Secretion of Cecropin AD in *Bacillus subtilis* with Enhanced Antimicrobial Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3683–3689.
- Cipakova, I. und Hostinova, E.** (2005). Production of the human-beta-defensin using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Protein Pept. Lett.* **12**, 551–554.
- Ciric, D., Richard, C.-A., Moudjou, M., Chapuis, J., Sibille, P., Daude, N., Westaway, D., Adrover, M., Béringue, V., Martin, D., et al.** (2015). Interaction between Shadoo and PrP Affects the PrP-Folding Pathway. *J. Virol.* **89**, 6287–6293.
- Clark, E. D. B.** (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 202–207.
- Cockburn, D., Nielsen, M. M., Christiansen, C., Andersen, J. M., Rannes, J. B., Blennow, A. und Svensson, B.** (2015). Surface binding sites in amylase have distinct roles in recognition of starch structure motifs and degradation. *Int. J. Biol. Macromol.* **75**, 338–345.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. und Galloway, T. S.** (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* **62**, 2588–2597.

- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J. und Galloway, T. S.** (2013). Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 6646–6655.
- CONTAM** (2016). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA J.* **14**, 4501–4531.
- Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P. und Martins, M. C. L.** (2011). Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* **7**, 1431–1440.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A. und Domingues, L.** (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front. Microbiol.* **5**, 63.
- Coutinho, P. M. und Henrissat, B.** (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (ed. Gilbert, H. J.), pp. 3–12. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K. und Chappell, T.** (2009). Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. In *Guide to Protein Purification* (ed. Burgess, R. R. und Deutscher, M. P.), pp. 169–189. Cambridge, MA: Academic Press.
- Cruz-Chu, E. R., Ritz, T., Siwy, Z. S. und Schulten, K.** (2009). Molecular control of ionic conduction in polymer nanopores. *Faraday Discuss.* **143**, 47–93.
- Cuyvers, S., Dornez, E., Hachem, M. A., Svensson, B., Hothorn, M., Chory, J., Delcour, J. A. und Courtin, C. M.** (2012). Isothermal titration calorimetry and surface plasmon resonance allow quantifying substrate binding to different binding sites of *Bacillus subtilis* xylanase. *Anal. Biochem.* **420**, 90–92.
- Damasceno, L. M., Huang, C.-J. und Batt, C. A.** (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 31–39.
- Daura, X., Gademann, K., Jaun, B., Seebach, D., van Gunsteren, W. F. und Mark, A. E.** (1999). Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. *Angew. Chemie Int. Ed.* **38**, 236–240.
- de Almeida, J. R. M., de Moraes, L. M. P. und Torres, F. A. G.** (2005). Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* **22**, 725–737.
- de Bruin, E. C., Duitman, E. H., de Boer, A. L., Veenhuis, M., Bos, I. G. A. und Hack, C. E.** (2005). Pharmaceutical Proteins From Methylotrophic Yeasts. In *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols* (ed. Smales, C. M. und James, D. C.), pp. 65–76. Totowa, NJ: Humana Press.
- De Lucca, A. J. und Walsh, T. J.** (1999). Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1–11.
- De Lucca, A. J., Bland, J. M., Jacks, T. J., Grimm, C. und Walsh, T. J.** (1998). Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin. *Med. Mycol.* **36**, 291–298.
- de Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T. und Bukau, B.** (2007). Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol.* **7**, 32.

- De Pourcq, K., De Schutter, K. und Callewaert, N.** (2010). Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1617–1631.
- Degering, C., Eggert, T., Puls, M., Bongaerts, J., Evers, S., Maurer, K.-H. und Jaeger, K.-E.** (2010). Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6370–6376.
- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K. A. und Corsi, I.** (2014). Accumulation and Embryotoxicity of Polystyrene Nanoparticles at Early Stage of Development of Sea Urchin Embryos *Paracentrotus lividus*. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 12302–12311.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T. und Gore, A. C.** (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* **30**, 293–342.
- Din, N., Gilkes, N. R., Tekant, B., Miller, R. C., Warren, R. A. J. und Kilburn, D. G.** (1991). Non-Hydrolytic Disruption of Cellulose Fibres by the Binding Domain of a Bacterial Cellulase. *Nat Biotech* **9**, 1096–1099.
- Din, N., Forsythe, I. J., Burtnick, L. D., Gilkes, N. R., Miller, R. C., Warren, R. A. J. und Kilburn, D. G.** (1994a). The cellulose-binding domain of endoglucanase A (CenA) from *Cellulomonas fimi*: evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. *Mol. Microbiol.* **11**, 747–755.
- Din, N., Damude, H. G., Gilkes, N. R., Miller, R. C., Warren, R. A. und Kilburn, D. G.** (1994b). C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11383–11387.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W. und Glick, B. R.** (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J. Ind. Microbiol.* **16**, 145–154.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J.-K., Wendorff, M., Losi, A., Gartner, W. und Jaeger, K.-E.** (2007). Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat. Biotechnol.* **25**, 443–445.
- Drepper, T., Huber, R., Heck, A., Circolone, F., Hillmer, A.-K., Büchs, J. und Jaeger, K.-E.** (2010). Flavin Mononucleotide-Based Fluorescent Reporter Proteins Outperform Green Fluorescent Protein-Like Proteins as Quantitative *In Vivo* Real-Time Reporters. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5990–5994.
- Duan, C.-J., Feng, Y.-L., Cao, Q.-L., Huang, M.-Y. und Feng, J.-X.** (2016). Identification of a novel family of carbohydrate-binding modules with broad ligand specificity. *Sci. Rep.* **6**, 19392.
- Dubos, R. J.** (1939). Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice. *J. Exp. Med.* **70**, 11–17.
- Dunn, S. D.** (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on western blots by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **157**, 144–153.

- Eberl, A., Heumann, S., Kotek, R., Kaufmann, F., Mitsche, S., Cavaco-Paulo, A. und Gübitz, G. M. (2008). Enzymatic hydrolysis of PTT polymers and oligomers. *J. Biotechnol.* **135**, 45–51.
- Eberl, A., Heumann, S., Brückner, T., Araújo, R., Cavaco-Paulo, A., Kaufmann, F., Kroutil, W. und Guebitz, G. M. (2009). Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. *J. Biotechnol.* **143**, 207–212.
- Eggert, T., Brockmeier, U., Dröge, M. J., Quax, W. J. und Jaeger, K.-E. (2003). Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**, 319–324.
- Ehrenstein, G. und Lecar, H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* **10**, 1–34.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G. und Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS One* **9**, e111913.
- Eriksson, C. und Burton, H. (2003). Origins and Biological Accumulation of Small Plastic Particles in Fur Seals from Macquarie Island. *Ambio* **32**, 380–384.
- Espino-Rammer, L., Ribitsch, D., Przylucka, A., Marold, A., Greimel, K. J., Herrero Acero, E., Guebitz, G. M., Kubicek, C. P. und Druzhinina, I. S. (2013). Two Novel Class II Hydrophobins from *Trichoderma* spp. Stimulate Enzymatic Hydrolysis of Poly(Ethylene Terephthalate) when Expressed as Fusion Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4230–4238.
- Esposito, D. und Chatterjee, D. K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 353–358.
- Fangel, J. U., Ulvskov, P., Knox, J. P., Mikkelsen, M. D., Harholt, J., Popper, Z. A. und Willats, W. G. T. (2012). Cell wall evolution and diversity. *Front. Plant Sci.* **3**, 152.
- Farrell, P. und Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environ. Pollut.* **177**, 1–3.
- Faust, G. (2014). Reaktionstechnische Untersuchungen zur Herstellung eines hydrophoben Spinnenseidenproteins mit *Escherichia coli*. *Dissertation*, Technische Universität München, Deutschland.
- Feldbrügge, M., Kellner, R. und Schipper, K. (2013). The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3253–3265.
- Fendall, L. S. und Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Mar. Pollut. Bull.* **58**, 1225–1228.
- Fischer-Colbrie, G., Heumann, S., Liebming, S., Almansa, E., Cavaco-Paulo, A. und Guebitz, G. M. (2004). New enzymes with potential for PET surface modification. *Biocatal. Biotransformation* **22**, 341–346.
- Francis, D. M. und Page, R. (2010). Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. In *Current Protocols in Protein Science* (ed. Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. und Wingfield, P. T.), pp. 1–29. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.

- Fu, Y., Busing, W. R., Jin, Y., Affholter, K. A. und Wunderlich, B.** (1993). Poly(ethylene terephthalate) fibers. 1. Crystal structure and morphology studies with full-pattern x-ray diffraction refinement. *Macromolecules* **26**, 2187–2193.
- Gaiser, R. A., Rivas, L. und López, P.** (2011). Production of eukaryotic antimicrobial peptides by bacteria – A review . In *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* (ed. Mendez-Vilas, A.), pp. 992–1002. Badajoz: Formatex.
- Galloway, T. S. und Lewis, C. N.** (2016). Marine microplastics spell big problems for future generations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 2331–2333.
- Gao, P. J., Chen, G. J., Wang, T. H., Zhang, Y. S. und Liu, J.** (2001). Non-hydrolytic Disruption of Crystalline Structure of Cellulose by Cellulose Binding Domain and Linker Sequence of Cellobiohydrolase I from *Penicillium janthinellum*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* **33**, 13–18.
- Gao, C. Y., Xu, T. T., Zhao, Q. J. und Li, C. L.** (2015). Codon optimization enhances the expression of porcine β -defensin-2 in *Escherichia coli*. *Genet. Mol. Res.* **14**, 4978–4988.
- Gecchele, E., Merlin, M., Brozzetti, A., Falorni, A., Pezzotti, M. und Avesani, L.** (2015). A Comparative Analysis of Recombinant Protein Expression in Different Biofactories: Bacteria, Insect Cells and Plant Systems. *J. Vis. Exp.* **97**, e52459.
- Georgelis, N., Yennawar, N. H. und Cosgrove, D. J.** (2012). Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 14830–14835.
- Gewert, B., Plassmann, M. M. und MacLeod, M.** (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* **17**, 1513–1521.
- Ghisaidoobe, A. B. T. und Chung, S. J.** (2014). Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22518–22538.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A. und Smith, H. O.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345.
- Gigova, L., Wishart, P., Uscheva, A., Ivanova, M., Bardarov, S., Jay, E. und Ivanov, I.** (1989). Expression of Repetitive Human Calcitonin Genes in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **11**, 401–412.
- Gilbert, H. J., Bolam, D. N., Szabo, L., Xie, H., Williamson, M. P., Simpson, P. J., Jamal, S., Boraston, A. B., Kilburn, D. G. und Warren, R. A. J.** (2002). An update on carbohydrate binding modules. In *Carbohydrate Bioengineering Interdisciplinary Approaches* (ed. Teeri, T. T., Svensson, B., Gilbert, H. J. und Feizi, T.), pp. 89–98. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Miller, R. C. und Warren, A.** (2001). Method and compositions for modification of polysaccharide characteristics. US6300493B1.
- Glinel, K., Jonas, A. M., Jouenne, T., Leprince, J., Galas, L. und Huck, W. T. S.** (2009). Antibacterial and Antifouling Polymer Brushes Incorporating Antimicrobial Peptide. *Bioconjug. Chem.* **20**, 71–77.

- Goebel-Stengel, M., Stengel, A., Taché, Y. und Reeve, J. R.** (2011). The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal. Biochem.* **414**, 38–46.
- Goldstein, M. A., Takagi, M., Hashida, S., Shoseyov, O., Doi, R. H. und Segel, I. H.** (1993). Characterization of Cellulose-Binding Domain of the *Clostridium cellulovorans* Cellulose-Binding Protein A. *J. Bacteriol.* **175**, 5762–5768.
- Gong, W., Wang, J., Chen, Z., Xia, B. und Lu, G.** (2011). Solution Structure of LCI, a Novel Antimicrobial Peptide from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **50**, 3621–3627.
- Gouin, T., Avalos, J., Brunning, I., Brzuska, K., Graaf, J. De, Kaumanns, J., Koning, T., Meyberg, M., Rettinger, K., Schlatter, H., et al.** (2015). Use of Micro-Plastic Beads in Cosmetic Products in Europe and Their Estimated Emissions to the North Sea Environment. *SOFW J.* **141**, 40–46.
- Graham, E. R. und Thompson, J. T.** (2009). Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **368**, 22–29.
- Guebitz, G. M. und Cavaco-Paulo, A.** (2008). Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers. *Trends Biotechnol.* **26**, 32–38.
- Guex, N. und Peitsch, M. C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723.
- Guillén, D., Santiago, M., Linares, L., Pérez, R., Morlon, J., Ruiz, B., Sánchez, S. und Rodríguez-Sanoja, R.** (2007). Alpha-Amylase Starch Binding Domains: Cooperative Effects of Binding to Starch Granules of Multiple Tandemly Arranged Domains. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 3833–3837.
- Guillén, D., Sánchez, S. und Rodríguez-Sanoja, R.** (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1241–1249.
- Guo, J. und Catchmark, J. M.** (2013). Binding specificity and thermodynamics of cellulose-binding modules from *Trichoderma reesei* Cel7A and Cel6A. *Biomacromolecules* **14**, 1268–1277.
- Gupta, R. und Brunak, S.** (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symp. Biocomput.* **7**, 310–322.
- Gürses, A., Açıkyıldız, M., Güneş, K. und Gürses, M. S.** (2016). *Dyes and Pigments*. Basel: Springer International Publishing.
- Gutiérrez, J., Criado, R., Martín, M., Herranz, C., Cintas, L. M. und Hernández, P. E.** (2005). Production of Enterocin P, an Antilisterial Pediocin-Like Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3004–3008.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- Hancock, R. E. W.** (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* **1**, 156–164.
- Hancock, R. E. W., Brown, K. L. und Mookherjee, N.** (2006). Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* **211**, 315–322.
- Hara, S. und Yamakawa, M.** (1996). Production in *Escherichia coli* of Moricin, a Novel Type Antibacterial Peptide from the Silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 664–669.

- Harvey, M. J., Giupponi, G. und De Fabritiis, G.** (2009). ACEMD: Accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 1632–1639.
- Herbst, W. und Hunger, K.** (2004). *Industrial Organic Pigments*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Steinkellner, G., Gruber, K., Greimel, K., Eiteljoerg, I., Trotscha, E., Wei, R., Zimmermann, W., Zinn, M., et al.** (2011). Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules* **44**, 4632–4640.
- Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Dellacher, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Steinkellner, G., Gruber, K., Schwab, H. und Guebitz, G. M.** (2013). Surface engineering of a cutinase from *Thermobifida cellulosilytica* for improved polyester hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 2581–2590.
- Hetrick, E. M. und Schoenfisch, M. H.** (2006). Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 780–789.
- Hoegenhaug, H. H. K., Schnorr, K. M. und Hansen, M. T.** (2006). Recombinant expression of defensins in filamentous fungi. WO2006097464A1.
- Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M. und Uhlén, M.** (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **26**, 501–510.
- Hong, P., Koza, S. und Bouvier, E. S. P.** (2012). Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **35**, 2923–2950.
- Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E. und Svendsen, C.** (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci. Total Environ.* **586**, 127–141.
- Hoskin, D. W. und Ramamoorthy, A.** (2008). Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 357–375.
- Hsieh, Y., Hartzell, M., Boston, M., Clarkson, K., Collier, K., Graycar, T. und Larenas, E.** (2003). Enzyme treatment to enhance wettability and absorbancy of textiles. US20030119172A1.
- Hu, H. Q., Li, X. S. und He, H.** (2010). Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of Capsicum bacterial wilt. *Biol. Control* **54**, 359–365.
- Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salánki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A. A. und Geissen, V.** (2017). Incorporation of microplastics from litter into burrows of *Lumbricus terrestris*. *Environ. Pollut.* **220**, 523–531.
- Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K.** (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38.
- Ingham, A. B. und Moore, R. J.** (2007). Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **47**, 1–9.
- Ivar do Sul, J. A. und Costa, M. F.** (2014). The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ. Pollut.* **185**, 352–364.

- Jacobs, P. P., Inan, M., Festjens, N., Haustraete, J., Van Hecke, A., Contreras, R., Meagher, M. M. und Callewaert, N. (2010). Fed-batch fermentation of GM-CSF-producing glycoengineered *Pichia pastoris* under controlled specific growth rate. *Microb. Cell Fact.* **9**, 93.
- Jemec, A., Horvat, P., Kunej, U., Bele, M. und Kržan, A. (2016). Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* **219**, 201–209.
- Jenssen, H., Hamill, P. und Hancock, R. E. W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 491–511.
- Jenzsch, M., Lange, M., Bär, J., Rahfeld, J.-U. und Lübbert, A. (2004). Bioreactor retrofitting to avoid aeration with oxygen in *Pichia pastoris* cultivation processes for recombinant protein production. *Chem. Eng. Res. Des.* **82**, 1144–1152.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P. und Duhr, S. (2011). Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 342–353.
- Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P. und Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* **1077**, 101–113.
- Jin, F., Xu, X., Zhang, W. und Gu, D. (2006). Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **49**, 39–46.
- Jones, A. T. (2007). Macropinocytosis: Searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 670–684.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. und Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926.
- Joshi, H., Shirude, P. S., Bansal, V., Ganesh, K. N. und Sastry, M. (2004). Isothermal Titration Calorimetry Studies on the Binding of Amino Acids to Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem B* **108**, 11535–11540.
- Jung, J., Sethi, A., Gaiotto, T., Han, J. J., Jeoh, T., Gnanakaran, S. und Goodwin, P. M. (2013). Binding and Movement of Individual Cel7A Cellobiohydrolases on Crystalline Cellulose Surfaces Revealed by Single-molecule Fluorescence Imaging. *J. Biol. Chem.* **288**, 24164–24172.
- Jungo, C., Marison, I. und von Stockar, U. (2007). Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *J. Biotechnol.* **128**, 824–837.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–2637.
- Kafatos, F. C., Jones, C. W. und Efstratiadis, A. (1979). Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1541–1552.
- Kamino, K. (2013). Mini-review: Barnacle adhesives and adhesion. *Biofouling* **29**, 735–749.
- Kanelli, M., Vasilakos, S., Nikolaivits, E., Ladas, S., Christakopoulos, P. und Topakas, E. (2015). Surface modification of poly(ethylene terephthalate) (PET) fibers by a cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem.* **50**, 1885–1892.

- Kang, C. S., Son, S.-Y. und Bang, I. S.** (2008). Biologically active and C-amidated hinnavinIII-38-Asn produced from a Trx fusion construct in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **46**, 656–661.
- Kaplan, D., Gatenholm, P., Berglin, K., Platko, J., Pepper, L. und Ngangan, A.** (2003). Barnacle adhesion proteins. US20030143673A1.
- Karam, L., Jama, C., Dhulster, P. und Chihib, N. E.** (2013). Study of surface interactions between peptides, materials and bacteria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. *J. Mater. Environ. Sci.* **4**, 798–821.
- Kashiwada, S.** (2006). Distribution of Nanoparticles in the See-through Medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Health Perspect.* **114**, 1697–1702.
- Kawai, F., Oda, M., Tamashiro, T., Waku, T., Tanaka, N., Yamamoto, M., Mizushima, H., Miyakawa, T. und Tanokura, M.** (2014). A novel Ca^{2+} -activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 10053–10064.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L. und Schwede, T.** (2009). The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**, D387–D392.
- Kim, H. R. und Song, W. S.** (2006). Lipase treatment of polyester fabrics. *Fibers Polym.* **7**, 339–343.
- Kim, H.-K., Chun, D.-S., Kim, J.-S., Yun, C.-H., Lee, J.-H., Hong, S.-K. und Kang, D.-K.** (2006). Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 330–338.
- Kim, J. M., Jang, S. A., Yu, B. J., Sung, B. H., Cho, J. H. und Kim, S. C.** (2008). High-level expression of an antimicrobial peptide histonin as a natural form by multimerization and furin-mediated cleavage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 123–130.
- Klaine, S. J., Koelmans, A. A., Horne, N., Carley, S., Handy, R. D., Kapustka, L., Nowack, B. und von der Kammer, F.** (2012). Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 3–14.
- Kleeberg, I., Welzel, K., VandenHeuvel, J., Mu, R.-J. und Deckwer, W.-D.** (2005). Characterization of a New Extracellular Hydrolase from *Thermobifida fusca* Degrading Aliphatic-Aromatic Copolyesters. *Biomacromolecules* **6**, 262–270.
- Koelmans, A. A., Besseling, E. und Shim, W. J.** (2015). Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review. In *Marine Anthropogenic Litter* (ed. Bergmann, M., Gutow, L. und Klages, M.), pp. 325–340. Basel: Springer International Publishing.
- Köpnick, H., Schmidt, M., Brüggling, W., Rüter, J. und Kaminsky, W.** (2012). Polyesters. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (ed. Elvers, B.), pp. 623–649. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kück, U.** (2005). *Praktikum der Molekulargenetik*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kufareva, I. und Abagyan, R.** (2012). Methods of protein structure comparison. *Methods Mol. Biol.* **857**, 231–257.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

- Lee, J. H., Minn, I., Park, C. B. und Kim, S. C.** (1998). Acidic Peptide-Mediated Expression of the Antimicrobial Peptide Buforin II as Tandem Repeats in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **12**, 53–60.
- Lee, Y.-T., Kim, D.-H., Suh, J.-Y., Chung, J. H., Lee, B. L., Lee, Y. und Choi, B.-S.** (1999). Structural characteristics of Tenecin 3, an insect antifungal protein. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47**, 369–376.
- Lee, J. H., Kim, J. H., Hwang, S. W., Lee, W. J., Yoon, H. K., Lee, H. S. und Hong, S. S.** (2000). High-Level Expression of Antimicrobial Peptide Mediated by a Fusion Partner Reinforcing Formation of Inclusion Bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 575–580.
- Lee, H., Shim, W. J. und Kwon, J.-H.** (2014). Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Sci. Total Environ.* **470–471**, 1545–1552.
- Levy, I. und Shoseyov, O.** (2002). Cellulose-binding domains: Biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **20**, 191–213.
- Li, Y.** (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expr. Purif.* **80**, 260–267.
- Li, Y. und Chen, Z.** (2008). RAPD: A database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* **289**, 126–129.
- Li, C., Haug, T. und Stensvåg, K.** (2010a). Antimicrobial peptides in Echinoderms. *Invertebr. Surviv. J.* **7**, 132–140.
- Li, C., Blencke, H.-M., Paulsen, V., Haug, T. und Stensvåg, K.** (2010b). Powerful workhorses for antimicrobial peptide expression and characterization. *Bioeng Bugs* **1**, 217–220.
- Li, W. C., Tse, H. F. und Fok, L.** (2016). Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Sci. Total Environ.* **566–567**, 333–349.
- Liang, J. Z., Tang, C. Y., Li, R. K. Y. und Wong, T. T.** (1998). Mechanical Properties of Polypropylene/CaCO₃ Composites. *Met. Mater.* **4**, 616–619.
- Liang, S., Zou, C., Lin, Y., Zhang, X. und Ye, Y.** (2013). Identification and characterization of P_{GCW14}: a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **35**, 1865–1871.
- Lin, Y., Li, M., Song, H., Xu, L., Meng, Q. und Liu, X.-Q.** (2013). Protein *trans*-splicing of multiple atypical split inteins engineered from natural inteins. *PLoS One* **8**, e59516.
- Linder, M. B.** (2009). Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **14**, 356–363.
- Liu, J., Liu, W., Pan, N. und Chen, Z.** (1990). The Characterization of anti-rice bacterial blight polypeptide LCI. *Rice Genet. Newsl.* **7**, 151–154.
- Liu, L., Fokkink, R. und Koelmans, A. A.** (2016). Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to polystyrene nanoplastic. *Environ. Toxicol. Chem.* **35**, 1650–1655.
- Lobanov, M. Y., Bogatyreva, N. S. und Galzitskaya, O. V.** (2008). Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Mol. Biol.* **42**, 623–628.

- Lohner, K. und Prenner, E. J.** (1999). Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1462**, 141–156.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. und Henrissat, B.** (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**, D490–D495.
- Lönnstedt, O. M. und Eklöv, P.** (2016). Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology. *Science.* **352**, 1213–1216.
- Loomis, J., Xu, P. und Panchapakesan, B.** (2013). Stimuli-responsive transformation in carbon nanotube/expanding microsphere-polymer composites. *Nanotechnology* **24**, 185703.
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D. und Kovar, K.** (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1177–1193.
- Loosli, F., Vitorazi, L., Berret, J.-F. und Stoll, S.** (2015). Isothermal titration calorimetry as a powerful tool to quantify and better understand agglomeration mechanisms during interaction processes between TiO₂ nanoparticles and humic acids. *Environ. Sci. Nano* **2**, 541–550.
- López-García, B., Moreno, A. B., Segundo, B. S., De los Ríos, V., Manning, J. M., Gavilanes, J. G. und Martínez-del-Pozo, Á.** (2010). Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **70**, 206–210.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. und Richardson, D. C.** (2003). Structure validation by C alpha geometry: phi, psi and C beta deviation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **50**, 437–450.
- Luan, C., Zhang, H. W., Song, D. G., Xie, Y. G., Feng, J. und Wang, Y. Z.** (2014). Expressing antimicrobial peptide cathelicidin-BF in *Bacillus subtilis* using SUMO technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3651–3658.
- Mabry, J. N., Kastantin, M. und Schwartz, D. K.** (2015). Capturing conformation-dependent molecule–surface interactions when surface chemistry is heterogeneous. *ACS Nano* **9**, 7237–7247.
- Machado, J., Araújo, A., Pinto, R. und Gama, F. M.** (2009). Studies on the interaction of the carbohydrate binding module 3 from the *Clostridium thermocellum* CipA scaffolding protein with cellulose and paper fibres. *Cellulose* **16**, 817–824.
- Mackerell, A. D., Feig, M. und Brooks, C. L.** (2004). Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **25**, 1400–1415.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S. und Gräslund, A.** (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, 414729.
- Maddah, H. A.** (2016). Polypropylene as a Promising Plastic: A Review. *Am. J. Polym. Sci.* **6**, 1–11.
- Malhotra, B., Keshwani, A. und Kharkwal, H.** (2015). Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls. *Front. Microbiol.* **6**, 611.

- Marcinčin, A.** (1999). Dyeing of polypropylene fibers. In *Polypropylene: An A–Z Reference* (ed. Karger-Kocsis, J.), pp. 172–177. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Matthieu, J.-M. und Quarles, R. H.** (1973). Quantitative scanning of glycoproteins on polyacrylamide gels stained with periodic acid-schiff reagent (PAS). *Anal. Biochem.* **55**, 313–316.
- Mattsson, K., Hansson, L.-A. und Cedervall, T.** (2015). Nano-plastics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* **17**, 1712–1721.
- Maurer, M., Kühleitner, M., Gasser, B. und Mattanovich, D.** (2006). Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* **5**, 37.
- McCord, M. G., Hwang, Y. J., Hauser, P. J., Qiu, Y., Cuomo, J. J., Hankins, O. E., Bourham, M. A. und Canup, L. K.** (2002). Modifying Nylon and Polypropylene Fabrics with Atmospheric Pressure Plasmas. *Text. Res. J.* **72**, 491–498.
- McLean, B. W., Bray, M. R., Boraston, A. B., Gilkes, N. R., Haynes, C. A. und Kilburn, D. G.** (2000). Analysis of binding of the family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi* xylanase 10A to cellulose: specificity and identification of functionally important amino acid residues. *Protein Eng.* **13**, 801–809.
- Michler, G. H.** (2008). *Electron Microscopy of Polymers*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-Petjingell, C., Sturtevant, J. und King, J.** (1991). Global Suppression of Protein Folding Defects and Inclusion Body Formation. *Science*. **253**, 54–59.
- Möller, M. und Denicola, A.** (2002). Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **30**, 175–178.
- Moon, J.-Y., Henzler-Wildman, K. A. und Ramamoorthy, A.** (2006). Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 1351–1358.
- Morassutti, C., De Amicis, F., Bandiera, A. und Marchetti, S.** (2005). Expression of SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system. *Protein Expr. Purif.* **39**, 160–168.
- Moreira, S., Castanheira, P., Casal, M., Faro, C. und Gama, M.** (2010). Expression of the functional carbohydrate-binding module (CBM) of human laforin. *Protein Expr. Purif.* **74**, 169–174.
- Morello, E., Bermúdez-Humarán, L. G., Llull, D., Solé, V., Miraglio, N., Langella, P. und Poquet, I.** (2008). *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 48–58.
- Morin, K. M., Arcidiacono, S., Beckwitt, R. und Mello, C. M.** (2006). Recombinant expression of indolicidin concatamers in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 698–704.
- Morra, M., Occhiello, E. und Garbassi, F.** (1989). Contact angle hysteresis on oxygen plasma treated polypropylene surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **132**, 504–508.
- Mueller, R.-J.** (2006). Biological degradation of synthetic polyesters – Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochem.* **41**, 2124–2128.

- Negulescu, I. I., Despa, S., Chen, J., Collier, B. J., Despa, M., Denes, A., Sarmadi, M. und Denes, F. S.** (2000). Characterizing Polyester Fabrics Treated in Electrical Discharges of Radio-Frequency Plasma. *Text. Res. J.* **70**, 1–7.
- Nicolas, P.** (2009). Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* **276**, 6483–6496.
- Nielsen, J.** (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. *Bioengineered* **4**, 207–211.
- Nielsen, M. M., Bozonnet, S., Seo, E.-S., Mótyán, J. A., Andersen, J. M., Dilokpimol, A., Abou Hachem, M., Gyémánt, G., Næsted, H., Kandra, L., et al.** (2009). Two Secondary Carbohydrate Binding Sites on the Surface of Barley α -Amylase 1 Have Distinct Functions and Display Synergy in Hydrolysis of Starch Granules. *Biochemistry* **48**, 7686–7697.
- Noor, M., Dworeck, T., Schenk, A., Shinde, P., Fioroni, M. und Schwaneberg, U.** (2012). Polymersome surface decoration by an EGFP fusion protein employing Cecropin A as peptide “anchor.” *J. Biotechnol.* **157**, 31–37.
- Notenboom, V., Boraston, A. B., Chiu, P., Frelove, A. C. J., Kilburn, D. G. und Rose, D. R.** (2001). Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: an X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study. *J. Mol. Biol.* **314**, 797–806.
- Obembe, O. O., Jacobsen, E., Timmers, J., Gilbert, H., Blake, A. W., Knox, J. P., Visser, R. G. F. und Vincken, J.-P.** (2007). Promiscuous, non-catalytic, tandem carbohydrate-binding modules modulate the cell-wall structure and development of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *J. Plant Res.* **120**, 605–617.
- Oehler, R., Lesnicki, G. und Galleno, M.** (1998). High cell density fermentation of *Pichia pastoris* using non-phosphate precipitate forming sodium hexametaphosphate as a phosphate source. In *Current topics in gene expression annual meeting*. San Diego, CA.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., Wollenberger, L., Santos, E. M., Paull, G. C., Van Look, K. J. W., et al.** (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. B* **364**, 2047–2062.
- Oh, I.-N., Jane, J., Wang, K., Park, J.-T. und Park, K.-H.** (2015). Novel characteristics of a carbohydrate-binding module 20 from hyperthermophilic bacterium. *Extremophiles* **19**, 363–371.
- Oliveira, C., Carvalho, V., Domingues, L. und Gama, F. M.** (2015). Recombinant CBM-fusion technology – Applications overview. *Biotechnol. Adv.* **33**, 358–369.
- Olsson, M. H., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. und Jensen, J. H.** (2011). PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537.
- Oren, Z. und Shai, Y.** (1998). Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Pept. Sci.* **47**, 451–463.
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. und Ramírez, O. T.** (2004). Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions. In *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols* (ed. Balbás, P. und Lorence, A.), pp. 15–51. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.

- Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C. und Franco, O. L.** (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* **38**, 446–456.
- Park, C. J., Lee, J. H., S.S., H., Lee, H. S. und Kim, S. C.** (1998). High level expression of the angiotensin-converting-enzyme-inhibiting peptide, YG-1, as tandem multimers in *Escherichia coli*. *Appl Microb. Biotechnol* **50**, 71–76.
- Pell, G., Williamson, M. P., Walters, C., Du, H., Gilbert, H. J. und Bolam, D. N.** (2003). Importance of Hydrophobic and Polar Residues in Ligand Binding in the Family 15 Carbohydrate-Binding Module from *Cellvibrio japonicus* Xyn10C. *Biochemistry* **42**, 9316–9323.
- Pellis, A., Herrero Acero, E., Ferrario, V., Ribitsch, D., Guebitz, G. M. und Gardossi, L.** (2016). The Closure of the Cycle: Enzymatic Synthesis and Functionalization of Bio-Based Polyesters. *Trends Biotechnol.* **34**, 316–328.
- Peng, L., Xu, Z., Fang, X., Wang, F., Yang, S. und Cen, P.** (2004). Preferential codons enhancing the expression level of human beta-defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Pept. Lett.* **11**, 339–344.
- Penttilä, M., Nevalainen, K. M. H., Rättö, M., Salminen, E. und Knowles, J.** (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**, 155–164.
- Perera, W. R. und Mauretti, G. J.** (2010). Expansible yarns and threads, and products made using them. US7785509 B2.
- Pérez-Payá, E., Houghten, R. A. und Blondelle, S. E.** (1995). The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 1048–1056.
- Perz, V., Zumstein, M. T., Sander, M., Zitzenbacher, S., Ribitsch, D. und Guebitz, G. M.** (2015). Biomimetic Approach to Enhance Enzymatic Hydrolysis of the Synthetic Polyester Poly(1,4-butylene adipate): Fusing Binding Modules to Esterases. *Biomacromolecules* **16**, 3889–3896.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth* **8**, 785–786.
- Peterson, G. L.** (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346–356.
- Petrović, D. und Zlatović, M.** (2015). Modeling Human Serum Albumin Tertiary Structure to Teach Upper-Division Chemistry Students Bioinformatics and Homology Modeling Basics. *J. Chem. Educ.* **92**, 1233–1237.
- Pinner, A.** (1890). Ueber die Umwandlung der Nitrile in Imidoäther. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **23**, 2917–2919.
- Popper, Z. A.** (2008). Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 286–292.
- Poultney, C., Baker, P. J., Liu, Z., Gross, R. und Montclare, J. K.** (2012). Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 229–240.

- Prielhofer, R., Maurer, M., Klein, J., Wenger, J., Kiziak, C. und Gasser, B.** (2013). Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* **12**, 5.
- Pushpanathan, M., Rajendhran, J., Jayashree, S., Sundarakrishnan, B., Jayachandran, S. und Gunasekaran, P.** (2012). Identification of a novel antifungal peptide with chitin-binding property from marine metagenome. *Protein Pept. Lett.* **19**, 1289–1296.
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P. und Rajendhran, J.** (2013). Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *Int. J. Pept.* **2013**, 675391.
- Pütz, A.** (2006). Isolierung, Identifizierung und biochemische Charakterisierung Dialkylphthalat spaltender Esterasen. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland.
- Quax, T. E. F., Claassens, N. J., Söll, D. und van der Oost, J.** (2015). Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Mol. Cell* **59**, 149–161.
- Rahmen, N., Fulton, A., Ihling, N., Magni, M., Jaeger, K.-E. und Büchs, J.** (2015). Exchange of single amino acids at different positions of a recombinant protein affects metabolic burden in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **14**, 10.
- Ravichandran, S., Kumaravel, K., Rameshkumar, G. und Ajithkumar, T. T.** (2010). Antimicrobial peptides from the marine fishes. *Res. J. Immunol.* **3**, 146–156.
- Ribitsch, D., Herrero Acero, E., Greimel, K., Dellacher, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Diaz Rodriguez, R., Steinkellner, G., Gruber, K., Schwab, H., et al.** (2012). A New Esterase from *Thermobifida halotolerans* Hydrolyses Polyethylene Terephthalate (PET) and Polylactic Acid (PLA). *Polymers*. **4**, 617–629.
- Ribitsch, D., Yebra, A. O., Zitzenbacher, S., Wu, J., Nowitsch, S., Steinkellner, G., Greimel, K., Doliska, A., Oberdorfer, G., Gruber, C. C., et al.** (2013). Fusion of binding domains to *Thermobifida cellulosilytica* cutinase to tune sorption characteristics and enhancing PET hydrolysis. *Biomacromolecules* **14**, 1769–1776.
- Ribitsch, D., Herrero Acero, E., Przylucka, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Gamerith, C., Tscheließnig, R., Jungbauer, A., Rennhofer, H., Lichtenegger, H., et al.** (2015). Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 3586–3592.
- Rinaldi, A. C.** (2002). Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 799–804.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T. und Teh, S. J.** (2013). Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Sci. Rep.* **3**, 3263.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A. und Clare, J. J.** (1992). Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Yeast* **8**, 423–488.
- Rosa, R. D. und Barracco, M. A.** (2010). Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebr. Surviv. J.* **7**, 262–284.
- Roth, C., Wei, R., Oeser, T., Then, J., Föllner, C., Zimmermann, W. und Sträter, N.** (2014). Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 7815–7823.
- Roxhed, N., Rydholm, S., Samel, B., van der Wijngaart, W., Griss, P. und Stemme, G.** (2006). A compact, low-cost microliter-range liquid dispenser based on expandable microspheres. *J. Micromechanics Microengineering* **16**, 2740–2746.

- Rübsam, K., Stomps, B., Böker, A., Jakob, F. und Schwaneberg, U.** (2017). Anchor peptides: A green and versatile method for polypropylene functionalization. *Polymer*. **116**, 124–132.
- Ruzanski, C., Smirnova, J., Rejzek, M., Cockburn, D., Pedersen, H. L., Pike, M., Willats, W. G. T., Svensson, B., Steup, M., Ebenhöf, O., et al.** (2013). A bacterial glucanotransferase can replace the complex maltose metabolism required for starch to sucrose conversion in leaves at night. *J. Biol. Chem.* **288**, 28581–28598.
- Sadr, V., Saffar, B. und Emamzadeh, R.** (2017). Functional expression and purification of recombinant Hepcidin25 production in *Escherichia coli* using SUMO fusion technology. *Gene* **610**, 112–117.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. **230**, 11350–11354.
- Salvati, A., Åberg, C., dos Santos, T., Varela, J., Pinto, P., Lynch, I. und Dawson, K. A.** (2011). Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine* **7**, 818–826.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samel, B.** (2007). Novel Microfluidic Devices Based on a Thermally Responsive PDMS Composite. *Dissertation*, School of Electrical Engineering Stockholm, Schweden.
- Sarkari, P., Reindl, M., Stock, J., Müller, O., Kahmann, R., Feldbrügge, M. und Schipper, K.** (2014). Improved expression of single-chain antibodies in *Ustilago maydis*. *J. Biotechnol.* **191**, 165–175.
- Sauerbrey, G.** (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Phys.* **155**, 206–222.
- Schallmeyer, M., Singh, A. und Ward, O. P.** (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**, 1–17.
- Schiek, R.** (1980). Paints and pigments. *J. Chem. Educ.* **57**, 270.
- Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. und Eliceiri, K. W.** (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* **82**, 518–529.
- Schindler, W. D. und Hauser, P. J.** (2004). *Chemical Finishing of Textiles*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Schreiber, C., Müller, H., Birrenbach, O., Klein, M., Heerd, D., Weidner, T., Salzig, D. und Czermak, P.** (2017). A high-throughput expression screening platform to optimize the production of antimicrobial peptides. *Microb. Cell Fact.* **16**, 29.
- Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A. E. und Marrink, S.-J.** (2008). Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 2308–2317.
- Shai, Y.** (1995). Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 460–464.

- Shojaosadati, S. A., Kolaei, S. M. V., Babaeipour, V. und Farnoud, A. M.** (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iran. J. Biotechnol.* **6**, 63–84.
- Shoseyov, O., Shani, Z. und Levy, I.** (2006). Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 283–295.
- Shubhra, Q. T., Alam, A. K. M. M. und Quaiyyum, M. A.** (2013). Mechanical properties of polypropylene composites: A review. *J. Thermoplast. Compos. Mater.* **26**, 362–391.
- Shukla, S. R., Mathur, M. R. und Hedao, V. B.** (1997). Alkaline weight reduction of polyester fibers. *Am. Dyest. Report.* **86**, 48–56.
- Silva, C., Da, S., Silva, N., Matamá, T., Araújo, R., Martins, M., Chen, S., Chen, J., Wu, J., Casal, M., et al.** (2011). Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates. *Biotechnol. J.* **6**, 1230–1239.
- Simpson, P. J., Xie, H., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. und Williamson, M. P.** (2000). The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules. *J. Biol. Chem.* **275**, 41137–41142.
- Singh, S. M. und Panda, A. K.** (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 303–310.
- Skerra, A. und Schmidt, T. G. M.** (2000). Use of the *Strep*-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**, 271–304.
- Smith, M. B. und March, J.** (2007). *March's advanced organic chemistry*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Soane, D. S., Millward, D. B., Linford, M. R., Lau, R., Green, E. G. und Ware, W.** (2008). Hydrophilic finish for fibrous substrates. US7427300B2.
- Sonnleitner, B. und Chmiel, H.** (2011). Wachstum: Kinetik und Prozessführung. In *Bioprozesstechnik* (ed. Chmiel, H.), pp. 99–149. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Sørensen, H. P. und Mortensen, K. K.** (2005a). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **115**, 113–128.
- Sørensen, H. P. und Mortensen, K. K.** (2005b). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **4**, 1.
- Southall, S. M., Simpson, P. J., Gilbert, H. J., Williamson, G. und Williamson, M. P.** (1999). The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett.* **447**, 58–60.
- Srivastava, V. und Srivastava, R.** (2014). A Review on Manufacturing, Properties and Application of Expanded Polypropylene. *Int. J. Mech. Eng.* **4**, 22–28.
- Steentoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T. G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N. B., Marcos-Silva, L., et al.** (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* **32**, 1478–1488.
- Steinberg, T. H.** (2009). Protein gel staining methods: an introduction and overview. *Methods Enzymol.* **463**, 541–563.

- Stewart, R. J.** (2011). Protein-based underwater adhesives and the prospects for their biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 27–33.
- Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M. und Schipper, K.** (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *J. Biotechnol.* **161**, 80–91.
- Strobel, K. L., Pfeiffer, K. A., Blanch, H. W. und Clark, D. S.** (2015). Structural Insights into the Affinity of Cel7A Carbohydrate-binding Module for Lignin. *J. Biol. Chem.* **290**, 22818–22826.
- Studier, F. W.** (2005). Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., et al.** (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 2430–2435.
- Syberg, K., Khan, F. R., Selck, H., Palmqvist, A., Banta, G. T., Daley, J., Sano, L. und Duhaime, M. B.** (2015). Microplastics: Addressing ecological risk through lessons learned. *Environ. Toxicol. Chem.* **34**, 945–953.
- Tanaka, K. und Takada, H.** (2016). Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Sci. Rep.* **6**, 34351.
- Teale, F. W. J. und Weber, G.** (1957). Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochem. J.* **65**, 476–482.
- Telenti, A., Southworth, M., Alcaide, F., Daugelat, S., Jacobs, W. R. und Perler, F. B.** (1997). The *Mycobacterium xenopi* GyrA protein splicing element: Characterization of a minimal intein. *J. Bacteriol.* **179**, 6378–6382.
- Terfrüchte, M., Reindl, M., Jankowski, S., Sarkari, P., Feldbrügge, M. und Schipper, K.** (2017). Applying Unconventional Secretion in *Ustilago maydis* for the Export of Functional Nanobodies. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 937.
- The Fiber Year 2015: World Survey on Textiles & Nonwovens.** (2015). <https://www.textilemedia.com/assets/Uploads/TFY15-sample-pages.pdf>.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6 Schrödinger, LCC.**
- Then, J., Wei, R., Oeser, T., Barth, M., Belisário-Ferrari, M. R., Schmidt, J. und Zimmermann, W.** (2015). Ca²⁺ and Mg²⁺ binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*. *Biotechnol. J.* **10**, 592–598.
- Then, J., Wei, R., Oeser, T., Gerds, A., Schmidt, J., Barth, M. und Zimmermann, W.** (2016). A disulfide bridge in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate. *FEBS Open Bio* **6**, 425–432.
- Tkavc, T., Vesel, A., Herrero Acero, E. und Fras Zemljič, L.** (2013). Comparison of oxygen plasma and cutinase effect on polyethylene terephthalate surface. *J. Appl. Polym. Sci.* **128**, 3570–3575.
- Torriani, A. und Rothman, F.** (1961). Mutants of *Escherichia coli* constitutive for alkaline phosphatase. *J. Bacteriol.* **81**, 835–836.

- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350–4354.
- Tsien, R. Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544.
- Ujhelyiova, A., Bolhova, E., Oravkinova, J., Tiño, R. und Marcinčin, A.** (2007). Kinetics of dyeing process of blend polypropylene/polyester fibres with disperse dye. *Dye. Pigment.* **72**, 212–216.
- van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Diederichsen, U. und Jahn, R.** (2012). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate increases Ca^{2+} affinity of synaptotagmin-1 by 40-fold. *J. Biol. Chem.* **287**, 16447–16453.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. und Berendsen, H. J. C.** (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701–1718.
- Velzeboer, I., Kwadijk, C. J. A. F. und Koelmans, A. A.** (2014). Strong Sorption of PCBs to Nanoplastics, Microplastics, Carbon Nanotubes, and Fullerenes. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 4869–4876.
- Vertommen, M. A. M. E., Nierstrasz, V. A., van der Veer, M. und Warmoeskerken, M. M. C. G.** (2005). Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). *J. Biotechnol.* **120**, 376–386.
- Villaverde, A. und Mar Carrió, M.** (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1385–1395.
- von der Osten, C., Cherry, J. R., Bjørnvad, M. E., Vind, J. und Rasmussen, M. D.** (1997). Process for removal or bleaching of soiling or stains from cellulosic fabric. WO1997028243A1.
- von Moos, N., Burkhardt-Holm, P. und Köhler, A.** (2012). Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 11327–11335.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., et al.** (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* **26**, 12.
- Wandrey, G., Bier, C., Binder, D., Hoffmann, K., Jaeger, K.-E., Pietruszka, J., Drepper, T. und Büchs, J.** (2016). Light-induced gene expression with photocaged IPTG for induction profiling in a high-throughput screening system. *Microb. Cell Fact.* **15**, 63.
- Wang, Y.-Q. und Cai, J.-Y.** (2007). High-level expression of acidic partner-mediated antimicrobial peptide from tandem genes in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **141**, 203–213.
- Wang, A. A., Mulchandani, A. und Chen, W.** (2002). Specific Adhesion to Cellulose and Hydrolysis of Organophosphate Nerve Agents by a Genetically Engineered *Escherichia coli* Strain with a Surface-Expressed Cellulose-Binding Domain and Organophosphorus Hydrolase. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1684–1689.
- Wang, H., Meng, X., Xu, J., Wang, J., Wang, H. und Ma, C.** (2012). Production, purification, and characterization of the cecropin from *Plutella xylostella*, pxCECA1, using an intein-induced self-cleavable system in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 1031–1039.

- Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q. und Li, M.** (2016). The behaviors of microplastics in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* **113**, 7–17.
- Wang, J., Peng, J., Tan, Z., Gao, Y., Zhan, Z., Chen, Q. und Cai, L.** (2017). Microplastics in the surface sediments from the Beijiang River littoral zone: Composition, abundance, surface textures and interaction with heavy metals. *Chemosphere* **171**, 248–258.
- Ward, J. E. und Kach, D. J.** (2009). Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar. Environ. Res.* **68**, 137–142.
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V und Cregg, J. M.** (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**, 37–44.
- Wavhal, S. D. und Balasubramanya, R. H.** (2011). Role of biotechnology in the treatment of polyester fabric. *Indian J. Microbiol.* **51**, 117–23.
- Webb, H. K., Arnott, J., Crawford, R. J. und Ivanova, E. P.** (2013). Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). *Polymers*. **5**, 1–18.
- Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P. und Koelmans, A. A.** (2012). Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 2490–2497.
- Wei, R. und Zimmermann, W.** (2017a). Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. *Microb. Biotechnol.* doi: 10.1111/1751-7915.12714.
- Wei, R. und Zimmermann, W.** (2017b). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microb. Biotechnol.* doi: 10.1111/1751-7915.12710.
- Weilnhammer, C. und Blass, E.** (1994). Continuous fermentation with product recovery by *in-situ* extraction. *Chem. Eng. Technol.* **17**, 365–373.
- Welzel, K., Müller, R.-J. und Deckwer, W.-D.** (2002). Enzymatischer Abbau von Polyester-Nanopartikeln. *Chemie Ing. Tech.* **74**, 1496–1500.
- Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R. F., Sykes, B. D. und Wishart, D. S.** (2003). VADAR: A web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3316–3319.
- Wu, W., Xing, L., Zhou, B. und Lin, Z.** (2011). Active protein aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **10**, 9.
- Xiang, Z.** (2006). Advances in homology protein structure modeling. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 217–227.
- Xie, H., Gilbert, H. J., Charnock, S. J., Davies, G. J., Williamson, M. P., Simpson, P. J., Raghothama, S., Fontes, C. M. G. A., Dias, F. M. V, Ferreira, L. M. A., et al.** (2001). *Clostridium thermocellum* Xyn10B Carbohydrate-Binding Module 22-2: The Role of Conserved Amino Acids in Ligand Binding. *Biochemistry* **40**, 9167–9176.
- Xing, L., Wu, W., Zhou, B. und Lin, Z.** (2011). Streamlined protein expression and purification using cleavable self-aggregating tags. *Microb. Cell Fact.* **10**, 42.
- Xu, Z., Bae, W., Mulchandani, A., Mehra, R. K. und Chen, W.** (2002). Heavy Metal Removal by Novel CBD-EC20 Sorbents Immobilized on Cellulose. *Biomacromolecules* **3**, 462–465.

- Yin, J., Li, G., Ren, X. und Herrler, G.** (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* **127**, 335–347.
- Yokoyama, S., Iida, Y., Kawasaki, Y., Minami, Y., Watanabe, K. und Yagi, F.** (2009). The chitin-binding capability of Cy-AMP1 from cycad is essential to antifungal activity. *J. Pept. Sci.* **15**, 492–497.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y. und Oda, K.** (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. **351**, 1196–1199.
- Young, F. E. und Spizizen, J.** (1961). Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**, 823–829.
- Yousif, E. und Haddad, R.** (2013). Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review. *Springerplus* **2**, 398.
- Yu, Z., Wang, Q., Ma, Q. und Zhang, R.** (2013). Secretory expression of lactacin Q fused with SUMO in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr. Purif.* **89**, 51–55.
- Yuan, Y. und Lee, T. R.** (2013). Contact Angle and Wetting Properties. In *Surface Science Techniques* (ed. Bracco, G. und Holst, B.), pp. 3–34. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Zanetti, M.** (2004). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 39–48.
- Zeronian, S. H. und Collins, M. J.** (1989). Surface Modification of Polyester by alkaline treatments. *Text. Prog.* **20**, 1–26.
- Zhang, W., Inan, M. und Meagher, M. M.** (2000). Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 275–287.
- Zhang, L., Rozek, A. und Hancock, R. E. W.** (2001). Interaction of Cationic Antimicrobial Peptides with Model Membranes. *J. Biol. Chem.* **276**, 35714–35722.
- Zhang, W., Inan, M. und Meagher, M. M.** (2007). Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations. In *Pichia Protocols* (ed. Cregg, J. M.), pp. 43–63. Totowa, NJ: Humana Press.
- Zhang, Y., Wang, L., Chen, J. und Wu, J.** (2013). Enhanced activity toward PET by site-directed mutagenesis of *Thermobifida fusca* cutinase-CBM fusion protein. *Carbohydr. Polym.* **97**, 124–129.
- Zhang, X., Wang, S., Wu, X., Liu, S., Li, D., Xu, H., Gao, P., Chen, G. und Wang, L.** (2015). Subsite-specific contributions of different aromatic residues in the active site architecture of glycoside hydrolase family 12. *Sci. Rep.* **5**, 18357.
- Zhao, P. und Cao, G.** (2012). Production of bioactive sheep beta-defensin-1 in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 11–17.
- Zhu, J.-P., Chen, B.-Z., Gong, W.-B., Liang, Y.-H., Wang, H.-C., Xu, Q., Chen, Z.-L. und Lu, G.-Y.** (2001). Crystallization and preliminary crystallographic studies of antibacterial polypeptide LCI expressed in *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. Sect. D* **57**, 1931–1932.
- Zhuang, Z., Jewett, A. I., Kuttimalai, S., Bellesia, G., Gnanakaran, S. und Shea, J.-E.** (2011). Assisted Peptide Folding by Surface Pattern Recognition. *Biophys. J.* **100**, 1306–1315.

- Zimmermann, W. und Billig, S.** (2011). Enzymes for the Biofunctionalization of Poly(Ethylene Terephthalate). In *Biofunctionalization of polymers and their applications* (ed. Nyanhongo, G. S., Steiner, W. und Guebitz, G. M.), pp. 97–120. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

6 Anhang

Tab. 6.1: Aminosäure-Sequenzen der CBMs

Name	Aminosäure-Sequenz
<i>PpCBM1</i>	LYGQCGGQNWNGATSCAQGSYCKYMNNYY
<i>TrCBM1</i>	VWGQCGGQNWSGPTCCASGSTCVYSNDYY
<i>BaCBM2</i>	ATFSVTSNWGSGYNFSIVIKNSGTTPIKNWKLEFDYNGNLTQVWDSKISSKINNHYVITNAGWNG EIPPGGS
<i>BsCBM2</i>	GNRWWNGFTAELVTNVSGTKLNSWSFTFDTVHKISGSPWGATVQSTD LGGGITRYVVTGSE WAASIAPGSSVKVGFNGTQGT
<i>BaCBM5</i>	AAWDPKKTYPATPCHEVSHAGKTWLNGWWVLGDVPGTGGGEWGAWRE
<i>B/CBM5</i>	NSDQACSYDEWKETSAYTGGERVAFNGKVYEAKWWTKGDRPDQSGEWGVWRLIGGC
<i>PaCBM10</i>	CNWYGTLYPLCVTTQSGWGWENSQSCIS
<i>ucCBM10</i>	MCNWYGSLTPLCVTTTSGWGYENGKSCV

Die Abb. 6.1–6.6 wurden in Kooperation mit dem Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie (Jun.-Prof. Dr. Strodel) am FZ Jülich von Dušan Petrović erstellt.

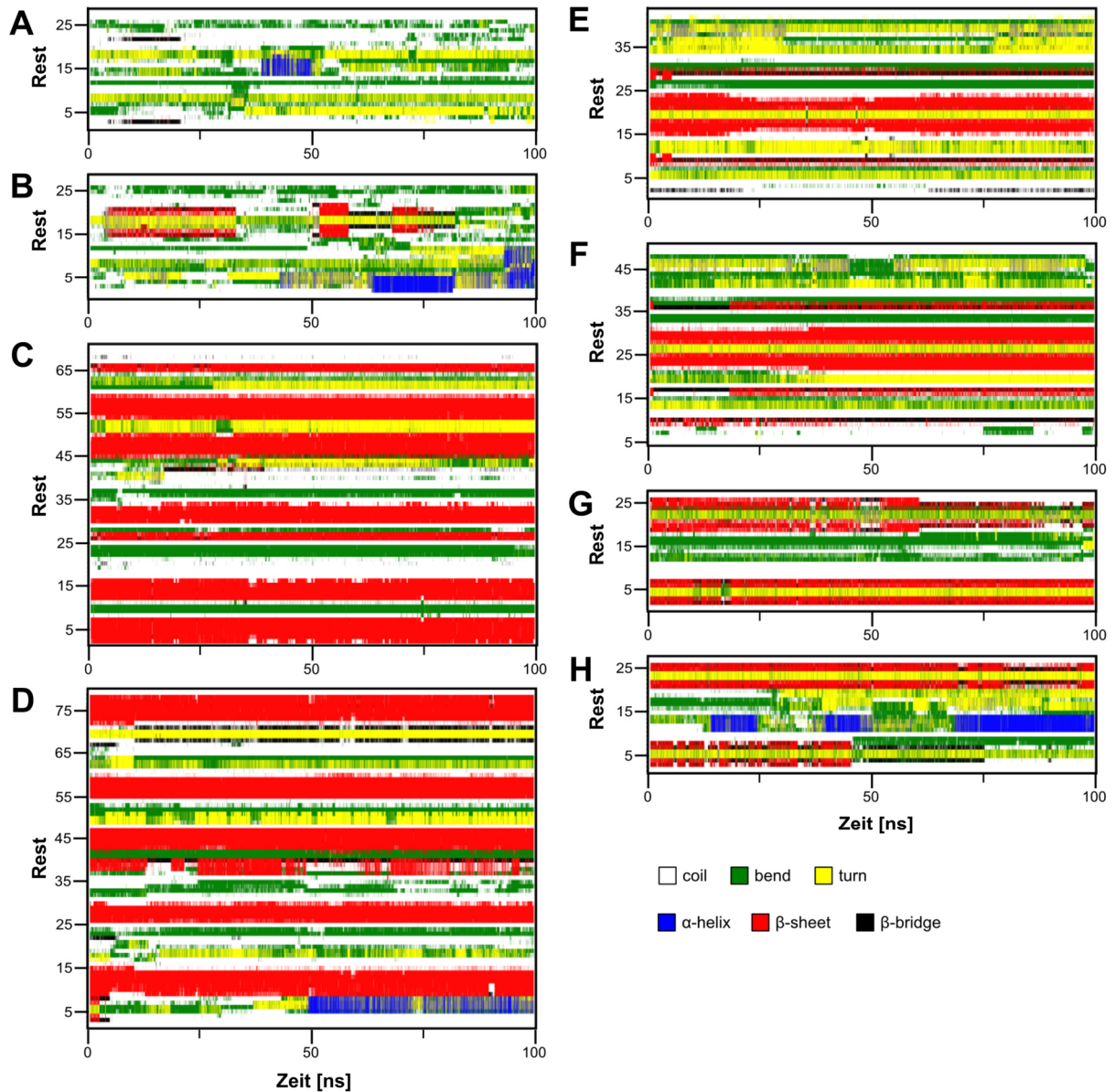


Abb. 6.1: Entwicklung der CBM-Sekundärstrukturen über den gesamten Verlauf der MD-Simulation.

(A) *TrCBM1*. (B) *PpCBM1*. (C) *BaCBM2*. (D) *BsCBM2_W63Y*. (E) *BaCBM5*. (F) *B/CBM5*. (G) *PaCBM10*. (H) *ucCBM10*. Die Sekundärstrukturen sind nach der DSSP-Klassifizierung bezeichnet (Kabsch und Sander, 1983).

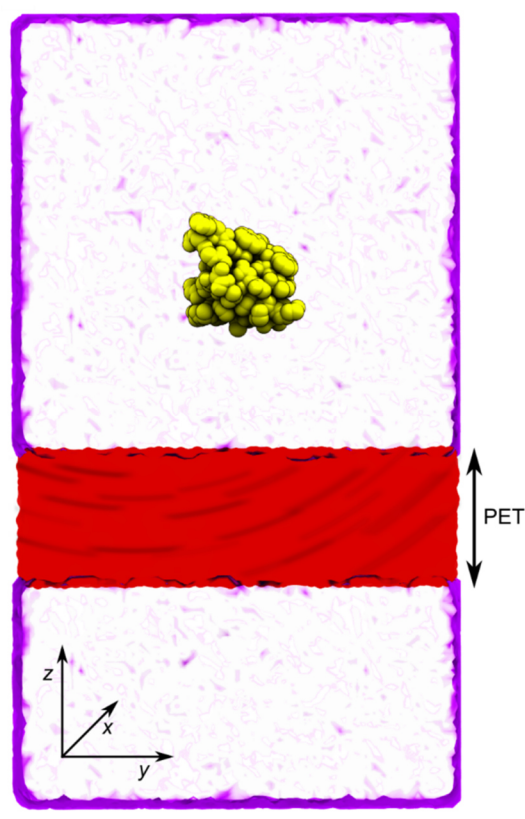


Abb. 6.2: 2D-Projektion einer typischen Simulationsbox.

Die Box enthielt eine unbegrenzte PET-Struktur (in x- und y-Richtung), die von Wasser in z-Richtung umgeben war. Die Peptide wurden $< 1,0$ nm von der PET-Oberfläche entfernt in der Wasserphase positioniert.

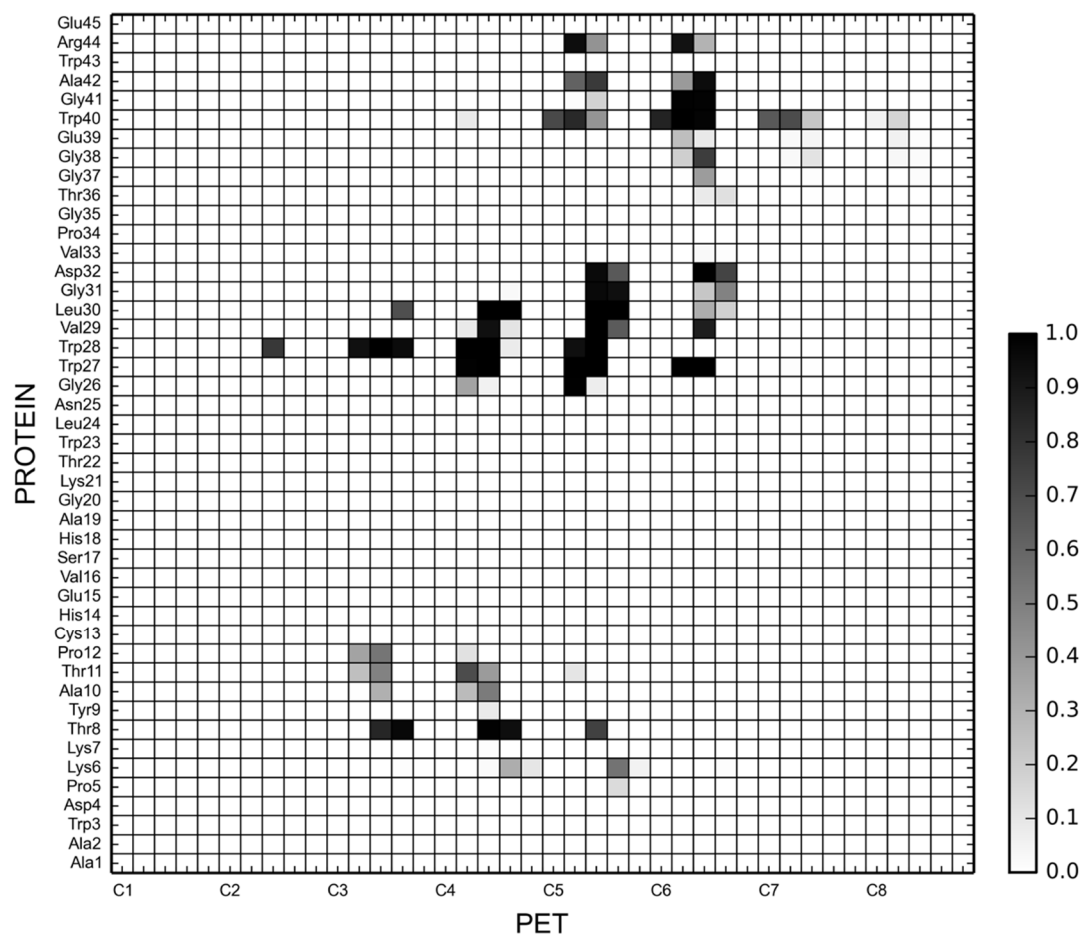


Abb. 6.3: Kontaktkarte der Interaktionshäufigkeit von *BaCBM5*-Resten mit der obersten PET-Schicht in den letzten 50 ns der MD-Simulation.

Die PET-Schicht bestand aus 8 Ketten (beschrieben als C1–C8) und jede Kette wies fünf monomere Einheiten auf (nicht nummerierte Striche innerhalb einer Kette). Die Intensität der Graustufen der Legende rechts beschreibt die Interaktionshäufigkeit.

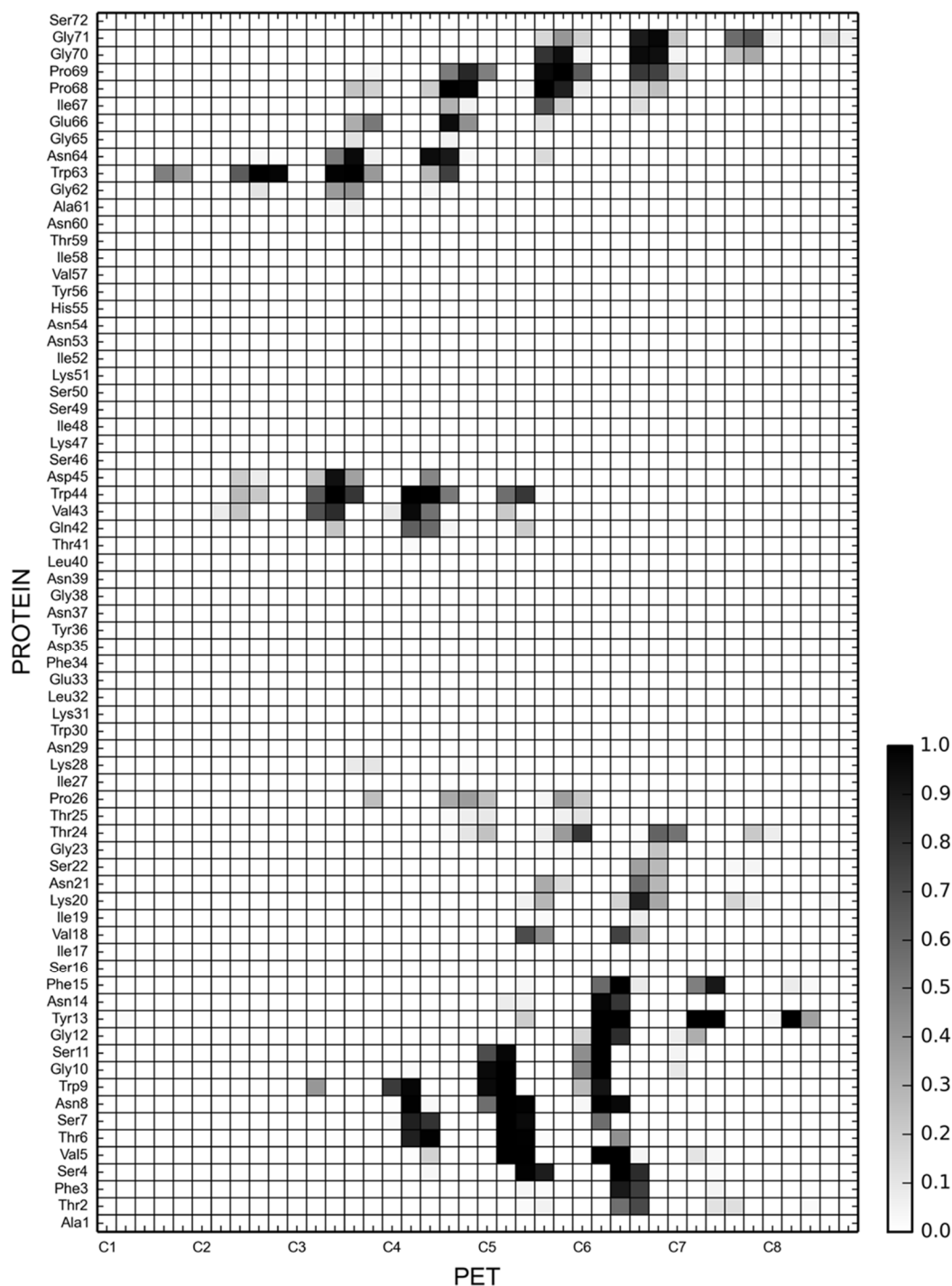


Abb. 6.4: Kontaktkarte der Interaktionshäufigkeit von *BaCBM2*-Resten mit der obersten PET-Schicht in den letzten 50 ns der MD-Simulation.

Die PET-Schicht bestand aus 8 Ketten (beschrieben als C1–C8) und jede Kette wies fünf monomere Einheiten auf (nicht nummerierte Striche innerhalb einer Kette). Die Intensität der Graustufen der Legende rechts beschreibt die Interaktionshäufigkeit.

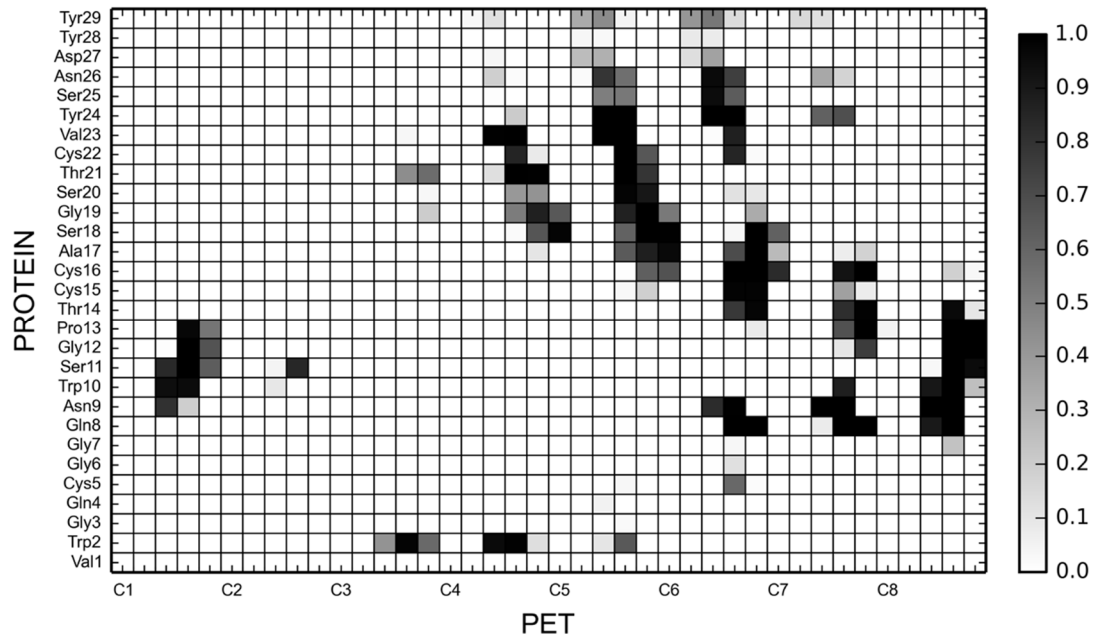


Abb. 6.5: Kontaktkarte der Interaktionshäufigkeit von *TrCBM1*-Resten mit der obersten PET-Schicht in den letzten 50 ns der MD-Simulation.

Die PET-Schicht bestand aus 8 Ketten (beschrieben als C1–C8) und jede Kette wies fünf monomere Einheiten auf (nicht nummerierte Striche innerhalb einer Kette). Die Intensität der Graustufen der Legende rechts beschreibt die Interaktionshäufigkeit.

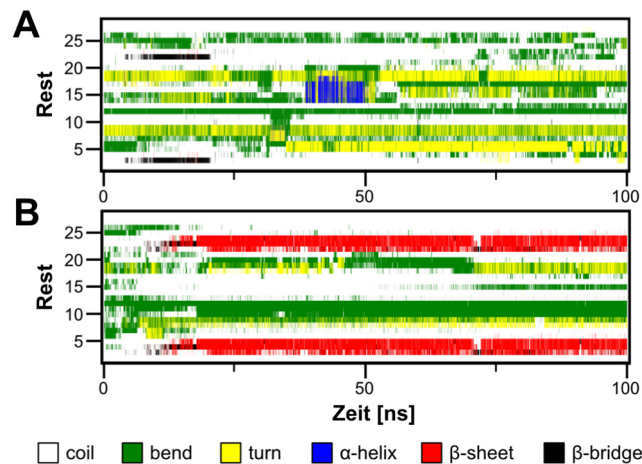


Abb. 6.6: Entwicklung der Sekundärstruktur von *TrCBM1* über den gesamten Verlauf der MD-Simulation in Wasser (A) und an der PET-Oberfläche (B).

Die Sekundärstrukturen sind nach der DSSP-Klassifizierung bezeichnet (Kabsch und Sander, 1983).

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich für die persönlichen Gespräche mit den vielen wegweisenden Anregungen.

Bei Prof. Dr. Michael Feldbrügge bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Evoxx technologies GmbH danke ich für die Überlassung der interessanten Thematik im Rahmen des BMBF-Projekts „FuPol“ und für die Bereitstellung des Laborplatzes. Darüber hinaus möchte ich mich für die „freie Hand“ und das mir entgegengebrachte Vertrauen zur Bearbeitung des Projekts bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Christian Leggewie und Dr. Christian Degering für die hervorragende Unterstützung, die zahlreichen, wissenschaftlichen Diskussionen und die konstruktive Kritik während der gesamten Arbeit.

Vielen Dank an alle Kollegen der evox technologies GmbH für die schöne Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft im Labor und die gemeinsamen Aktivitäten über die Arbeit hinaus!

Bei Dr. Christian Leggewie und Dr. Stephan Kolkenbrock möchte ich mich herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und der Dissertation bedanken.

Dr. Stephan Kolkenbrock danke ich für die Unterstützung über Unternehmensgrenzen hinweg.

Dem BMBF danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts im Rahmen der Allianz „FuPol“.

Ich danke Benjamin Stomps, Marc Zimmermann, Dr. Dmitry Grigoriev und Prof. Dr. Alexander Böker vom Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP in Potsdam für die sehr gute Kooperation im „FuPol“-Projekt. Vielen Dank für die Möglichkeit der gemeinsamen Laborarbeit vor Ort, die Gastfreundschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich bedanke mich bei B. Stomps und M. Zimmermann für die konstruktiven Telefonate und die Bereitstellung von Daten für diese Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Coats Opti Germany GmbH in Rhaderfehn und beim DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V. RWTH Aachen für die gute Kooperation und die anregenden Diskussionsrunden im „FuPol“-Projekt bedanken.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Dušan Petrović und Jun.-Prof. Dr. Birgit Strodel vom Institut für Komplexe Systeme: Strukturelle Biochemie am FZ Jülich für die hervorragende Kooperation. Vielen Dank für die Durchführung der aufschlussreichen MD-Simulationen, die tolle Zusammenarbeit zur Verschriftlichung der Ergebnisse in Form eines Manuskripts und die Bereitstellung von Daten für diese Arbeit.

Dr. Sander Smits und Prof. Dr. Lutz Schmitt vom Lehrstuhl für Biochemie I der HHU Düsseldorf danke ich für die Benutzung des Fluorologs, die wissenschaftliche Unterstützung zur Interpretation der Daten sowie für die Korrektur des Manuskripts.

Mareike Kessenbrock vom Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie der HHU Düsseldorf und Dr. Ingo Weyand vom Institut für Komplexe Systeme: Zelluläre Biophysik am Forschungszentrum Jülich danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung bei den MST-Messungen. Ebenso möchte ich mich bei den Institutsleitungen Prof. Dr. Georg Groth und Prof. Dr. Christoph Fahlke für die Benutzung der Geräte bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei NanoTemper Technologies GmbH für die Demo-Messung sowie die weitere wissenschaftliche Betreuung von MST-Messungen bedanken.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und Freunden für die stetige Unterstützung und die gelungenen Ablenkungen während der letzten Jahre bedanken! Ganz besonders danke ich Marius, der jederzeit für mich da war und mich immer motiviert hat.

Joanna Weber

Geburtstag: 22.11.1988

Geburtsort: Essen

Schulische und universitäre Ausbildung

- | | |
|-----------------|--|
| 10/2013–heute | Promotionsstudium Biologie
Thema der Dissertation: „Identifizierung und biotechnologische Anwendungen Polymer-bindender Peptide“
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzym-technologie, Prof. Dr. K.-E. Jaeger
Durchgeführt bei evovx technologies GmbH in Monheim am Rhein |
| 10/2011–09/2013 | Masterstudium Biologie
Thema der Masterarbeit: „Expression und Sekretion heterologer Enzyme mit <i>Bacillus subtilis</i> “
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzym-technologie, Prof. Dr. K.-E. Jaeger
Durchgeführt bei evocatal GmbH (jetzt evovx technologies GmbH) in Düsseldorf |
| 10/2008–08/2011 | Bachelorstudium Biologie
Thema der Bachelorarbeit: „Fluoreszenz-basierte Reportersysteme zur Zellkern-Markierung in <i>Candida albicans</i> “
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Mikrobiologie, Abteilung für Molekulare Mykologie, Prof. Dr. J. F. Ernst |
| 1999–2007 | Allgemeine Hochschulreife
Immanuel-Kant Gymnasium in Heiligenhaus |

Berufserfahrung und Praktika

- | | |
|-----------------|--|
| 10/2013–12/2016 | Doktorarbeit bei evovx technologies GmbH in Monheim am Rhein |
| 09/2012–01/2013 | Praktikum bei evocatal GmbH (jetzt evovx technologies GmbH) in Düsseldorf |
| 09/2011–12/2011 | Studentische Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie, Abteilung für Molekulare Mykologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf |
| 08/2010–09/2010 | Praktikum beim Deutschen Roten Kreuz in Ratingen |

Zusatzqualifikationen und Stipendium

- Internationales Zertifikat für Wirtschaftskompetenz EBC*L A (European Business Competence* Licence A) am Hagener Institut für Managementstudien an der FernUniversität Hagen
- „Good Scientific Practice for Doctoral Researchers“, erfolgreiche Kursteilnahme
- “Fortbildungsveranstaltung zur Vermittlung der Sachkunde nach §15 Abs. 2 S. 1 Nr. 3, Abs. 4 Gentechnik-Sicherheitsverordnung“, erfolgreiche Kursteilnahme mit Erlangung der Sachkunde
- „Schreibworkshop Research Paper“, erfolgreiche Kursteilnahme
- „Einführung in den gewerblichen Rechtsschutz“, erfolgreiche Kursteilnahme
- Deutschlandstipendium „Chancen Nutzen“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Sprachen

- Deutsch (Muttersprache)
- Englisch (Fließend in Wort und Schrift)
- Französisch (Grundlagen)