



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences**

**Medienoptimierung für die pDNA-Produktion im
Mikrotiterplattenformat**

Bachelorarbeit im Studiengang B. Sc. Biotechnologie

vorgelegt von

**Chantal Brämer
2081314**

Hamburg
am 10. August 2015

Erstgutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich
HAW Hamburg

Zweitgutachterin: Anke Eichmann
Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG

Diese Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Prozessentwicklung des Unternehmens Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG am Standort Hamburg.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Michael Kuchler und Richter-Helm BioLogics für die Ermöglichung der Arbeit.

Anke Eichmann möchte ich herzlich für die Korrektur, Betreuung und die hilfreichen Ratschläge bei der Durchführung und Auswertung danken.

Ich danke Anke Eichmann und Prof. Dr. Ullrich für die Erstellung der Gutachten.

Ich möchte mich auch bei den Mitarbeitern der gesamten Prozessentwicklung bedanken, die Arbeit hat mir in dem Team sehr viel Spaß und Freude bereitet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Ziel der Arbeit	1
2 Theoretische Grundlagen	2
2.1 Plasmidproduktion	2
2.2 Optimierung von Fermentationsmedien	4
2.3 Design of Experiments	5
2.3.1 DoE-Datenanalyse mit MODDE®	7
2.4 Mikrofermentation und <i>Scale-Up</i>	10
2.5 Messtechnik und Analytik	11
2.5.1 Bestimmung des Zellwachstums	11
2.5.2 Bestimmung der pDNA-Ausbeute und –Qualität mittels Anionentauscher-HPLC	11
3 Material und Methoden	13
3.1 Plasmide und Stämme	14
3.2 Vorkultivierung	15
3.3 Mikrotiterplatten-Fermentation	17
3.3.1 Vorbereitungen	18
3.3.2 Start der Fermentation	19
3.3.3 Fermentation	19
3.3.4 Ende der Fermentation	19
3.3.5 Nachbereitung	19
3.4 Medienoptimierung mit <i>Design of Experiments</i> im Mikrotiterplattenformat	20
3.4.1 Optimierung des Mediums mit Glucose als C-Quelle	21
3.4.2 Optimierung des Mediums mit kombinierter C-Quelle	22
3.4.3 Auswertung mit dem <i>Optimizer</i> -Tool	24
3.5 <i>Scale-up</i>	24
3.6 Messtechnik und Analytik	25
3.6.1 Probennahme und Bestimmung des Zellwachstums	25
3.6.2 Probennahme und -vorbereitung zur Bestimmung der pDNA-Ausbeute	26
3.6.3 Bestimmung der pDNA-Ausbeute mittels Anionentauscher-HPLC	27
4 Ergebnisse und Diskussion	28
4.1 Plasmid 1	30
4.1.1 Optimierung des Mediums mit Glucose als C-Quelle (V01 bis V03)	31

4.1.2 Optimierung des Mediums mit kombinierter C-Quelle (V07 bis V09)	35
4.1.3 <i>Scale-up</i> von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben (V13)	39
4.2 Plasmid 2	41
4.2.1 Optimierung des Mediums mit Glucose als C-Quelle (V04 bis V06)	42
4.2.2 Optimierung des Mediums mit kombinierter C-Quelle (V10 bis V12)	46
4.2.3 <i>Scale-up</i> von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben (V14 bis V16)	50
4.3 Bewertung der Verwendung von <i>Design of Experiments</i>	55
4.4 Bewertung des <i>Scale-up</i>	55
5 Zusammenfassung und Ausblick	56
6 Literaturverzeichnis.....	58

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
Art. Nr.	Artikelnummer
c	Konzentration
ccc	<i>covalently-closed-circular</i>
CP	<i>Center Point</i>
DoE	<i>Design of Experiments</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EoF	<i>end of fermentation</i> (dt. Fermentationsende)
Fa.	Firma
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der USA)
h	<i>hour</i> (dt. Stunde)
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (dt. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Ile	Isoleucin
KF	Korrelationsfaktor
Leu	Leucin
M	Molar
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MTP	Mikrotiterplatte
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
oc	<i>open-circular</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
p	Plasmid
Pro	Prolin
RCB	<i>Research Cell Bank</i> (dt. Forschungszellbank)
RHB	Richter-Helm BioLogics
rpm	<i>revolutions per minute</i> (dt. Umdrehungen pro Minute)
SDS	sodium dodecyl sulfate
Thi	Thiamin
V	Verdünnungsfaktor
VK	Vorkultur
WCB	<i>Working Cell Bank</i> (dt. Arbeitszellbank)
WHO	<i>World Health Organization</i> (dt. Weltgesundheitsorganisation)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klassischer Aufbau eines DNA-Therapeutikums (In Anlehnung an: Bower & Prather, 2009).....	3
Abb. 2: Maximierung der Information mit gleichzeitiger Minimierung der Experimente durch Anwendung von Design of Experiments (modifiziert: GE Healthcare).	5
Abb. 3: MODDE®, Software zur modellgestützten Versuchsplanung und Optimierung von Prozessen.....	7
Abb. 4: Beispiele für <i>Summary of Fit</i> -Plots.....	8
Abb. 5: Beispiel für das Ergebnis einer Optimierung von zwei Zielgrößen mit dem <i>Optimizer</i> -Tool von MODDE®.....	9
Abb. 6: Informationsgehalt während der experimentellen Entwicklung eines Bioprozesses (Betts & Baganz, 2006).	10
Abb. 7: Beispiel-Chromatogramm für die Anionentauscher-HPLC Analytik einer pDNA-Probe.....	12
Abb. 8: Ablauf der Versuche unterteilt in Vorarbeiten, Versuche in der Mikrotiterplatte und <i>Scale-up</i>	13
Abb. 9: A) 24-Well Mikrotiterplatte mit Pyramidenböden nach Duetz; B) Schema des Verbunddeckels (Franzgrote, 2014).	17
Abb. 10: Plattenschema mit Nummer (N) der Experimente.	19
Abb. 11: Ergebnisse für die Optimierung des Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) für V01 bis V03.....	33
Abb. 12: Ergebnisse für die Optimierung des Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) mit kombinierter C-Quelle für V07 bis V09.	37
Abb. 13: V13: <i>Scale-up</i> (.) von DH10B::P1 und dem dazugehörigen Experiment in der Platte (●).	39
Abb. 14: Ergebnisse für die Optimierung des Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) für V04 bis V06.....	44
Abb. 15: Ergebnisse für die Optimierung des Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) mit kombinierter C-Quelle für V10 bis V12.	48
Abb. 16: <i>Scale-up</i> (.) V14 von DH5α::P2 und dem dazugehörigen Experiment in der Platte (●).	51
Abb. 17: <i>Scale-up</i> (.) V15 von DH10B::P2 und dem dazugehörigen Experiment in der Platte (●).	52
Abb. 18: <i>Scale-up</i> (.) V16 von Stbl3::P2 und dem dazugehörigen Experiment in der Platte (●).	53
Abb. 19: Übertragung einer "Negativkontrolle" von der Platte in den Schüttelkolben zur Bewertung des <i>Scale-up</i>	55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Für die Plasmidproduktion relevante Gene eines Stammes.	2
Tab. 2: Vergleich verschiedener Designs mit der Anzahl der durchzuführenden Experimente abhängig von der Anzahl der Faktoren (vgl. Eriksson, 2008).	6
Tab. 3: Bezeichnung und Richtwerte der Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung.	8
Tab. 4: Verwendete Plasmide mit wichtigen Charakteristika.	14
Tab. 5: Verwendete Stämme mit Genotyp.....	14
Tab. 6: Zusammensetzung des PDM-Mediums für die Vorkultivierung.	15
Tab. 7: Parameter und Sollwerte für die Vorkultivierung.	15
Tab. 8: Geräte zum Ansetzen von Medien und Durchführung von Vorkulturen.	16
Tab. 9: Parameter und Sollwerte für die Mikrotiterplatten-Fermentation im Schüttelinkubator der Fa. Infors HAT (Typ <i>Multitron Pro</i>).	17
Tab. 10: Verwendete Geräte und Materialien zur Durchführung der MTP-Fermentationen.....	18
Tab. 11: Experimente (N) des Rechtschaffner Designs mit 5 normierten Faktoren x_1 bis x_5	20
Tab. 12: Material zum Ansatz von Stocklösungen und deren Sterilfiltration für die Optimierungsversuche.	21
Tab. 13: Faktoren und Faktorbereich für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) mit Glucose als C-Quelle für alle Stamm Plasmid-Kombinationen.....	21
Tab. 14: Zusammensetzung des Grundmediums für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) mit Glucose als C-Quelle.	22
Tab. 15: Zusätze für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) mit Glucose als C-Quelle.....	22
Tab. 16: Faktoren und Faktorbereich für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) mit kombinierter C-Quelle für alle Stamm Plasmid-Kombinationen.....	23
Tab. 17: Zusammensetzung des Grundmediums für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) mit kombinierter C-Quelle.....	23
Tab. 18: Zusätze für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang <i>et al.</i> (2001) mit kombinierter C-Quelle.....	23
Tab. 19: Parameter und Sollwerte für den <i>Scale-up</i> im Schüttelkolben.	24
Tab. 20: Geräte und Materialien zur Bestimmung von OD_{600} mit dem <i>Multiskan GO</i>	25
Tab. 21: Geräte und Materialien für die Probennahme und –vorbereitung zur Bestimmung der pDNA-Ausbeute.....	26
Tab. 22: Puffer und Standard für die Durchführung der Anionentauscher-HPLC.....	27
Tab. 23: Geräte und Materialien zur Durchführung der Anionentauscher-HPLC.	27
Tab. 24: Übersicht der Optimierungsversuche V01 bis V16.....	29
Tab. 25: Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung für V01 bis V03.....	31
Tab. 26: Faktoreinstellungen und theoretische Zielgrößen laut MODDE® <i>Optimizer</i> für V01 bis V03.....	31
Tab. 27: Faktoreinstellungen der theoretischen Zielgrößen für die Schnittmenge von V01 bis V03.....	31
Tab. 28: Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung für V07 bis V09.....	35
Tab. 29: Faktoreinstellungen laut MODDE® <i>Optimizer</i> für V07 bis V09.....	35
Tab. 30: Theoretische Zielgrößen laut MODDE® <i>Optimizer</i> für V07 bis V09.....	35

Tab. 31: Konzentrationen der Zusätze und theoretische Werte für F_{OD} und pDNA-Ausbeute für V13.....	39
Tab. 32: Ergebnisse für den <i>Scale-up</i> von V13.	40
Tab. 33: <i>Scale-up</i> von DH10B::P1 (V13).....	40
Tab. 34: Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung für V04 bis V06.....	42
Tab. 35: Faktoreinstellungen und theoretische Zielgrößen laut MODDE® <i>Optimizer</i> für V04 bis V06.....	42
Tab. 36: Faktoreinstellungen der theoretischen Zielgrößen für die Schnittmenge von V04 bis V06.....	42
Tab. 37: Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung für V10 bis V12.....	46
Tab. 38: Faktoreinstellungen laut MODDE® <i>Optimizer</i> für V10 bis V12.....	46
Tab. 39: Theoretische Zielgrößen laut MODDE® <i>Optimizer</i> für V10 bis V12.....	46
Tab. 40: Konzentrationen der Zusätze und theoretische Werte für F_{OD} und pDNA-Ausbeute für V14, V15, V16.	50
Tab. 41: Ergebnisse für den <i>Scale-up</i> von V14, V15, V16.....	50
Tab. 42: <i>Scale-up</i> von DH5 α ::P2 (V14).....	51
Tab. 43: <i>Scale-up</i> von DH10B::P2 (V15).....	52
Tab. 44: <i>Scale-up</i> von Stbl3::P2 (V16).....	53
Tab. 45: Zusammenfassung der Ergebnisse der pDNA-Ausbeute für die Skalierung in den Kolben auf Grundlage der berechneten Medienzusammensetzungen für die besten Stamm Plasmid-Kombination mit den theoretischen (th.) und tatsächlichen pDNA-Ausbeuten nach 8 h und 24 h Fermentation.....	56

1 Einleitung

Neben klassischen Therapeutika zur Behandlung von Infektions- und Erbkrankheiten etablieren sich aktuell vielversprechende therapeutische Ansätze, wobei Plasmide den Grundstein und eigentlichen Wirkstoff darstellen. Im Gegensatz zu konventionellen Therapeutika, die als Vakzin eingesetzt werden, haben DNA Vakzine viele Vorteile. Sie sind unter anderem stabiler, rufen nur eine spezifische Immunantwort hervor und verbleiben mehrere Wochen im menschlichen Körper um dort ihre Wirkung zu entfalten. Damit versprechen DNA Vakzine eine bessere Wirksamkeit und werden zur effizienteren und kostengünstigeren Alternative. Sie werden sich besonders für den Einsatz in Schwellenländern ihren Weg bahnen, denn in diesen Ländern brechen regelmäßig große Epidemien aus. Im letzten Jahr infizierten sich beispielsweise 21.000 Menschen mit Ebola, von denen rund 8.400 starben. Seit Ende 2014 wurden 280 Mio. Euro in die Impfstoffentwicklung und Herstellung investiert, um einen geeigneten Wirkstoffkandidaten für den Kampf gegen Ebola zu entwickeln. Zu diesen Kandidaten gehören unter anderem Vakzine auf Basis von Plasmid DNA (Nader, 2015).

Ein wesentlicher Bestandteil eines leistungsfähigen biotechnologischen Herstellungsverfahrens ist die Produktausbeute am Ende der Fermentation. Mit Blick auf die Produktion von Plasmid DNA ist die Medienoptimierung für die Fermentation ein zentrales Thema.

Dazu werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit exemplarisch die Medien für zwei Plasmide P1 und P2 in den Stämmen DH5 α , DH10B und Stbl3 optimiert. Die Versuchsplanung beruht auf *Design of Experiments* und wird in Mikrotiterplatten umgesetzt. Für jedes Plasmid wird ein Vergleich zwischen den Stämmen gezogen und der geeignetste Stamm für eine Maßstabsvergrößerung ausgewählt.

Die Grundlage bildet das stöchiometrische Medium nach Wang *et al.* (2001), zu dem verschiedene Aminosäurezusätze sowie die C-Quellen Glucose und Glycerin addiert werden.

In der Arbeit sollen unter anderem Erkenntnisse über die Abhängigkeiten der Plasmid DNA-Ausbeute von Aminosäuren, die die jeweiligen Stämme selber nicht synthetisieren können (Auxotrophien) gewonnen werden. In Verbindung damit wird der Zusammenhang von Genen, die die Plasmid-Produktion beeinflussen untersucht. Dazu gehört beispielsweise der Lokus *relA*, welcher die Replikation trotz Aminosäuremangel zulässt.

Des Weiteren wird der Einfluss der C-Quelle auf die pDNA-Ausbeute in der zweiten Optimierungsrunde analysiert. Lopes *et al.* (2014) beschreibt, dass unter Einsatz von einer Kombination aus Glucose und Glycerin die Produktivität und Ausbeute eines Stammes beeinflusst werden.

Zuletzt soll in einem größeren Maßstab gezeigt werden, dass die Fermentation in der Mikrotiterplatte repräsentativ ist.

Zusätzlich sollen in dieser Arbeit Informationen über Plasmid- bzw. stammabhängige pDNA-Ausbeuten gewonnen werden, die eine Aussage darüber zulassen, ob die Optimierung von Medien für die pDNA-Produktion verallgemeinert werden kann.

1.1 Ziel der Arbeit

Das Mikrotiterplatten-Tool bietet im Zusammenhang mit *Design of Experiments* gute Möglichkeiten für die medienabhängige Optimierung von pDNA-Ausbeuten. Dabei wird der Versuchsaufwand minimal gehalten und liefert den maximalen Informationsgehalt.

Das Ziel der Arbeit ist die Steigerung der pDNA-Ausbeute von verschiedenen Stamm Plasmid-Kombinationen. Dabei wird die statistische Versuchsplanung eingesetzt, um Trends für diese Optimierung zu liefern.

2 Theoretische Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden die theoretischen Grundlagen für die durchgeführten Versuche erläutert. Die theoretischen Grundlagen sind in Plasmidproduktion (2.1), Optimierung von Fermentationsmedien (2.2), *Design of Experiments* (2.3), Mikrofermentation und *Scale-up* (2.4) und Messtechnik und Analytik (2.5) unterteilt.

2.1 Plasmidproduktion

Plasmide bilden die Grundlage für vielversprechende DNA-Vakzine und Gentherapeutika. Bereits im Jahr 2003 wurde das erste Therapeutikum auf Basis von Plasmid DNA für Menschen in China zugelassen. Anschließend wurden im Jahr 2008 vier Gentherapeutika auf Basis von Plasmid DNA für die tierische Anwendung zugelassen während 100 klinische Studien von Phase I zu Phase II fortschritten. Die zahlreichen klinischen Studien zeigen vor allem die Sicherheit der Methoden mit pDNA sowie das hohe Potential dieser neuen Gentherapeutika und DNA Vakzine (Subramanian, 2012).

Bei Plasmid DNA handelt es sich um extrachromosomale autonom replizierte DNA-Elemente mit 3 bis 20 kb. Üblicherweise liegen Plasmide in der zirkulären (*covalently-closed-circular, ccc*) Form vor (Knippers, 2006). Durch Einzel- oder Doppelstrangbruch entstehen die entspannte (*open-circular, oc*) oder die lineare Form der pDNA (Antranikian, 2006). Die *Food and Drug Administration* (FDA) schreibt vor, dass ausschließlich DNA-Therapeutika mit mindestens 80 % der ccc-Form der pDNA eingesetzt werden (Food and Drug Administration, 1996; Robertson & Griffiths, 1998).

Das DNA-Vakzin wirkt indem es eine spezifische Immunantwort hervorruft und über mehrere Wochen im Körper verbleibt. Das Gentherapeutikum wird direkt in die Zellen eines Patienten eingebracht mit dem Zweck ein Gen zu ersetzen, zu reparieren oder ein defektes Gen zu unterdrücken (Lara & Ramirez, 2012).

Da die Herstellung von Plasmiden in Bakterien durchgeführt wird, muss das Plasmid zusätzlich zu den eukaryotischen Elementen (Promoter, *gene of interest*, polyA-Schwanz) prokaryotische Elemente tragen. Dazu gehören der selektive Marker (z.B. ein Resistenzgen) und der Replikationsursprung (Bower & Prather, 2009).

pDNA wird zurzeit ausschließlich in *E. coli* hergestellt. Die K12 Stämme eignen sich aufgrund verschiedener Eigenschaften sehr gut als Produktionsstämme. In Tab. 1 sind einige Gene aufgeführt, die für die Plasmidproduktion relevant sind (Węgrzyn, 1999; Durfee *et al.*, 2008; Lara & Ramirez, 2012; Subramanian, 2012).

Tab. 1: Für die Plasmidproduktion relevante Gene eines Stammes.

Gen	Bedeutung für die Plasmidproduktion
<i>recA1/recA13</i>	Reduzierte Plasmid Rekombination, erhöhte Plasmidstabilität
<i>endA1</i>	Verbesserte Ausbeute
<i>relA1</i>	Relaxierter Phenotyp: erlaubt die RNA-Synthese unter Aminosäuremangel
<i>spoT1</i>	Gen für ein cytosolisches Gen, dass die RNA-Synthese unter Glucosemangel erlaubt
<i>nupG</i>	Hohe Transformationsraten, Stamm nimmt große Plasmide gut auf

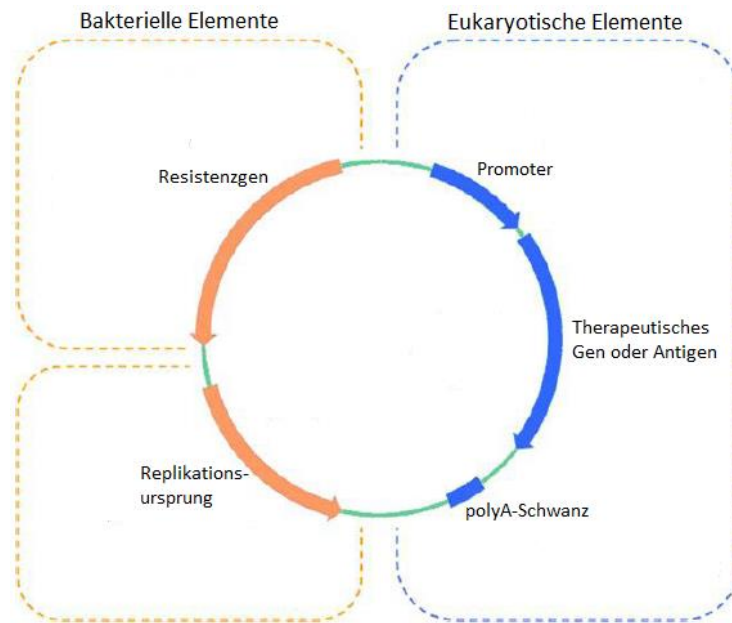


Abb. 1: Klassischer Aufbau eines DNA-Therapeutikums (In Anlehnung an: Bower & Prather, 2009). In der Abbildung ist ein DNA-Therapeutikum gezeigt. Es enthält zum einen die bakteriellen Elemente (Resistenzgen und Replikationsursprung), die für die Produktion notwendig sind. Zum anderen die eukaryotischen Elemente mit Promoter, dem therapeutischen Gen oder Antigen und dem polyA-Schwanz, die für die Vakzination oder Genthherapie nötig sind.

Die Produktion von Plasmid DNA startet im Allgemeinen im kleinen Maßstab mit dem Plasmid-Design und der Stammauswahl. Zuerst wird ein Vektor mit einem Replikationsursprung ausgewählt. Die Wahl fällt normalerweise auf ColE1-Derivate, da diese weit verbreitet und gut studiert sind. Des Weiteren replizieren sie mit hohen Kopienzahlen und führen damit zu hohen pDNA-Ausbeuten. Schließlich wird das DNA-Therapeutikum designt und mit den oben genannten Elementen bestückt (Prather *et al.*, 2003). Das Plasmid kann in verschiedene Stämme eingebracht werden, zu den populärsten gehört DH5 α . Daneben werden allerdings auch andere Stämme mit geeigneten Genotypen für die pDNA-Produktion eingesetzt. Die Untersuchung von verschiedenen Stamm Plasmid-Kombinationen kann in vielen Fällen zu immensen Steigerungen der Ausbeuten führen und sollte in der Entwicklung nicht vernachlässigt werden. So eignet sich beispielsweise DH10B besonders für das Einbringen von großen Plasmiden (Durfee *et al.*, 2008). Von dem Design der Stamm Plasmid-Kombination gefolgt, werden die Fermentationsbedingungen angepasst und optimiert. Zuletzt wird das Plasmid isoliert und in mehreren Schritten aufgereinigt. Die Fermentation spielt im Produktionsprozess eine übergeordnete Rolle, da in diesem Schritt das Plasmid mit möglichst hoher Effizienz und Produktivität hergestellt werden soll (Zheng *et al.*, 2007). Erst in den letzten Jahren wurde dem Fermentationsmedium größere Aufmerksamkeit geschenkt und gezeigt, dass sich die Ausbeute mit dem richtigen Medium immens steigern lässt (O'Kennedy *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). In diesem Sinne wird im nächsten Abschnitt auf die Optimierung von Fermentationsmedien für die pDNA-Produktion eingegangen.

2.2 Optimierung von Fermentationsmedien

Bisher waren die Medien für die Fermentation von rekombinanten *E. coli* auf die Expression von Proteinen ausgelegt. Allerdings stellt die Produktion von den relativ großen Plasmiden ganz andere Ansprüche. Im Gegensatz zur Produktion von Proteinen, bei der zellinterne Prozesse wie die Transkription und Translation ablaufen, ist die Replikation der einzige zellinterne Prozess, der für die Herstellung von pDNA benötigt wird. Von dem Plasmid sollen keine Informationen abgelesen werden. Die Replikation ist abhängig von dem Replikationsursprung des Plasmids und bestimmt die Kopienzahl pro Zelle. Üblicherweise werden ColE1-ähnliche Plasmide eingesetzt, sie gehören zu den *high copy* Plasmiden.

Das Fermentationsmedium soll die optimalen Bedingungen schaffen, um die Replikation des Plasmids so stark wie möglich zu steigern während andere zellinterne Prozesse eher unterdrückt werden. Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass die Plasmid-Replikation umgekehrt abhängig vom Wachstum der Zelle ist. Bei geringem Zellwachstum kann mehr Zeit und Energie für die Replikation aufgebracht werden, was sich sowohl positiv auf die Ausbeute als auch auf die Qualität auswirken kann (Lara & Ramirez, 2012).

Obwohl die Optimierung von Fermentationsmedien einen großen Stellenwert hat, findet man wenige Informationen über die Optimierung von Fermentationsmedien für die pDNA-Produktion. Standardmäßig werden Komplexmedien (z.B. LB-Medium) aus Hefeextrakt und hydrolysierten Proteinen eingesetzt. Sie sind einfach anzusetzen und führen in den meisten Fällen zu hohen Zelldichten. Als C-Quelle werden besonders Glucose und Glycerin eingesetzt. Stickstoff wird häufig in der Form von Ammoniumsalzen hinzugefügt. Oft werden zusätzlich Spurenelemente oder Vitamine zum Medium zugesetzt. Definierte Medien sind im Gegensatz zu den komplexen zwar viel reproduzierbarer, benötigen allerdings einen viel größeren Aufwand für die Vorbereitung und Optimierung. Daher werden bislang eher Komplexmedien eingesetzt (Danquah & Forde, 2007).

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass die Anpassung von Mineralmedien an die Ansprüche eines Stammes, der pDNA produziert, ebenso zu hohen Ausbeuten und Optischen Dichten führt. Daher zielen immer mehr Experimente darauf ab, optimale Mineralmedien für die pDNA-Produktion zu entwickeln. O'Kennedy *et al.* (2000) bewiesen die Abhängigkeit der pDNA-Replikation von dem Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff und fanden heraus, dass ein Verhältnis von 2.78:1 in einem semi-definierten Medium zu den höchsten pDNA-Ausbeuten führte. Standardmedien weisen Werte von 12:1 auf und führen zu wesentlich geringen Ausbeuten. Trotz der Änderung des Verhältnisses zwischen C- und N-Quelle wurden keine Unterschiede im Wachstum beobachtet. Daher wurde darauf geschlossen, dass das Verhältnis von 2.78:1 die Replikation positiv beeinflusst. Zusätzlich dazu führt der Einsatz von Komplexmedien, wie LB-Medium, im Gegensatz zu semi-definierten Medien zu Minderungen der Qualität bzw. Stabilität um 63 % (Wang *et al.*, 2015; O'Kennedy *et al.*, 2000).

Auch Wang *et al.* (2001) führten Experimente zur Ausbeutesteigerung durch Design eines Fermentationsmediums durch und stellten Berechnungen zur Optimierung eines stöchiometrischen definierten Mediums an. Mit der Anpassung dieses stöchiometrischen Minimalmediums erzielten Wang *et al.* (2001) Steigerungen der pDNA-Ausbeute um das 7.5- bis 15-fache (in mgL^{-1}) im Vergleich zu LB-Medium. Wang *et al.* (2001) beschreiben in ihrer Arbeit den Pool der Medienkomponenten, die für die zellulären Prozesse von *E. coli* notwendig sind. Dazu gehören eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Mineralsalze. Glucose wird als Energiequelle und für die Synthese von Kohlenhydraten, Fetten und Nukleotiden benötigt. Zelluläre Proteine werden aus allen Aminosäuren synthetisiert während für die Synthese von Nucleotiden (RNA, DNA und pDNA) lediglich Glutamin, Asparaginsäure und Glycin vorhanden sein müssen. Von allen 20 Aminosäuren werden nur sechs Aminosäuren aus je einem unabhängigen Stoffwechselweg eingesetzt: Glycin, Leucin, Histidin, Aspartat, Glutamin und Tryptophan. Dieses Aminosäuregemisch führt im Gegensatz zum Einsatz von

allen Aminosäuren zu höheren Ausbeuten sowie zur Steigerung der Plasmidstabilität. Die Kultivierung im stöchiometrischen Medium weist eine Korrelation zwischen dem Wachstum und dem Verbrauch an Histidin, Glutamin, Glycin und Aspartat auf.

In Anlehnung an das stöchiometrische Medium nach Wang *et al.* (2001) liefern Danquah & Forde (2007) ein Plasmid-DNA-Medium (PDM), welches die stöchiometrischen Berechnungen berücksichtigt und die ökonomisch optimierte Variante des Minimalmediums darstellt. Die Aminosäuren werden durch entsprechende Mengen Trypton und Hefeextrakt ersetzt. Das Medium liefert 4-fach höhere Ausbeuten als LB-Medium.

Martins *et al.* (2015) vergleicht den Gebrauch von Glucose und Glycerin zur Steigerung der pDNA-Ausbeute, während Lopes *et al.* (2014), sogar Kombinationen von Glucose und Glycerin einsetzt. Während Glucose zu einer hohen Produktivität führt, hat Glycerin einen positiven Effekt auf die Ausbeute. Die hohe Produktivität von Glucose bezieht sich auf schnelles Wachstum und dem damit verbundenen zellinternen Plasmid-Gehalt. Glucose kann ebenfalls einen negativen Effekt ausüben, wenn die Wachstumsrate so hoch wird, dass die Replikation nicht hinterherkommt.

In den bisher durchgeführten Optimierungsansätzen wird hauptsächlich der Stamm DH5 α eingesetzt, kaum werden Stämme untereinander verglichen. Auch wird nicht näher auf das Plasmid eingegangen, da ein ähnliches Verhalten erwartet wird. Dennoch ist anzumerken, dass für Plasmide beispielweise größenabhängige Effekte auftreten. Dazu gehört vor allem, dass große *high copy* Plasmide eine größere metabolische Last auf den Stamm bewirken und somit schneller die stationäre Phase und damit viel geringere Zelldichten erreichen. Zusätzlich neigen Stämme mit großen Plasmiden zum Verlust des Plasmids und niedrigeren Kopienzahlen (Smith & Bidochka, 1998; Cheah *et al.*, 1987).

Aufgrund der vielen Erkenntnisse und Ansatzpunkte für die systematische Veränderung von Medien ist das übliche Prinzip *trial and error* zu ineffektiv, daher findet die statistische Versuchsplanung hier Anwendung. Sie wird im nächsten Abschnitt detailliert beschrieben.

2.3 Design of Experiments

Derzeit ist *Design of Experiments* (kurz: *DoE*) die am weitesten verbreitete statistische Technik zur Optimierung von Bioprozessen. Besonders über den erfolgreichen Einsatz zur Medienoptimierung wird berichtet (Zheng *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015; Nikerel, 2006; Mandenius, 2008; O'Mahony, 2007).

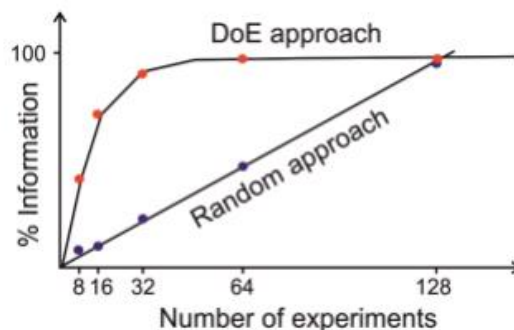


Abb. 2: Maximierung der Information mit gleichzeitiger Minimierung der Experimente durch Anwendung von Design of Experiments (modifiziert: GE Healthcare).

Die Abbildung zeigt, dass unter Einsatz von *DoE* der Informationsgehalt trotz weniger Experimente stärker steigt als unter Einsatz von nicht systematisch geplanten Experimenten.

Wie in Abb. 2 zu sehen ist, wird unter Einsatz von Design of Experiments die Anzahl der Experimente minimiert während der Informationsgehalt maximiert wird.

Auf der Grundlage eines Designs wird eine Versuchsdurchführung geplant und umgesetzt. Die Auswertung erfolgt durch verschiedene mathematische Modelle (Eriksson, 2008).

Das Design wird abhängig von den zu variierenden Parametern geplant und bestimmt das Ziel der Experimente (z.B. Screening oder Optimierung) sowie deren Anzahl. Das Vorgehen ist in drei Schritte unterteilt: Screening, Optimierung und Robustheitstest. Im Screening wird bei einer hohen Anzahl an Faktoren das Systemverhalten untersucht. Signifikante Einflussfaktoren sowie deren Einstellweite werden identifiziert. Basierend auf diesen Ergebnissen wird die Optimierung geplant. Die Optimierung liefert die optimalen Faktorbedingungen unter Einhaltung der vorher festgelegten Qualitätskriterien. Zum Abschluss eines DoE-Optimierungsverfahrens wird der Robustheitstest durchgeführt. Dieser liefert Aussagen bezüglich der Verlässlichkeit des Modells (Erikson *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wird eine Optimierung basierend auf den Versuchen von Wang *et al.* (2001) mit fünf Faktoren durchgeführt. Daher wird das Screening ausgelassen und bei der Optimierung eingesetzt. Zur Durchführung wird ein drei-Stufen Rechtschaffner Design verwendet. Dabei handelt es sich um ein gesättigtes Design, welches sowohl zum Screening als auch zur Optimierung ab fünf Faktoren eingesetzt wird. Die fünf Faktoren werden normiert, sodass sie jeweils einen Eckpunkt und drei axiale Punkte eines 5-dimensionalen Würfels belegen. Die benötigte Anzahl der Experimente (N) für das drei-Level Rechtschaffner Design mit k Faktoren ergibt sich aus:

$$N = 1 + k + k + k \frac{(k-1)}{2}. \quad (2.1)$$

Zusätzlich werden drei *Center Point (CP)* Experimente durchgeführt. Sie dienen der Analyse von nicht linearen Beziehungen der Faktoren und der Reproduzierbarkeit. Für fünf Faktoren ergeben sich damit 24 Experimente. Ziel des Designs ist es, alle 2-Faktor Interaktionen vorherzusagen oder zu berechnen und die nicht-signifikanten Größen zu eliminieren.

Im Gegensatz zu klassischen Designs werden, wie in Tab. 2 gezeigt, weniger Experimente benötigt.

Tab. 2: Vergleich verschiedener Designs mit der Anzahl der durchzuführenden Experimente abhängig von der Anzahl der Faktoren (vgl. Eriksson, 2008).

Anzahl Faktoren	Central Composite Designs	Drei-Level Vollfaktorielles Design	Rechtschaffner Design	Box-Behnken Design
2	11	12	/	/
3	17	30	13	15
4	27	84	18	27
5	29	146	24	43
6	47	732	31	51

Diese Arbeit setzt das Rechtschaffner Design mit fünf Faktoren ein, da dieses sich gut für die Anzahl der Wells in der Mikrotiterplatte eignet. Auf den Einsatz von Mikrotiterplatten zur Optimierung von Medien wird im Abschnitt 2.4 eingegangen. Zunächst wird die Auswertung mit der MODDE® Software beschrieben.

2.3.1 DoE-Datenanalyse mit MODDE®

Das Programm MODDE® (Version 10.1) der Fa. Umetrics, SE übernimmt die statistische Datenanalyse sowie die Modellbildung. Abb. 3 zeigt, welche Aussagen mit MODDE® getroffen werden können. Die Software zeigt welche Faktoren die Zielgröße beeinflussen und dient dazu die besten Faktoreinstellungen zu ermitteln.

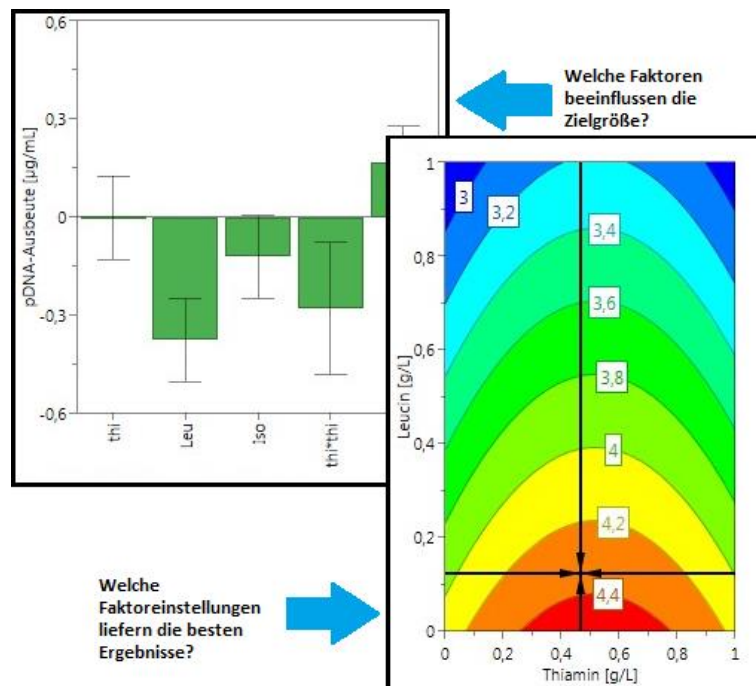


Abb. 3: MODDE®, Software zur modellgestützten Versuchsplanung und Optimierung von Prozessen. Die Abbildung zeigt, welche Faktoren die Zielgröße beeinflussen (*Coefficients*) und welche Faktoreinstellungen die besten Ergebnisse liefern (*Response Surface Plot*).

Die Rohdaten werden an ein Regressionsmodell angepasst, wobei zwischen zwei Verfahren der multivariaten Datenanalyse gewählt werden kann, der *Multiple linear regression (MLR)* und der *Partial least squares (PLS)*. In dieser Arbeit wurde ausschließlich MLR verwendet. MLR ist ein nützliches Instrument zur Bestimmung der Art und Stärke der Zusammenhänge zwischen Faktoren (Eriksson, 2008). Nach Anpassung der Rohdaten können lineare, interaktive und quadratische Modelle gebildet werden, die die mathematischen Zusammenhänge beschreiben.

Eine sichere und aussagekräftige Analyse kann nur erfolgen, wenn die Daten repräsentativ sind. Die Beurteilung des Modells erfolgt anhand von vier Kenngrößen. Deren Erstellung geschieht auf der Grundlage einer Varianzanalyse und ist im *Summary of Fit-Plot* dargestellt. Dieser Plot dient der Auswertung und Bewertung. Abb. 4 zeigt links ein schlecht angepasstes Modell, während auf der rechten Seite ein sehr gutes Modell gezeigt wird.

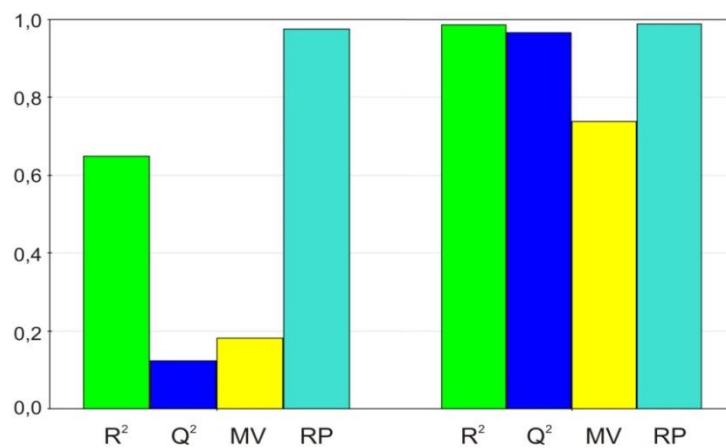


Abb. 4: Beispiele für *Summary of Fit-Plots*.

Links ist ein negatives Beispiel zu sehen, rechts ein positives Beispiel. Die Werte für Q^2 und MV liegen unter den Richtwerten von $Q^2 > 0,5$ und $MV > 0,25$. Damit eignet sich das linke Modell nicht für die Voraussagung zukünftiger Experimente und eignet sich ebenfalls nicht gut um die Rohdaten zu beschreiben.

In Tab. 3 sind die Kenngrößen mit ihrem Mindest- oder Richtwert aufgeführt, der in einer erfolgreichen Modellbildung erreicht werden sollte (Eriksson, 2008).

Tab. 3: Bezeichnung und Richtwerte der Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung.

Kenngröße	Bezeichnung	Anforderung
R^2	Güte der Anpassung an die Rohdaten	> 0,50
Q^2	Güte der Voraussagung zukünftiger Experimente	> 0,50
$R^2 - Q^2$	Differenz zwischen R^2 und Q^2	< 0,30
MV	Modellvalidität – Eignung des Modells zur Beschreibung der Rohdaten	> 0,25
RP	Reproduzierbarkeit aus den Center Points	> 0,50

R^2 gibt an, wie gut die Rohdaten an das Regressionsmodell angepasst sind. Ein Wert von 1 spricht für ein perfektes Modell, ein Wert von 0 für ein nicht angepasstes Modell. Ab einem Wert von 0,5 handelt es sich um ein gutes Modell. Q^2 spiegelt die Voraussagbarkeit eines Wertes wider. Das Modell ist gut, wenn der Wert größer als 0,5 ist, ein sehr gutes Modell, wenn der Wert 0,9 überschreitet. Die Differenz zwischen R^2 und Q^2 gibt die Modelleignung an und sollte einen Wert, der kleiner als 0,3 ist annehmen. MV gibt an, in wieweit das gewählte Modell Gültigkeit für die Rohdaten besitzt. Der Wert sollte höher als 0,25 sein. Die Modellvalidität spielt bei der Beurteilung eines Modells gegenüber der Reproduzierbarkeit eine untergeordnete Rolle. RP beschreibt die Wiederholbarkeit der Versuchsdurchführung und wird anhand der Varianz identischer Experimente, der *Center Points*, berechnet. Durch die Eliminierung nicht signifikanter Faktoren lässt sich die Eignung des Modells verbessern, was im *Summary of Fit-Plot* zu sehen ist (Eriksson, 2008).

Optimizer-Tool

MODDE® enthält den sogenannten *Optimizer*. Dieser ermöglicht die Optimierung der Zielgröße oder der Zielgrößen unter Angabe der spezifischen Konditionen. Zunächst müssen die Faktoren gesetzt oder ein Bereich angegeben werden. Faktoren, die nicht im Modell enthalten sind werden ausgegraut. Bei der Optimierung der Zielgrößen kann zwischen Maximierung, Minimierung, Anstreben eines Wertes oder Ausschluss gewählt werden. Das Tool eignet sich besonders gut, um die Schnittmenge von mehreren Zielgrößen zu finden und somit optimale Faktoreinstellungen zu bestimmen. Basierend auf den vorgegebenen Bedingungen verwendet der *Optimizer* das geltende Modell und die durchgeführten Experimente zur Berechnung von acht Startpunkten für je ein Optimierungsverfahren. Die Ergebnisse für die besten Optimierungen werden angezeigt (Eriksson, 2008).

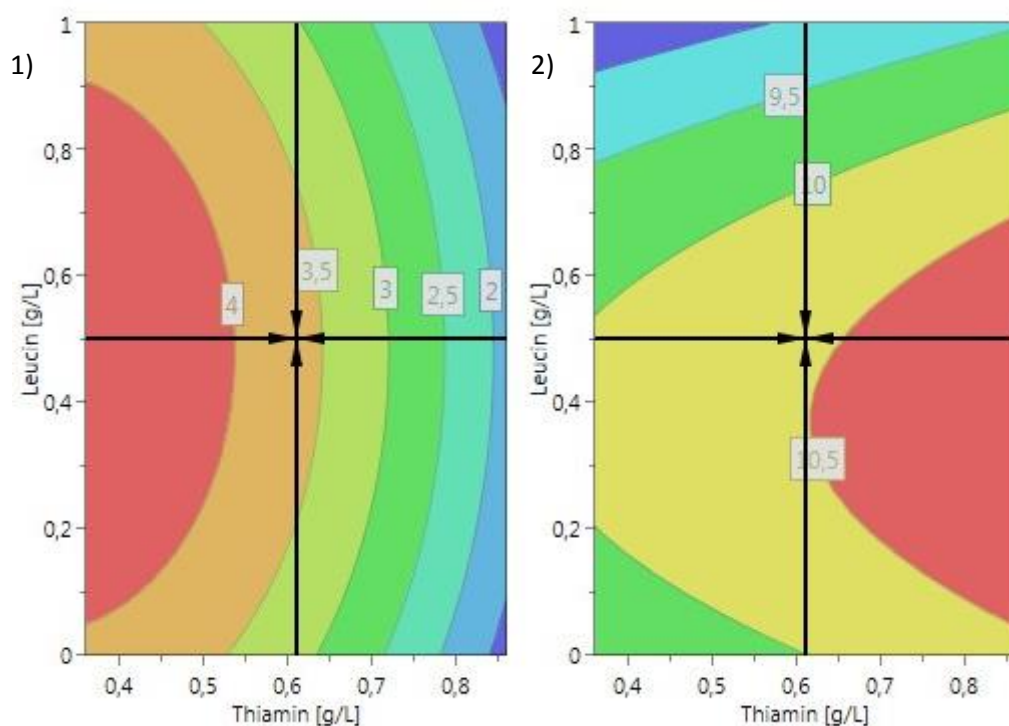


Abb. 5: Beispiel für das Ergebnis einer Optimierung von zwei Zielgrößen mit dem *Optimizer*-Tool von MODDE®.

In der Abbildung ist die Optimierung eines Mediums mit den Faktoren Leucin und Thiamin gezeigt. Die Zielgrößen 1) und 2) sollen maximiert werden. Das schwarze Kreuz kennzeichnet die Schnittmenge, für die die maximalen Ergebnisse beider Zielgrößen erreicht werden.

2.4 Mikrofermentation und *Scale-Up*

Die systematische Veränderung von Bioprozessen führt zu einer Vielzahl an Experimenten. Daher spielen Mikrotiterplatten (MTP) eine wichtige Rolle im Einsatz für Hochdurchsatz-Screenings im kleinen Maßstab. Sie werden beispielsweise als Mikrobioreaktoren mit bis zu 96-Wellen eingesetzt und bringen damit einen geringeren Aufwand und geringere Kosten mit sich. Anschließend wird der Prozess im Schüttelkolben durchgeführt, um ihn schließlich im *Small*- und dann im *Large-Scale* durchzuführen (vgl. Abb. 6).

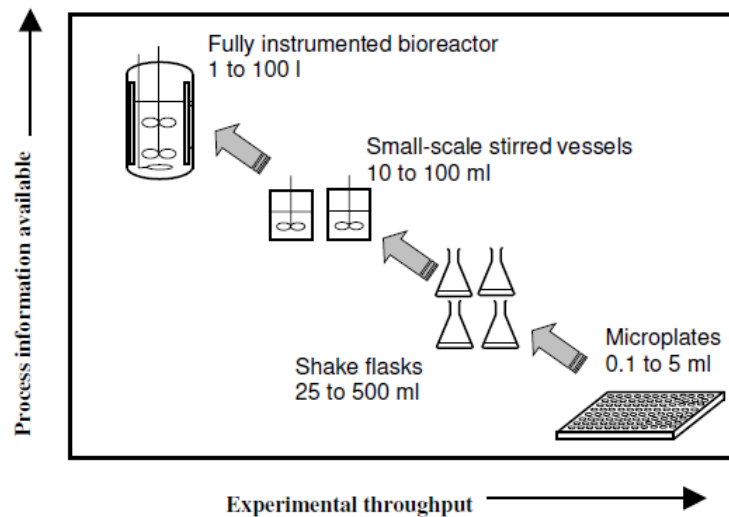


Abb. 6: Informationsgehalt während der experimentellen Entwicklung eines Bioprozesses (Betts & Baganz, 2006).

Die Abbildung zeigt die Entwicklung eines Bioprozesses. Zu Beginn werden viele Experimente im kleinen Maßstab durchgeführt, um möglichst viele Informationen zu sammeln. Steigt die Information, wird der Prozess in einen größeren Maßstab übertragen. Sind alle Informationen für die Durchführung vorhanden, wird der Bioprozess in den Produktionsmaßstab übertragen.

Um die erfolgreiche Übertragung in einen größeren Maßstab durchzuführen, muss die Fermentation in der MTP identisch zu der Fermentation im Fermenter verlaufen. Dazu muss die Skalierbarkeit für das System untersucht werden. Verschiedene Versuche haben beispielsweise die technische Größe Sauerstofftransfer rate (OTR) charakterisiert (Kensy *et al.*, 2009). Die OTR verhält sich proportional zur Schüttelfrequenz sowie zur Schüttelamplitude (Duetz *et al.*, 2000) und umgekehrt abhängig zur Füllhöhe, vor allem bei hohen Schüttelfrequenzen (Hermann *et al.*, 2003). Die Schüttelfrequenz wird durch das Überlaufen der flüssigen Phase begrenzt (Kensy *et al.*, 2005).

Duetz *et al.* (2000) vergleichen Sauerstofftransfer rates in MTP und im Schüttelkolben und beschreiben ähnliche Eigenschaften für die Systeme. Fermentationen im MTP Maßstab liefern OTR-Werte von $10,9 \text{ mmol}^{-1}\text{h}^{-1}$ bei 375 rpm, 25 mm Schüttelhub und einem Füllvolumen von 42 %. Schüttelkolben mit knapp 20 % Füllvolumen liefern bei 200 rpm OTR-Werte von 2 bis $8 \text{ mmol}^{-1}\text{h}^{-1}$ bei 50 mm Schüttelhub (Maier *et al.*, 2004).

Die pDNA-Ausbeute und das Wachstum werden bei Kulturen im kleinen Maßstab nicht durch das Inokulum beeinflusst, solange der Wert für die optische Dichte bei 600 nm über 0,01 liegt (Grunzel *et al.*, 2014).

Die Entwicklung von pDNA-Prozessen wird im Labor-Maßstab (MTP, Schüttelkolben) durchgeführt und bietet die Grundlage für Aussagen über Ausbeuten im Fermenter.

2.5 Messtechnik und Analytik

2.5.1 Bestimmung des Zellwachstums

Bei der Messung der Optischen Dichte (OD) handelt es sich um eine indirekte Methode zur Bestimmung des Zellgehalts in Flüssigkulturen. Die photometrische Messung wird bei 600 nm (OD_{600}) durchgeführt, da die Absorption des Mediums bei 600 nm minimal ist. Dadurch, dass Zellen einen anderen Brechungsindex als das Medium aufweisen, verursachen sie eine Trübung bzw. OD. Die Intensität des eingestrahnten Lichts wird durch die Streuung geschwächt. Dies bezeichnet man als Extinktion.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz besagt, dass die Extinktion E ,

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d, \quad (2.2)$$

aus dem Logarithmus der Ausgangsintensität I_0 zu der gemessenen Intensität I gebildet wird. Neben der Stoffmengenkonzentration c und dem Extinktionskoeffizienten ε_λ , ist die Extinktion abhängig von der Schichtdicke des durchstrahlten Körpers d .

Eine Proportionalität zwischen Trübung und Zellmasse besteht im Bereich von 0,3 bis 0,6, sodass bei höheren Werten mit Medium verdünnt werden muss. Die Methode eignet sich für homogene Suspensionen und ist abhängig von Größe und Form der Zellen (Steinbüchel *et al.*, 2012).

Der OD_{600} -Wert für die Zellsuspension,

$$OD_{600,Suspension} = V \cdot (OD_{600,gemessen} - OD_{600,Blank}) \quad (2.3)$$

ergibt sich aus der Differenz von Probe und Blank, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor V . Der OD-Wert aufgetragen gegen die Zeit liefert die Wachstumskinetik einer Kultivierung.

Neben der optischen Dichte kann die Biotrockenmasse (BTM) als Bewertungsgröße für das Wachstum herangezogen werden.

2.5.2 Bestimmung der pDNA-Ausbeute und –Qualität mittels Anionentauscher-HPLC

Im Zuge der Entwicklung von DNA Vakzinen und deren Herstellung spielen analytische Methoden eine wichtige Rolle. Dank verschiedener Techniken wie Agarose-Gelelektrophorese, UV-Messung und verschiedene Chromatographien kann besonders während der Entwicklung die Konzentration und Qualität der pDNA bestimmt werden.

Zu den gängigen Methoden zählen chemische und enzymatische Untersuchungen, Elektrophorese, spektroskopische Methoden, Mikroskopie und Chromatographie. Besonders im Zusammenhang mit der pDNA-Herstellung eignen sich schnelle Methoden, die in der Lage sind die verschiedenen Formen der pDNA zu trennen und zu quantifizieren. Damit entspricht die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) genau den Ansprüchen der pDNA-Analytik und ist daneben fast in jedem Labor für Prozessentwicklung vorhanden (Prazeres, 2011).

Die Anionentauscher-HPLC ist eine gängige Methode der Flüssigkeitschromatographie zur pDNA-Analytik. Die Auftrennung der Plasmid Moleküle beruht auf der Interaktion zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA Gerüsts und positiv geladenen Gruppen der stationären Phase. Die Proben werden unter Niedrigsalzbedingungen auf die Säule gegeben und die negativen Phosphatgruppen der pDNA treten in Wechselwirkung mit der stationären Phase. Mit steigender Salzkonzentration eluieren die pDNA Moleküle der Länge ihrer geladenen Phosphatgruppen nach (Smith *et al.*, 2007). Teilweise sind Salzkonzentrationen (z.B. NaCl) von bis zu 1 M nötig, um die pDNA zu eluieren. Abb. 7 zeigt ein Beispiel-Chromatogramm für die Anionentauscher-HPLC einer pDNA-

Probe. Die Probe wurde aus *E. coli* isoliert und bei einer Salzkonzentration von 0,5 M NaCl geladen. Die ccc-Form und die Isoformen der pDNA eluieren in zwei Peaks bei steigendem Salzgradienten. Verunreinigungen, wie z.B. mit RNase behandelte RNA eluieren aufgrund geringerer Molekülgröße bei geringeren Salzkonzentrationen (Prazeres, 2011).

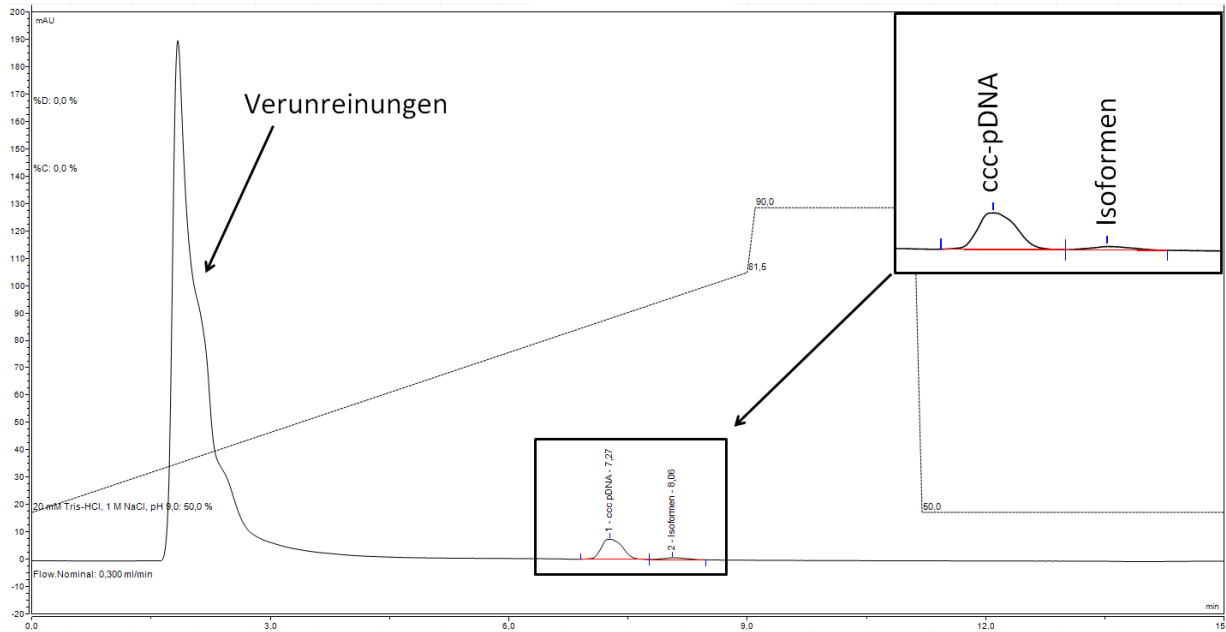


Abb. 7: Beispiel-Chromatogramm für die Anionentauscher-HPLC Analytik einer pDNA-Probe. Die Abbildung zeigt pDNA (P1, 7,6 kb) isoliert aus *E. coli* Zellen, die unter Hochsalzbedingung (0,5 M NaCl) geladen wurde. Die ccc-Form der pDNA und die Isoformen eluieren in zwei Peaks unter steigendem Salzgradienten (bis zu 0,9 M NaCl). Vorher eluieren die Verunreinigungen.

3 Material und Methoden

Nachdem in Kapitel 2 die theoretischen Grundlagen und Hintergründe der Arbeit dargelegt wurden, werden in diesem Kapitel die Materialien und Methoden für die Fermentationen (3.1, 3.2, 3.3), die Anwendung von Design of Experiments (3.4), der *Scale-up* (3.5) sowie die Analytik (3.6) erläutert.

In Abb. 8 ist der Versuchsablauf in Teilschritten dargestellt: Transformation und Zellbankablage, Mikrotiterplatten-Fermentationen und *Scale-up*. Zunächst wurde das Plasmid in den Stamm der Wahl transformiert und eine Zellbank abgelegt. Auf eine Vorkultivierung im Schüttelkolben folgt immer eine Hauptfermentation im 24-Well Format oder im Schüttelkolben (*Scale-up*). Die Analytik wird anhand der drei Methoden OD-Messung, Biotrockenmassebestimmung und Anionentauscher-HPLC durchgeführt. Die Biotrockenmasse wird nur für Proben des *Scale-up* bestimmt, da die MTP zu geringe Volumina beinhalten. Die OD-Messung wird am Ende jeder Vorkultur und über die gesamte MTP-Fermentation durchgeführt. Da pDNA in der Zelle vorliegt, wird zunächst eine alkalische Lyse durchgeführt. Anschließend folgt die pDNA-Analytik mittels Anionentauscher-HPLC.

Die Versuche werden mit V-Nummern bezeichnet und sind in Kapitel 4 aufgeführt.

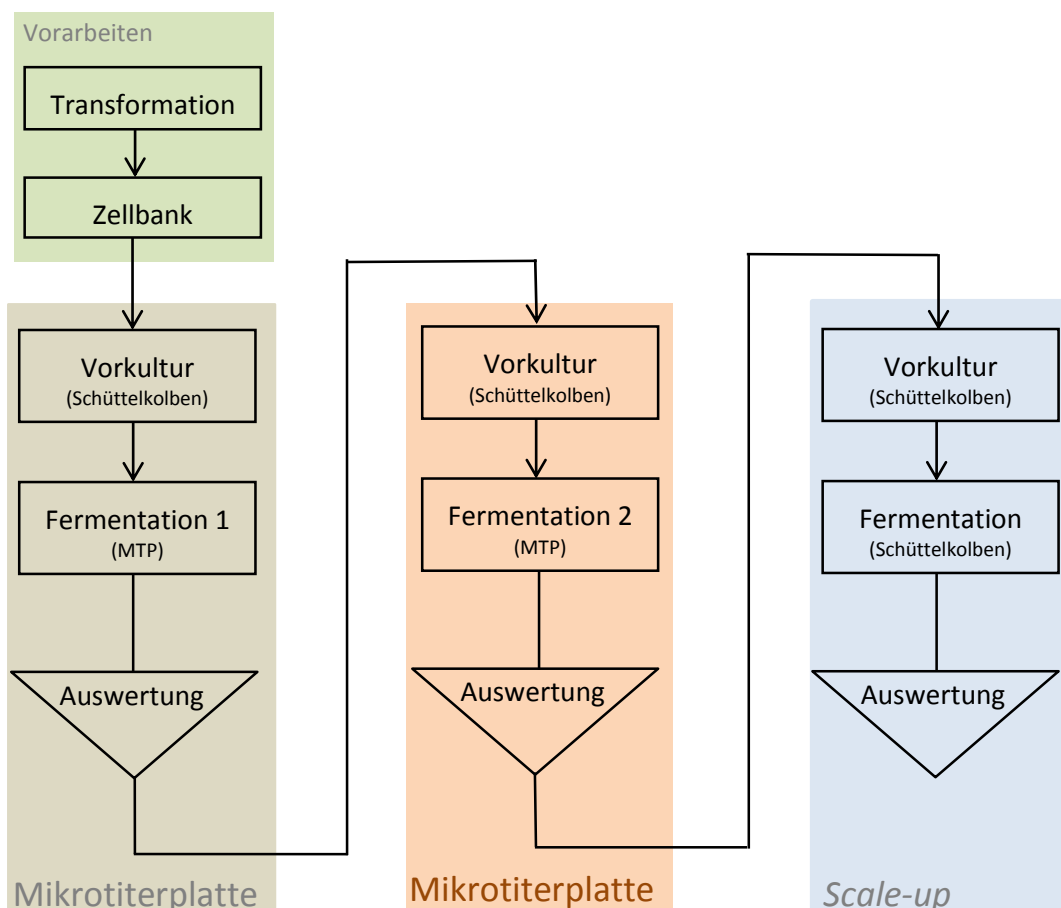


Abb. 8: Ablauf der Versuche unterteilt in Vorarbeiten, Versuche in der Mikrotiterplatte und *Scale-up*. Die Abbildung zeigt den Versuchsablauf dieser Arbeit. Zunächst werden die Vorarbeiten durchgeführt. Sie beinhalten die Transformation und Zellbankablage. Anschließend werden die zwei Optimierungen in der Mikrotiterplatte durchgeführt. Zuletzt folgt der *Scale-up* in den Schüttelkolben.

3.1 Plasmide und Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme und Plasmide mit Genotypen bzw. Charakteristika werden in Tab. 4 und Tab. 5 gezeigt. Die Plasmide tragen die Synonyme P1 und P2, wobei P für Plasmid steht. Plasmid 1 trägt die gängigen Komponenten eines DNA Therapeutikums: Replikationsursprung (ori), Promoter (p), Resistenzgen (R), polyA-Schwanz (poly-A) sowie das *gene of interest*. Im Gegensatz dazu trägt Plasmid 2 zwei Promotoren und zwei *genes of interest*. Die eingesetzten Stämme DH5 α , DH10B und Stbl3 weisen verschiedene Auxotrophien auf, die im Zuge der Optimierung berücksichtigt werden. Des Weiteren tragen die Stämme Gene, die für die Plasmid-Produktion relevant sind (vgl. Tab. 1, S.2).

P1 und P2 wurden in je drei Stämme durch Hitzeschock transformiert. Der Transformations-Ansatz wurde auf selektiven Agarplatten (PDM-Medium, vgl. Tab. 6) mit 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin ausplattiert und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert (Brutschrank *Thermo Scientific™*, Typ *Heratherm*). Zwei positive Klone wurden gepickt und in sterilen 3 mL-Röhrchen (Sarstedt, 62.515.006) für 15,5 Stunden (37 °C; 220 rpm) im Schüttelinkubator *Infors HT* (Typ Multitron Pro) kultiviert. Nach Auswahl des besten Klons anhand einer Plasmid Präparation (Qiagen, 27106), wurde dieser in einer 20 mL-Schüttelkultur (37 °C; 200 rpm) bis zur exponentiellen Phase kultiviert und als *Research Cell Bank* (RCB) mit 10 % (v/v) Glycerin abgelegt. Die Zellbank wurde bei -80 °C gelagert.

Tab. 4: Verwendete Plasmide mit wichtigen Charakteristika.

Plasmid	Charakteristika	Hersteller
P1	colE1ori, pCMV, kanR, polyA, gene of interest, 7,4 kb	Externe Unternehmen
P2	pUCori (colE1-Typ), pCMV (Cytomegalovirus), pEF1 α , kanR, polyA, 2 <i>genes of interest</i> , 8,7 kb	

Tab. 5: Verwendete Stämme mit Genotyp.

Auxotrophien und relevante Merkmale für die pDNA-Produktion sind gekennzeichnet.

Stamm	Genotyp	Hersteller
Library Efficiency DH5α™ Chemically competent Cells	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <u>recA1</u> <u>endA1</u> <u>hsdR17</u> (rK-, mK+) <u>phoA</u> <u>supE44</u> λ - <u>thi-1</u> <u>gyrA96</u> <u>relA1</u>	Invitrogen™ (18263-012)
DH10-Beta Competent <i>E. coli</i>	F- <u>mcrA</u> Δ (<u>mrr</u> - <u>hsdRMS</u> - <u>mcrBC</u>) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 <u>recA1</u> <u>endA1</u> <u>araD139</u> Δ (<u>ara</u> <u>leu</u>) 7697 <u>galU</u> <u>galK</u> <u>rpsL</u> <u>nupG</u> λ - <u>relA1</u> <u>spoT1</u>	McLab (DH10-10)
One Shot Stbl3™ Chemically competent Cells	F- <u>mcrB</u> <u>mrr</u> <u>hsdS20</u> (rB-, mB-) <u>recA13</u> <u>supE44</u> <u>ara-14</u> <u>galK2</u> <u>lacY1</u> <u>proA2</u> <u>rpsL20</u> (StrR) <u>xyl-5</u> λ - <u>leu</u> <u>mtl-1</u>	Invitrogen™ (C7373-03)

3.2 Vorkultivierung

In der Vorkultur wurde Startmaterial für die Experimente in den Mikrotiterplatten generiert. Die Vorkultivierung wurde in PDM durchgeführt (Danquah & Forde, 2007). Trypton wurde durch Pepton ersetzt, da Richter-Helm BioLogics (RHB) keine Rohstoffe tierischen Ursprungs einsetzt. Der Einsatz von Pepton verspricht aber genauso hohe pDNA-Ausbeuten (vgl. Wang *et al.*, 2015).

Die Vorkulturen wurden in 100 mL Schüttelkolben mit einem Füllvolumen von 20 mL durchgeführt. Die Dauer der Vorkulturen (VK) betrug 15,5 Stunden mit OD₆₀₀-Werten abhängig von der Plasmid Stamm-Kombination, zwischen 6,9 – 11,4.

Mit dem Material der Vorkulturen wurden die MTPs angeimpft (3.3.2). Dabei wurde eine festgelegte Menge eingesetzt. Durch den hohen Durchsatz an Experimenten, wurde eine einheitliche Start-Zelldichte nicht umgesetzt. Daher wurde die Bewertung des Wachstums in Relation zur Start-Zelldichte gesetzt und garantierte somit eine einheitliche Betrachtung der Stamm Plasmid-Kombinationen.

In Tab. 6 und Tab. 7 sind die Zusammensetzung des Mediums und die Parameter und Sollwerte für die Vorkultivierung aufgeführt.

Tab. 6: Zusammensetzung des PDM-Mediums für die Vorkultivierung.

Substanz	Hersteller (Art. Nr.)	Menge pro 1 L [g]
Glucose · H ₂ O	Merck (1.08346)	11
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Merck (1.37036)	8,5
KH ₂ PO ₄	Merck (1.04871)	3,0
NH ₄ Cl	Merck (1.01145)	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck (1.05882)	0,492
Hefeextrakt	BD BioSciences (212720)	4,41
Sojapepton	BD BioSciences (211906)	7,93
Kanamycin	AppliChem (A4789.0010)	0,05

Lösemittel: VE-Wasser; pH = 7,0 ± 0,2. Sterilisation bei 121 °C für 20 Minuten bzw. Sterilfiltration durch Bottle-Top Filter.

Tab. 7: Parameter und Sollwerte für die Vorkultivierung.

Parameter	Sollwert
Temperatur	37 °C
Drehzahl	200 rpm
Schüttelhub	25 mm
Füllvolumen	20 mL

Tab. 8 fasst die Geräte zusammen, die zur Vorbereitung und Durchführung der Vorkultivierung nötig waren.

Tab. 8: Geräte zum Ansetzen von Medien und Durchführung von Vorkulturen.

Geräte etc.	Hersteller (Typ)	Verwendung
Analysenwaage	Mettler Toledo (XSE 205 Dual Range)	Einwaage der Medienkomponenten
Autoklav	Systec (VX-150 u. 2540 EL)	Sterilisation des Mediums und Materials
Rührer	Heidolph (MR 3000 u. 3001)	Vermischen der Medienkomponenten
pH-Meter	Mettler Toledo (Seven Excellence)	pH-Wert einstellen
Sicherheitswerkbank	Heraeus (HeraSafe HSP12)	Steriles Arbeiten
Vakuumpumpe	KNF Neuberger (Laboport®)	Sterilfiltration von Medienteilen
Schüttelinkubator	Infors HT (Multitron Pro)	Inkubation der Vorkultur
100 mL Schikanekolben	Duran (1267659, Glas)	Gefäß für Vorkultur

3.3 Mikrotiterplatten-Fermentation

Im Anschluss an die Vorkultur wurden verschiedene Fermentationen in Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt. Die Planung erfolgte auf Grundlage von *DoE* (3.4). In diesem Abschnitt wird ausschließlich die Handhabung der MTP beschrieben. Folgende Punkte werden behandelt: Vorbereitungen (3.3.1), Start der Fermentation (3.3.2), Fermentation (3.3.3), Ende und Nachbereitung der Fermentation (3.3.4 und 3.3.5).

Alle MTP-Fermentationen sind Batch-Fermentationen, die im *System Duetz* durchgeführt werden. Das Plattensystem ist in Abb. 9 dargestellt und besteht aus einer 24-Well Mikrotiterplatte mit Pyramidenböden und einem Verbunddeckel. Dieser Verbunddeckel dichtet die Platte mit einer Silikoneinlage steril ab, gewährleistet dennoch gleichzeitig eine Sauerstoffversorgung durch die Belüftungslöcher. Platte und Deckel können mit der Einspannvorrichtung *Universal Cover Clamps* im Schüttelinkubator fixiert werden. Der Sauerstoffeintrag ist abhängig vom Kulturvolumen, dem Schüttelhub und der Schüttelart (Duetz *et al.*, 2000). Im Hinblick auf den *Scale-up* wurde der Hub für alle Experimente auf 25 mm bei einem Füllvolumen von 20 bis 30 % eingestellt. Um ein guten Sauerstoffeintrag zu gewährleisten wurde für die Drehzahl die maximale Einstellung von 400 rpm gewählt.

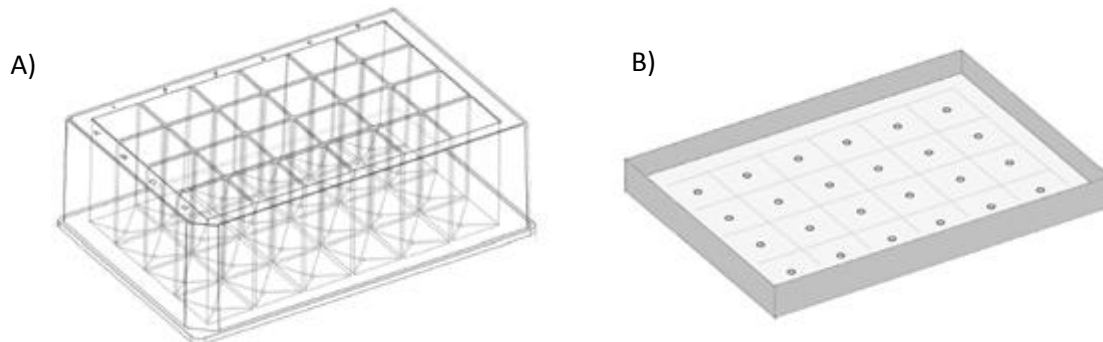


Abb. 9: A) 24-Well Mikrotiterplatte mit Pyramidenböden nach Duetz; B) Schema des Verbunddeckels (Franzgrote, 2014).

In der Abbildung ist das Plattensystem nach *Duetz* zu sehen. A) zeigt die 24-Well Mikrotiterplatte mit Pyramidenböden, in der die Fermentation durchgeführt wird und B) den Verbunddeckel mit der nach oben zeigenden Silikoneinlage zur sterilen Abdichtung sowie den Belüftungslöchern.

Für nähere Informationen zu dem Plattensystem nach *Duetz* wird auf die Arbeit von Lukas Franzgrote (2014) verwiesen.

Alle MTP-Fermentationen wurden unter den in Tab. 9 genannten Bedingungen durchgeführt.

Tab. 9: Parameter und Sollwerte für die Mikrotiterplatten-Fermentation im Schüttelinkubator der Fa. Infors HAT (Typ *Multitron Pro*).

Parameter	Sollwert
Temperatur	37 °C
Drehzahl	400 rpm
Schüttelhub	25 mm
Füllvolumen	3 mL (entspricht 27% des Gesamtvolumens von 11 mL)
Fermentationsdauer	ca. 8 h

In Tab. 10 werden die verwendeten Geräte und Materialien zur Durchführung für die Mikrotiterplatten-Fermentation aufgeführt.

Tab. 10: Verwendete Geräte und Materialien zur Durchführung der MTP-Fermentationen.

Geräte etc.	Hersteller (Typ)	Eigenschaften	Verwendung
24-deepwell Microplates (MTP)	EnzyScreen (CR1424a)	11 mL, 40x17x17 mm, Polypropylen	MTP-Fermentation
24-deepwell Sandwich Cover	EnzyScreen (CR1224b)	2,5x5,0 mm Belüftungslöcher	Sterile Abdichtung der MTP
Einkanalpipetten	Eppendorf (613-3633; 613-3637; 613-3641)	20 – 1000 µL	Befüllen der MTP
Elektrische Mehrkanalpipette	Rainin (E3-8-1200R)	8 Kanäle 100 – 1200 µL	Befüllen der MTP
Reagenzbehälter	A. Hartenstein (RE60)	60 mL, autoklavierbar	Vorlage für Mehrkanalpipette
Schüttelinkubator	Infors HAT (Multitron Pro)	20 - 400 rpm; Schüttelhub 25 mm	Fermentation
Universal Cover Clamps	EnzyScreen (CR1800)	-	Einspannvorrichtung im Schüttelinkubator
Trockenschrank	Memmert (210133)	-	Trocknung der autoklavierten Materialien
Sicherheitswerkbank	Heraeus (HeraSafe HSP12)	-	Steriles Arbeiten

3.3.1 Vorbereitungen

Für die Fermentation in der Mikrotiterplatte musste zuerst sichergestellt werden, dass die saubere 24-Well-Platte mit dem Verbunddeckel autoklaviert und getrocknet wurde. Zusätzlich mussten die Reagenzbehälter sowie Pipettenspitzen steril und trocken vorliegen. Am Vortag des Experiments wurde die Platte mit Medium befüllt, sodass über Nacht ein Sterillauf parallel zur Vorkultur laufen konnte. Auf die Planung der Experimente und Medienzusammensetzungen wird im Kapitel 4 eingegangen. In Abb. 10 sind exemplarisch zwei Plattenschemata dargestellt. Jede Platte bietet Platz für 24 Experimente, welche mit einer N-Nummer durchnummeriert werden. Da die Durchführung auf *DoE* basiert, wurden die Experimente zufällig festgelegt und ergaben ein Plattenschema wie in Abb. 10 rechts zu sehen ist. Jedes Well beinhaltet 3 mL Medium mit unterschiedlicher Zusammensetzung, sodass zunächst das Grundmedium vorgelegt und durch Stocklösungen auf 3 mL ergänzt wurde.

	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
A	N1	N2	N3	N4	N5	N6	A	N5	N6	N11	N19	N13	N21
B	N7	N8	N9	N10	N11	N12	B	N24	N15	N23	N3	N16	N1
C	N13	N14	N15	N16	N17	N18	C	N17	N10	N12	N4	N2	N9
D	N19	N20	N21	N22	N23	N24	D	N18	N14	N22	N8	N7	N20

Abb. 10: Plattenschema mit Nummer (N) der Experimente.

Die Nummern der Experimente sind beispielhaft chronologisch aufgetragen (links). Für die Durchführung der Experimente mit *DoE* werden sie zufällig festgelegt, um systematische Fehler zu eliminieren (rechts).

3.3.2 Start der Fermentation

Nachdem über Nacht die Vorkultur und der Sterillauf der Platte gelaufen sind, wurde visuell begutachtet, ob die MTP steril geblieben ist. Im Laufe der Experimente konnte keine Kontamination beobachtet werden.

Unter sterilen Bedingungen wurde die MTP geöffnet und eine Nullprobe in Doppelbestimmung (200 μ L) für die OD_{600} -Messung genommen. Anschließend wurden alle Platten mit 200 μ L VK inokuliert.

3.3.3 Fermentation

Die Platte wurde unter sterilen Bedingungen mit dem Verbunddeckel geschlossen und mit der Einspannvorrichtung im Schüttelinkubator fixiert. Bei der Fixierung musste darauf geachtet werden, dass der Stempel, der den Deckel auf die Platte drückt, nicht zu fest gezogen wurde. Ansonsten kann kein optimaler Sauerstoffeintrag durch die Belüftungslöcher gewährleistet werden. Die MTP-Fermentation wurde unter den in Tab. 9 genannten Bedingungen gestartet und durchgeführt. Der Wert für OD_{600} zu Beginn der Fermentation wurde theoretisch anhand der $OD_{600, VK}$ bestimmt. Das Wachstum während der Fermentation wurde durch regelmäßige OD_{600} -Messung verfolgt (vgl. 3.6.1 Probennahme und Bestimmung des Zellwachstums). Durch das geringe Füllvolumen konnten vier OD_{600} -Messungen (pro Messung 200 μ L) durchgeführt werden, damit genug Material für die pDNA-Analytik zurück blieb (mind. 2 Mal 1 mL, vgl. 3.6.2).

3.3.4 Ende der Fermentation

Nach der vorgegeben Fermentationsdauer wurde die MTP aus dem Schüttelinkubator genommen. Da die Fermentation beendet war, konnte die Analytik unsteril durchgeführt werden. Die letzte OD_{600} -Messung (OD_{EoF}) und die Probennahme für die pDNA-Analytik wurden durchgeführt.

3.3.5 Nachbereitung

Nach Beendigung der Experimente wurde die Platte mit Deckel sowie die Reagenzbehälter autoklaviert und anschließend gespült und getrocknet.

3.4 Medienoptimierung mit *Design of Experiments* im Mikrotiterplattenformat

Die Optimierungsversuche wurden mit je fünf Faktoren durchgeführt. Ein geeigneter Ansatz war das Rechtschaffner-Design, welches für die Optimierung von fünf Faktoren 24 Experimente lieferte. Diese 24 Experimente wurden zufällig auf der MTP verteilt (vgl. Abb. 10, S. 19) und durchgeführt.

Alle Versuche wurden auf Grundlage von Tab. 11 durchgeführt. Dabei wurden die normierten Faktoren für jede Optimierung durch die entsprechenden Faktoren ersetzt. -1 und 1 stehen für den minimalen sowie den maximalen Wert, den ein Faktor annehmen konnte. Der minimale Wert betrug immer 0 gL^{-1} . 0 bezeichnete die Mitte zwischen minimalem und maximalem Wert. Die Experimente des Designs wurden mit N-Nummern bezeichnet. Wie in Tab. 11 zu sehen ist, unterschieden sich die Medienzusammensetzungen (abgesehen von den *Center Points*, N22 - N24) voneinander, sodass zu dem jeweiligen Grundmedium (Tab. 14, Tab. 17) die Stocklösungen der entsprechenden Faktoren hinzu pipettiert werden mussten. Durch den Faktorbereich wurde angegeben welche Konzentrationen von welchem Faktor eingesetzt wurden.

In jedem Well wird die benötigte Menge Grundmedium vorgelegt und mit den zuvor berechneten Mengen der Stocks auf 3 mL aufgefüllt. Die Berechnung erfolgt durch einfachen Dreisatz:

$$V_{\text{Grundmedium}} = 3 \text{ mL} - \sum V_{\text{Stock}, x_{1-5}} \quad (3.1)$$

$$\text{Mit: } V_{\text{Stock}} = \frac{c_{\text{soll}} \cdot V_{\text{soll}}}{c_{\text{Stock}}} \quad (3.2)$$

Tab. 11: Experimente (N) des Rechtschaffner Designs mit 5 normierten Faktoren x_1 bis x_5 .

N	Normierte Faktoren				
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5
1	-1	-1	-1	-1	-1
2	-1	1	1	1	1
3	1	-1	1	1	1
4	1	1	-1	1	1
5	1	1	1	-1	1
6	1	1	1	1	-1
7	1	1	-1	-1	-1
8	1	-1	1	-1	-1
9	1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	1	-1	-1
12	-1	1	-1	1	-1
13	-1	1	-1	-1	1
14	-1	-1	1	1	-1
15	-1	-1	1	-1	1
16	-1	-1	-1	1	1
17	1	0	0	0	0
18	0	1	0	0	0
19	0	0	1	0	0
20	0	0	0	1	0
21	0	0	0	0	1
22	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0

Das Grundmedium wurde je nach Versuch angesetzt und autoklaviert bzw. steril filtriert. Die Stocklösungen wurden angesetzt indem die Komponente im Grundmedium gelöst wurde und anschließend steril filtriert wurde. Um eine längst mögliche Haltbarkeit der Stocklösungen zu gewährleisten wurden diese bei 4 °C und mit UV-Schutz gelagert.

Das Grundmedium wurde mit den in Tab. 8 aufgeführten Geräten und Materialien angesetzt. In Tab. 12 ist das Material zum Ansatz von Stocklösungen aufgelistet.

Tab. 12: Material zum Ansatz von Stocklösungen und deren Sterilfiltration für die Optimierungsversuche.

Geräte etc.	Hersteller (Art. Nr.)	Verwendung
15 mL Tubes	SIGMA (CLS430791)	Lagerung der Lösungen
Verschlusskonus	Sarstedt (744.311)	Verschluss der Spritzen
Omnifix® Spritzen 10 mL	B. Braun (4617100V)	Filtration
Whatman® Spritzenvorsatzfilter	GE Healthcare (10462200)	Filtration

Zur Bewertung der Experimente wurden die Zielgrößen F_{OD} und pDNA-Ausbeute wie in 3.6.1 und 3.6.3 berechnet. F_{OD} bezeichnet die Erhöhung von OD_{600} im Vergleich zur Start-Zelldicht OD_0 . Die pDNA-Ausbeute liefert einen Konzentrationswert der pDNA in $\mu\text{g pDNA pro mL Medium}$.

3.4.1 Optimierung des Mediums mit Glucose als C-Quelle

Die Durchführung und Planung der Optimierung des stöchiometrischen Mediums mit Glucose als C-Quelle basiert auf dem Medium von Wang *et al.* (2001). Dieses Medium beruht auf stöchiometrischen Berechnungen, die sowohl die Aminosäuren berücksichtigen, die für das Wachstum benötigt werden, als auch die Aminosäuren, die zur pDNA-Produktion in *E. coli* gebraucht werden. Zusätzlich dazu werden die Aminosäuren in 6 verschiedene Stoffwechselwege unterteilt, von denen jeweils eine Aminosäure eingesetzt wird.

Die Faktoren für die Versuche mit den verschiedenen Stamm Plasmid-Kombinationen sind in Tab. 13 gezeigt. In dieser ersten Optimierung wurden alle Kombinationen mit den gleichen Versuchsbedingungen für das Medium durchgeführt.

Tab. 13: Faktoren und Faktorbereich für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit Glucose als C-Quelle für alle Stamm Plasmid-Kombinationen.

Faktor	Faktorbereich
x_1 Thiamin	0 - 0,1 gL^{-1}
x_2 Histidin	0 - 0,5 gL^{-1}
x_3 Leucin	0 - 1 gL^{-1}
x_4 Prolin	0 - 1 gL^{-1}
x_5 Isoleucin	0 - 0,5 gL^{-1}

Für die Versuche werden das abgeänderte Grundmedium in Tab. 14 und die Stocklösungen in Tab. 15 eingesetzt.

Tab. 14: Zusammensetzung des Grundmediums für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit Glucose als C-Quelle.

Substanz	Hersteller (Art. Nr.)	Menge pro 1 L [g]
Glucose·2H ₂ O	Merck (1.08346)	11
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck (1.37036)	8,5
KH ₂ PO ₄	Merck (1.04871)	3,0
NH ₄ Cl	Merck (1.01145)	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck (1.05882)	0,491
L-Asparaginsäure	Merck (1.00126)	1,240
L-Glutamin	Merck (1.00289)	1,153
Glycin	Cal Biochem (3570)	0,379
L-Tryptophan	VWR (28821.131)	0,032
Kanamycin	AppliChem (A4789.0010)	0,05

Lösemittel: VE-Wasser; pH = 7,0 ± 0,2. Sterilisation bei 121 °C für 20 Minuten oder durch Bottle-Top Filter.

Tab. 15: Zusätze für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit Glucose als C-Quelle.

Zusatz	Abkürzung	Hersteller (Art. Nr.)	c _{Stock} [mgmL ⁻¹]
Thiamin-HCl	Thi	RHB (10093)	2
L-Histidin	His	Merck (1.04351)	10
L-Leucin	Leu	Merck (1.05020)	20
L-Prolin	Pro	Merck (1.07430)	20
L-Isoleucin	Ile	Merck (1.05357)	10

3.4.2 Optimierung des Mediums mit kombinierter C-Quelle

Nachdem die erste Optimierung (3.4.1) durchgeführt wurde, wurden die Ergebnisse genutzt um eine weitere Optimierung mit verschiedenen C-Quellen durchzuführen. In Anlehnung an Lopes *et al.* (2014) wurde mit einer kombinierten C-Quelle aus Glucose und Glycerin gearbeitet. Die maximale Konzentration der C-Quellen wurde für Glucose auf 8 gL⁻¹ gesetzt. Aufgrund der verschiedenen Ausbeutekoeffizienten wurden für Glycerin 10 gL⁻¹ eingesetzt und somit äquivalente Verhältnisse geschaffen. Es wurden die üblichen Ausbeutekoeffizienten 0,4 g Zellen g⁻¹ Substrat für Glucose und 0,5 g Zellen g⁻¹ Substrat für Glycerin verwendet. Das zuvor feste C/N-Verhältnis blieb bei den Versuchen nicht bestehen. Da die Anzahl der Faktoren beibehalten wurde und zwei davon Glucose und Glycerin einnahmen, blieben drei weitere Faktoren für jede Stamm Plasmid-Kombination übrig.

Tab. 16 zeigt die Faktoren für die Optimierung mit kombinierter C-Quelle. Für Stb13 wurde zusätzlich Thiamin als konstanter Faktor gesetzt, da es einen positiven Effekt auf die pDNA-Ausbeute hatte.

Tab. 16: Faktoren und Faktorbereich für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit kombinierter C-Quelle für alle Stamm Plasmid-Kombinationen.

Faktor	DH5 α ::P1	DH5 α ::P2	DH10B::P1	DH10B::P2	Stbl3::P1	Stbl3::P2
x ₁	0 - 0,5 gL ⁻¹	0 - 0,5 gL ⁻¹	0 - 0,5 gL ⁻¹	0 - 0,5 gL ⁻¹	0 - 2 gL ⁻¹	0 - 2 gL ⁻¹
	Thiamin	Thiamin	Thiamin	Thiamin	Prolin	Prolin
x ₂	0 - 2 gL ⁻¹	0 - 2 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹
	Prolin	Prolin	Leucin	Leucin	Leucin	Leucin
x ₃	0 - 1 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹	0 - 1 gL ⁻¹
	Leucin	Histidin	Isoleucin	Isoleucin	Histidin	Isoleucin
x ₄	0 - 8 gL ⁻¹	0 - 8 gL ⁻¹	0 - 8 gL ⁻¹	0 - 8 gL ⁻¹	0 - 8 gL ⁻¹	0 - 8 gL ⁻¹
	Glucose	Glucose	Glucose	Glucose	Glucose	Glucose
x ₅	0 - 10 gL ⁻¹	0 - 10 gL ⁻¹	0 - 10 gL ⁻¹	0 - 10 gL ⁻¹	0 - 10 gL ⁻¹	0 - 10 gL ⁻¹
	Glycerin	Glycerin	Glycerin	Glycerin	Glycerin	Glycerin
konstant	-	-	-	-	0,1 gL ⁻¹ Thiamin	

Für die Versuche wurden das abgeänderte Grundmedium in Tab. 17 und die Stocklösungen in Tab. 18 eingesetzt.

Tab. 17: Zusammensetzung des Grundmediums für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit kombinierter C-Quelle.

Substanz	Hersteller (Art. Nr.)	Menge pro 1 L [g]
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Merck (1.37036)	8,5
KH ₂ PO ₄	Merck (1.04871)	3,0
NH ₄ Cl	Merck (1.01145)	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck (1.05882)	0,4915
L-Asparaginsäure	Merck (1.00126)	1,240
L-Glutamin	Merck (1.00289)	1,1524
Glycin	Cal Biochem (3570)	0,3785
L-Tryptophan	VWR (28821.131)	0,0306
Kanamycin	AppliChem (A4789.0010)	0,05

Lösemittel: VE-Wasser; pH = 7,0 ± 0,2. Sterilisation bei 121 °C für 20 Minuten oder durch Bottle-Top Filter.

Tab. 18: Zusätze für die Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit kombinierter C-Quelle.

Zusatz	Abkürzung	Hersteller (Art. Nr.)	C _{Stock} [mg mL ⁻¹]
Glucose	Glu	Merck (1.09346)	160
Glycerin	Gly	Merck (1.04093)	200
Thiamin-HCl	Thi	RHB (10093)	10
L-Histidin	His	Merck (1.04351)	20
L-Leucin	Leu	Merck (1.05020)	20
L-Prolin	Pro	Merck (1.07430)	40
L-Isoleucin	Ile	Merck (1.05357)	20

3.4.3 Auswertung mit dem *Optimizer*-Tool

Die Auswertung der Versuche mit *Design of Experiments* erfolgte auf Grundlage der berechneten Zielgrößen (siehe 3.6.1 und 3.6.3). Nach der Anpassung des Modells an die Zielgrößen, wurde das *Optimizer*-Tool von MODDE® eingesetzt. Dazu wurde vorgegeben, dass die Zielgrößen (F_{OD} und pDNA-Ausbeute) maximiert werden sollten. Das Tool lieferte die optimalen Faktoreinstellungen für die Zielgrößen F_{OD} und pDNA-Ausbeute im angegebenen Bereich der Faktoren. Die optimierten Bedingungen und die theoretischen Zielgrößen wurden bewertet und verglichen. Die besten Ergebnisse wurden in der MTP und im Schüttelkolben (*Scale-up*) durchgeführt.

3.5 *Scale-up*

Nachdem die optimierten Bedingungen in der MTP durchgeführt wurden, wurde die Fermentation in den Maßstab des Schüttelkolbens mit einem Füllvolumen von 20 mL übertragen. Alle weiteren Parameter sind in Tab. 19 aufgeführt.

Die Ergebnisse für die MTP und den Kolben wurden verglichen und bewertet.

Tab. 19: Parameter und Sollwerte für den *Scale-up* im Schüttelkolben.

Parameter	Sollwert
Temperatur	37°C
Drehzahl	200 rpm
Schüttelhub	25 mm
Füllvolumen	20 mL
Dauer	8 h/24 h
Inokulum	1333 µL auf 20 mL

Zur Bewertung des *Scale-up* wurde eine sogenannte „Negativkontrolle“ mitgeführt. Sie sollte die in der MTP schlecht verlaufene Fermentation im *Scale-up* bestätigen.

Die *Scale-up* Versuche wurden im Schüttelinkubator der Fa. New Brunswick Scientific (Typ *Innova 4230*) in einem Schikanekolben (vgl. Tab. 8) durchgeführt.

3.6 Messtechnik und Analytik

3.6.1 Probennahme und Bestimmung des Zellwachstums

Die Messung der Optischen Dichte bei 600 nm wurde in 96-Well Platten durchgeführt. Die Probennahme erfolgte alle 1,5 bis 2 Stunden nach Start des Plattenversuchs. Sowie am Ende jeder Vorkultur und MTP-Fermentation. Anhand von Vorversuchen wurde der Korrelationsfaktor (KF) 5,9 ($OD_{\text{Küvette}}/OD_{\text{Multiskan}}$) für die Umrechnung von einer Messung in einer Küvette und der 96-Well Platte mit einem Füllvolumen von 100 μL ermittelt (vgl. Franzgrote, 2014).

Die Messung in den 96-Well Platten wurde mit dem *Multiskan GO* in Doppelbestimmung durchgeführt. Für jede Messung wurde die Standardabweichung berechnet und auf Ausreißer kontrolliert. Als Ausreißer wurden Messungen mit einer Standardabweichung größer 5 % bezeichnet. In den Versuchen waren keine Ausreißer zu verzeichnen. Für alle Messungen wurde als Referenz das jeweilige Medium in der 96-Well Platte verwendet.

Für jede Fermentation in der MTP wurden maximal vier Proben genommen, um genug Probenvolumen für die pDNA-Analytik zu gewährleisten.

Die Methode der Messung bestand aus 20 Sekunden schütteln und der anschließenden Messung bei 600 nm. Das Schütteln sollte verhindern, dass Luftblasen oder unterschiedliche Oberflächenspannungen in den Wells die Messung beeinflussen.

Nach der Messung wurde manuell die Referenz subtrahiert und der Mittelwert zwischen den doppelbestimmten Werten gebildet. Anhand der Gleichung (3.4) wurde die Optische Dichte bei 600 nm der 96-Well Platte in die Optische Dichte bei 600 nm einer Küvette umgerechnet.

$$OD_{600,\text{Küvette}} = KF \cdot \overline{OD}_{600,96\text{-Well Platte}} \quad (3.4)$$

Tab. 20: Geräte und Materialien zur Bestimmung von OD_{600} mit dem *Multiskan GO*.

Geräte und Materialien	Hersteller (Typ)
96-Well Platte	Thermo Scientific Nunc (269620)
Multiskan GO Microplate and cuvette spectrophotometer mit Software	Thermo Scientific (51119300)

Bewertung des Wachstums anhand vom Wachstumsfaktor F_{OD} bezogen auf OD_0

Um eine einheitliche Bewertungsgröße zu haben, wurde die Erhöhung der OD_{600} im Vergleich zum Wert von OD_{600} zu Beginn der MTP-Fermentation (OD_0) berechnet:

$$F_{OD} = \frac{OD_{EoF}}{OD_0} - 1 \quad (3.5)$$

3.6.2 Probennahme und -vorbereitung zur Bestimmung der pDNA-Ausbeute

Am Ende der MTP-Fermentation wurden zwei 1 mL Proben (A und B) genommen. Die Probengefäße (SafeSeal 2mL, Sarstedt 72.695) wurden vorher bei 80°C für 24 Stunden getrocknet und leer gewogen. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 13.000 rpm für 10 Minuten. Anschließend wurde die Probe A lysiert und analysiert. Die B-Probe diente als Backup für die pDNA-Gehaltsbestimmung.

Für die *Scale-up* Versuche wurde die Biotrockenmasse der B-Proben bestimmt, nachdem die Analytik mit der A-Probe erfolgreich abgeschlossen war.

Alkalische Lyse

Die modifizierte alkalische Lyse nach Birnboim & Doly wurde mit dem Plasmid Kit der Fa. Qiagen durchgeführt und diente dem Zellaufschluss und damit der Freisetzung der pDNA, um im Anschluss die Quantifizierung mittels Anionentauscher-HPLC durchzuführen (Birnboim & Doly, 1979).

Die pelletierten Proben wurden in 333 μl P1 mit 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RNase resuspendiert. Durch Zugabe von 333 μl P2 und sechsmaliges Invertieren setzte die Lyse ein, welche nach ca. 3 Minuten durch Zugabe von 333 μl P3 und sechsmaliges Invertieren gestoppt wurde. Das Endvolumen betrug 999 μl und wurde bei der Quantifizierung berücksichtigt. Um die gebildeten Flocken vom Lysat zu trennen wurden die Proben 20 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach diesem Schritt war das Lysat nicht vollständig geklärt. Da im Anschluss eine Chromatographie durchgeführt wurde, wurden die Proben nochmals filtriert. Dies geschah mit Filterplatten, die gleichzeitig das passende Format für die Probenaufgabe der Chromatographie-Anlage geboten haben. 300 μl des Überstandes wurden in die Filterplatte pipettiert. Eine untergestellte 96-Well Platte diente als Auffanggefäß, sodass die Probe nach 1 Minute Zentrifugation bei 1500 x g (Angabe des Herstellers) hierin vorlag.

In Tab. 21 sind die verwendeten Geräte und Materialien aufgeführt.

Tab. 21: Geräte und Materialien für die Probennahme und –vorbereitung zur Bestimmung der pDNA-Ausbeute.

Geräte und Materialien	Hersteller (Art. Nr./Typ)	Verwendung
Plasmid Mini Kit	Qiagen (12123)	Alkalische Lyse
96-Well Filterplatte, 0.2 μm Porendurchmesser, 350 μl Wells	NTRL (PN 8019)	Filtration der Proben für die Chromatographie
Zentrifuge	Eppendorf (Centrifuge 5451D)	Abtrennung von Flocken nach Lyse
Zentrifuge mit Einsatz für MTP	Heraeus (Multifuge 3 S-R)	Filtration der Lysate
96-Well Platte	Thermo Scientific Nunc (269620)	Auffangen der Proben
Vortexer	Heidolph (REAX top)	Resuspension

3.6.3 Bestimmung der pDNA-Ausbeute mittels Anionentauscher-HPLC

Die Anionentauscher-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wird an der UHPLC *Ultimate 3000* der Fa. Dionex durchgeführt. Die verwendete Anionentauschersäule *TSKgel DNA-NPR* der Fa. Tosoh besteht aus einer und Vor- und Hauptsäule. Die Vorsäule fängt stärkere Verunreinigungen ab und sorgt für eine längere Haltbarkeit der Hauptsäule. Zusammen haben die Vor- und Hauptsäule ein Säulenvolumen von 1,33 mL.

Die lysierten und filtrierten Proben konnten direkt injiziert werden, da ihr Salzgehalt unter 0,8 M NaCl lag. Ansonsten müssten die Proben mit Equilibrierungspuffer verdünnt werden. Die Methode umfasst eine lineare Gradientenelution, die bei 50 % Equilibrierungspuffer und 50 % Elutionspuffer beginnt und mit 0.3 mL min^{-1} betrieben wird.

Die UHPLC verfügt einen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlten Sampler, in den die 96-Well Platte gestellt wird. Von jeder Probe wurden $10 \text{ }\mu\text{L}$ vermessen und anhand von $5 \text{ }\mu\text{L}$ des Standards P1 ($\approx 100 \text{ ng}$) quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Chromeleon*, welche automatisch die pDNA-Menge in Nanogramm bestimmt.

Die Tab. 22 und Tab. 23 zeigen die verwendeten Puffer, Standards und Geräte zur Durchführung der Anionentauscher-HPLC.

Tab. 22: Puffer und Standard für die Durchführung der Anionentauscher-HPLC.

Puffer/Standard	Zusammensetzung
Equilibrierungspuffer	20 mM TRIS-HCl, pH $9,0 \pm 0,1$
Elutionspuffer	20 mM TRIS-HCl, 1 M NaCl, pH $9,0 \pm 0,1$
Standard P1 (7.4 kb)	$20 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$

Tab. 23: Geräte und Materialien zur Durchführung der Anionentauscher-HPLC.

Geräte	Hersteller (Typ)
UHPLC mit Chromeleon 7 Software	Dionex (UltiMate 3000)
Anionentauschersäule	Tosoh (TSKgel DNA-NPR)
Analysenwaage	Sartorius (Secura 5102-1S)
pH-Meter	Mettler Toledo (Seven Excellence)

Berechnung der pDNA-Ausbeute und Qualität

Die Quantifizierung der Peaks erfolgte mithilfe der Chromeleon Software anhand des Standards P1 in Nanogramm. Zur Berechnung der pDNA-Ausbeute wurden die Verdünnung V während der Lyse sowie das Injektionsvolumen berücksichtigt (3.6).

$$\text{pDNA-Ausbeute} = \frac{\text{pDNA-Menge}}{\text{Injektionsvolumen}} \cdot V \text{ in } [\text{ng}\mu\text{L}^{-1} \equiv \mu\text{g mL}^{-1}] \quad (3.6)$$

Die Qualität wurde ebenfalls für jede Probe bestimmt. Sie ergab sich aus dem Quotienten der Menge der ccc-Form zur Gesamtmenge der pDNA (3.7).

$$\text{Qualität} = \frac{\text{ccc-Form}}{\text{pDNA}_{\text{gesamt}}} \text{ in } [\%] \quad (3.7)$$

4 Ergebnisse und Diskussion

Im Kapitel Ergebnisse und Diskussion werden die durchgeführten Optimierungs- und *Scale-up*-Versuche ausgewertet und diskutiert.

Das Plasmid stellt das Zielprodukt dar, daher unterteilt sich dieses Kapitel in Plasmid 1 in den Stämmen DH5 α , DH10B und Stbl3 und in Plasmid 2 in den Stämmen DH5 α , DH10B und Stbl3.

Plasmid 1 und Plasmid 2 sind beide relativ groß. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen dadurch, dass Plasmid 2 die Information für zwei Zielprodukte und den zugehörigen Promotoren trägt. Die eingesetzten Stämme bieten einige Eigenschaften, die sich positiv auf die Plasmidproduktion auswirken sollen (vgl. Tab. 5). Dazu gehören Gene, die die Plasmid-Ausbeute (*endA*), die Plasmidstabilität (*recA*) und die Replikation unter Nährstoffmangel (*relA*, *spoT*) beeinflussen. Alle Stämme tragen das *recA* Gen. DH10B sticht dadurch hervor, dass er die zwei Gene *spoT1* und *relA1* trägt und somit unter Aminosäure- und Glucosemangel Replikation betreiben kann. DH5 α trägt ebenfalls das *relA* Gen. Stbl3 weist eine Endonucleaseaktivität auf, welche bei DH10B und DH5 α ausgeschaltet wurde (*endA*). Diese Eigenschaft könnte in der Aufreinigung zu Schwierigkeiten führen. Allerdings sind diese bei den durchgeführten Versuchen nicht aufgetreten.

Die Versuche mit dem jeweiligen Plasmid haben das Ziel eine geeignete Kombination mit einem guten Wachstum und einer hohen pDNA-Ausbeute hervorzubringen. Ein sehr großer Einflussfaktor ist dabei das Medium, welches alle nötigen Stoffe zum Aufbau von Zellmasse und der Replikation liefert. Da die drei Stämme unterschiedliche Metabolismen sowie Ansprüche (Auxotrophien) an das Medium haben, muss dieses angepasst werden. Außerdem verlangt jedes Plasmid ebenso unterschiedliche Stoffe zur Replikation abhängig vom Aufbau und der Information, die das Plasmid selbst trägt.

Bevor die Optimierungsversuche mit der jeweiligen Stamm Plasmid-Kombination durchgeführt werden konnten, wurden die Plasmide P1 und P2 in die Stämme transformiert. Darauf folgte die Zellbankablage wie in 3.1 beschrieben. Diese Zellbänke wurden zum animpfen der Vorkultur verwendet, welche wiederum dazu diente die Versuche in den Mikrotiterplatten zu inokulieren. Die Vorkultivierungen lieferten OD₆₀₀-Werte zwischen 6,9 und 11,4 nach 15,5 Stunden. Eine Ausnahme stellte der DH5 α ::P2 mit einer OD_{600, VK} von knapp 2,0 am Ende der Vorkultur dar. Der Unterschied zum DH5 α mit dem Plasmid 1 (OD_{600, VK} = 6,9) war sehr groß. Dennoch wurden alle Optimierungen mit DH5 α ::P2 durchgeführt.

Zunächst wurde die Optimierung des Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit Glucose als C-Quelle in der MTP durchgeführt. Dieser Schritt sollte das Medium grundlegend an die Ansprüche der Stämme anpassen sowie eine Richtung für die nächste Stufe der Optimierung liefern. Daher wurden mit den Erkenntnissen der Versuche die Faktoren für die Stamm Plasmid-Kombinationen optimiert und nicht signifikante Faktoren eliminiert. Zusätzlich wurde für die erste Optimierung, bei der für alle Kombinationen die gleichen Bedingungen galten, die Schnittmenge des Mediums berechnet und bewertet. Die Schnittmenge sollte zeigen, ob es ein universelles Medium für das Plasmid in den Stämmen gibt. Lediglich für Plasmid 2 konnte diese Schnittmenge gebildet werden und vergleichbare Werte liefern.

In der zweiten Optimierung in der MTP wurden die C-Quellen Glucose und Glycerin als quantitative Faktoren in das Design aufgenommen. Am Ende wurden die optimierten theoretischen Ergebnisse aller Versuche in der MTP untereinander verglichen. Der Stamm bzw. die Stämme mit den besten theoretischen Ergebnissen für Wachstum und pDNA-Ausbeute wurden ausgewählt und in den Schüttelkolben übertragen. Zuletzt wurde eine Aussage über den Erfolg von *DoE* sowie den *Scale-up* getroffen.

Im Vordergrund stand die pDNA-Ausbeute als Zielgröße, dennoch muss das Wachstum ebenso betrachtet werden, da diese beiden Größen sich gegenläufig verhalten. In den Experimenten in denen kein Wachstum zu beobachten war, traten im MTP Maßstab trotzdem hohe pDNA-Ausbeuten auf. Dies bietet keine Grundlage für einen *Scale-up*. Daher werden die Zielgrößen pDNA-Ausbeute in $\mu\text{g mL}^{-1}$ und die Bewertungsgröße F_{OD} nach 8 Stunden Kultivierungsdauer mit dem *Optimizer*-Tool von MODDE® maximiert.

Aufgrund der Vielzahl an Versuchen und der kleinen Volumina wurden das Inokulum sowie der pH-Wert in den Mikrotiterplatten-Fermentationen vernachlässigt. Die Bestimmung der Biotrockenmasse zeigte für die MTP Versuche große Variabilität, bedingt durch sehr kleine Pellets blieben Überstandsreste zurück oder das Pellet wurde mit aufgenommen. Damit fällt die Bewertung der pDNA-Ausbeute pro Biotrockenmassen für die MTP ebenfalls weg. Im Gegensatz dazu werden die *Scale-up* Versuche anhand der pDNA-Ausbeute pro Biotrockenmasse bewertet, da ein größeres Probenvolumen zur Verfügung stand.

Insgesamt wurden 16 Versuche durchgeführt. Dabei umfasst V01 bis V12 je einen MTP Versuch und V13 bis V16 je einen MTP Versuch und je einen *Scale-up* Versuch. Die Nummerierung erfolgt nach der Optimierungsstufe, daher wurden die Versuche V01 bis V03 und V07 bis V09 sowie V13 mit Plasmid 1 durchgeführt. Die restlichen Versuche V04 bis V06, V10 bis V12 und V14 bis V16 wurden mit Plasmid 2 durchgeführt. In Tab. 24 ist eine detailliertere Auflistung zu sehen.

Tab. 24: Übersicht der Optimierungsversuche V01 bis V16.

Versuch	Zielprodukt	Maßstab	Ziel
V01	Plasmid 1	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose für DH5 α
V02	Plasmid 1	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose für DH10B
V03	Plasmid 1	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose für Stbl3
V04	Plasmid 2	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose für DH5 α
V05	Plasmid 2	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose für DH10B
V06	Plasmid 2	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose für Stbl3
V07	Plasmid 1	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose und Glycerin für DH5 α
V08	Plasmid 1	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose und Glycerin für DH10B
V09	Plasmid 1	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose und Glycerin für Stbl3
V10	Plasmid 2	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose und Glycerin für DH5 α
V11	Plasmid 2	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose und Glycerin für DH10B
V12	Plasmid 2	MTP	Optimierung des Mediums mit Glucose und Glycerin für Stbl3
V13	Plasmid 1	Kolben	<i>Scale-up</i> von DH10B::P1
V14	Plasmid 2	Kolben	<i>Scale-up</i> von DH5 α ::P2
V15	Plasmid 2	Kolben	<i>Scale-up</i> von DH10B::P2
V16	Plasmid 2	Kolben	<i>Scale-up</i> von Stbl3::P2

Im nächsten Abschnitt folgen die Ergebnisse und Diskussion für Plasmid 1 und anschließend für Plasmid 2.

4.1 Plasmid 1

Plasmid 1 enthält die gängigen Elemente Resistenzgen, Replikationsursprung, Promoter, *gene of interest* und polyA-Schwanz. Während der Zellbankablage wurden gutes Wachstum und hohe pDNA-Ausbeuten beobachtet. Dieses Plasmid wird bei RHB oft als Referenz für andere große Plasmide eingesetzt.

In den Medienoptimierungen wurden die Kombinationen DH5 α ::P1, DH10B::P1 und Stbl3::P1 untersucht.

Zunächst wurden für jede Kombination in der ersten Optimierung die Faktoren Thiamin (0 – 0,1 gL⁻¹), Histidin (0 – 0,5 gL⁻¹), Leucin (0 – 1 gL⁻¹), Prolin (0 – 1 gL⁻¹) und Isoleucin (0 – 0,5 gL⁻¹) optimiert. Die Auswahl erfolgte auf der Grundlage von Auxotrophien (Leucin, Thiamin und Prolin). Isoleucin wurde in die Versuche aufgenommen, da der Einsatz die Steigerung vom Wachstum und der pDNA-Ausbeute verspricht (Huber, 2007). Histidin gehört alleine zu einem unabhängigen Stoffwechselweg, dessen Effekt untersucht werden soll. Die Konzentrationen wurden von den Versuchen nach Wang *et al.* (2001) abgeleitet.

In der zweiten Optimierung wurde zusätzlich der Einfluss von Glucose (0 – 8 gL⁻¹) und Glycerin (0 – 10 gL⁻¹) als C-Quellen untersucht. Für diese Optimierungen wurden zusätzlich drei Faktoren der ersten Optimierung in angepassten Konzentrationsbereichen eingesetzt. Für DH5 α ::P1 wurden Thiamin, Leucin und Prolin, für DH10B::P1 Thiamin, Leucin und Isoleucin und für Stbl3::P1 Leucin, Prolin und Histidin weiter optimiert. Die zweite Optimierung von Stbl3::P1 wurde zusätzlich mit einer festen Konzentration von 0,1 gL⁻¹ Thiamin durchgeführt.

Der Konzentrationsbereich von Thiamin wurde in der zweiten Optimierung auf 0,5 gL⁻¹, die Konzentrationsbereiche von Isoleucin und Histidin auf 1 gL⁻¹ und von Prolin auf 2 gL⁻¹ erhöht.

Für den *Scale-up* wurden die besten Stamm Plasmid-Kombinationen aus DH5 α ::P1, DH10B::P1 und Stbl3::P1 ausgewählt und mit dem optimierten Medium aus der ersten bzw. zweiten Optimierung zunächst in der MTP und dann im Schüttelkolben durchgeführt.

In den nächsten Abschnitten werden zunächst die Ergebnisse der ersten und der zweiten Optimierung mit *DoE* in der MTP dargestellt.

4.1.1 Optimierung des Mediums mit Glucose als C-Quelle (V01 bis V03)

Die Auswertung mit MODDE® und Anpassung der Modelle an die Zielgröße F_{OD} und pDNA-Ausbeute liefert für die Versuche V01 bis V03 geeignete Modelle. Die Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung liegen für alle Versuche über 0,7. Die Modelle zeigen mindestens eine Reproduzierbarkeit von 86 Prozent. Die zugehörigen Plots sind im Anhang zu finden (V01, V02, V03). In Tab. 25 sind die zugrunde liegenden Kennzahlen der Modelle gezeigt.

Tab. 25: Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung für V01 bis V03.

Versuch	R ²		Q ²		MV		RP		Modelleignung	
	F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute	
V01 (DH5α::P1)	0,87	0,77	0,79	0,71	0,73	0,72	0,92	0,86	Ja	Ja
V02 (DH10B::P1)	0,98	0,94	0,91	0,89	0,91	0,91	0,95	0,90	Ja	Ja
V03 (Stb13::P1)	0,99	0,87	0,95	0,87	0,97	0,89	0,95	0,86	Ja	Ja

Der *Optimizer* liefert die in Tab. 26 folgenden Faktoreinstellungen und theoretische Zielgrößen für die erste Optimierung von DH5α::P1 (V01), DH10B::P1 (V02) und Stb13::P1 (V03). Leere Felder bedeuten, dass der Faktor keine Relevanz in dem Modell für die Optimierung hat und somit rausfällt. Laut dem *Optimizer*-Tool liefern die aufgeführten Konzentrationen die maximalen Werte für F_{OD} und die pDNA-Ausbeute. Zusätzlich zur einzelnen Betrachtung wurde die Schnittmenge des optimalen Mediums für die drei Stamm Plasmid-Kombinationen berechnet, sowie die dazugehörigen theoretischen Zielgrößen. Die Schnittmenge liefert für V01 und V02 vergleichbare Ergebnisse. Für V03 weicht der theoretische Wert für die pDNA-Ausbeute der Schnittmenge stark ab, sodass sich kein passendes Medium für die drei Stamm Plasmid-Kombinationen der Schnittmenge ergibt.

Tab. 26: Faktoreinstellungen und theoretische Zielgrößen laut MODDE® *Optimizer* für V01 bis V03.

Versuch	Thiamin [gL ⁻¹]	Histidin [gL ⁻¹]	Leucin [gL ⁻¹]	Prolin [gL ⁻¹]	Isoleucin [gL ⁻¹]	F _{OD} [-]	pDNA-Ausbeute [μgmL ⁻¹]
V01	0,50	-	0,1	-	0,04	1,3	4,3
V02	0,09	0,05	0,5	-	0,30	3,0	10,4
V03	0,09	-	0,54	0,83	0,28	2,2	12,1

Tab. 27: Faktoreinstellungen der theoretischen Zielgrößen für die Schnittmenge von V01 bis V03.

Versuch	Thiamin	Histidin	Leucin	Prolin	Isoleucin	F _{OD} [-]	pDNA-Ausbeute [μgmL ⁻¹]
V01						1,1	3,9
V02	0,22 gL ⁻¹	0,24 gL ⁻¹	0,33 gL ⁻¹	0,58 gL ⁻¹	0,28 gL ⁻¹	3,0	13,1
V03						2,0	3,0

Die Schnittmenge liefert kein passendes Medium für die Stamm Plasmid-Kombinationen aus V01 bis V03.

Die Versuche mit dem Plasmid 1 in verschiedenen Stämmen zeigen, dass diese sich in Bezug auf das Medium individuell verhalten. Wie in Abb. 11 zu sehen ist, reagieren alle drei Stämme mit dem Plasmid 1 mit verschiedenen Werten für F_{OD} und pDNA-Ausbeute auf die gleichen Medienzusammensetzungen.

Die Werte von F_{OD} bewegen sich bei DH5 α ::P1 im Bereich von 0,1 bis 1,3, bei DH10B::P1 im Bereich von 0,8 bis 2,6 und bei Stbl3::P1 im Bereich von 0,0 bis 2,1. Damit zeigen sich für Stbl3::P1 die größten Effekte auf das Wachstum, die zweitgrößten für DH10B. Die verschiedenen Medienzusammensetzungen wirken sich am wenigsten auf das Wachstum von DH5 α ::P1 aus. Allerdings zeigt sich generell für DH5 α schlechtes Wachstum.

Die Werte für die pDNA-Ausbeute (c_{pDNA}) liegen für DH5 α ::P1 im Bereich von 2,1 bis 4,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, für DH10B::P1 im Bereich von 5,3 bis 11,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und für Stbl3::P1 im Bereich von 6,3 bis 12,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Für alle Stämme wurde mindestens eine Verdopplung der Ausbeute im Rahmen des Versuchs erzeugt.

Das N1-Experiment entspricht bei allen Versuchen dem Grundmedium ohne Zusätze der Faktoren x_1 bis x_5 . Die Experimente N22 bis N24 sind die *Center Point*-Experimente mit jeweils der mittleren Konzentration jedes Faktors (vgl. 3.4).

DH5 α ::P1 (V01)

Experiment N1 zeigt trotz moderatem Wachstum ($F_{OD} = 0,8$) eine relativ hohe pDNA-Ausbeute von 4,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Maximales Wachstum sowie maximale Ausbeute tritt bei Experiment N12 auf. Hier wurden 0,5 g L^{-1} Histidin und 1 g L^{-1} Prolin eingesetzt. Minimale Ausbeute tritt bei 1 g L^{-1} Leucin, 1 g L^{-1} Prolin (N14) und minimales Wachstum ohne den Zusatz von Isoleucin (N6) auf. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich keine Aussage über optimale Bedingungen treffen.

Die statistische Auswertung ergab, dass die Zielgröße F_{OD} lediglich von Leucin und Isoleucin und die Zielgröße pDNA-Ausbeute von Thiamin, Leucin und Isoleucin abhängig sind (Anhang, V01).

DH10B::P1 (V02)

Das N1-Experiment zeigt minimales Wachstum (0,8) bei einer moderaten pDNA-Ausbeute von 7,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Maximales Wachstum und maximale Ausbeute tritt bei N18 mit 0,05 g L^{-1} Thiamin, 0,5 g L^{-1} Histidin, 0,5 g L^{-1} Leucin, 0,5 g L^{-1} Prolin und 0,25 g L^{-1} Isoleucin auf. In Experimenten ohne Thiamin, Leucin und Prolin tritt kein Wachstum auf (N1, N13). N15 zeigt mit 1 g L^{-1} Leucin, 0,5 g L^{-1} Isoleucin die geringste Ausbeute.

Die statistische Auswertung ergab Abhängigkeiten von F_{OD} bezüglich Thiamin, Prolin, Leucin und Isoleucin sowie der pDNA-Ausbeute von Thiamin, Leucin und Isoleucin. Thiamin wirkt sich dabei positiv auf beide Zielgrößen aus, während sich Leucin und Isoleucin negativ auf die pDNA-Ausbeute auswirken sollen (Anhang, V02).

Stbl3::P1 (V03)

Ohne den Zusatz der Faktoren x_1 bis x_5 (N1) tritt kein Wachstum auf, dennoch wird eine vergleichsweise hohe Menge pDNA gebildet (6,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Andere Experimente, die kaum Wachstum verzeichnen zeigen ähnliche pDNA-Ausbeuten (N10, N13, N15). Allen Experimenten wurde kein Prolin zugesetzt. Maximales Wachstum sowie maximale Ausbeute treten bei Experimenten mit einer Kombination aller Faktoren auf (z.B. N24). Die geringste Ausbeute zeigt sich ohne Zugabe von Prolin, Leucin und Thiamin in Experiment N13.

Die statistische Auswertung zeigte eine Abhängigkeit bezüglich aller Faktoren, davon hat den stärksten positiven Effekt auf F_{OD} und die pDNA-Ausbeute (Anhang, V03).

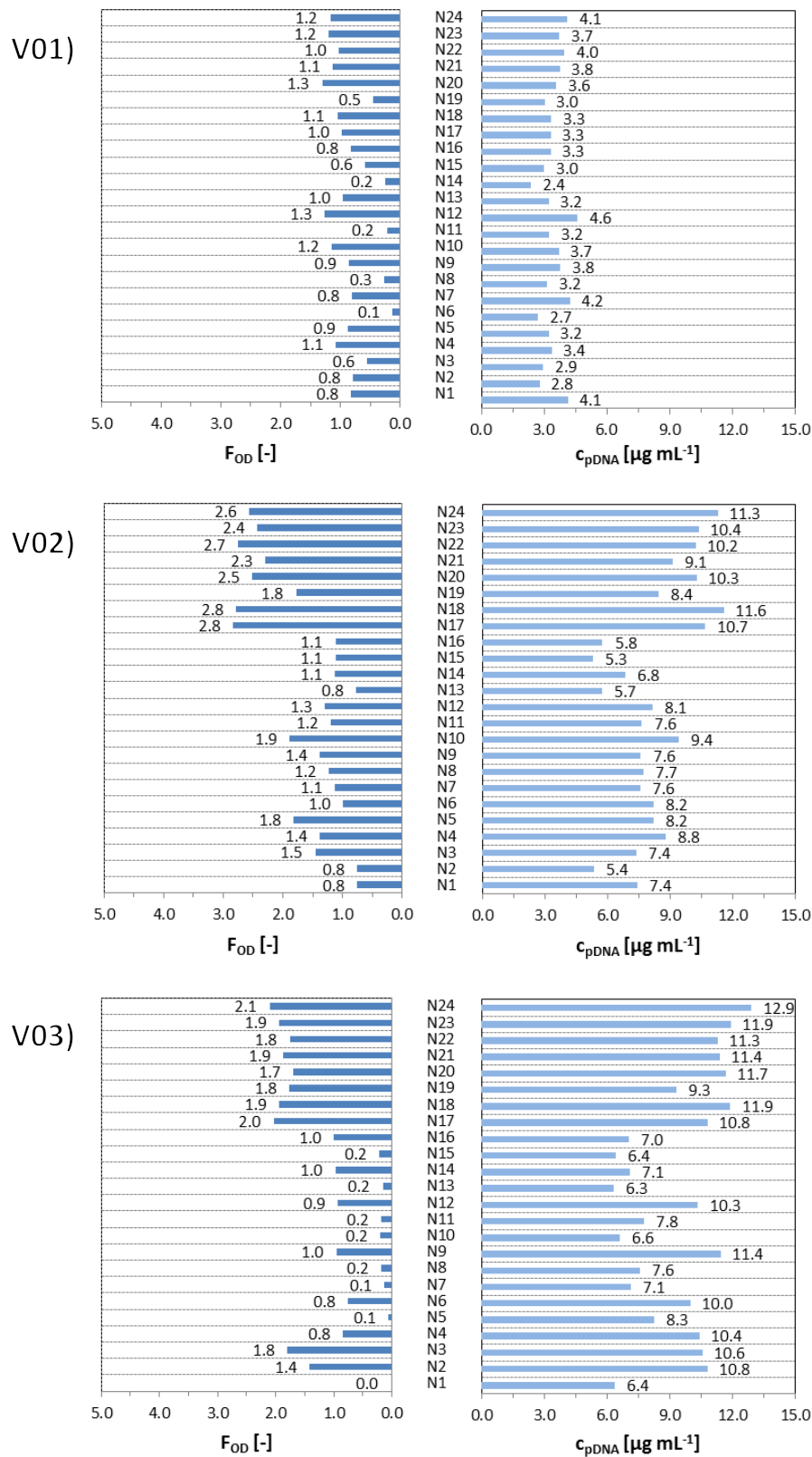


Abb. 11: Ergebnisse für die Optimierung des Mediums nach Wang *et al.* (2001) für V01 bis V03.

In der Abbildung werden die Ergebnisse für F_{OD} und die pDNA-Ausbeute (c_{pDNA}) von V01 bis V03 gezeigt. Der Wert F_{OD} gibt an wie stark sich die End-OD bezogen auf OD_0 erhöht, c_{pDNA} gibt die Ausbeute in $\mu\text{g mL}^{-1}$ an. Die Abbildung verdeutlicht, dass die verschiedenen Stamm Plasmid-Kombinationen von V01, V02 und V03 unterschiedlich auf die Medienzusammensetzungen reagieren, die höchste pDNA-Ausbeute wird in V03, N24 mit $12,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht. Dabei haben die verschiedenen Experimenten Nummern (z.B. N1) die gleiche Medienzusammensetzung.

Diskussion

Die Durchführung der Medienoptimierung mit *DoE* in der Mikrotiterplatte liefert die besten theoretischen Ergebnisse beider Zielgrößen für die Stamm-Plasmid Kombination von DH10B::P1 (V02) mit $F_{OD} = 3,0$ und pDNA-Ausbeute = $10,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Stb13::P1 (V03) erreicht trotz eines hohen Wertes für die pDNA-Ausbeute ($12,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) einen niedrigeren Wert für das Wachstum ($F_{OD} = 2,2$). Da das Wachstum ebenfalls als Kriterium gilt, wird V02 als besser bewertet. Das optimale Medium für DH10B::P1 besteht aus $0,09 \text{ g L}^{-1}$ Thiamin, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ Histidin, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Leucin und $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Isoleucin. In diesem wie auch in den optimalen Medien für DH5 α und Stb13 treten die Aminosäuren auf, die der jeweilige Stamm selbst nicht synthetisieren kann.

Leucin ist essentiell für das Wachstum von DH10B, hat allerdings einen negativen Effekt auf die pDNA-Ausbeute. Diese wird viel mehr von Thiamin positiv beeinflusst. DH10B trägt das Gen *relA*, welches dazu führt dass die pDNA-Produktion unabhängig vom Wachstum durchgeführt werden kann und somit der Leucin-Mangel in einem positiven Effekt für die pDNA-Ausbeute sichtbar wird. Die Energie, die sonst in das Wachstum fließen würde, wird für die Replikation genutzt.

Aufgrund der zwei Auxotrophien von Stb13 gegenüber Prolin und Leucin, zeigt dieser Stamm die stärksten Abhängigkeiten von den zwei Aminosäuren. Das Wachstum und die pDNA-Produktion werden davon beeinflusst. Stb13 trägt nicht die Mutation *relA*, somit findet die pDNA-Produktion parallel zum Wachstum statt. Der positive Effekt von Prolin wird in der zweiten Optimierung mit einer Erhöhung der Konzentration auf 2 g L^{-1} untersucht.

Der Stamm DH5 α reagiert kaum auf verschiedene Medienzusammensetzungen und zeigt konstant niedrige Werte für beide Zielgrößen ($F_{OD} = 1,3$; pDNA-Ausbeute = $4,3 \mu\text{g mL}^{-1}$). Die Auswertung zeigt einen Zusammenhang von pDNA-Ausbeute und Thiamin-Konzentration mit einem Optimum bei $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Außerhalb des Bereichs des Optimums zeigt sich allerdings ein negativer Effekt von Thiamin auf die pDNA-Ausbeute (vgl. V01, N12). DH5 α ist ebenfalls Träger des Gens *relA*. Daher kann die Replikation unter Mangel an Thiamin ebenfalls positiv beeinflusst werden.

Die Auxotrophien stehen deutlich in Beziehung mit dem Wachstum und je nach Genotyp eines Stammes mit der pDNA-Ausbeute. Stämme mit dem Gen *relA* können auch unter Aminosäuremangel hohe pDNA-Ausbeuten erzielen. Unter geeigneten Bedingungen kann so der zellinterne Gehalt an pDNA gesteigert werden während das Zellwachstum stagniert.

Die Stämme DH5 α und DH10B haben jeweils eine Auxotrophie während Stb13 zwei Auxotrophien aufweist. In den Versuchen hat sich gezeigt, dass Stämme mit einer Auxotrophie den Mangel dieser Stoffwechselprodukte, die ihnen fehlen, ausgleichen können. Stb13 kann den Mangel der zwei Aminosäuren nicht kompensieren (vgl. F_{OD} des N1-Experimentes).

Da Thiamin einen positiven Effekt auf die pDNA-Ausbeute von V02 und V03 ausübt, wird die Konzentration in der nächsten Optimierung erhöht (vgl. Anhang, Abbildung 6 und Abbildung 9).

Verglichen mit Ausbeuten von Standardprozeduren mit bis zu $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ in diesem Maßstab (Grunzel *et al.*, 2014), erreichen DH10B::P1 (V02) mit $11,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ und Stb13::P1 (V03) mit $12,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ hohe Ausbeuten.

4.1.2 Optimierung des Mediums mit kombinierter C-Quelle (V07 bis V09)

Die zweite Runde der Optimierungsversuche V07 (DH5 α ::P1), V08 (DH10B::P1) und V09 (Stbl3::P1) bauen auf den Versuchen V01 bis V03 auf. Abhängig von der Auswertung der Versuche V01 bis V03 wurden signifikante Faktoren eliminiert sowie Glucose und Glycerin in das Design aufgenommen. Die Anpassung der Daten liefert Modelle mit guter Modelleignung und hoher Reproduzierbarkeit (Tab. 28). Lediglich die Differenz von R^2 und Q^2 für das Modell der pDNA-Ausbeute von V07 liegt an der Grenze für die Richtwerte eines guten Modells.

Tab. 28: Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung für V07 bis V09.

Versuch	R^2		Q^2		MV		RP		Modelleignung	
	F_{OD}	Ausbeute	F_{OD}	Ausbeute	F_{OD}	Ausbeute	F_{OD}	Ausbeute	F_{OD}	Ausbeute
V07 (DH5 α ::P1)	0,90	0,84	0,75	0,51	0,79	0,74	0,95	0,93	Ja	Ja
V08 (DH10B::P1)	0,99	0,98	0,88	0,82	0,58	0,69	0,99	0,98	Ja	Ja
V09 (Stbl3::P1)	0,85	0,95	0,79	0,89	0,68	0,49	0,94	0,99	Ja	Ja

Die Medienoptimierung unter Einsatz von Glucose und Glycerin als mögliche C-Quellen liefert für V08 und V09 eine Kombination der C-Quellen. Leucin und Thiamin sind in jedem Medium enthalten während Histidin allen Versuchen als signifikanter Faktor für ein optimales Medium herausfällt. Isoleucin ist nur im Medium für DH10B::P1 enthalten.

Tab. 29: Faktoreinstellungen laut MODDE® *Optimizer* für V07 bis V09.

Versuch	Thiamin [gL ⁻¹]	Histidin [gL ⁻¹]	Leucin [gL ⁻¹]	Prolin [gL ⁻¹]	Isoleucin [gL ⁻¹]	Glucose [gL ⁻¹]	Glycerin [gL ⁻¹]
V07	0,50	-	0,05	-	-	8,0	-
V08	0,60	-	0,50	-	0,43	10,0	8,6
V09	0,10	-	0,50	1,3	-	5,9	10,0

Die berechneten Medienzusammensetzungen aus Tab. 30 liefern theoretische Werte für V07 bis V09 von F_{OD} zwischen 1,3 und 3,7 sowie pDNA-Ausbeuten von 3,2 bis 13,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tab. 30). Das schlechteste Ergebnis liefert die Stamm Plasmid-Kombination DH5 α ::P1 (V07), das beste Ergebnis liefert DH10B::P1 (V08) mit einem hohen Wert für das Wachstum ($F_{OD} = 3,7$) und ebenso einen hohen Wert für die pDNA-Ausbeute (10,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Die Ausbeute ist zwar für V09 am höchsten (13,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), allerdings ist im Vergleich zu V08 kaum Wachstum ($F_{OD} = 1,4$) zu verzeichnen.

Tab. 30: Theoretische Zielgrößen laut MODDE® *Optimizer* für V07 bis V09.

Versuch	F_{OD} [-]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
V07	1,3	3,2
V08	3,7	10,4
V09	1,4	13,5

Die Medienoptimierungen des Plasmid 1 mit Glucose und Glycerin als kombinierte C-Quelle zeigen deutlich stärkere Unterschiede in den Ergebnissen (Abb. 12) als in der ersten Optimierung (Abb. 11).

Auf den ersten Blick fällt auf, das DH5 α ::P1 (V07) im Gegensatz zu DH10B::P1 und Stbl3::P1 viel geringere Werte für F_{OD} und pDNA-Ausbeute (C_{pDNA}) liefert. Die Werte für F_{OD} erstrecken sich im Bereich von 0 bis 1,3 und für die pDNA-Ausbeute von 2,2 bis 3,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. DH10B weist Werte von F_{OD} von 0,8 bis 4,3 und pDNA-Ausbeuten von 4,0 bis 9,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Stbl3::P1 kann ebenso wie DH5 α ::P1 keine guten Werte für das Wachstum liefern ($F_{OD} = 0,0 - 1,8$), überragt aber dennoch mit pDNA-Ausbeuten von 7,7 bis 13,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In den Optimierungsversuchen mit Plasmid 1 stellt die Ausbeute von 13,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ den höchsten Wert dar. Allerdings tritt diese Konzentration im Zusammenhang mit geringem Wachstum auf ($F_{OD} = 1,7$).

Das N1-Experiment entspricht bei allen Versuchen wieder dem Grundmedium ohne Zusätze der Faktoren x_1 bis x_5 , das bedeutet auch ohne C-Quelle. Die Experimente N22 bis N24 stellen die *Center Point*-Experimente mit jeweils der mittleren Konzentration jedes Faktors dar.

DH5 α ::P1 (V07)

Unter limitierenden Bedingungen (N1) tritt geringes Wachstum und eine leichte Erhöhung der pDNA-Ausbeute auf 2,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ein. Die Zusammensetzung aus Thiamin und Glycerin in Experiment N10 führt relativ zu maximalem Wachstums ($F_{OD} = 1,3$) sowie zur maximalen pDNA-Ausbeute von 3,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Die geringste pDNA-Ausbeute von 2,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ wird ohne Thiamin, Prolin und Glucose in Experiment N15 erzeugt. Eine mittlere Kombination der Faktoren und der maximalen Leucin-Konzentration von 1 g L^{-1} führt zu minimalem Wachstum.

Die statistische Auswertung bestätigt die Abhängigkeit der pDNA-Ausbeute von Thiamin und Glycerin sowie den negativen Effekt von hohen Leucin-Konzentrationen auf das Wachstum (Anhang, V07).

DH10B::P1 (V08)

Wie in Abb. 12 zu sehen ist, führen die Versuchsbedingungen für DH10B::P1 für F_{OD} und für die pDNA-Ausbeute zu guten Ergebnissen. Beide Zielgrößen nehmen moderate Werte an.

Der Aminosäure- und C-Quellenmangel wirkt sich mit schlechtem Wachstum ($F_{OD} = 0,9$) aber einer relativ hohen Plasmid-Ausbeute von 6,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aus. Geringes Wachstum tritt außerdem in den Experimenten N8 und N15 auf, in beiden Medien sind kein Leucin und keine Glucose enthalten. Mit maximalem Wachstum reagiert der Stamm DH10B bei einer Kombination aus allen Faktoren. Ohne den Zusatz von Glucose aber allen anderen Komponenten wird die höchste Ausbeute von 9,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (N5) erreicht. Die Qualität der pDNA leidet unter dem Nährstoffmangel, dennoch liefert das Experiment N5 mit der höchsten Ausbeute eine Qualität von 97 %.

Die statistische Auswertung mit MODDE[®] bestätigt für DH10B die Abhängigkeit des Wachstums von Glucose sowie die Abhängigkeit der Ausbeute von Glycerin (Anhang, V08). Die Optimierung liefert ein optimales Medium, indem beide C-Quellen enthalten sind (vgl. Tab. 29).

Stbl3::P1 (V09)

Unter Mangel an Glucose und Aminosäuren wächst Stbl3 fast gar nicht und produziert relativ betrachtet wenig pDNA (7,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Das beste Wachstum wird in den Experimenten N17 bis N24 beobachtet, diese Experimente werden mit allen Zusätzen durchgeführt. N17 setzt sich aus den mittleren Konzentrationen von Leucin, Histidin, Glucose und Glycerin und der maximalen Prolin-Konzentration von 2 g L^{-1} zusammen. Dieses Experiment liefert die höchste pDNA-Ausbeute von 13,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ohne den Zusatz von Prolin (N2 und N13) werden das Wachstum und die Ausbeute negativ beeinflusst.

Laut MODDE[®] hängen Wachstum und pDNA-Ausbeute stark von Prolin und Leucin ab. Glucose übt einen positiven Effekt auf das Wachstum aus, während Glycerin einen positiven Effekt auf die pDNA-Ausbeute bewirkt (Anhang, V09).

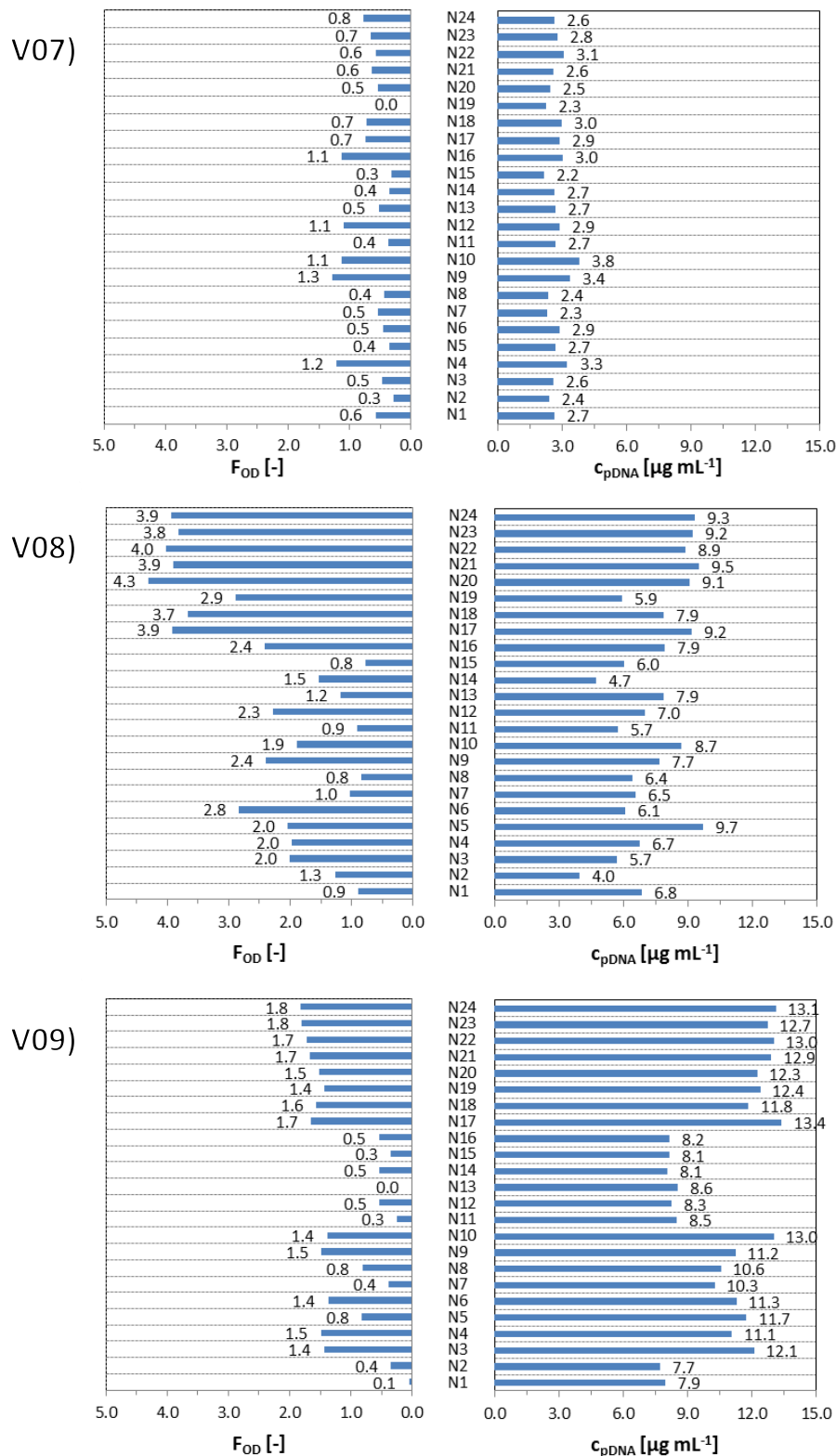


Abb. 12: Ergebnisse für die Optimierung des Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit kombinierter C-Quelle für V07 bis V09.

In der Abbildung werden die Ergebnisse der zweiten Optimierung für F_{OD} und die pDNA-Ausbeute (c_{pDNA}) von V07 bis V09 gezeigt. Der Wert F_{OD} gibt an wie stark sich die End-OD bezogen auf OD_0 erhöht, c_{pDNA} gibt die Ausbeute in $\mu\text{g mL}^{-1}$ an. Die Medien setzen sich aus bis zu drei angepassten Zusätzen sowie zwei verschiedenen C-Quellen (Glucose und Glycerin) zusammen. Die höchste Ausbeute wird in V09, N17 mit $13,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht, allerdings ist der Wert für F_{OD} mit 1,7 im Vergleich zu den Ergebnissen aus V08 sehr niedrig. V08 liefert gute Ergebnisse für beide Zielgrößen.

Diskussion

Die zweite Optimierung des Mediums mit kombinierter C-Quelle aus Glycerin und Glucose liefert das beste Ergebnis ebenfalls für die Kombination DH10B::P1 (V08). Das optimale Medium enthält $0,6 \text{ gL}^{-1}$ Thiamin, $0,5 \text{ gL}^{-1}$ Leucin, $0,43 \text{ gL}^{-1}$ Isoleucin, 10 gL^{-1} Glucose und $8,6 \text{ gL}^{-1}$ Glycerin. Die Zielgröße $F_{OD} = 3,7$ konnte erhöht werden und pDNA-Ausbeute = $10,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ bleibt gleich zu der ersten Optimierung. Die Kombination der C-Quellen wirkt sich positiv auf das Wachstum aus.

Die Kombination aus den Genen von *relA* und *spoT* des Stammes DH10B führt zu hohen praktischen Ausbeuten (pDNA-Ausbeute = $9,7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) unter Mangel an Aminosäuren und ohne Glucose. Allerdings ist das Ergebnis etwas niedriger als die Ausbeute in der ersten Optimierung, die nur unter Aminosäuremangel erzielt wird.

Wird das Wachstum von zu schnell, kann beobachtet werden, dass die Qualität der pDNA sinkt. DH10B::P1 verzeichnet die höchsten Wachstumsraten und büßt in der Qualität ein. Die Replikation hält mit der Zellteilung nicht mit und synthetisiert die Plasmide nicht komplett (vgl. Lara & Ramirez, 2012).

Für Stb13::P1 wird die höchste pDNA-Ausbeute von $13,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ vorausgesagt (Tab. 30) und auch die höchste praktische Ausbeute erzielt ($13,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), allerdings liegt der Wert für F_{OD} mit 1,4 sehr niedrig.

Die Kombination aus DH5 α mit Plasmid 1 schneidet mit den geringen Werten beider Zielgrößen ($F_{OD} = 1,3$; pDNA-Ausbeute = 3,2) am schlechtesten ab.

Auch in diesen Versuchen bestätigt sich die Tatsache, dass die Auxotrophien die Reaktion der Stämme auf die Medien stark beeinflussen. Eine Erhöhung der Konzentration von Prolin auf $1,5 \text{ gL}^{-1}$ steigert die Ausbeute, sodass die theoretischen Werte von Stb13::P1 von $12,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in der ersten Optimierung auf $13,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ gestiegen sind. Des Weiteren wirkt sich

Im Großen und Ganzen wurden in der zweiten Optimierung unter Einsatz einer kombinierten C-Quelle aus Glucose und Glycerin Ausbeuten erreicht, die mit $13,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ für Stb13::P1 mehr als drei Mal höher sind als in einem Komplexmedium (Grunzel *et al.*, 2014).

Die Auswertung hat für DH10B::P1 eine Kombination aus gutem Wachstum und hoher pDNA-Ausbeute mit $10,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ geliefert. Diese Ausbeute liegt ebenfalls um mehr als den Faktor 2,5 höher als standardmäßige Ausbeute an pDNA (Grunzel *et al.*, 2014).

Die Verwendung von kombinierten C-Quellen erhöht die pDNA-Ausbeute und das Wachstum für Plasmid 1 und erscheint damit äußerst sinnvoll. Weiterhin werden trotz Anpassung der Medienbestandteile mit dem Stamm DH5 α keine Verbesserungen für die Ausbeuten von Plasmid 1 erzielt. Vermutlich ist nicht jede Kombination von Stamm und Plasmid kompatibel.

4.1.3 Scale-up von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben (V13)

Die optimierten Medienbedingungen aus dem *Optimizer*-Tool werden zunächst in der MTP durchgeführt. Anschließend soll gezeigt werden, dass sich die Fermentation in der MTP in den Schüttelkolben übertragen lässt. Dazu werden alle Bedingungen maßstabsgetreu vergrößert.

Aufgrund der theoretischen Werte für F_{OD} und pDNA-Ausbeute konnte eine klare Entscheidung für den *Scale-up* mit DH10B::P1 getroffen werden. Die Optimierungen aus 4.1.1 und 4.1.2 haben ergeben, dass die Medienzusammensetzungen in Tab. 31 die besten Ergebnisse für beide Zielgrößen F_{OD} und pDNA-Ausbeute liefern.

Tab. 31: Konzentrationen der Zusätze und theoretische Werte für F_{OD} und pDNA-Ausbeute für V13.

Faktor oder Zielgröße	Thiamin [gL ⁻¹]	Leucin [gL ⁻¹]	Isoleucin [gL ⁻¹]	Glucose [gL ⁻¹]	Glycerin [gL ⁻¹]	F_{OD} [-]	pDNA-Ausbeute [µg mL ⁻¹]
Theoretischer Wert	0,60	0,50	0,43	10,0	8,6	3,7	10,4

Die Versuche wurden entsprechend der Berechnungen in den Maßstäben MTP und Kolben durchgeführt. Die theoretischen und praktischen Ergebnisse für das Wachstum und die pDNA-Ausbeute sind in Abb. 13 dargestellt.

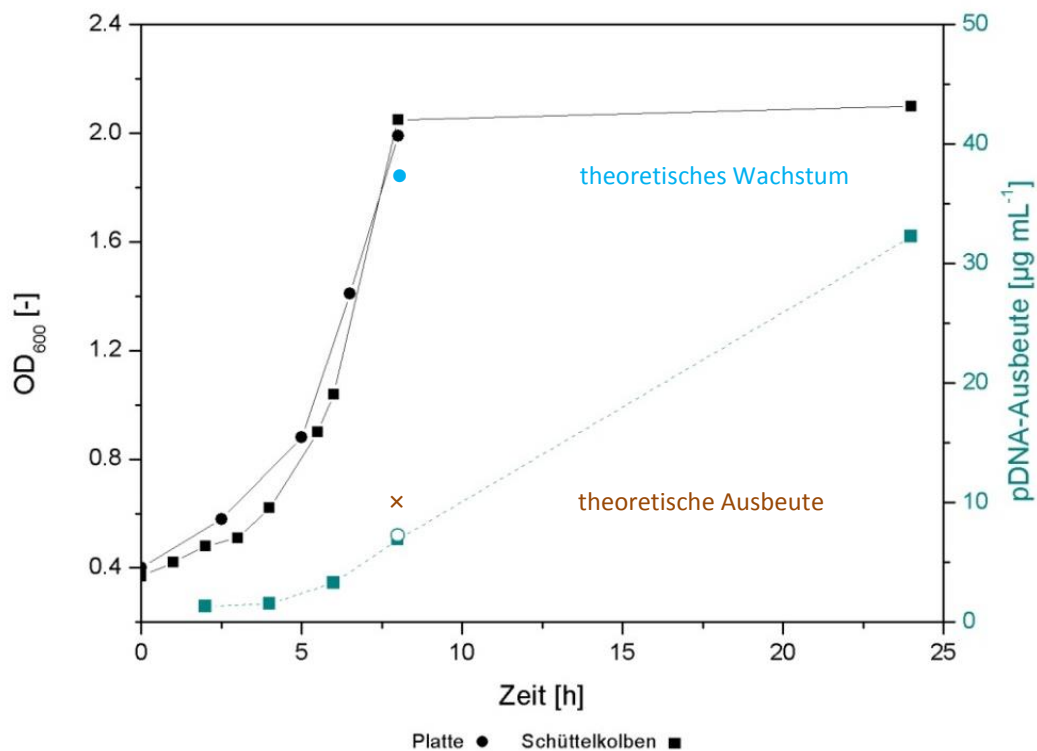


Abb. 13: V13: *Scale-up* (■) von DH10B::P1 und dem dazugehörigen Experiment in der Platte (●).

Gezeigt werden theoretisches (blau) und praktisches Wachstum (schwarz) sowie theoretische (braun) und praktische Produktausbeute (Cyan) des *Scale-up* von DH10B::P1 mit dem optimierten Medium in der MTP und im Schüttelkolben. Das Medium enthält neben den Komponenten des Grundmediums (vgl. Tab. 17) 0,6 gL⁻¹ Thiamin, 0,5 gL⁻¹ Leucin, 0,43 gL⁻¹ Isoleucin, 10 gL⁻¹ Glucose und 8,6 gL⁻¹ Glycerin. Im Schüttelkolben wird eine pDNA-Ausbeute von 32 µg mL⁻¹ bei einer OD₆₀₀ = 2,1 nach 24 h erreicht. Die Abbildung bestätigt die Übertragung der Fermentation von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben, sowie die Anwendung von *DoE* zur Optimierung von Fermentationsmedien für die pDNA-Produktion.

Die Durchführung der Versuche liefert die in Tab. 32 gezeigten Werte für F_{OD} und die pDNA-Ausbeute. Die Werte für F_{OD} liegen für die Versuche in der Platte ($F_{OD} = 4,9$) und im Kolben ($F_{OD} = 5,5$) über dem theoretischen Wert von 3,7. Wie auch in Abb. 13 zu sehen ist, verläuft das Wachstum für beide Versuche sehr ähnlich. Das Ergebnis für die pDNA-Ausbeute liegt mit $6,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Kolben etwas unter dem theoretischen Wert von $10,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Der Wert für die pDNA-Ausbeute in der MTP liegt mit $8,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ noch im Bereich der Standardabweichung.

Tab. 32: Ergebnisse für den *Scale-up* von V13.

Maßstab	$F_{OD, 8h}$ [-]	pDNA-Ausbeute _{8h} [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
Platte	4,9	8,4
Kolben	5,5	6,9

Der *Scale-up* wird bis zu 24 Stunden weitergeführt. Die pDNA-Ausbeute steigt sehr stark auf $32,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ an, während das Wachstum stagniert. Die Qualität bleibt dabei konstant sehr gut bei knapp 96 % (Tab. 33). Der spezifische pDNA-Gehalt steigt von $9,9 \mu\text{g}(\text{mg BTM})^{-1}$ nach 8 Stunden auf $26,9 \mu\text{g}(\text{mg BTM})^{-1}$ nach 24 Stunden an.

Tab. 33: *Scale-up* von DH10B::P1 (V13).

Zeit [h]	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD_{600} [-]	Spezifische Ausbeute [$\text{mg pDNA} (\text{g BTM})^{-1}$]
8	98,8	6,9	2,1	9,9
24	95,7	32,3	2,1	26,9

Diskussion

Die Übertragung von der MTP in den Schüttelkolben mit dem optimierten Medium war im Großen und Ganzen erfolgreich. Obwohl die vorausgesagte Ausbeute von $10,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ nach 8 Stunden im Rahmen der Messgenauigkeit nur in der Platte erreicht wurde, lieferte der *Scale-up* von DH10B::P1 nach 24 Stunden eine erhebliche Steigerung der pDNA-Ausbeute auf $32,3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Das Medium eignet sich für die Ausnutzung der positiven Eigenschaften von DH10B für die pDNA-Produktion. Die Gene *relA* und *spoT* führen dazu, dass trotz stagnierendem Wachstum die pDNA-Ausbeute um den Faktor 5 steigt. Der Einsatz von Glucose und Glycerin als C-Quelle unterstützt diesen Effekt zusätzlich, denn trotz der ausreichenden C-Quelle halten sich Wachstum und pDNA-Produktion so die Waage, dass zu keinem Zeitpunkt eine qualitativ minderwertige pDNA-Ausbeute entsteht (vgl. Tab. 33). Trotz dieser sehr guten Ergebnisse für die pDNA-Ausbeute ist nicht zu vergessen, dass das Modell aus MODDE® Trends voraussagt. Im Kapitel 4.3 wird dieser Aspekt diskutiert.

In der Literatur wird ein optimales Verhältnis von C- zu N-Quelle 2,78:1 beschrieben. Das hier eingesetzte Medium weist ein Verhältnis von 7,5:1 auf und liegt damit fast drei Mal höher. Allerdings wird in das Verhältnis von 2,78:1 unter Verwendung von Glucose angegeben.

Die erzielte pDNA-Ausbeute ist 8-mal höher als der Literaturwert von $4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Die spezifische Ausbeute von fast $27 \mu\text{g pDNA} (\text{mg BTM})^{-1}$ wird selten im batch-Betrieb erreicht, im fed-batch-Betrieb konnten in einem definierten Medium $39 \mu\text{g pDNA} (\text{mg BTM})^{-1}$ erreicht werden (Carnes *et al.*, 2010).

Die verschiedenen Genotypen von Stämmen bieten für die pDNA-Produktion gute Ansatzpunkte zur Ausbeutesteigerung. DH10B kann dazu ausgenutzt werden sehr hohe Ausbeuten unter limitierenden Bedingungen zu erreichen. Indem höhere Konzentration eingesetzt werden, könnten höhere pDNA-Ausbeuten und höhere OD_{600} -Werte erreicht werden. Fraglich ist, wie sich Wachstum und pDNA-Ausbeute bei höheren Anfangskonzentrationen im Medium verhalten. Eine Ausweichmöglichkeit bietet der fed-batch Betrieb mit kontinuierlicher Zufütterung der benötigten Medienbestandteile. Der *Scale-up* wird in 4.4 bewertet und diskutiert.

4.2 Plasmid 2

Der Aufbau von Plasmid 2 unterscheidet sich in dem Sinne von Plasmid 1, dass es die doppelte Information mit zwei *genes of interest* und den dazugehörigen Promotoren trägt. Das Plasmid wird als bicistronisch oder multivalent bezeichnet. Im Vorfeld der Versuche ist nicht klar, ob sich die zwei Plasmide trotz ähnlicher Größe auch vergleichbar in der Medienoptimierung verhalten.

In den Medienoptimierungen wurden ebenfalls die Stämme DH5 α , DH10B und Stbl3 eingesetzt und ergeben mit Plasmid 2 die Kombinationen DH5 α ::P2, DH10B::P2 und Stbl3::P2.

Schon während der Zellbankablage haben die Plasmide unterschiedliche Eigenschaften in den Stämmen gezeigt. Zunächst wurde eine Transformation mit gleichen Konzentrationen der Plasmide in die Stämme DH5 α , DH10B und Stbl3 durchgeführt. Die darauf folgende Vor- und Hauptkultur diente der Zellbankablage. Hierbei gab es Schwierigkeiten mit der Stamm Plasmid-Kombination DH5 α ::P2, da diese Stamm Plasmid-Kombination mit einer sehr geringen Wachstumsrate von 0,18 h⁻¹ gewachsen ist. Daher wurde die Zellbank von DH5 α ::P2 mit einer niedrigen OD₆₀₀ abgelegt. Da den Versuchen in der MTP immer eine Vorkultur voran geht, werden die Versuche trotzdem mit dieser Zellbank durchgeführt. Trotzdem fiel auch bei den Vorkulturen auf, dass die OD₆₀₀ den Wert 2,0 nicht überschritt.

Im Allgemeinen zeigten auch die anderen Stämme mit Plasmid 2 ein geringeres Wachstum in der Vorkultur als mit Plasmid 1.

Die Medienoptimierungen mit den Stamm Plasmid-Kombinationen DH5 α ::P2, DH10B::P2 und Stbl3::P2 wurden dennoch entsprechend denen von Plasmid 1 durchgeführt. Die erste Optimierung wurde ebenfalls mit den Faktoren Thiamin (0 – 0,1 gL⁻¹), Histidin (0 – 0,5 gL⁻¹), Leucin (0 – 1 gL⁻¹), Prolin (0 – 1 gL⁻¹) und Isoleucin (0 – 0,5 gL⁻¹) durchgeführt. Die Auswahl der Faktoren erfolgte wie für Plasmid 1.

Die zweite Optimierung wurde auf Grundlage der ersten Optimierung durchgeführt und lieferte drei Faktoren in angepassten Konzentrationsbereichen sowie zusätzlich die C-Quellen Glucose (0 – 8 gL⁻¹) und Glycerin (0 – 10 gL⁻¹). Für DH5 α ::P2 wurden Thiamin, Prolin und Histidin, für DH10B::P2 Thiamin, Leucin und Isoleucin und für Stbl3::P2 Leucin, Prolin und Isoleucin weiter optimiert. Der Konzentrationsbereich von Thiamin wurde auf 0,5 gL⁻¹, die Konzentrationsbereiche von Isoleucin und Histidin auf 1 gL⁻¹ und der Konzentrationsbereich von Prolin auf 2 gL⁻¹ erhöht. Die Faktoren von DH5 α ::P2 und Stbl3::P2 weichen zur zweiten Optimierung mit Plasmid 1 ab. Für die zweite Optimierung von DH5 α ::P2 wurde als dritter Faktor Histidin zugesetzt während mit Plasmid 1 Leucin hinzugefügt wurde. Als dritter Faktor für die zweite Optimierung von Stbl3::P2 wurde Isoleucin statt Histidin eingesetzt.

Für den *Scale-up* wurden die besten Stamm Plasmid-Kombinationen aus DH5 α ::P2, DH10B::P2 und Stbl3::P2 ausgewählt und mit dem optimierten Medium aus der ersten bzw. zweiten Optimierung zunächst in der MTP und dann im Schüttelkolben durchgeführt.

4.2.1 Optimierung des Mediums mit Glucose als C-Quelle (V04 bis V06)

Die Durchführung der Versuche und Auswertung der Optimierung des stöchiometrischen Mediums nach Wang *et al.* (2001) lieferte für die Stamm Plasmid-Kombinationen DH5 α ::P2 (V04), DH10B::P2 (V05) und Stbl3::P2 (V06) Modelle mit guter Modelleignung (Tab. 34). Lediglich die Modellvalidität des Modells für die pDNA-Ausbeute von V04 lag an der unteren Grenze. Die Reproduzierbarkeit lag allerdings bei 0,99 sodass das Modell trotzdem als gut bewertet werden kann.

Tab. 34: Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung für V04 bis V06.

Versuch	R ²		Q ²		MV		RP		Modelleignung	
	F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute	
V04 (DH5 α ::P2)	0,91	0,92	0,76	0,63	0,47	0,25	0,98	0,99	Ja	Ja
V05 (DH10B::P2)	0,97	0,87	0,94	0,69	0,78	0,59	0,98	0,96	Ja	Ja
V06 (Stbl3::P2)	0,89	0,82	0,71	0,68	0,51	0,82	0,96	0,89	Ja	Ja

Die Auswertung mit dem *Optimizer*-Tool ergibt die Faktoreinstellungen und theoretischen Zielgrößen in Tab. 35. Für alle Stämme mit Plasmid 2 scheidet Histidin im optimalen Medium aus. Prolin taucht ausschließlich im Medium von Stbl3 auf. Die gemeinsame Auswertung ergibt das Medium der Schnittmenge (vgl. Tab. 36). Im Vergleich zu den separaten Optimierungen liefert die Schnittmenge vergleichbare theoretische Werte für F_{OD} und die pDNA-Ausbeute.

Tab. 35: Faktoreinstellungen und theoretische Zielgrößen laut MODDE® *Optimizer* für V04 bis V06.

Versuch	Thiamin [g L ⁻¹]	Histidin [g L ⁻¹]	Leucin [g L ⁻¹]	Prolin [g L ⁻¹]	Isoleucin [g L ⁻¹]	F _{OD} [-]	pDNA-Ausbeute [μ g mL ⁻¹]
V04	0,60	-	0,48	-	-	5,9	6,0
V05	0,10	-	0,32	-	0,16	7,0	5,8
V06	0,09	-	0,50	0,78	0,30	3,7	5,3

Tab. 36: Faktoreinstellungen der theoretischen Zielgrößen für die Schnittmenge von V04 bis V06.

Versuch	Thiamin	Histidin	Leucin	Prolin	Isoleucin	F _{OD} [-]	pDNA-Ausbeute [μ g mL ⁻¹]
V04						4,4	4,9
V05	0,50 gL ⁻¹	0,40 gL ⁻¹	0,49 gL ⁻¹	0,61 gL ⁻¹	0,36 gL ⁻¹	7,0	4,5
V06						3,8	6,4

Ebenso wie mit Plasmid 1 zeigen sich auch mit Plasmid 2 und den eingesetzten Stämmen sehr unterschiedliche Ergebnisse für die verschiedenen Medienzusammensetzungen (vgl. Abb. 14).

Die Werte für F_{OD} erstrecken sich für DH5 α ::P2 von 0,3 bis 4,5, also deutlich höher als mit Plasmid 1. Für DH10B::P2 liegen die Werte für F_{OD} im Bereich von 1,6 bis 4,4 und für Stbl3::P2 von 0,0 bis 3,7. Generell waren mit Plasmid 2 stärkere Wachstumseffekte zu beobachten. Die stärksten Effekte durch die verschiedenen Medienzusammensetzungen treten bei DH5 α ::P2 auf, die schwächsten bei DH10B::P2.

Die Werte für die pDNA-Ausbeute (c_{pDNA}) liegen für DH5 α ::P2 im Bereich von 2,0 bis 4,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, für DH10B::P2 im Bereich von 2,6 bis 4,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und für Stb13::P2 im Bereich von 2,6 bis 5,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Für DH5 α und Stb13 wurde eine Verdopplung der Ausbeute im Rahmen der Experimente erzeugt.

Das N1-Experiment entspricht bei allen Versuchen dem Grundmedium ohne Zusätze der Faktoren x_1 bis x_5 . Die Experimente N22 bis N24 sind die Center Point-Experimente mit jeweils der mittleren Konzentration jedes Faktors.

DH5 α ::P2 (V04)

Bei DH5 α ::P2 treten unter Einsatz von Thiamin, Histidin, Leucin, Prolin und Isoleucin in mittleren Konzentrationen (N22, N24) die maximalen Werte für F_{OD} und pDNA-Ausbeute auf. Ohne den Zusatz von Thiamin in Experiment N2 tritt der geringste Wert für das Wachstum von $F_{OD} = 0,3$ auf. Die kleinste pDNA-Ausbeute von 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ wurde ohne den Zusatz von Histidin, Leucin und Isoleucin in Experiment N9 generiert.

Die statistische Auswertung ergibt eine Abhängigkeit für beide Zielgrößen von Thiamin und Leucin. Prolin übt ebenfalls einen Effekt aus, liefert in der Optimierung allerdings keine Maximierung von den Zielgrößen und ist daher nicht im optimalen Medium mit 0,6 g L^{-1} Thiamin und 0,48 g L^{-1} Leucin vorhanden (Anhang, V04).

DH10B::P2 (V05)

Experiment N1 liefert eine pDNA-Ausbeute von 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bei $F_{OD} = 2,7$ ohne den Zusatz von einer der fünf Faktoren. DH10B::P2 reagiert auf den Mangel an Thiamin, Histidin und Isoleucin mit minimalem Wachstum sowie minimaler Ausbeute (N14) während der Zusatz von Thiamin und Histidin zu einer maximalen Ausbeute von 4,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Experiment N7 führt. Eine Kombination aus Thiamin und Isoleucin führt zu maximalem Wachstum in Experiment N10. Die Qualität der pDNA sinkt in den Experimenten N17 bis N24 unter 50 %. Das optimale Medium setzt sich laut der Berechnung des *Optimizer*-Tools aus den abhängigen Faktoren 1 g L^{-1} Thiamin, 0,32 g L^{-1} Leucin und 0,16 g L^{-1} Isoleucin zusammen (Anhang, V05),

Stb13::P2 (V06)

Stb13::P2 liefert ohne den Zusatz der fünf Faktoren eine mittlere Ausbeute von 3,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pDNA während so gut wie kein Wachstum erkennbar ist ($F_{OD} = 0,1$). Experiment N5 zeigt, dass ohne den Zusatz von Prolin Stb13::P2 nicht wächst und ohne Prolin, Histidin und Isoleucin am wenigsten Replikation betreibt (N8). Ein *Center Point*-Experiment liefert mit mittleren Konzentrationen der fünf Zusätze die höchste Ausbeute von 5,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Maximales Wachstum wird ohne den Zusatz von Histidin erreicht (N3).

Die statistische Auswertung ergibt, dass beide Zielgrößen stark abhängig von Prolin, Leucin und Thiamin sind. Die optimale Zusammensetzung des Mediums besteht aus 0,09 g L^{-1} Thiamin, 0,5 g L^{-1} Leucin, 0,78 g L^{-1} Prolin und 0,3 g L^{-1} Isoleucin (Anhang, V06).

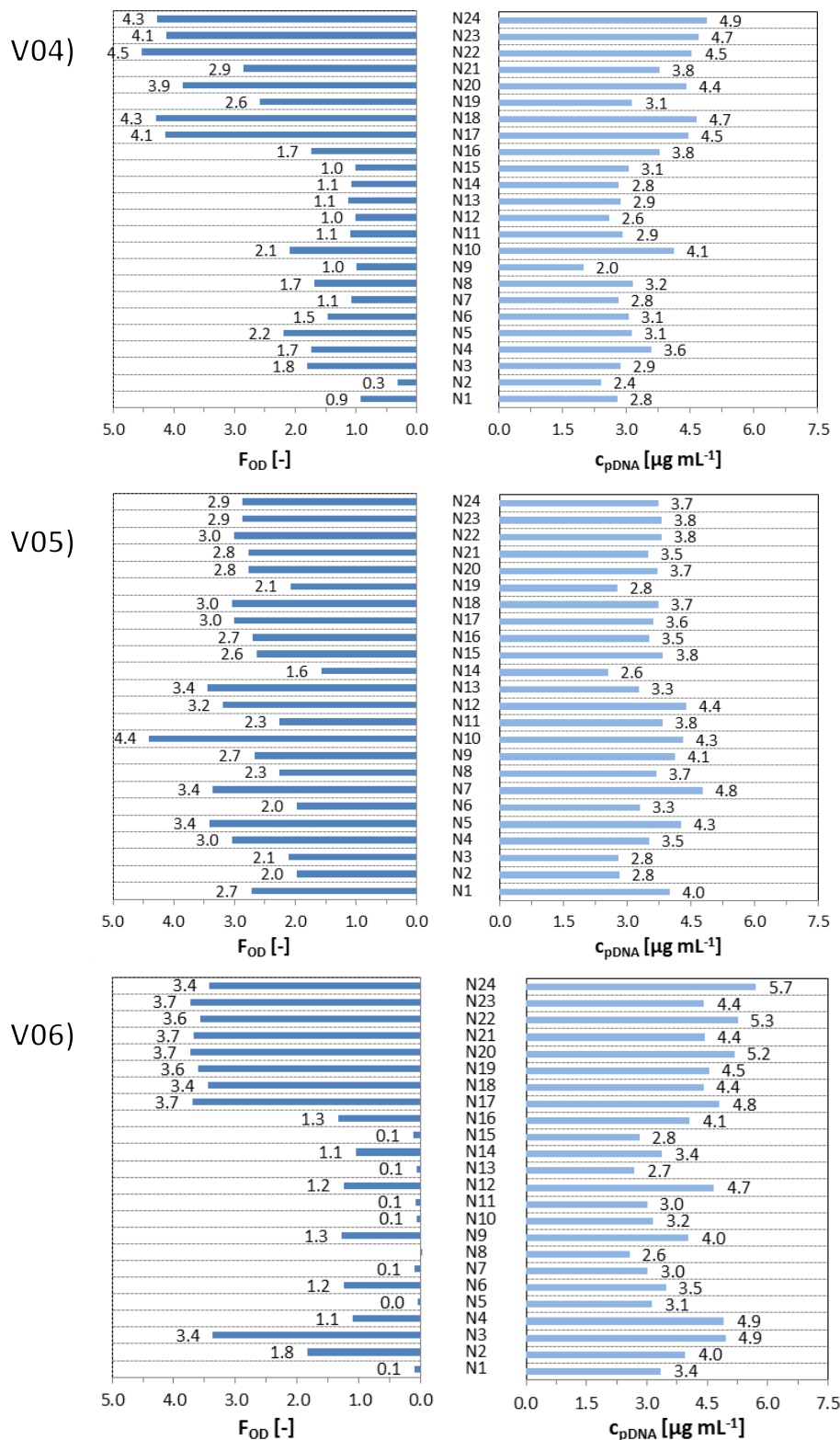


Abb. 14: Ergebnisse für die Optimierung des Mediums nach Wang *et al.* (2001) für V04 bis V06.

In der Abbildung werden die Ergebnisse für F_{OD} und die pDNA-Ausbeute (c_{pDNA}) von V04 bis V06 gezeigt. Der Wert F_{OD} gibt an wie stark sich die End-OD bezogen auf OD_0 erhöht, c_{pDNA} gibt die Ausbeute in $\mu\text{g mL}^{-1}$ Medium an. Die Abbildung verdeutlicht, dass die verschiedenen Stamm Plasmid-Kombinationen von V04, V05 und V06 unterschiedlich auf die Medienzusammensetzungen reagieren, die höchste pDNA-Ausbeute wird in V06, N24 mit $5,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht. Dabei haben die verschiedenen Experimenten Nummern (z.B. N1) die gleiche Medienzusammensetzung. Vergleichen mit den Experimenten V01 bis V03 werden nur halb so hohe Ausbeuten erzielt.

Diskussion

Die Medienoptimierungen für Plasmid 2 liefern Ausbeuten, die mit bis zu $5,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ um den Faktor 2 kleiner sind als die Ausbeuten von Plasmid 1 mit bis zu $13,4 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Unter Einbeziehung beider Zielgrößen ergeben sich für die erste Medienoptimierung zwei gute Ergebnisse mit den Stamm Plasmid-Kombinationen DH5 α ::P2 (V04) und DH10B::P2 (V05). Die Ergebnisse von DH5 α sind interessant, da in den Versuchen mit Plasmid 1 keine Verbesserungen erzielt wurden. Für Plasmid 2 werden mit DH5 α vergleichbare Ergebnisse wie in den anderen Stämmen erzielt.

DH5 α ::P2 und DH10B::P2 liefern theoretische Ausbeuten von $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $5,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ pDNA und hohe F_{OD} -Werte von 5,9 und 7,0. Theoretisch lassen sich in allen drei Stämme ähnliche Ausbeuten erreichen, allerdings sind größere Unterschiede im Wachstum zu erkennen. Stbl3 liefert theoretische Werte für das Wachstum, die mit $F_{\text{OD}} = 3,7$ um den Faktor 2 schlechter als von DH10B mit $F_{\text{OD}} = 7,0$. Da die pDNA-Ausbeute und das Wachstum weniger zwischen den Stämmen schwanken, lässt sich ein Medium bestimmen, das mit allen Stämmen gut kompatibel ist (Schnittmenge, Tab. 36). Dieses besteht aus $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Thiamin, $0,4 \text{ g L}^{-1}$ Histidin, $0,49 \text{ g L}^{-1}$ Leucin, $0,61 \text{ g L}^{-1}$ Prolin und $0,36 \text{ g L}^{-1}$ Isoleucin. Theoretischen sollen Wert für das Wachstum F_{OD} von 3,8 bis 7,0 erreicht werden und für die pDNA-Ausbeute Werte von $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Die Auswertung der Medienoptimierung bestätigt, dass alle Stämme die Aminosäuren benötigen, die sie selber nicht herstellen können. Dementsprechend enthält das optimierte Medium von DH5 α ::P2 $0,6 \text{ g L}^{-1}$ Thiamin, das optimierte Medium von DH10B::P2 $0,32 \text{ g L}^{-1}$ Leucin und das optimierte Medium von Stbl3::P2 $0,5 \text{ g L}^{-1}$ Leucin und $0,78 \text{ g L}^{-1}$ Prolin.

Im Zusammenhang mit dem Gen *relA* lässt sich bei DH5 α und DH10B pDNA-Synthese unter limitierenden Bedingungen beobachten. Stbl3 verzeichnet im Gegensatz zu DH5 α und DH10B ohne den Zusatz der benötigten Aminosäuren keinerlei Wachstum, da dieser Stamm den Mangel an zwei essentiellen Aminosäuren zu sehr belastet.

Stärkeres Wachstum korreliert bei DH10B (V05) mit einer qualitativ schlechteren pDNA (vgl. Anhang, Tab. A. 5). Dieser Effekt wird mit Stbl3 (V06) bei teilweise noch besserem Wachstum nicht beobachtet, die Qualität liegt durchgängig über 90 % (vgl. Anhang, Tab. A. 6).

Wie in den vorangegangenen Versuchen, tritt auch in dieser Versuchsreihe Histidin nicht als nötiger Zusatz für die pDNA-Produktion auf. Vielmehr taucht Isoleucin in V05 und V06 auf und beeinflusst Wachstum und pDNA-Ausbeute positiv (vgl. Huber, 2007).

Mit Plasmid 2 ließen sich praktisch nur moderate pDNA-Ausbeuten von $5,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ erzielen. Sie liegen kaum über dem Literaturwert von $4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Das optimierte Medium verspricht eine minimale Steigerung auf $6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Daraus lässt sich schließen, dass die Performance abhängig vom Plasmid ist. So lässt sich auch im Gegensatz zu Plasmid 1, ein Medium finden, das für die drei verwendeten Stämme mit Plasmid 2 kompatibel ist.

Die Fermentation von multivalenten Plasmiden wird in der Literatur bisher nicht in den Vergleich mit der Fermentation zu Plasmiden mit einem therapeutischen Gen gesetzt. Zusätzlich ist unklar, wie die zwei Gensequenzen und deren Promotoren den Metabolismus des Stammes beeinflussen oder in irgendeiner Weise interagieren.

Die nächste Optimierung mit kombinierter C-Quelle wird äquivalent zu der des Plasmid 1 durchgeführt. Die Konzentrationen der Zusätze werden wie in der zweiten Optimierung von Plasmid 1 angepasst.

4.2.2 Optimierung des Mediums mit kombinierter C-Quelle (V10 bis V12)

Die Versuche V10 bis V12 bauen auf den Versuchen V04 bis V06 auf. Die Auswertung von V04 bis V06 hat die Faktoren eliminiert die nicht signifikant für die Optimierung des Mediums waren. Zusätzlich dazu wurden Glucose und Glycerin als Faktoren in die Medienoptimierung aufgenommen. Mithilfe von MODDE® wurden die Daten der Versuche an Modelle angepasst, welche anhand der Kenngrößen in Tab. 37 bewertet werden. Für die Versuche V10 (DH5α::P2), V11 (DH10B::P2) und V12 (Stbl3::P2) wurden Modelle mit guter Modelleignung aufgestellt. Abgesehen von der Modellvalidität der Zielgröße F_{OD} von V11 liegen alle Kenngrößen im vorgegebenen Bereich. Die hohen Werte für die Reproduzierbarkeit wiegen die niedrigen Werte für die Modellvalidität auf.

Tab. 37: Kenngrößen zur Bewertung der Modelleignung für V10 bis V12.

Versuch	R ²		Q ²		MV		RP		Modelleignung	
	F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute		F _{OD} /Ausbeute	
V10 (DH5α::P2)	0,97	0,90	0,96	0,68	0,28	0,63	0,99	0,95	Ja	Ja
V11 (DH10B::P2)	0,99	0,93	0,98	0,79	0,05	0,42	0,99	0,99	Ja	Ja
V12 (Stbl3::P2)	0,92	0,95	0,87	0,89	0,26	0,49	0,99	0,99	Ja	Ja

Die Optimierung liefert die in Tab. 38 aufgeführten Faktoreinstellungen und die Zielgrößen in Tab. 39. Lediglich für V10 ergibt sich ein Medium mit der Kombination aus Glucose und Glycerin. Histidin tritt in keiner Kombination auf, während in allen Medien Thiamin enthalten ist.

Tab. 38: Faktoreinstellungen laut MODDE® *Optimizer* für V10 bis V12.

Versuch	Thiamin	Histidin	Leucin	Prolin	Isoleucin	Glucose	Glycerin
	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]	[gL ⁻¹]
V10	0,50	-	-	-	-	7,2	10,0
V11	0,70	-	0,70	-	0,46	10,0	-
V12	0,10	-	0,75	1,50	-	8,0	-

Tab. 39: Theoretische Zielgrößen laut MODDE® *Optimizer* für V10 bis V12.

Versuch	F _{OD} [-]	pDNA-Ausbeute [µg mL ⁻¹]
V10	1,9	5,3
V11	5,3	3,5
V12	3,1	12,4

Verglichen mit der vorangegangenen Optimierung wurden für die Stämme DH5α und DH10B abweichende Ergebnisse erzielt. In diesen Versuchen wurden besonders für DH5α höhere Ausbeuten mit 5,8 µg mL⁻¹ pDNA (4,9 µg mL⁻¹ pDNA in der ersten Optimierung) und für DH10B mit 3,5 µg mL⁻¹ pDNA (4,8 µg mL⁻¹ pDNA in der ersten Optimierung) eher niedrigere Ausbeuten erzielt.

Der Effekt des Wachstums von DH5α::P2 ist im Schnitt halb so hoch wie das von den Stämmen DH10B und Stbl3. Dennoch wird mit DH5α::P2 die höchste Ausbeute von 5,8 µg mL⁻¹ pDNA erzielt.

Die Werte von F_{OD} bewegen sich für DH5α::P2 im Bereich von 1,1 bis 2,4, für DH10B::P2 im Bereich von 0,4 bis 5,4 und für Stbl3::P2 im Bereich von 0,0 bis 5,5. Damit zeigen sich für Stbl3::P2 die größten Effekte auf das Wachstum, die zweitgrößten für DH10B::P2. Die verschiedenen Medienzusammensetzungen wirken sich am wenigsten auf das Wachstum von DH5α aus. Allerdings zeigt sich generell für DH5α schlechteres Wachstum.

Die Werte für die pDNA-Ausbeute (c_{pDNA}) liegen für DH5 α ::P2 im Bereich von 3,4 bis 5,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, für DH10B::P2 im Bereich von 1,5 bis 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und für StbI3::P2 im Bereich von 1,7 bis 4,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Damit werden für DH10B mit Plasmid 2 die geringsten Ausbeuten erzielt.

Das N1-Experiment entspricht bei allen Versuchen dem Grundmedium ohne Zusätze der Faktoren x_1 bis x_5 , das bedeutet auch ohne C-Quelle. Die Experimente N22 bis N24 stellen die *Center Point*-Experimente mit jeweils der mittleren Konzentration jedes Faktors dar.

DH5 α ::P2 (V10)

Das Wachstum weist sein Minimum ohne Zusätze der Faktoren auf (N1), während maximales Wachstum ohne den Zusatz von Prolin zu verzeichnen ist (N3 und N20). Auch die pDNA-Ausbeute wird negativ von dem Zusatz von Prolin beeinflusst (N7 und N13). Die Kombination der maximalen Konzentrationen von Thiamin, Histidin, Glucose und Glycerin führt zu der höchsten Ausbeute von 5,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Die statistische Auswertung bestätigt die Abhängigkeit der pDNA-Ausbeute von allen Faktoren. Die Werte von F_{OD} werden dagegen nur von Thiamin, Histidin und Glucose beeinflusst.

Dennoch liefert ein Medium, das ausschließlich aus Thiamin und den C-Quellen Glucose und Glycerin besteht, die besten Ergebnisse für beide Zielgrößen (Anhang, V10).

DH10B::P2 (V11)

Auch für DH10B::P2 zeigt der Zusatz von Thiamin einen positiven Effekt auf das Wachstum (N17) sowie einen negativen Effekt ohne den Zusatz (N2). Beinhaltet das Medium nur Isoleucin und Glycerin wird die geringste pDNA-Ausbeute erzielt. Die Zusammensetzung von Experiment N17 zeigt ebenso wie für das Wachstum die höchste pDNA-Ausbeute. Unter limitierenden Bedingungen (N1) findet moderates Wachstum und eine mittlere pDNA-Produktion statt.

Die statistische Auswertung mit MODDE[®] liefert für Wachstum und pDNA-Ausbeute die gleichen signifikanten Faktoren Thiamin, Glucose und Glycerin. Sie haben neben den anderen Faktoren den größten Effekt. Das optimale Medium mit Thiamin, Isoleucin, Leucin und Glucose liefert theoretisch die besten Ergebnisse (Anhang, V11).

StbI3::P2 (V12)

Betrachtet man Abb. 15 fällt im Gegensatz zu V10 und V11 auf, dass in mehreren Experimenten gar kein Wachstum auftritt (N1, N13, N14, N15, N16). In diesen Experimenten fehlt Prolin, welches StbI3 nicht selber synthetisieren kann. Der Einsatz von mittleren Konzentrationen aller Faktoren führt zum besten Ergebnis für das Wachstum (N20). Das Maximum der pDNA-Ausbeute wird in Experiment N3 mit 4,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ohne den Zusatz von Leucin und bei schlechtem Wachstum erreicht. N1 entspricht einer Limitierung der C-Quelle und Aminosäuren, die vom Stamm selbst nicht hergestellt werden können. Hier ist kein Wachstum zu verzeichnen, trotzdem wird eine moderate Menge pDNA hergestellt (2,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Die statistische Auswertung unterstreicht die Abhängigkeit des Wachstums von Glucose und von den Aminosäuren Prolin und Leucin, die StbI3 nicht synthetisieren kann. Die pDNA-Ausbeute ist abhängig von Prolin, Leucin und von Glycerin (Anhang, V12).

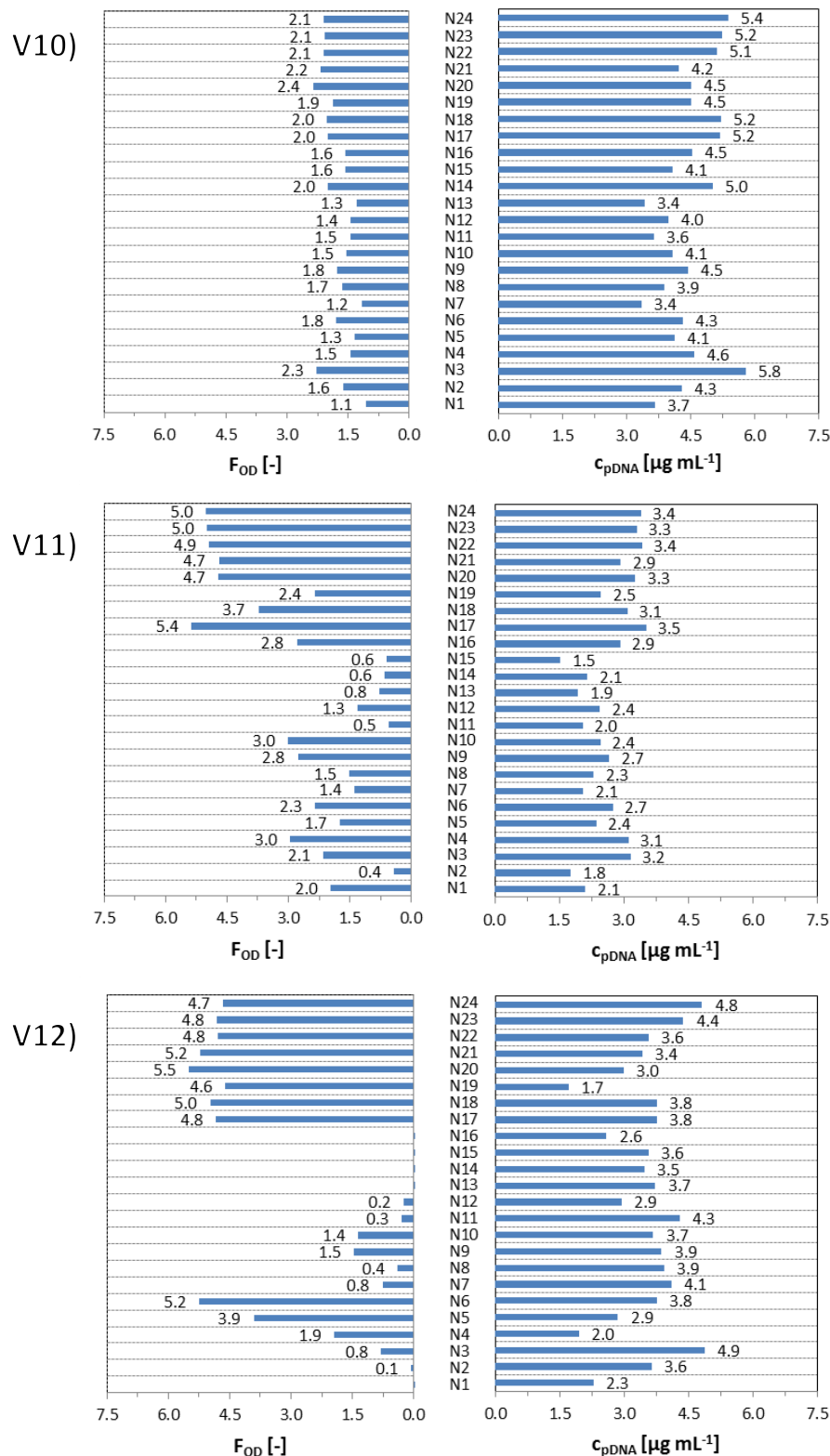


Abb. 15: Ergebnisse für die Optimierung des Mediums nach Wang *et al.* (2001) mit kombinierter C-Quelle für V10 bis V12.

In der Abbildung werden die Ergebnisse der zweiten Optimierung für F_{OD} und die pDNA-Ausbeute (c_{pDNA}) von V10 bis V12 gezeigt. Der Wert F_{OD} gibt an wie stark sich die End-OD bezogen auf OD₀ erhöht, c_{pDNA} gibt die Ausbeute in µg mL⁻¹ Medium an. Die Medien bestehen jeweils aus drei angepassten Zusätzen sowie zwei verschiedenen C-Quellen (Glucose und Glycerin). Die höchste pDNA-Ausbeute wird in V10, N3 mit 5,8 µg mL⁻¹ erreicht. Obwohl das Wachstum von V10 generell schlecht ist, konnte eine Steigerung der Ausbeute erzielt werden.

Diskussion

Die Optimierung des Mediums mit kombinierter C-Quelle aus Glycerin und Glucose liefert das beste Ergebnis für die Stamm Plasmid-Kombination Stb13::P2 (V12). Das optimale Medium enthält $0,1 \text{ gL}^{-1}$ Thiamin, $0,75 \text{ gL}^{-1}$ Leucin, $1,5 \text{ gL}^{-1}$ Prolin und 8 gL^{-1} Glucose. Die Zielgrößen liefern die theoretischen Werte $F_{OD} = 3,1$ und $pDNA\text{-Ausbeute} = 12,4 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Verglichen mit der ersten Optimierung führen höhere Konzentrationen von Prolin und Leucin zur Steigerung der $pDNA$ -Ausbeute und damit zur höchsten theoretischen Ausbeute in der Versuchsreihe.

In den Versuchen wurde mit DH5 α die höchste praktische Ausbeute von $5,8 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht, allerdings wird nur geringes Wachstum beobachtet. Obwohl die Kombination aller Faktoren diese Ausbeute erzeugt, besteht das optimale Medium aus $0,5 \text{ gL}^{-1}$ Thiamin, $7,2 \text{ gL}^{-1}$ Glucose und 10 gL^{-1} Glycerin. Dieses Ergebnis ist damit zu erklären, dass die Faktoren Prolin, Leucin und Histidin ebenso in Faktorkombination enthalten sind, die sich sowohl negativ auf das Wachstum als auch auf die $pDNA$ -Ausbeute auswirken.

Ebenso wie mit Plasmid 1 steht eine höhere Ausbeute bei Stb13 mit den Aminosäuren Prolin und Leucin im Zusammenhang. Die Replikation ist abhängig von der Bildung von Proteinen, die bei der Replikation mitwirken. Daher wirkt sich ein Mangel an Prolin und Leucin in einer verringerten Replikation und andersherum in einer erhöhten Replikation aus.

Die Art der C-Quelle hat keinen Einfluss auf die $pDNA$ -Ausbeute. Glycerin führt nicht zur Steigerung der Ausbeute von Plasmid 2.

Vergleicht man die erreichte $pDNA$ -Ausbeute ($5,8 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) mit denen von Plasmid 1 ($12,9 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), unterscheiden sie sich um den Faktor zwei. Hinsichtlich der Experimente im MTP-Format besteht mit Plasmid 2 weniger Optimierungspotential.

Das optimierte Medium von Stb13::P2 soll theoretisch eine Ausbeute von $12,4 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ liefern. Damit würde eine 3-fach höhere Ausbeute als in der Literatur beschrieben wird, erzielt werden (Grunzel *et al.*, 2014). In Abschnitt 4.2.3 wird dieses optimierte Medium verwendet und gezeigt, ob diese Ausbeute erreicht werden kann.

Im Gegensatz zu den MTP-Versuchen mit Plasmid 1, sind in den Versuchen mit Plasmid 2 Effekte des Mediums auf DH5 α zu erkennen. Allerdings werden generell geringere $pDNA$ -Ausbeuten erreicht. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Plasmid-abhängige Reaktion.

Aus den Optimierungsversuchen von Plasmid 2 mit kombinierter C-Quelle ergeben sich folgende Hypothesen. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der maximalen Ausbeute und dem Plasmid. Es ist ebenso abhängig vom Plasmid, ob ein positiver Effekt durch Veränderung der C-Quelle erzielt werden kann.

4.2.3 Scale-up von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben (V14 bis V16)

Die berechneten Medienbedingungen aus dem *Optimizer*-Tool werden zunächst in der MTP durchgeführt. Anschließend soll gezeigt werden, dass sich die Fermentation in der MTP in den Schüttelkolben übertragen lässt. Dazu werden alle Bedingungen maßstabsgetreu vergrößert.

Für das Plasmid 2 werden drei Versuche durchgeführt: DH5 α ::P2 aus der ersten Optimierung (V14), DH10B::P2 aus der ersten Optimierung (V15) und Stb13::P2 aus der zweiten Optimierung (V16).

Im Gegensatz zu Plasmid 1, ergaben sich für Plasmid 2 für alle drei Stämme gute Optimierungsergebnisse, sodass für Plasmid 2 mit allen drei Stämmen ein *Scale-up* durchgeführt wurde. Die Medienzusammensetzungen mit den theoretischen Zielgrößen sind Tab. 40 für die Maßstäbe in der MTP und im Kolben aufgeführt. Die optimierten Medien enthalten alle Glucose als C-Quelle.

Tab. 40: Konzentrationen der Zusätze und theoretische Werte für F_{OD} und pDNA-Ausbeute für V14, V15, V16.

Faktor o. Zielgröße	Thiamin [gL ⁻¹]	Leucin [gL ⁻¹]	Prolin [gL ⁻¹]	Isoleucin [gL ⁻¹]	Glucose [gL ⁻¹]	F_{OD} [-]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
V14 (DH5 α ::P2)	0,60	0,48	-	-	10	5,9	6,0
V15 (DH10B::P2)	0,10	0,32	-	0,16	10	7,0	5,8
V16 (Stb13::P2)	0,10	0,75	1,5	-	8,0	1,5	12,4

Die Durchführung hat für die Versuche V15 und V16 im Rahmen der Messgenauigkeit die erwarteten Werte für die pDNA-Ausbeute geliefert. Die Ergebnisse für die pDNA-Ausbeute im Plattenversuch und im Kolben stimmen für V14 bis V16 mit geringen Abweichungen überein. Der Wert für F_{OD} weicht für V14 ab, die Werte in der Platte und im Kolben unterscheiden sich um den Faktor 3,6.

Die höchste pDNA-Ausbeute wurde nach 8 Stunden mit DH5 α ::P2 (7,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pDNA) und nach 24 Stunden mit Stb13::P2 (13,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pDNA) erzielt.

Tab. 41: Ergebnisse für den *Scale-up* von V14, V15, V16.

Versuch	Maßstab	$F_{OD, 8h}$ [-]	pDNA-Ausbeute _{8h} [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
V14	Platte	0,9	6,7
	Kolben	3,3	7,1
V15	Platte	1,6	5,0
	Kolben	1,6	5,2
V16	Platte	1,0	5,5
	Kolben	1,3	5,8

Auf den folgenden Seiten werden die Versuche graphisch dargestellt. Alle wichtigen Daten zur Bewertung werden genannt und in Relation zu dem Literaturwert von Grunzel *et al.* (2014) gesetzt. Mit der Standard Prozedur wurden in einem Komplexmedium 1,5 bis 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pDNA nach 16 Stunden Kultivierung erreicht.

Im Vergleich zu der theoretischen Ausbeute für DH5 α ::P2 von 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, waren die tatsächlichen pDNA-Ausbeuten in der MTP mit 6,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und im Kolben mit 7,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ vergleichbar. Das Wachstum hat sich in der Platte deutlich schlechter verhalten als der theoretische Wert von 5,9. Das Wachstum im Schüttelkolben kommt dem theoretischen Wert mit 3,3 näher. Die Ausbeuten in den verschiedenen Maßstäben nach 8 Stunden sind vergleichbar.

Der *Scale-up* lieferte nach 24 Stunden Kultivierung eine Ausbeute von 10,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mit einer konstanten Qualität von 97 %. Die spezifische Ausbeute betrug nach 8 Stunden 14,1 $\text{mg}(\text{g BTM})^{-1}$ und ist nach weiteren 16 Stunden Kultivierung auf 6 $\text{mg}(\text{g BTM})^{-1}$ gesunken.

Im Großen und Ganzen konnte eine Steigerung der Ausbeute auf 10,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pDNA erzielt werden. In Abb. 16 ist zu erkennen, dass die Übertragung in einen größeren Maßstab ebenso erfolgreich war, lediglich die Wachstumskurven weichen voneinander ab. Das ist mit den limitierenden Bedingungen in der Platte zu erklären.

Tab. 42: *Scale-up* von DH5 α ::P2 (V14).

Zeit [h]	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD ₆₀₀ [-]	Spezifische Ausbeute [$\text{mg pDNA}(\text{g BTM})^{-1}$]
8	97,4	7,1	1,1	14,1
24	97,0	10,8	3,0	6,0

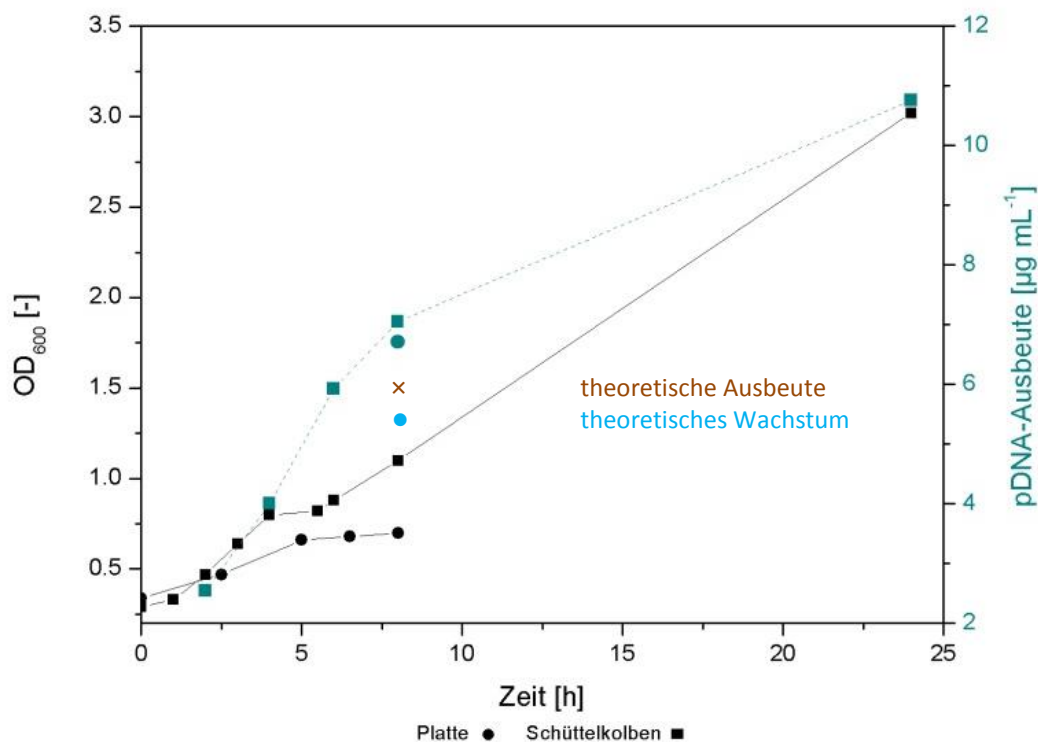


Abb. 16: *Scale-up* (■) V14 von DH5 α ::P2 und dem dazugehörigen Experiment in der Platte (●).

Gezeigt werden theoretisches (blau) und praktisches Wachstum (schwarz) sowie theoretische (braun) und praktische Produktausbeute (Cyan) des *Scale-up* von DH5 α ::P2 Versuch mit dem optimierten Medium in der MTP und im Schüttelkolben. Das Medium enthält neben den Komponenten des Grundmediums 0,6 g L^{-1} Thiamin, 0,48 g L^{-1} Leucin und 10 g L^{-1} Glucose (vgl. Tab. 40). Im Schüttelkolben wird nach 24 h eine pDNA-Ausbeute von 10,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bei einer OD₆₀₀ = 3,0 erreicht. Die Abbildung bestätigt die Übertragung der Fermentation von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben, sowie die Anwendung von *DoE* zur Optimierung von Fermentationsmedien für die pDNA-Produktion.

Die Durchführung der Versuche mit DH10B::P2 in der MTP und im Schüttelkolben liefern gute Ergebnisse für die Übertragung von der MTP in den Schüttelkolben. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, stimmen Wachstum und pDNA-Ausbeute überein. Dennoch liegen die tatsächlichen Werte für die pDNA-Ausbeute etwas unter den vorausgesagten Werten $pDNA = 5,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $F_{OD} = 7,0$.

Der *Scale-up* liefert nach 8 Stunden eine Ausbeute von $5,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ und nach 24 Stunden eine Ausbeute von $8,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nach 8 Stunden liegt die spezifische Ausbeute bei $17,3 \text{ mg(g BTM)}^{-1}$ und sinkt nach 24 Stunden auf $5,8 \text{ mg(g BTM)}^{-1}$ ab. Ebenso sinkt die Qualität der pDNA nach 24 Stunden auf knapp 80 %.

Tab. 43: *Scale-up* von DH10B::P2 (V15).

Zeit [h]	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD ₆₀₀ [-]	Spezifische Ausbeute [$\text{mg pDNA (g BTM)}^{-1}$]
8 h	95,3	5,2	0,9	17,3
24h	79,7	8,1	2,8	5,8

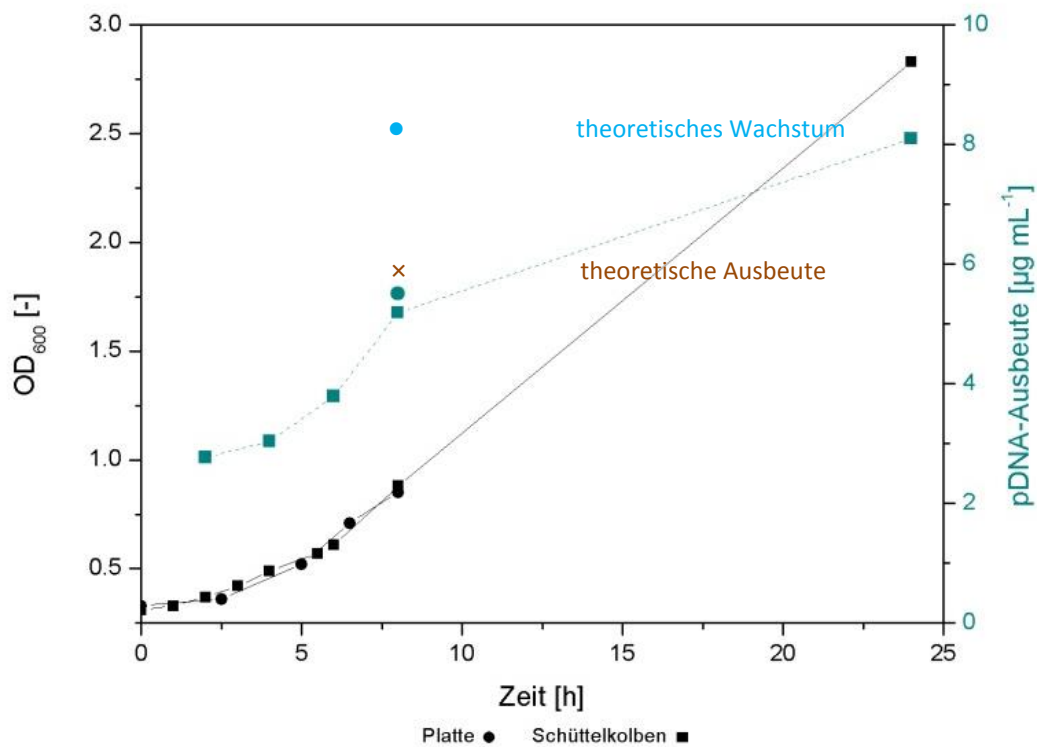


Abb. 17: *Scale-up* (■) V15 von DH10B::P2 und dem dazugehörigen Experiment in der Platte (●).

Gezeigt werden theoretisches (blau) und praktisches Wachstum (schwarz) sowie theoretische (braun) und praktische Produktausbeute (Cyan) des *Scale-up* von DH10B::P2 Versuch mit dem optimierten Medium in der MTP und im Schüttelkolben. Das Medium enthält neben den Komponenten des Grundmediums $0,1 \text{ g L}^{-1}$ Thiamin, $0,32 \text{ g L}^{-1}$ Leucin; $0,16 \text{ g L}^{-1}$ Isoleucin und 10 g L^{-1} Glucose (vgl. Tab. 40). Im Schüttelkolben wird nach 24 h eine pDNA-Ausbeute von $8,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bei einer $OD_{600} = 2,8$ erreicht. Die Abbildung bestätigt ebenfalls die Übertragung der Fermentation von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben, sowie die Anwendung von *DoE* zur Optimierung von Fermentationsmedien für die pDNA-Produktion.

Die besten Ergebnisse für die pDNA-Ausbeute und das Wachstum werden mit der Stamm Plasmid-Kombination Stbl3::P2 erreicht. Bis auf einen Ausreißer im Wachstum in der MTP stimmen die Wachstumskurven von Platte und Kolben überein. Auch die Ausbeuten von $5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $5,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ nach 8 Stunden in der MTP und im Schüttelkolben entsprechen einander. Verglichen mit den tatsächlichen Werten liegt die pDNA-Ausbeute nach 8 Stunden um den Faktor 2 darunter. Der Wert $F_{\text{OD}} = 1,5$ wird fast erreicht.

Die Ausbeute liegt im *Scale-up* liegt nach 8 Stunden bei $5,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ und steigt nach 24 Stunden um mehr als das Doppelte auf $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ und übertrifft damit den theoretischen Wert von $12,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dabei bleiben die Qualität und die spezifische Ausbeute nahezu konstant.

Tab. 44: *Scale-up* von Stbl3::P2 (V16).

Zeit [h]	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD [-]	Spezifische Ausbeute [$\text{mg pDNA (g BTM)}^{-1}$]
8	92,9	5,8	1,1	8,3
24	93,6	13,0	3,1	10,0

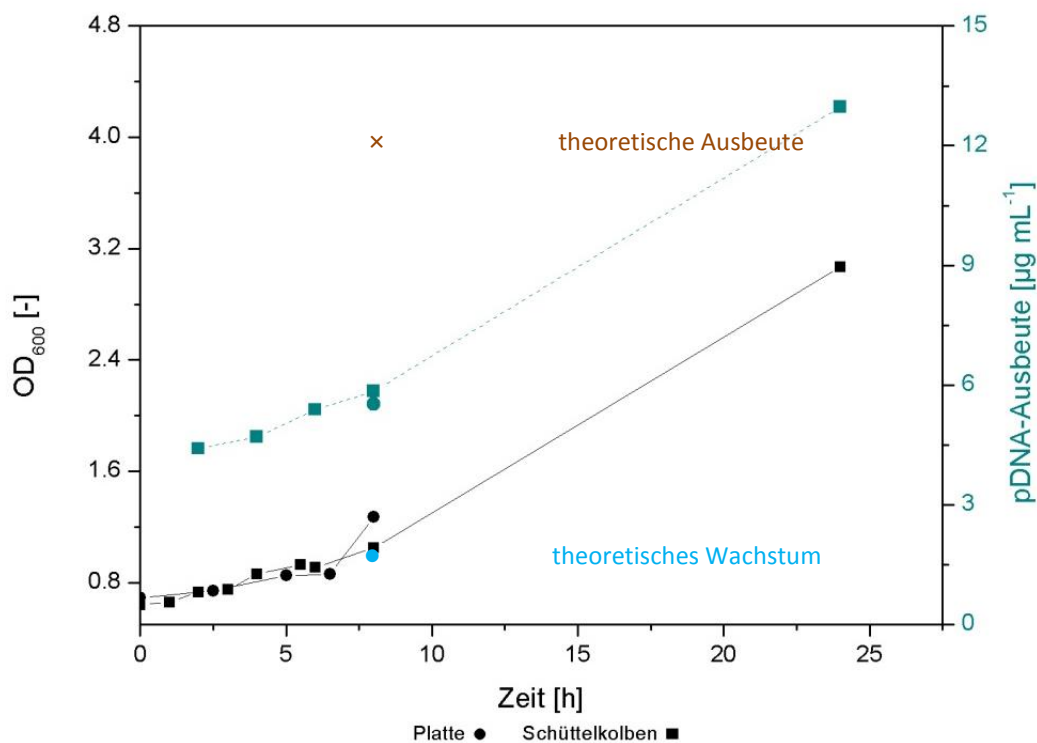


Abb. 18: *Scale-up* (■) V16 von Stbl3::P2 und dem dazugehörigen Experiment in der Platte (●).

Gezeigt werden theoretisches (blau) und praktisches Wachstum (schwarz) sowie theoretische (braun) und praktische Produktausbeute (Cyan) des *Scale-up* von Stbl3::P2 Versuch mit dem optimierten Medium in der MTP und im Schüttelkolben. Das Medium enthält neben den Komponenten des Grundmediums $0,1 \text{ g L}^{-1}$ Thiamin, $0,75 \text{ g L}^{-1}$ Leucin; $1,5 \text{ g L}^{-1}$ Prolin und 8 g L^{-1} Glucose (vgl. Tab. 40). Im Schüttelkolben wird nach 24 h eine pDNA-Ausbeute von $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ bei einer $\text{OD}_{600} = 3,1$ erreicht. Auch diese Abbildung bestätigt die Übertragung der Fermentation von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben, sowie die Anwendung von *DoE* zur Optimierung von Fermentationsmedien für die pDNA-Produktion.

Diskussion

Im Großen und Ganzen hat auch für Plasmid 2 die Übertragung von MTP in den Schüttelkolben gut funktioniert. Obwohl in dem Versuch V16 mit Stbl3::P2 die vorausgesagte pDNA-Ausbeuten des *Optimizer*-Tools nach 8 Stunden nicht erreicht wurde, wurde der theoretische Wert von $12,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ pDNA für Stbl3::P2 nach 24 Stunden Kultivierung im Schüttelkolben mit $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ überschritten.

Zusätzlich wurde eine Verbesserung mit der Stamm Plasmid-Kombination von DH5 α ::P2 erzielt. Nach 8 Stunden Fermentation im Schüttelkolben wurde eine Ausbeute von $7,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht. Immerhin konnte eine Steigerung um fast 22 Prozent im Gegensatz zu den Optimierungsversuchen in der Platte gezeigt werden. Nach insgesamt 24 Stunden weist Stbl3::P2 die höchste Ausbeute von $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ auf.

Der Einsatz hoher Konzentrationen der Aminosäuren Prolin und Leucin, die Stbl3 nicht synthetisieren kann, führt zu relativ hohen pDNA-Ausbeuten. DH5 α zeigt ebenfalls, dass der Einsatz von $0,6 \text{ g L}^{-1}$ Thiamin zu einer Ausbeute von $10,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ pDNA führt. Das optimierte Medium für DH10B erfüllt die Ansprüche der pDNA-Produktion nicht und führt zur Minderung der Qualität unter 80 %.

In diesen Experimenten können keine Zusammenhänge zwischen den relevanten Genen für die pDNA-Produktion (*relA*, *spoT*) gezeigt werden. In den Versuchen wird Glucose als C-Quelle verwendet, sie führt im Gegensatz zu Glycerin zu einer höheren Produktivität.

Verglichen mit der Optimierung von DH10B::P1 und der erzielten Ausbeute von $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ nach 24-stündiger Kultivierung im Schüttelkolben, liegt die maximale Ausbeute für Plasmid 2 mit $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ ca. 2,5-mal niedriger. Trotzdem wurde im Vergleich zur Verwendung eines Komplexmediums eine Verbesserung der Ausbeute um den Faktor 3,25 erzielt (Grunzel *et al.*, 2014).

Daraus wird geschlossen, dass die pDNA-Ausbeute vom Plasmid selbst beeinflusst wird. Multivalente Plasmide sind eine noch größere Belastung für den Stamm, in dem es repliziert wird. Möglicherweise treten Strukturen auf, die mit dem Stamm interagieren.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Optimierung der Ausbeute von Plasmid 2 Schwierigkeiten mit sich bringt und in vorangegangenen Versuchen schon aufgetreten sind, kann man dennoch von einer Verbesserung sprechen.

Je nach Anspruch an die pDNA-Ausbeute kann die Optimierung erweitert werden, um die pDNA-Ausbeute weiter zu steigern.

Die Versuche mit Plasmid 2 zeigen, dass die Anpassung und Optimierung von Fermentationsmedien für die pDNA-Produktion nicht verallgemeinert werden können. Neben den Ansprüchen von den Stämmen an ein Medium kommt möglicherweise die Interaktion mit dem Plasmid dazu.

4.3 Bewertung der Verwendung von *Design of Experiments*

Die Optimierung der Medien unter Einsatz von *Design of Experiments* kann im Rahmen des Versuchsziels als erfolgreich bezeichnet werden.

Das Ziel ist einen Trend zu finden, sowie eine Durchführung, die im kleinen kostengünstigen Maßstab möglich ist. Die Optimierung von Plasmid 1 belegt, dass Trends für das Medium geliefert werden, die ansonsten nur mit großem zeitlichem Aufwand zu identifizieren wären.

Die Schwierigkeit bei der Anwendung von *DoE* im Mikrotiterplattenformat besteht darin, dass die Batch-Versuche über eine bestimmte Zeit durchgeführt werden und nach Ablauf der Zeit eine Aussage über das relative Wachstum und die pDNA-Ausbeute getroffen wird. Es werden keine biologischen Prozesse des Bakteriums einbezogen. Dazu gehören beispielsweise Wachstumsphasen oder ab- und zunehmender pDNA-Gehalt über die gesamte Dauer der Fermentation. Natürlich würde die Durchführung unter Berücksichtigung all dieser Faktoren zu theoretischen Werten führen, die schließlich der Realität entsprechen. Nun soll das MTP-Tool mit *DoE* im Rahmen der Prozessentwicklung von RHB lediglich Trends für die Medienoptimierung liefern und erfüllt damit die Ansprüche an das System.

4.4 Bewertung des *Scale-up*

Bei der Übertragung von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben stellte sich die Frage, ob das MTP-System reproduzierbare Ergebnisse für sowohl gute als auch schlechte Versuchsbedingungen liefert. Neben den *Scale-up* Versuchen in 4.1.3 und 4.2.3 wurden sogenannte „Negativkontrollen“ mitgeführt. Sie bestätigen, dass auch schlechte Bedingungen in Platte und Kolben sich gleich verhalten. In Abb. 19 ist ein Versuch gezeigt, in dem ein N1-Experiment der 2. Optimierung (3.4.2) in Platte und Kolben durchgeführt wurde (Stb13::P2). Es ist kaum Wachstum zu beobachten. Die pDNA-Ausbeuten stimmen gut überein.

Im Großen und Ganzen lässt sich die Übertragung von MTP zu Schüttelkolben als gut bewerten, da keine großen Schwankungen auftreten. In Anlehnung an Literaturwerte (vgl. 2.4 Mikrofermentation und *Scale-Up*) wurde versucht die OTR in der Platte und im Kolben ähnlich einzustellen. Da im Rahmen der Versuche keine Messung vorgenommen werden konnte, wird anhand des Vergleichs darauf geschlossen, vergleichbare Bedingungen geschaffen zu haben.

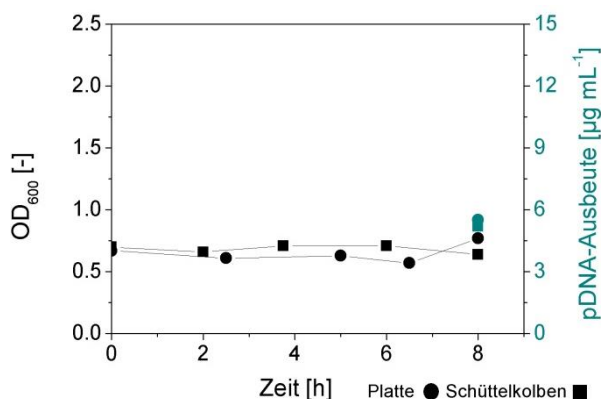


Abb. 19: Übertragung einer "Negativkontrolle" von der Platte in den Schüttelkolben zur Bewertung des *Scale-up*.

Die Abbildung zeigt den Vergleich von der Fermentation in der Platte und im Schüttelkolben. Dargestellt sind das Wachstum, OD₆₀₀ (schwarz) und die pDNA-Ausbeute (cyan) in Abhängigkeit der Zeit. Zusammen mit den *Scale-up* Versuchen bestätigt diese Abbildung den Erfolg der Übertragung von der MTP in den Schüttelkolben.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Bachelorarbeit behandelt die Optimierung eines Minimalmediums Fermentation im Mikrotiterplattenformat mit dem Ziel einer Steigerung der pDNA-Ausbeute von verschiedenen Stamm-Plasmid Kombinationen. Die Durchführung der Studie erfolgte unter Anwendung von *Design of Experiments* und lieferte Trends für die optimale Medienzusammensetzung zur die Steigerung der pDNA-Ausbeute und des Wachstums. Die Versuche wurden mit zwei Plasmiden P1 und P2 in den Stämmen DH5 α , DH10B und Stbl3 durchgeführt. Die Plasmide unterscheiden sich in der Größe, der Nukleinsäure-Zusammensetzung und in den strukturellen Elementen. Plasmid 1 trägt ein therapeutisches Gen und Plasmid 2 gehört zu den sogenannten multivalenten Plasmiden mit zwei therapeutischen Genen.

Als Grundlage der Medienoptimierung wurde das Minimalmedium nach Wang *et al.* (2001) modifiziert und durch Aminosäuren ergänzt. Zusätzlich wurde die C-Quelle Glucose in einer weiteren Optimierung durch Glycerin erweitert.

Auf Basis der Optimierung in der Mikrotiterplatte wurden die besten Stamm Plasmid-Kombinationen in den Schüttelkolben übertragen. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Skalierung von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben aufgeführt. Es werden die Werte für die pDNA-Ausbeute nach 8 Stunden sowie nach 24 Stunden angegeben. Der theoretische Wert basiert auf einer Mikrotiterplatten-Fermentation nach 8 Stunden. Zusätzlich werden die Medienzusammensetzungen, die zu diesem Ergebnis geführt haben, angegeben.

Tab. 45: Zusammenfassung der Ergebnisse der pDNA-Ausbeute für die Skalierung in den Kolben auf Grundlage der berechneten Medienzusammensetzungen für die besten Stamm Plasmid-Kombination mit den theoretischen (th.) und tatsächlichen pDNA-Ausbeuten nach 8 h und 24 h Fermentation.

Stamm:: Plasmid	th. Ausbeute nach 8 h [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Ausbeute nach 8 h [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Ausbeute nach 24 h [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Medienzusammensetzung
DH10B::P1	10,4	6,9	32,3	0,6 g L^{-1} Thiamin, 0,5 g L^{-1} Leucin, 0,43 g L^{-1} Isoleucin, 10 g L^{-1} Glucose, 8,6 g L^{-1} Glycerin
DH5 α ::P2	6,0	7,1	10,8	0,6 g L^{-1} Thiamin, 0,48 g L^{-1} Leucin, 10 g L^{-1} Glucose
DH10B::P2	5,8	5,2	8,1	0,1 g L^{-1} Thiamin, 0,32 g L^{-1} Leucin, 0,16 g L^{-1} Isoleucin, 10 g L^{-1} Glucose
Stbl3::P2	12,4	5,8	13,0	0,1 g L^{-1} Thiamin, 0,75 g L^{-1} Leucin, 1,5 g L^{-1} Prolin, 8 g L^{-1} Glucose

Für Plasmid 1 wurde nach 24 Stunden Kultivierung im Schüttelkolben eine sehr hohe pDNA-Ausbeute von 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht, das entspricht einem 8-mal höherem Wert als im Komplexmedium (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Das Medium enthielt Glucose und Glycerin als C-Quelle sowie Leucin, Thiamin und Isoleucin.

Mit Plasmid 2 wurde in Stbl3 eine 3-mal höhere Ausbeute als in Komplexmedium von knapp 13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht. Das Medium setzte sich aus Glucose, Thiamin, Leucin und Prolin zusammen.

Die aufgestellten Modelle der statistischen Versuchsplanung haben Trends für die pDNA-Ausbeuten vorausgesagt. Die Versuche in den Mikrotiterplatten wurden alle über 8 Stunden durchgeführt, damit fand die Auswertung der verschiedenen Experimente in unterschiedlichen Wachstumsphasen statt. *Design of Experiments* kann keine biologischen Prozesse abbilden und liefert daher für die durchgeführten Versuche nur Trends zur Optimierung. Allerdings wurden alle pDNA-Ausbeuten nach

erfolgreicher Übertragung in den Schüttelkolben nach 24 h Fermentation erreicht bzw. überschritten (vgl. Tab. 45).

In zukünftigen Versuchen könnten die Zielgrößen zum Batch-Ende erfasst werden. Eine alternative Lösung ist der Einsatz eines vollautomatischen Platten-Fermentationssystems wie beispielsweise das *BioLector*[®] System.

Im Rahmen der Bachelorarbeit konnte die Übertragung von der Mikrotiterplatte in den Schüttelkolben mit gleichzeitiger Steigerung der pDNA-Ausbeute gezeigt werden. Zusätzlich zu den Versuchen in dieser Arbeit könnte eine weitere Skalierung in einen Fermenter durchgeführt werden.

Die Optimierung der Medien hat gezeigt, dass besonders bei Stbl3 der Einsatz von bestimmten Aminosäuren zur Steigerung der pDNA-Ausbeute führt. Daher sollte der fed-batch-Betrieb als Fermentationsstrategie betrachtet und untersucht werden.

Für DH10B sollte man weiterhin die Ausnutzung der nützlichen Gene für die pDNA-Produktion in Betracht ziehen, sowie kombinierte C-Quellen einsetzen. Denn im Fall von Plasmid 1 wurde eine immense Steigerung der pDNA-Ausbeute auf $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht.

Obwohl der Stamm DH5 α erst kaum Verbesserungen in der Optimierung zeigte, wurde in der Skalierung in den Schüttelkolben gezeigt, dass dieser Stamm für die pDNA-Produktion nicht ausgeschlossen werden sollte. Nach 8 Stunden Fermentation wurde mit DH5 α ::P2 die höchste pDNA-Ausbeute von $7,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ im Schüttelkolben erzielt.

Die Herangehensweise der Arbeit für die Medienoptimierung zur Steigerung der Plasmid-Ausbeute in verschiedenen Stämmen hat sich als sinnvoll und effektiv erwiesen. Als Empfehlung für weitere Plasmide sollte das Prinzip beibehalten werden. Zunächst wird das Plasmid in die drei Stämme DH5 α , DH10B und Stbl3 transformiert. Es werden Zellbänke in PDM abgelegt und anschließend die zwei Optimierungen durchgeführt. Diese liefern die Medienzusammensetzungen für die Übertragung in den Schüttelkolben. Da in der Arbeit gezeigt wurde, dass das Ergebnis in der Mikrotiterplatte und im Schüttelkolben vergleichbar ist, reicht es aus nur die Fermentation im Schüttelkolben mit dem optimierten Medium durchzuführen. Darauf folgt die Übertragung in größere Maßstäbe, welche nicht Bestandteil dieser Arbeit ist.

6 Literaturverzeichnis

- ANTRANIKIAN, G.: Angewandte Mikrobiologie:Springer, (2006).
- BETTS, J. I.; BAGANZ, F.: Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *In: Microbial cell factories*, (2006), Nr. 5, S.1, 21.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *In: Nucleic acids research*, (1979), Nr. 7, S. 6, 1513-1523.
- BOWER, D. M.; PRATHER, K. L.: Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid DNA. *In: Applied Microbiology and Biotechnology*, (2009), Nr. 82, S. 5, 805-813.
- CARNES, A. E.; LUKE, J.; VINCENT, J.; HODGSON, C.; WILLIAMS, J.: Escherichia coli plasmid DNA fermentation: strain and process-specific effects on vector yield, quality, and transgene expression, (2010).
- CHEAH, U. E.; WEIGAND, W. A.; STARK, B. C.: Effects of recombinant plasmid size on cellular processes in Escherichia coli. *In: Plasmid*, (1987), Nr. 18, S. 2, 127-134.
- DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.: Growth medium selection and its economic impact on plasmid DNA production. *In: Journal of bioscience and bioengineering*, (2007), Nr. 104, S. 6, 490-497.
- DUETZ, W. A.; RUEDI, L.; HERMANN, R.; O'CONNOR, K.; BUCHS, J.; WITHOLT, B.: Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *In: Applied and Environmental Microbiology*, (2000), Nr. 66, S. 6, 2641-2646.
- DURFEE, T.; NELSON, R.; BALDWIN, S.; PLUNKETT, G.,3rd; BURLAND, V.; MAU, B.; PETROSINO, J. F.; QIN, X.; MUZNY, D. M.; AYELE, M.; GIBBS, R. A.; CSORGO, B.; POSFAI, G.; WEINSTOCK, G. M.; BLATTNER, F. R.: The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *In: Journal of Bacteriology*, (2008), Nr. 190, S. 7, 2597-2606.
- ERIKSSON, L.: Design of experiments: principles and applications:MKS Umetrics AB, (2008).
- Food and Drug Administration: Points to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious disease indications. *In: Food and Drug Administration, Washington, DC*, (1996).
- FRANZGROTE, L.: Systematische Untersuchung des Einflusses von Aminosäurezusätzen auf das Wachstumsverhalten und die Produktbildung rekombinanter Escherichia coli im Mikrotiterplattenformat. Hamburg:HAW Hamburg, (2014).
- GRUNZEL, P.; PILAREK, M.; STEINBRÜCK, D.; NEUBAUER, A.; BRAND, E.; KUMKE, M. U.; NEUBAUER, P.; KRAUSE, M.: Mini-scale cultivation method enables expeditious plasmid production in Escherichia coli. *In: Biotechnology journal*, (2014), Nr. 9, S. 1, 128-136.
- HERMANN, R.; LEHMANN, M.; BÜCHS, J.: Characterization of gas–liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *In: Biotechnology and bioengineering*, (2003), Nr. 81, S. 2, 178-186.
- HUBER, J.: Process Development for Industrial Cultivation of Therapeutic Plasmid DNA, (2007).
-

-
- KENSY, F.; ZIMMERMANN, H. F.; KNABBEN, I.; ANDERLEI, T.; TRAUTHWEIN, H.; DINGERDISSEN, U.; BÜCHS, J.: Oxygen transfer phenomena in 48-well microtiter plates: Determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth. *In: Biotechnology and bioengineering*, (2005), Nr. 89, S. 6, 698-708.
- KENSY, F.; ENGELBRECHT, C.; BÜCHS, J.: Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *In: Microb Cell Fact*, (2009), Nr. 8, 68.
- LARA, A. R.; RAMÍREZ, O. T.: Plasmid DNA production for therapeutic applications: *Recombinant Gene Expression*:Springer, (2012).
- LOPES, M. B.; MARTINS, G.; CALADO, C. R.: Kinetic modeling of plasmid bioproduction in *Escherichia coli* DH5 α cultures over different carbon-source compositions. *In: Journal of Biotechnology*, (2014), Nr. 186, 38-48.
- MAIER, U.; LOSEN, M.; BÜCHS, J.: Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. *In: Biochemical engineering journal*, (2004), Nr. 17, S. 3, 155-167.
- MARTINS, L. M.; PEDRO, A. Q.; OPPOLZER, D.; SOUSA, F.; QUEIROZ, J. A.; PASSARINHA, L. A.: Enhanced biosynthesis of plasmid DNA from *Escherichia coli* VH33 using Box-Behnken design associated to aromatic amino acids pathway. *In: Biochemical engineering journal*, (2015), Nr. 98, 117-126.
- NADER, C.: Ebola Situation Report:World Health Organization, (2015).
- O'KENNEDY, R. D.; BALDWIN, C.; KESHAVARZ-MOORE, E.: Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *In: Journal of Biotechnology*, (2000), Nr. 76, S. 2, 175-183.
- PRATHER, K. J.; SAGAR, S.; MURPHY, J.; CHARTRAIN, M.: Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *In: Enzyme and microbial technology*, (2003), Nr. 33, S. 7, 865-883.
- PRAZERES, D. M. F.: Plasmid biopharmaceuticals: basics, applications, and manufacturing:John Wiley & Sons, (2011).
- ROBERTSON, J.; GRIFFITHS, E.: WHO guidelines for assuring the quality of DNA vaccines. *In: Biologicals journal of the International Association of Biological Standardization*, (1998), Nr. 26, S. 3, 205-212.
- SMITH, C. R.; DEPRINCE, R. B.; DACKOR, J.; WEIGL, D.; GRIFFITH, J.; PERSMARK, M.: Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: shifts in elution order of linear DNA. *In: Journal of Chromatography B*, (2007), Nr. 854, S. 1, 121-127.
- SMITH, M. A.; BIDOCHKA, M. J.: Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *In: Canadian journal of microbiology*, (1998), Nr. 44, S. 4, 351-355.
- STEINBÜCHEL, A.; OPPERMANN-SANIO, F. B.; EWERING, C.; PÖTTER, M.: Mikrobiologisches Praktikum: Versuche und Theorie:Springer-Verlag, (2012).
-

SUBRAMANIAN, G.: Biopharmaceutical production technology. 1:John Wiley & Sons, (2012).

WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; WU, H.; ZHU, X. M.; XU, Y. J.; YAN, J. Q.; YU, J. Y.: Increasing plasmid-based DNA vaccine construct (16 kb pSVK-HBVA) production in Escherichia coli XL10-Gold through optimization of media component. *In: Biotechnology & Biotechnological Equipment*, (2015), Nr. 29, S. 1, 164-174.

WANG, Z.; LE, G.; SHI, Y.; WĘGRZYN, G.: Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *In: Process Biochemistry*, (2001), Nr. 36, S. 11, 1085-1093.

WĘGRZYN, G.: Replication of plasmids during bacterial response to amino acid starvation. *In: Plasmid*, (1999), Nr. 41, S. 1, 1-16.

ZHENG, S.; FRIEHS, K.; HE, N.; DENG, X.; LI, Q.; HE, Z.; XU, C.; LU, Y.: Optimization of medium components for plasmid production by recombinant E. coli DH5 α pUK21CMV β 1.2. *In: Biotechnology and Bioprocess Engineering*, (2007), Nr. 12, S. 3, 213-221.

Anhang

I. Versuchsdaten

Anmerkung zu den Abbildungen:

Die *Summary of Fit Plots* zeigen die vier Kenngrößen R^2 , Q^2 , MV und RP zur Bewertung der Modelle für F_{OD} (links) und pDNA-Ausbeute(rechts).

Die *Coefficients Plots* zeigen die signifikanten Faktoren der Modelle für F_{OD} (links) und pDNA-Ausbeute(rechts).

Die *Response Surface Plots* mit dem *Optimizer-Tool* von MODDE® zeigen die Maximierung der Zielgrößen F_{OD} (links) und pDNA-Ausbeute (rechts) mit den eingestellten Faktoren. In der Abbildung sind jeweils die Abhängigkeiten der Zielgrößen von zwei signifikanten Faktoren dargestellt.

A. V01

Tab. A. 1: Übersicht V01.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD_{EOF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	92,9	4,14	0,6	6,9
N2	90,6	2,78	0,6	4,7
N3	89,8	2,94	0,5	5,7
N4	86,2	3,36	0,7	4,9
N5	86,2	3,22	0,6	5,2
N6	92,0	2,70	0,4	7,2
N7	87,3	4,23	0,6	7,1
N8	90,2	3,15	0,4	7,5
N9	89,2	3,78	0,6	6,1
N10	83,3	3,70	0,7	5,2
N11	89,3	3,23	0,4	8,0
N12	88,6	4,58	0,7	6,1
N13	84,1	3,22	0,6	5,0
N14	89,8	2,38	0,4	5,8
N15	86,4	2,99	0,5	5,7
N16	83,8	3,32	0,6	5,5
N17	81,9	3,31	0,7	5,1
N18	83,4	3,34	0,7	4,9
N19	88,8	3,02	0,5	6,3
N20	89,4	3,59	0,8	4,7
N21	86,5	3,75	0,7	5,3
N22	89,5	3,97	0,7	5,9
N23	87,9	3,73	0,7	5,1
N24	90,8	4,10	0,7	5,7

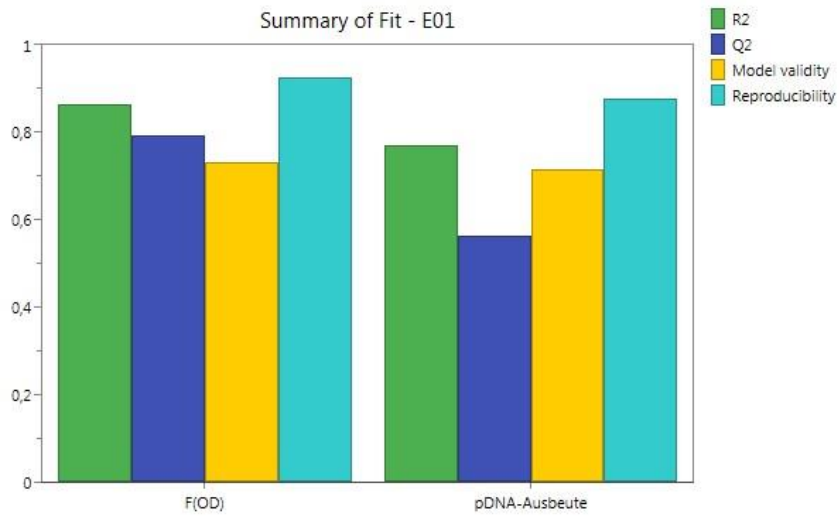


Abbildung 1: Summary of Fit Plot für V01.

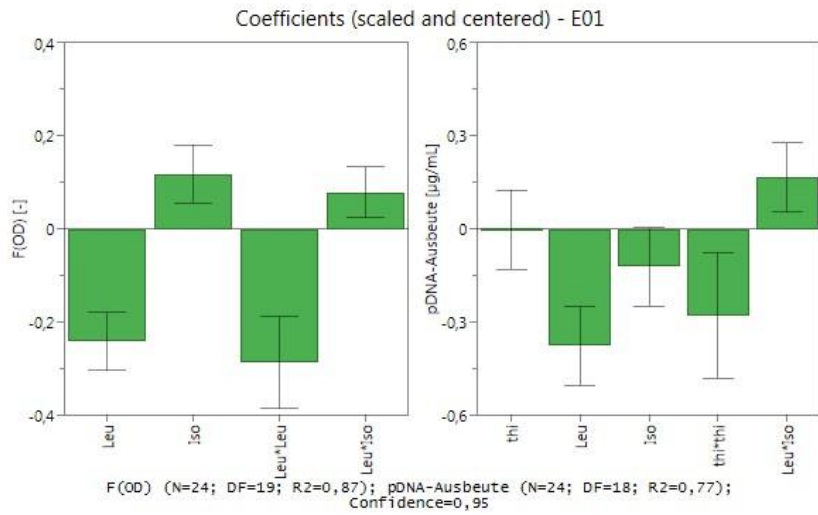


Abbildung 2: Coefficients Plot V01.

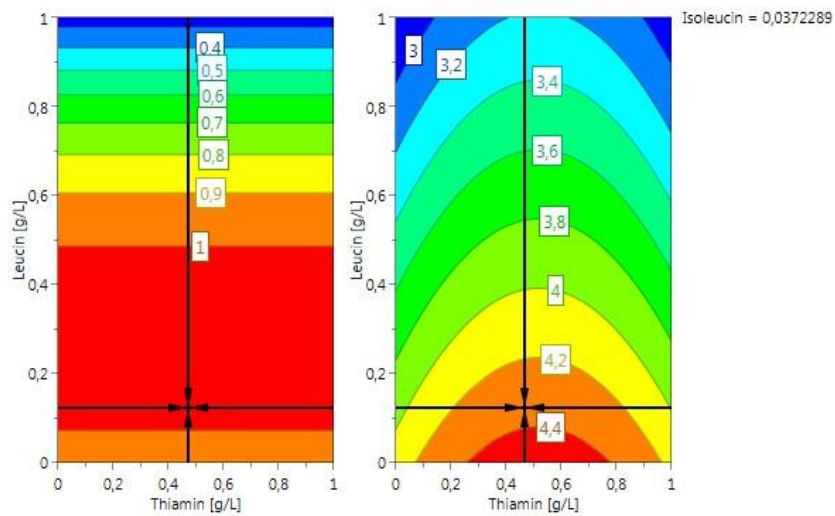


Abbildung 3: Response Surface Plot des *Optimizer*-Tools V01.

B. V02

Tab. A. 2: Übersicht V02.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD _{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	96,1	7,4	0,8	9,0
N2	96,1	5,4	0,8	6,5
N3	96,8	7,4	1,2	6,4
N4	95,9	8,8	1,1	7,8
N5	96,7	8,2	1,3	6,2
N6	94,6	8,2	0,9	8,8
N7	95,9	7,6	1,0	7,6
N8	94,7	7,7	1,0	7,3
N9	95,5	7,6	1,1	6,8
N10	95,8	9,4	1,4	7,0
N11	94,9	7,6	1,0	7,4
N12	95,5	8,1	1,1	7,5
N13	96,4	5,7	0,8	6,9
N14	94,8	6,8	1,0	6,8
N15	96,1	5,3	1,0	5,3
N16	95,7	5,8	1,0	5,8
N17	96,7	10,7	1,8	5,9
N18	96,9	11,6	1,8	6,5
N19	96,9	8,4	1,3	6,5
N20	96,9	10,3	1,6	6,2
N21	96,8	9,1	1,6	5,9
N22	96,9	10,2	1,8	5,8
N23	96,7	10,4	1,6	6,4
N24	96,8	11,3	1,7	6,7

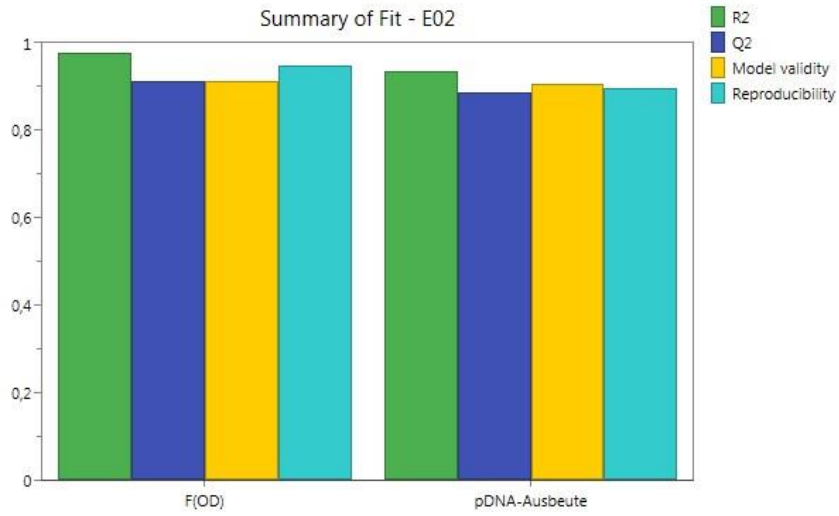


Abbildung 4: Summary of Fit Plot für V02.

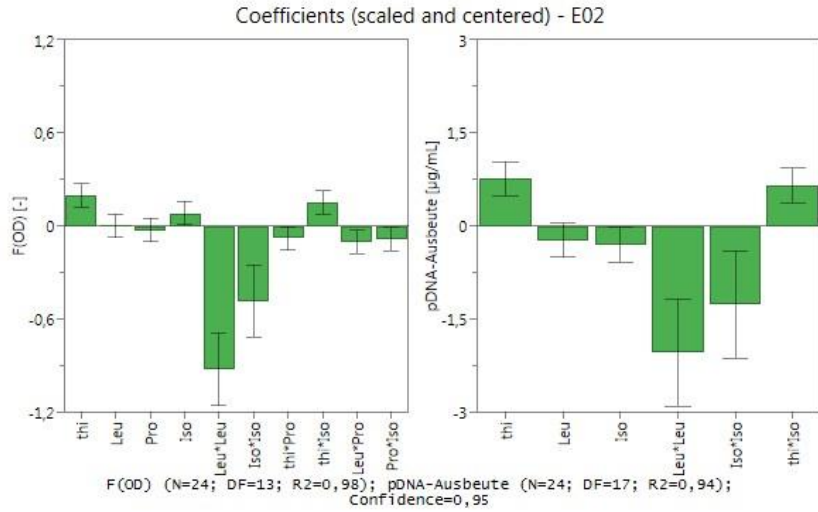


Abbildung 5: Coefficients Plot V02.

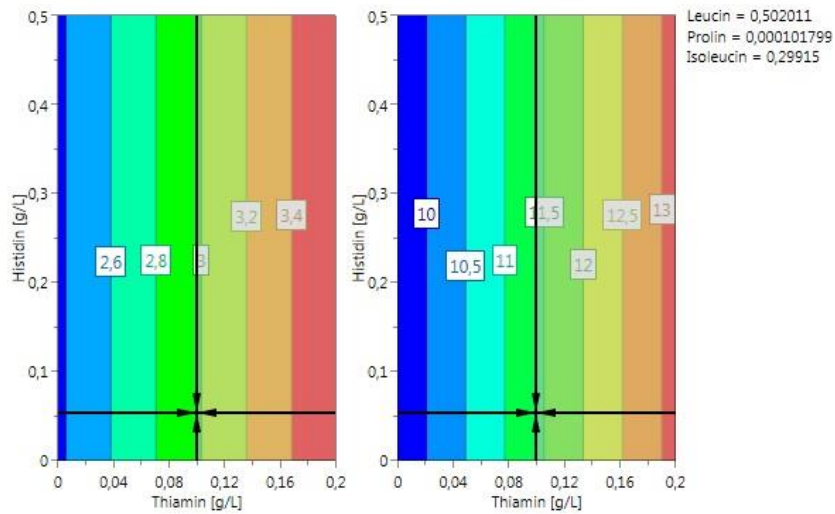


Abbildung 6: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V02.

C. V03

Tab. A. 3: Übersicht V03.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD _{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	91,6	6,37	0,8	8,3
N2	92,4	10,80	1,8	5,9
N3	93,2	10,56	2,1	5,0
N4	92,5	10,41	1,4	7,4
N5	91,2	8,27	0,8	10,3
N6	92,9	10,00	1,3	7,5
N7	92,3	7,12	0,9	8,3
N8	91,7	7,55	0,9	8,4
N9	92,5	11,44	1,5	7,7
N10	91,5	6,63	0,9	7,3
N11	90,9	7,77	0,9	8,7
N12	92,6	10,34	1,5	7,0
N13	91,0	6,34	0,9	7,2
N14	92,5	7,10	1,5	4,7
N15	91,4	6,43	0,9	7,0
N16	92,7	7,05	1,5	4,6
N17	92,7	10,82	2,3	4,7
N18	92,6	11,90	2,2	5,3
N19	93,5	9,31	2,1	4,4
N20	92,7	11,68	2,0	5,7
N21	92,7	11,37	2,2	5,2
N22	92,7	11,28	2,1	5,4
N23	93,1	11,93	2,2	5,3
N24	92,7	12,91	2,4	5,5

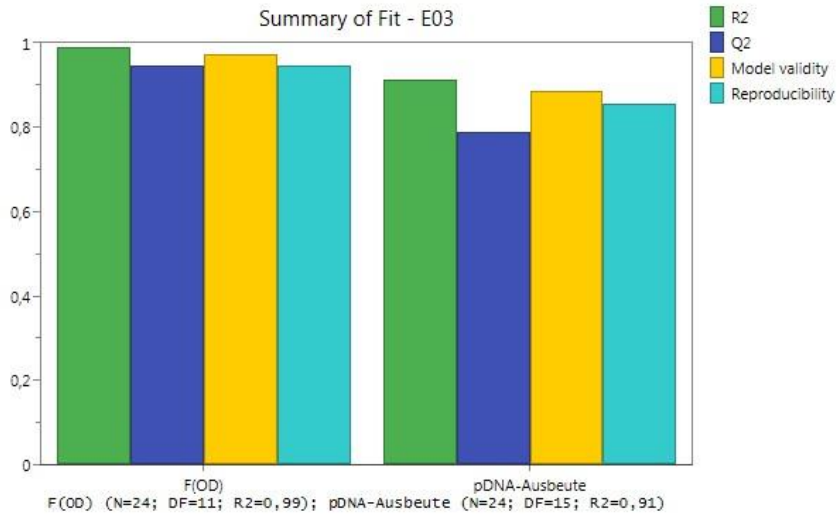


Abbildung 7: Summary of Fit Plot für V03.

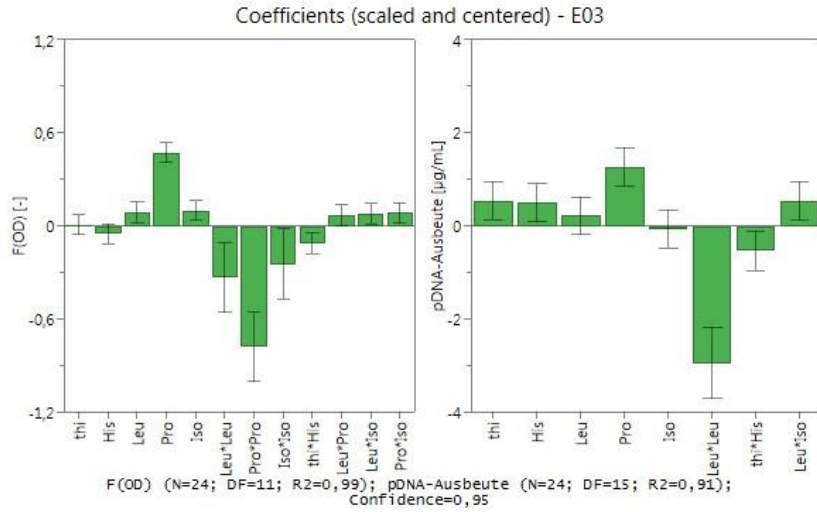


Abbildung 8: Coefficients Plot V03.

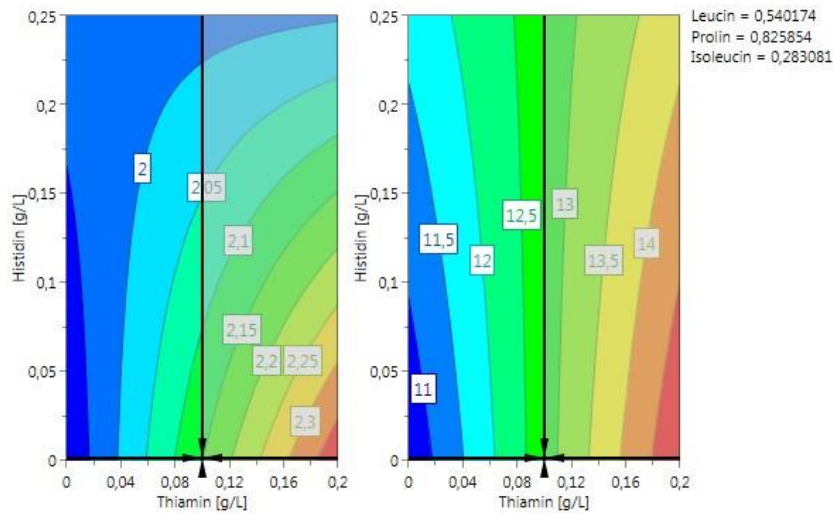


Abbildung 9: Response Surface Plot des *Optimizer*-Tools V03.

D. V04

Tab. A. 4: Übersicht V04.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD_{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1} \text{OD}^{-1}$]
N1	95,4	3,99	0,7	5,7
N2	91,0	2,83	0,6	5,0
N3	90,5	2,79	0,6	4,7
N4	90,5	3,51	0,8	4,6
N5	94,5	4,28	0,8	5,1
N6	93,8	3,31	0,6	5,9
N7	96,3	4,77	0,8	5,8
N8	94,7	3,68	0,6	5,9
N9	96,1	4,13	0,7	5,9
N10	93,1	4,32	1,0	4,2
N11	94,2	3,84	0,6	6,2
N12	94,4	4,40	0,8	5,5
N13	94,9	3,28	0,8	3,9
N14	96,5	2,56	0,5	5,2
N15	97,2	3,85	0,7	5,6
N16	95,5	3,52	0,7	5,0
N17	94,4	3,63	0,8	4,8
N18	95,8	3,74	0,8	4,9
N19	96,1	2,78	0,6	4,8
N20	93,6	3,70	0,7	5,2
N21	95,7	3,50	0,7	4,9
N22	92,9	3,82	0,8	5,0
N23	94,3	3,82	0,7	5,2
N24	93,9	3,73	0,7	5,1

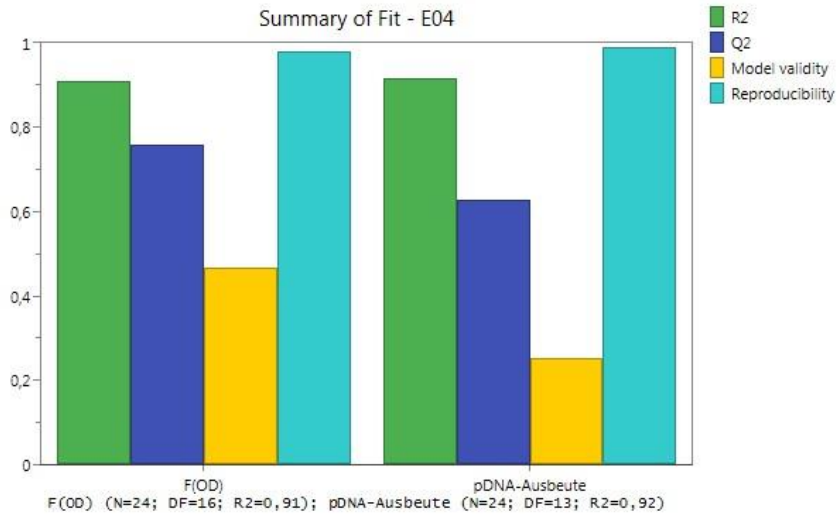


Abbildung 10: Summary of Fit Plot für V04.

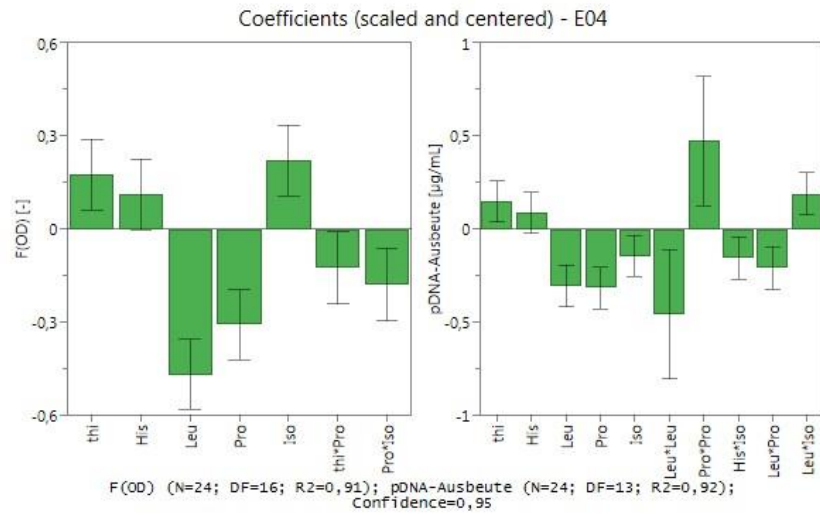


Abbildung 11: Coefficients Plot V04.

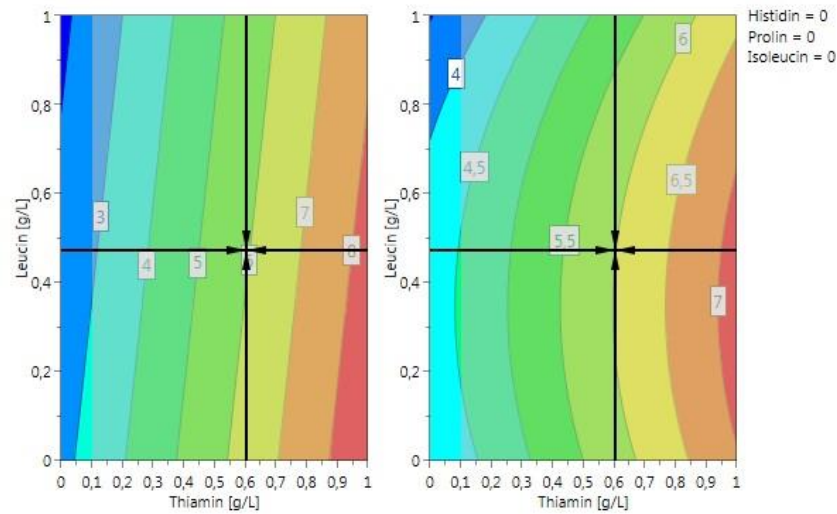


Abbildung 12: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V04.

E. V05

Tab. A. 5: Übersicht V05.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD_{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1} \text{OD}^{-1}$]
N1	80,4	2,8	0,8	3,5
N2	88,9	2,4	0,5	4,5
N3	72,3	2,9	1,1	2,5
N4	59,6	3,6	1,1	3,2
N5	69,5	3,1	1,3	2,4
N6	69,3	3,1	1,0	3,0
N7	76,7	2,8	0,9	3,3
N8	69,8	3,2	1,1	2,9
N9	72,9	2,0	0,8	2,4
N10	59,4	4,1	1,3	3,2
N11	76,4	2,9	0,9	3,4
N12	74,0	2,6	0,8	3,2
N13	76,4	2,9	0,9	3,3
N14	74,5	2,8	0,9	3,3
N15	81,1	3,1	0,8	3,7
N16	61,4	3,8	1,1	3,4
N17	48,7	4,5	2,1	2,1
N18	48,2	4,7	2,2	2,1
N19	64,7	3,1	1,5	2,1
N20	48,9	4,4	2,0	2,2
N21	59,0	3,8	1,6	2,4
N22	47,6	4,5	2,3	2,0
N23	47,5	4,7	2,1	2,2
N24	47,9	4,9	2,2	2,3

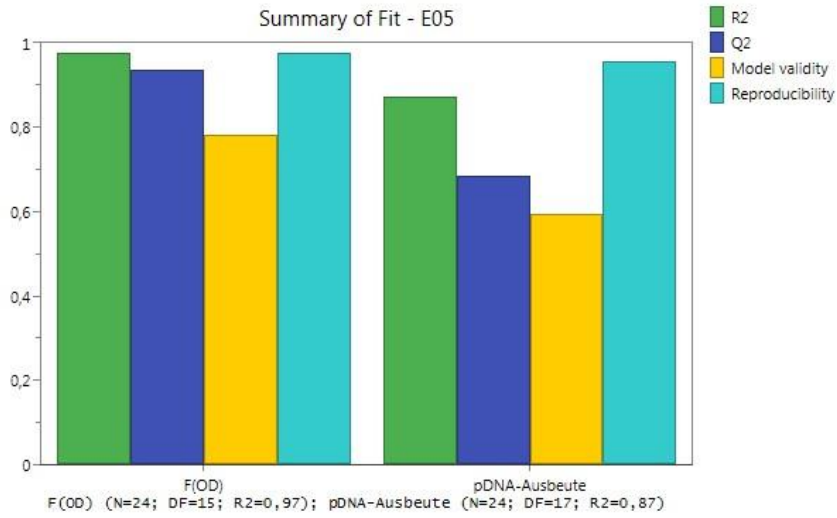


Abbildung 13: Summary of Fit Plot für V05.

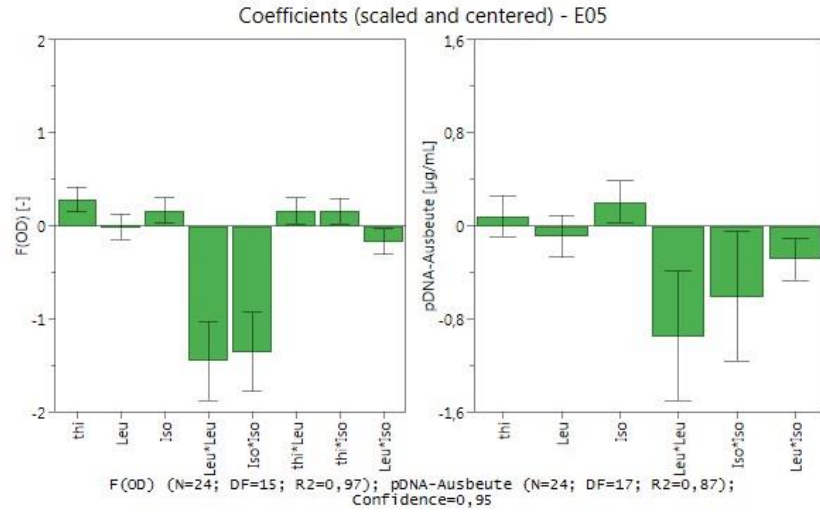


Abbildung 14: Coefficients Plot V05.

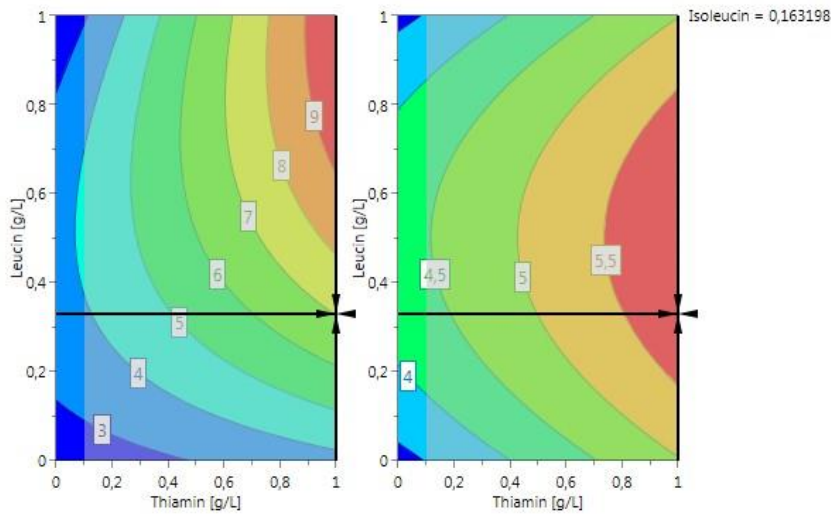


Abbildung 15: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V05.

F. V06

Tab. A. 6: Übersicht V06.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD _{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	93,5	3,35	0,7	5,0
N2	93,5	3,96	1,7	2,3
N3	94,2	4,95	2,6	1,9
N4	93,1	4,92	1,3	3,9
N5	91,5	3,14	0,6	5,0
N6	92,8	3,47	1,3	2,6
N7	91,9	3,02	0,7	4,5
N8	93,0	2,57	0,6	4,4
N9	92,0	4,03	1,4	2,9
N10	92,7	3,16	0,6	5,0
N11	91,5	3,01	0,7	4,6
N12	92,4	4,66	1,3	3,5
N13	92,4	2,70	0,6	4,2
N14	92,4	3,38	1,2	2,7
N15	92,1	2,81	0,7	4,2
N16	93,4	4,07	1,4	2,9
N17	93,6	4,80	2,8	1,7
N18	93,8	4,40	2,7	1,7
N19	93,9	4,54	2,8	1,6
N20	94,2	5,17	2,8	1,8
N21	94,2	4,43	2,8	1,6
N22	93,7	5,27	2,7	1,9
N23	93,6	4,42	2,8	1,6
N24	93,6	5,71	2,7	2,2

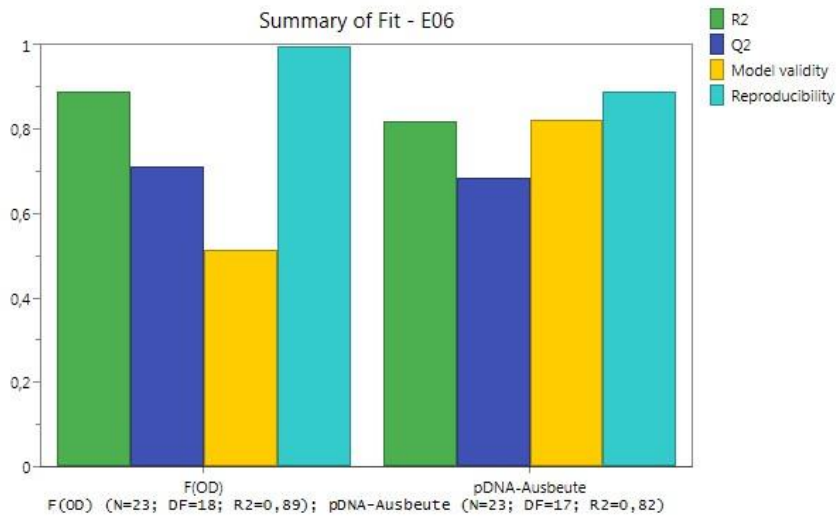


Abbildung 16: Summary of Fit Plot für V06.

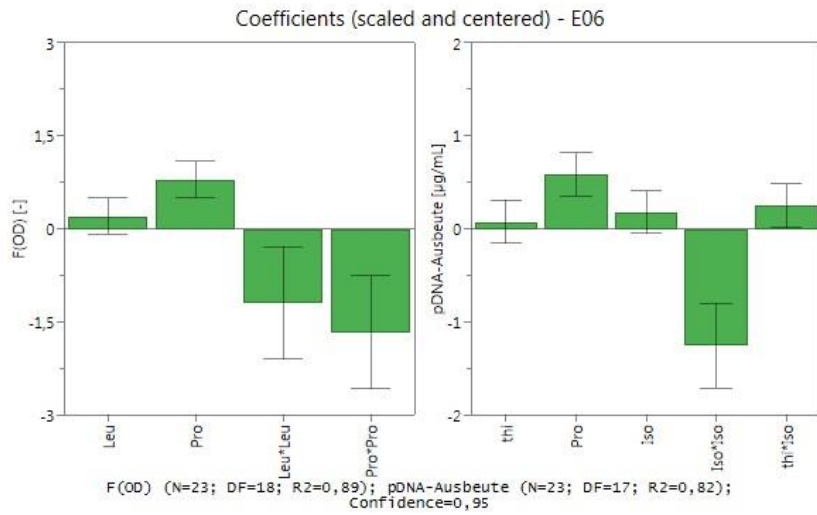


Abbildung 17: Coefficients Plot V06.

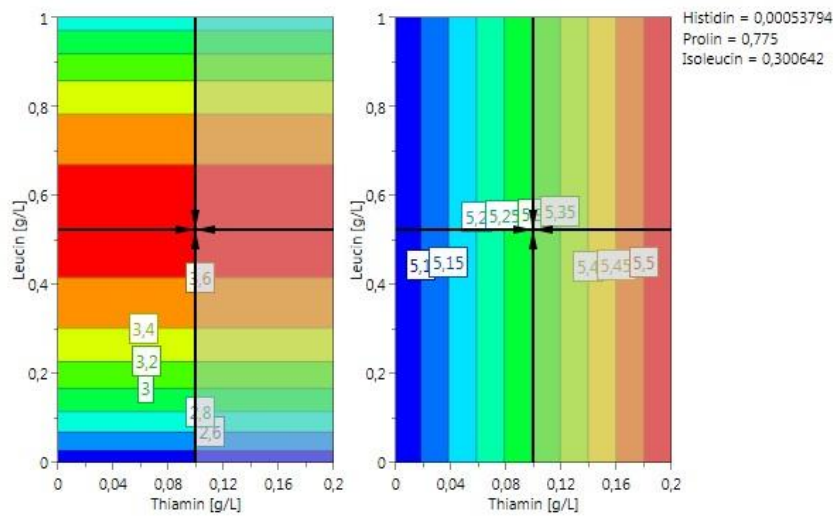


Abbildung 18: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V06.

G. V07

Tab. A. 7: Übersicht V07.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD _{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	96,6	2,66	0,4	6,5
N2	99,9	2,41	0,3	7,3
N3	99,8	2,59	0,4	6,9
N4	100,0	3,25	0,6	5,7
N5	96,3	2,68	0,4	7,6
N6	97,3	2,90	0,4	7,7
N7	96,3	2,32	0,4	5,8
N8	96,0	2,36	0,4	6,4
N9	100,0	3,38	0,6	5,7
N10	97,1	3,81	0,5	6,9
N11	96,8	2,68	0,4	7,6
N12	100,0	2,91	0,5	5,4
N13	97,1	2,69	0,4	6,8
N14	97,1	2,66	0,3	7,6
N15	96,1	2,16	0,3	6,4
N16	100,0	3,04	0,6	5,5
N17	100,0	2,89	0,4	6,4
N18	100,0	3,01	0,4	6,8
N19	100,0	2,26	0,3	8,7
N20	100,0	2,47	0,4	6,2
N21	100,0	2,61	0,4	6,2
N22	97,9	3,10	0,4	7,6
N23	100,0	2,78	0,4	6,5
N24	97,4	2,64	0,5	5,8

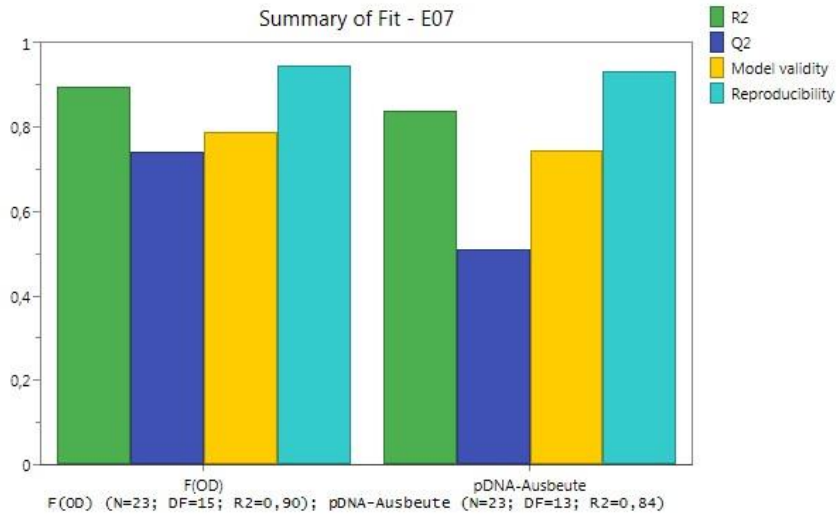


Abbildung 19: Summary of Fit Plot für V07.

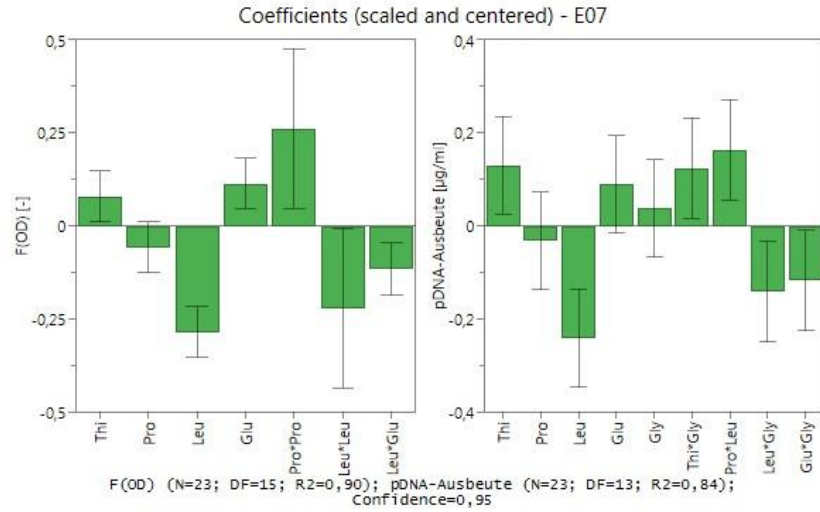


Abbildung 20: Coefficients Plot V07.

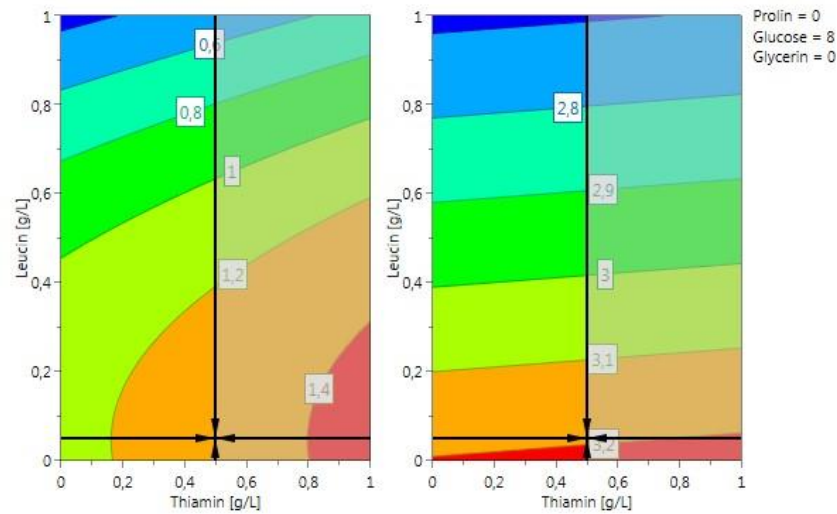


Abbildung 21: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V07.

H. V08

Tab. A. 8: Übersicht V08.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD _{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	68,3	6,84	0,7	10,4
N2	39,5	3,96	0,8	5,0
N3	57,0	5,71	1,0	5,5
N4	67,4	6,74	1,0	6,5
N5	96,7	9,68	1,1	9,2
N6	60,8	6,09	1,3	4,6
N7	65,4	6,54	0,7	9,3
N8	64,2	6,43	0,6	10,1
N9	76,7	7,68	1,2	6,5
N10	87,0	8,71	1,0	8,7
N11	57,2	5,73	0,7	8,6
N12	69,8	6,98	1,1	6,1
N13	78,7	7,88	0,8	10,4
N14	47,1	4,71	0,9	5,3
N15	60,1	6,02	0,6	9,8
N16	78,9	7,90	1,2	6,7
N17	91,6	9,17	1,7	5,4
N18	78,6	7,86	1,6	4,9
N19	59,4	5,95	1,3	4,4
N20	90,6	9,07	1,8	4,9
N21	95,0	9,51	1,7	5,6
N22	88,6	8,87	1,7	5,1
N23	92,0	9,21	1,7	5,5
N24	93,0	9,31	1,7	5,4

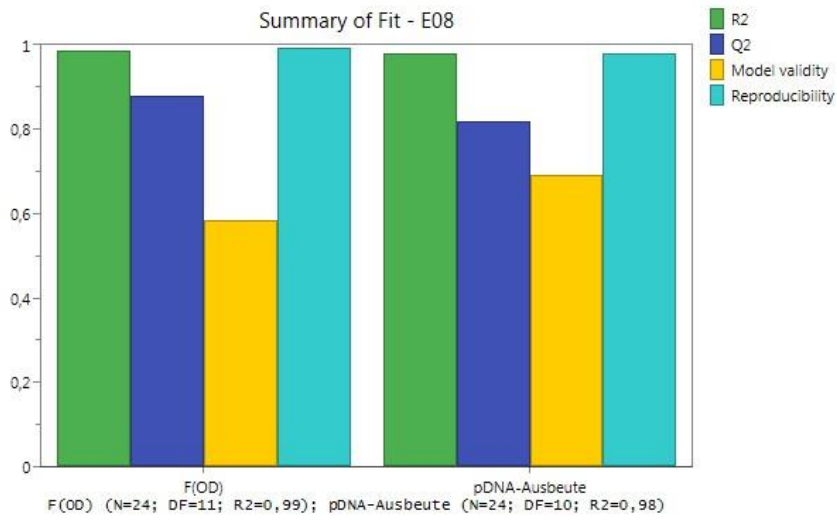


Abbildung 22: Summary of Fit Plot für V08.

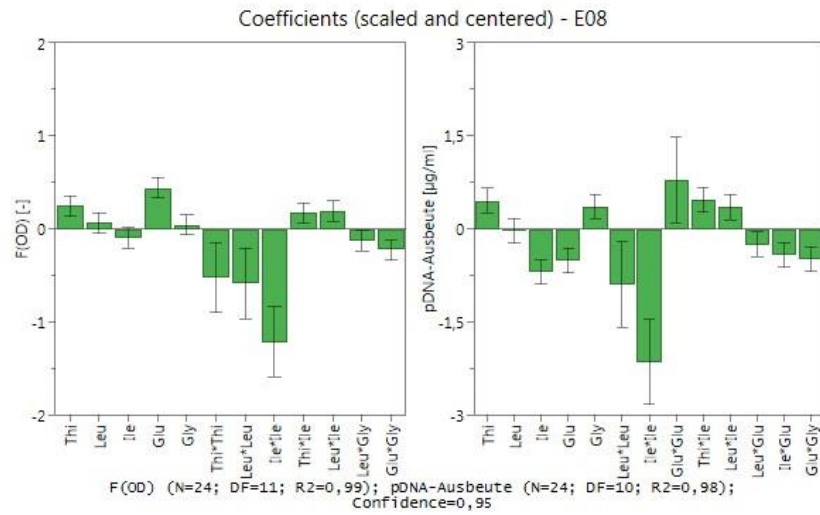


Abbildung 23: Coefficients Plot V08.

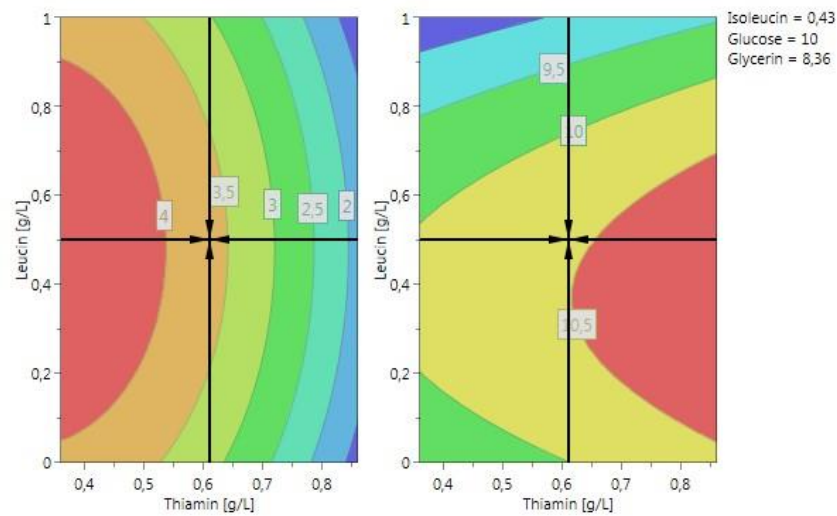


Abbildung 24: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V08.

I. V09

Tab. A. 9: Übersicht V09.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD_{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1} \text{OD}^{-1}$]
N1	94,6	3,66	0,6	6,2
N2	93,6	4,30	0,7	5,7
N3	93,0	5,80	0,9	6,2
N4	93,5	4,59	0,7	6,6
N5	93,2	4,12	0,7	6,2
N6	93,1	4,33	0,8	5,5
N7	94,5	3,36	0,6	5,4
N8	94,9	3,89	0,8	5,1
N9	93,7	4,45	0,8	5,6
N10	92,4	4,09	0,7	5,7
N11	91,7	3,64	0,7	5,2
N12	91,6	3,97	0,7	5,7
N13	93,1	3,42	0,7	5,2
N14	92,1	5,02	0,9	5,9
N15	92,7	4,09	0,7	5,6
N16	91,8	4,54	0,7	6,2
N17	93,4	5,18	0,9	6,1
N18	93,5	5,22	0,9	6,1
N19	92,3	4,52	0,8	5,5
N20	94,0	4,52	1,0	4,7
N21	94,0	4,22	0,9	4,7
N22	93,6	5,10	0,9	5,8
N23	93,3	5,23	0,9	6,0
N24	93,9	5,39	0,9	6,1

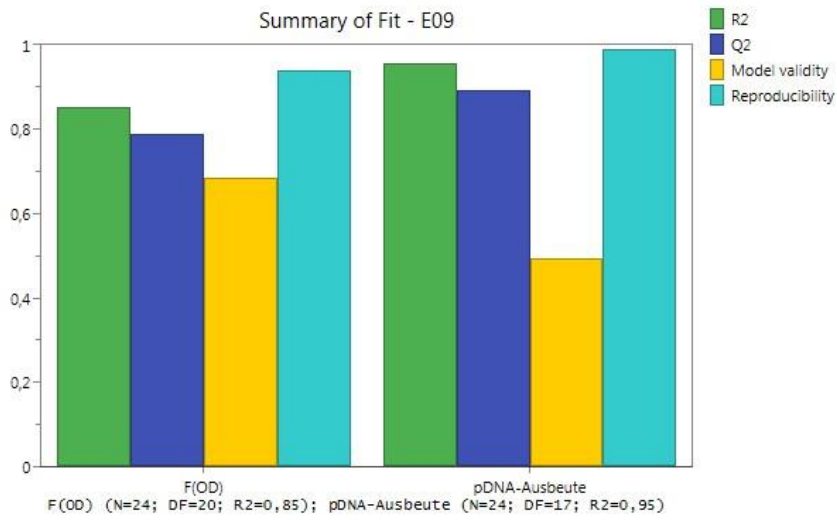


Abbildung 25: Summary of Fit Plot für V09.

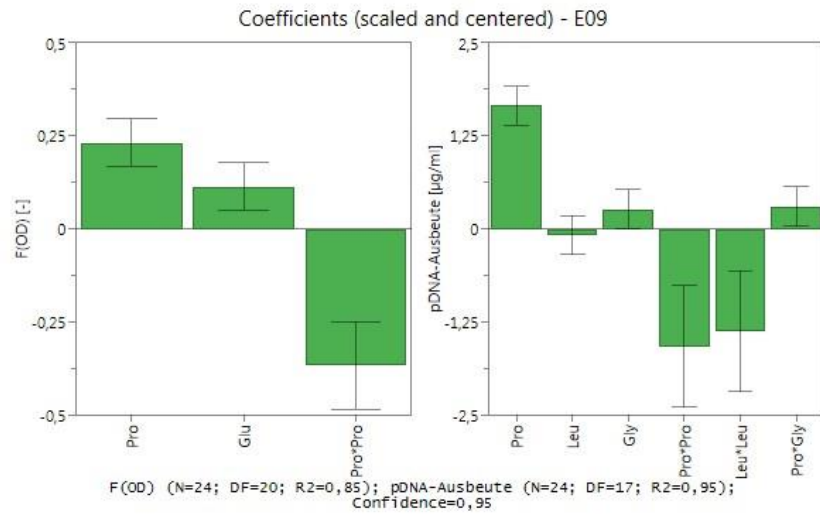


Abbildung 26: Coefficients Plot V09.

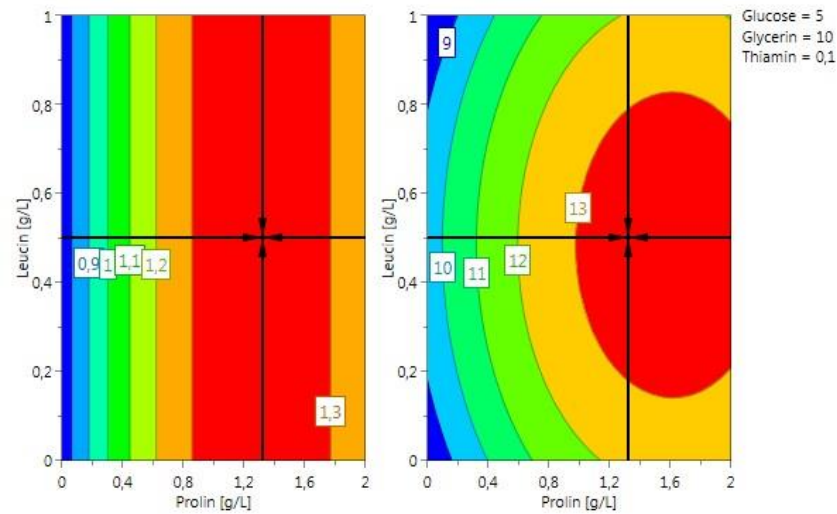


Abbildung 27: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V09.

J. V10

Tab. A. 10: Übersicht V10.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD_{EoF} [-]	Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	96,1	3,66	0,6	6,2
N2	97,7	4,30	0,7	5,7
N3	97,7	5,80	0,9	6,2
N4	97,3	4,59	0,7	6,6
N5	96,9	4,12	0,7	6,2
N6	97,3	4,33	0,8	5,5
N7	96,0	3,36	0,6	5,4
N8	95,4	3,89	0,8	5,1
N9	97,2	4,45	0,8	5,6
N10	96,4	4,09	0,7	5,7
N11	96,3	3,64	0,7	5,2
N12	97,5	3,97	0,7	5,7
N13	96,3	3,42	0,7	5,2
N14	97,1	5,02	0,9	5,9
N15	95,4	4,09	0,7	5,6
N16	97,5	4,54	0,7	6,2
N17	97,2	5,18	0,9	6,1
N18	97,0	5,22	0,9	6,1
N19	96,8	4,52	0,8	5,5
N20	97,3	4,52	1,0	4,7
N21	98,7	4,22	0,9	4,7
N22	97,0	5,10	0,9	5,8
N23	97,0	5,23	0,9	6,0
N24	97,0	5,39	0,9	6,1

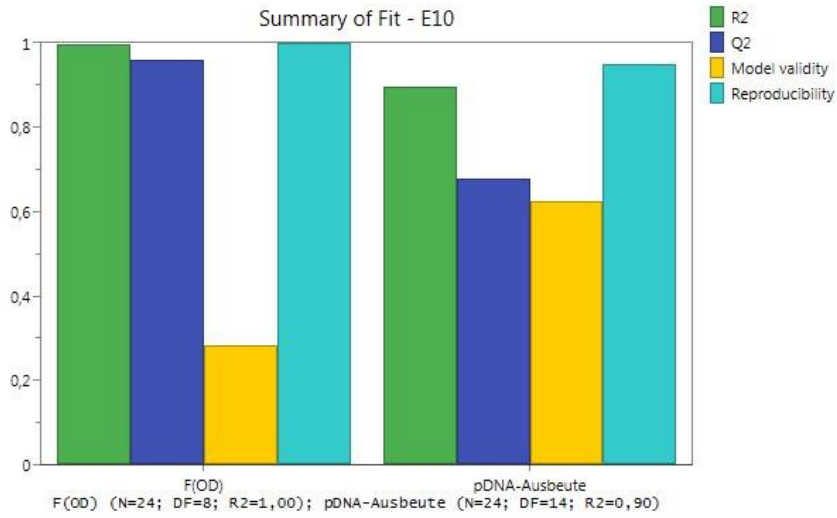


Abbildung 28: Summary of Fit Plot für V10.

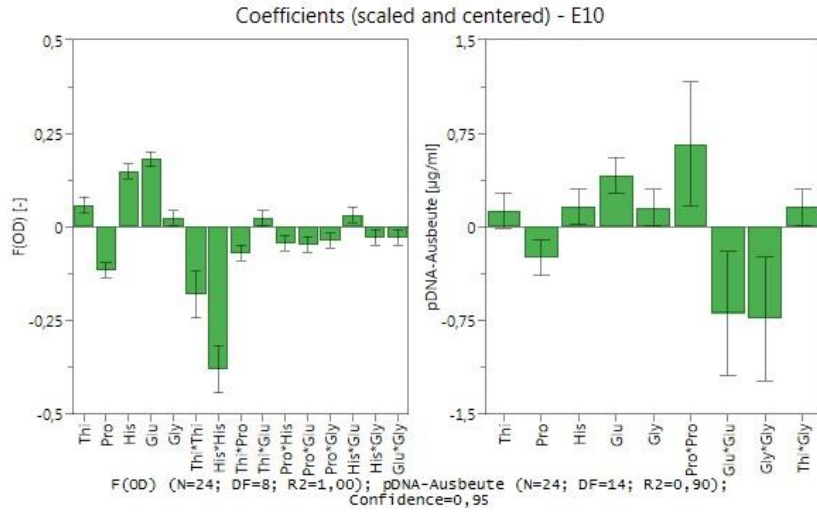


Abbildung 29: Coefficients Plot V10.

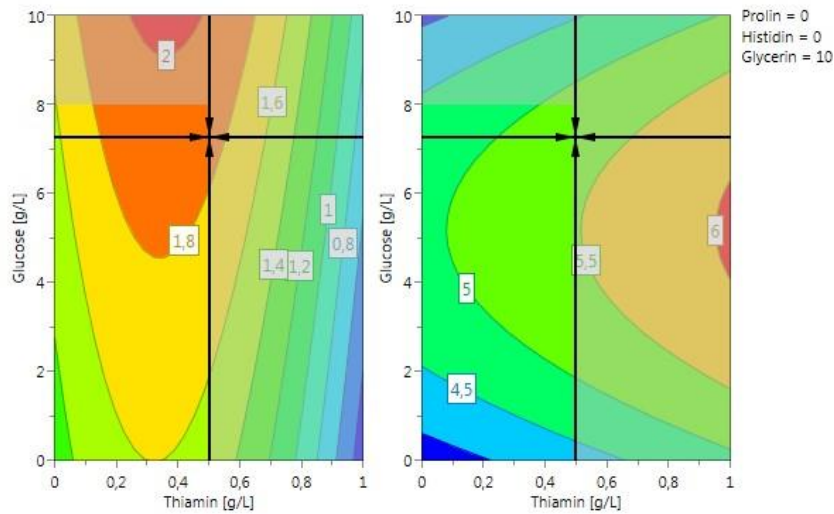


Abbildung 30: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V10.

K. V11

Tab. A. 11: Übersicht V11.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD _{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	76,5	2,11	0,7	2,9
N2	91,3	1,77	0,3	5,1
N3	79,9	3,16	0,8	4,1
N4	75,4	3,11	1,0	3,2
N5	81,4	2,36	0,7	3,5
N6	84,6	2,74	0,8	3,4
N7	75,0	2,05	0,6	3,5
N8	75,4	2,29	0,6	3,7
N9	79,5	2,66	0,9	2,9
N10	75,1	2,45	1,0	2,5
N11	88,1	2,04	0,4	5,4
N12	86,9	2,44	0,6	4,3
N13	82,8	1,94	0,4	4,4
N14	90,2	2,15	0,4	5,3
N15	88,8	1,52	0,4	3,9
N16	80,3	2,91	0,9	3,1
N17	71,1	3,51	1,6	2,3
N18	80,1	3,09	1,2	2,7
N19	85,4	2,47	0,8	3,0
N20	74,0	3,26	1,4	2,3
N21	72,8	2,93	1,4	2,1
N22	72,4	3,42	1,5	2,4
N23	74,2	3,30	1,5	2,3
N24	73,9	3,40	1,5	2,3

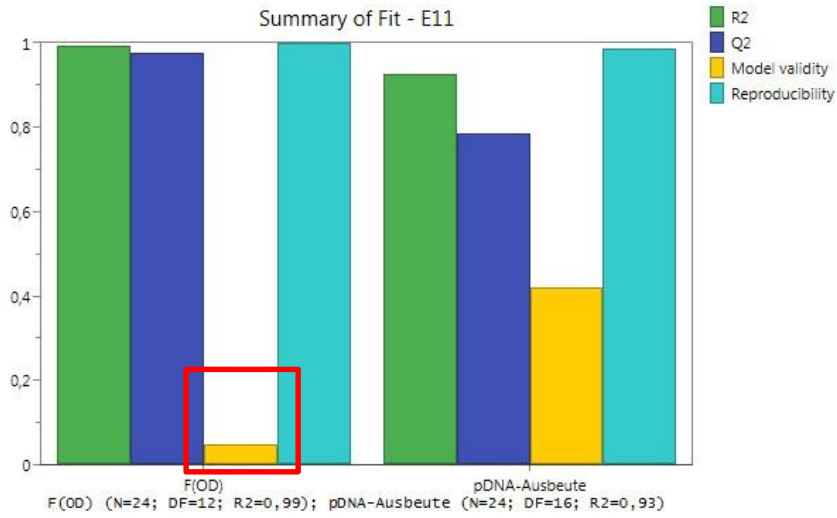


Abbildung 31: Summary of Fit Plot für V11.

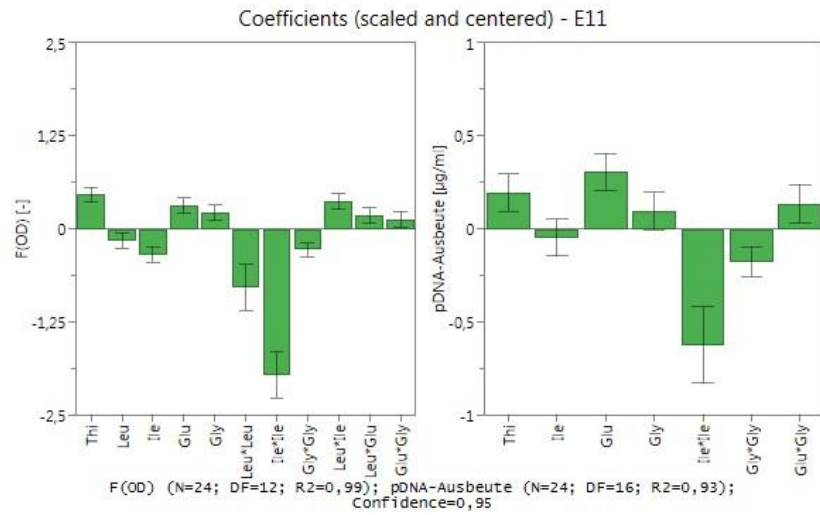


Abbildung 32: Coefficients Plot V11.

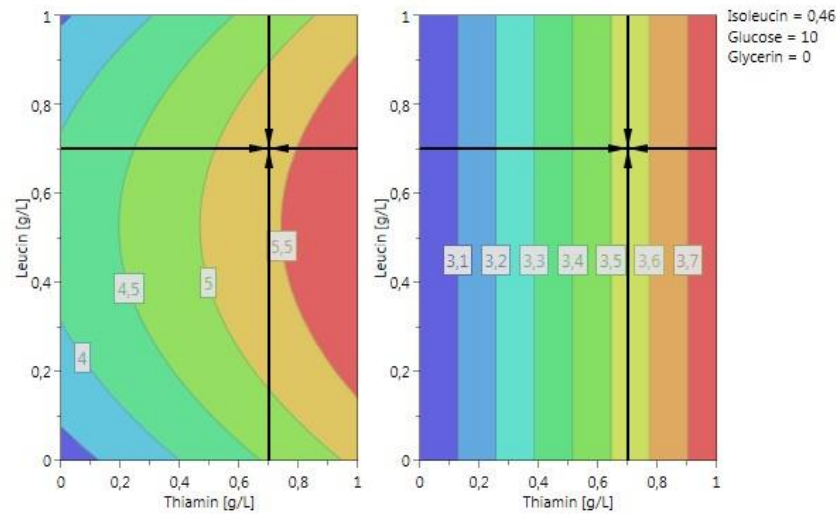


Abbildung 33: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V11.

L. V12

Tab. A. 12: Übersicht V12.

Experimenten- Nummer	Qualität [%]	pDNA-Ausbeute [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	OD_{EoF} [-]	pDNA-Gehalt nach 8 h [$\text{mg mL}^{-1}\text{OD}^{-1}$]
N1	92,9	2,29	0,5	4,8
N2	89,3	3,64	0,6	6,4
N3	87,3	4,88	1,0	5,1
N4	90,6	1,96	1,6	1,2
N5	84,7	2,86	2,6	1,1
N6	86,1	3,77	3,3	1,1
N7	83,9	4,09	0,9	4,3
N8	84,7	3,93	0,7	5,2
N9	85,3	3,87	1,3	2,9
N10	82,7	3,68	1,3	2,9
N11	86,2	4,29	0,7	6,2
N12	86,3	2,94	0,7	4,4
N13	87,2	3,73	0,4	8,4
N14	87,3	3,48	0,5	6,7
N15	86,5	3,56	0,5	6,8
N16	86,5	2,59	0,5	5,0
N17	86,4	3,75	3,1	1,2
N18	86,0	3,76	3,2	1,2
N19	95,3	1,71	3,0	0,6
N20	93,7	2,98	3,5	0,9
N21	88,6	3,42	3,3	1,0
N22	93,3	3,56	3,1	1,2
N23	88,3	4,38	3,1	1,4
N24	88,1	4,81	3,0	1,6

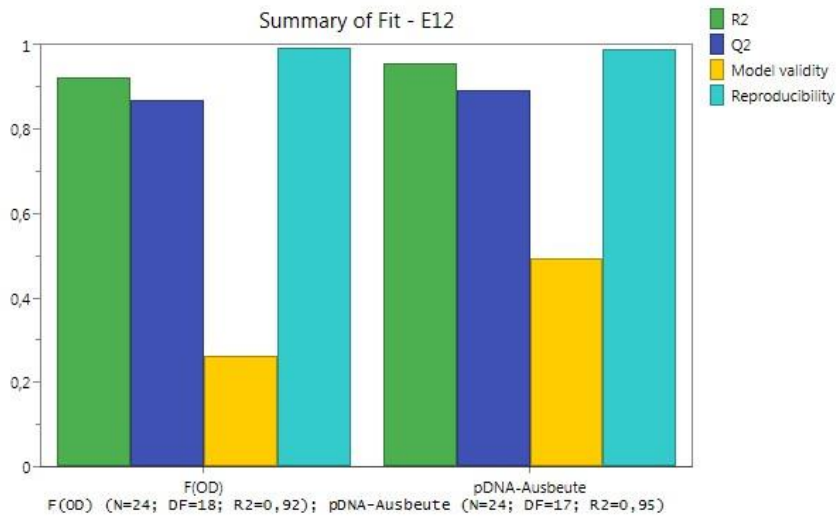


Abbildung 34: Summary of Fit Plot für V12.

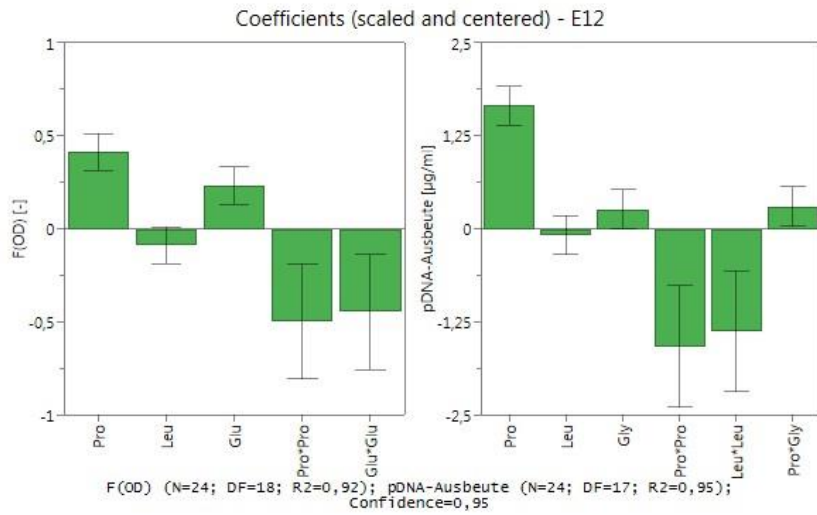


Abbildung 35: Coefficients Plot V12.

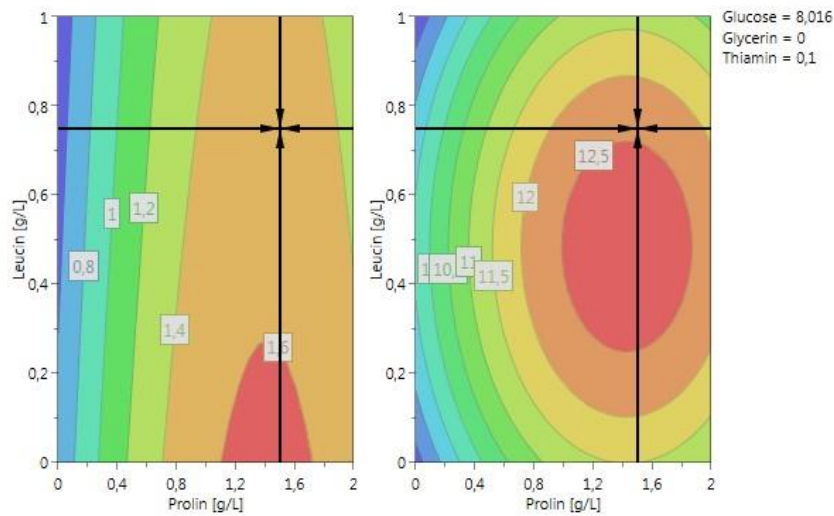


Abbildung 36: Response Surface Plot des Optimizer-Tools V12.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Thema Medienoptimierung für die pDNA-Produktion im Mikrotiterplattenformat selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, den 10. August 2015

Chantal Brämer
