



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Hamburg University of Applied Sciences

Fakultät Life Science

Bachelorarbeit

Biotechnologie

Herstellung des antimikrobiellen Peptides NK-2 ALK als
Fusionsprotein in *Escherichia coli* BL21 (DE3)



Jochen Erich Embruch

31. Juli 2018

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen
(HAW Hamburg)
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä
(HAW Hamburg)

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Thema „Herstellung des antimikrobiellen Peptides NK-2 ALK als Fusionsprotein in *Escherichia coli* BL21 (DE3)“ ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Jochen Erich Embruch

Hamburg, den 31.07.2018

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungs- und Transferzentrum für Bioprozess- und Analysetechnik der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg angefertigt. Ich durfte diese Arbeit im Rahmen des Projektes PharmCycle erstellen und bin sehr glücklich mit dem mir übertragenen Aufgabengebiet gewesen. Für diese Möglichkeit und die Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen bedanken. Herrn Prof. Dr. Jörg André verdanke ich die Beratung bei biochemischen Anliegen. Außerdem geht ein großer Dank an Herrn Scheffler, der mir stets mit Rat und Tat weitergeholfen hat und mich in schwierigen Situationen unterstützte. Auch Frau Derr und Frau Hirsch waren mir eine große Hilfe bei der Planung und Durchführung von Experimenten. Ich möchte mich sehr bei meinem Bürokollegen Herrn Bertelsen dafür bedanken, dass er für Abwechslung im Laboralltag gesorgt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Zielsetzung	8
3	Theoretische Grundlagen	9
3.1	Antimikrobielle Peptide.....	9
3.1.1	Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden.....	9
3.1.2	AMP-Produktion heute.....	10
3.2	Fusionsprotein ONC-DCless-H6-(P)-NK-2-ALK.....	11
3.2.1	NK-2 ALK (-OH)	11
3.2.2	ONC-DCless.....	12
3.2.3	Sonstige Bestandteile des Fusionsproteins	12
3.3	Vorgehen	13
4	Material und Methoden	15
4.1	Material.....	15
4.1.1	Ansätze und Pufferlösungen.....	15
4.1.2	Medien	17
4.1.3	Bakterienstamm	18
4.1.4	Verwendeter Vektor	19
4.1.5	Bioreaktor	20
4.2	Methoden.....	21
4.2.1	Upstreamprozess.....	21
4.2.1.1	Charakteristika von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) mit dem verwendeten Vektor	22
4.2.1.2	Vorkultur	23
4.2.1.3	Hauptkultur.....	23
4.2.1.3.1	Batch-Kultivierung	23
4.2.1.3.2	Fed-Batch-Kultivierung	24
4.2.2	Downstreamprozess.....	26

4.2.2.1	Zellernte	26
4.2.2.2	Zellaufschluss	26
4.2.2.3	Solubilisierung	27
4.2.2.4	IMAC	27
4.2.2.5	Säurespaltung	28
4.2.2.6	Neutralisation	28
4.2.3	Analysemethoden	28
4.2.3.1	Tricin- Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) Gelelektrophorese	29
4.2.3.2	Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) Gelelektrophorese	30
5	Ergebnisse und Diskussion.....	31
5.1	Upstreaming	31
5.1.1	Vorbereitende Experimente	31
5.1.2	MFCs S88-Rezept.....	33
5.1.2.1	Init-Phase.....	33
5.1.2.2	Batch-Phase	35
5.1.2.3	Fed-Batch-Phase.....	37
5.1.2.4	Production-Phase.....	38
5.1.2.5	End-Phase.....	39
5.1.2.6	Zusammenfassung S88-Rezept	39
5.1.3	Batch-Fermentation	40
5.1.3.1	Kultivierung am 17.04.2018.....	40
5.1.3.2	Kultivierung am 26.04.2018.....	42
5.1.3.3	Kultivierung am 17.05.2018.....	43
5.1.4	Fed-Batch-Fermentation.....	44
5.1.4.1	Kultivierung vom 29.05.2018	45
5.1.4.2	Kultivierung am 07.06.2018.....	47
5.2	Downstreaming.....	48

5.2.1	Durchführung der Reinigungsschritte	49
5.2.2	SDS-PAGE	52
5.2.3	Tricin-SDS-PAGE	57
5.2.4	Flussdiagramm	59
6	Zusammenfassung	61
7	Ausblick	62
8	Literaturverzeichnis	63
9	Abbildungsverzeichnis	65
10	Tabellenverzeichnis	67

1 Einleitung

1928 wurde das erste Antibiotikum entdeckt und leitete damit eine neue Ära in der Medizin und der Mikrobiologie ein¹. Schon früh zeichnete sich ab, dass allein ein Antibiotikum auf die Dauer nicht für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten ausreichen würde, weil die Bakterien die Möglichkeit besitzen sich zu immunisieren². Seitdem wurden vermehrt Antibiotika gefunden und entwickelt. Diese sollten bisher vor Allem eine Anforderung erfüllen: Sie sollten möglichst das Bakterium an einer Stelle angreifen, welche nicht schnell mutieren und damit das Antibiotikum unwirksam machen kann³. Erst später wurde festgestellt, dass die Antibiotika nach ihrer Anwendung besonders in den Gewässern akkumulieren. Man geht von einer Vielzahl an Auswirkungen auf Flora und Fauna in diesen Gewässern aus². Daher wird heutzutage bei der Entwicklung von neuen Antibiotika nicht nur auf die Wirksamkeit geachtet, sondern auch auf deren Abbaumöglichkeiten⁴. In dieser Arbeit soll an einem Antibiotikum geforscht werden, welches aus den Bausteinen von Proteinen, nämlich den Aminosäuren, aufgebaut ist. Diese müssten durch einen natürlichen Abbauprozess zersetzt werden können. Der Abbauprozess kann dann in den Klärwerken stattfinden, so dass das Abwasser von diesem Antibiotikum befreit wird⁵. Das sogenannte antimikrobielle Peptid (AMP) ist nicht neu erfunden worden, sondern wird bereits im Kampf gegen Bakterien und Pilzen von der Pflanzen- und Tierwelt eingesetzt⁶. Das in dieser Arbeit hergestellte AMP entstammt dem Schwein, welches einen dem Menschen ähnliches physiologisches System besitzt. In der Humanmedizin soll das AMP später Anwendung finden⁵. Bei der Herstellung von Peptiden eignen sich zwei Methoden besonders: die chemische Synthese und die Herstellung mittels rekombinanter Bakterien. Durch die Länge des Peptides bedingt, ist die chemische Synthese großer Mengen sehr teuer und daher nicht rentabel⁷. Aus diesem Grund soll das Peptid mit Hilfe rekombinanter Bakterien hergestellt werden. AMP in seiner aktiven Form, sowie auch jedes andere Antibiotikum würde jedoch das Bakterium schon bei der Herstellung angreifen, weshalb es in dieser Arbeit vom Bakterium als Fusionsprotein exprimiert wird und daher zunächst inaktiv ist⁸.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit liegt darin den kompletten Produktionsprozess des AMPs NK-2 zu durchlaufen. Dieser beinhaltet die Kultivierung des rekombinanten *Escherichia coli* BL21 (DE3) mit dem inklonierten Plasmid ONC-DCless-H6-(P), sowie die die Aufreinigung von NK-2⁵. Dabei sollen Verbesserungsmöglichkeiten, in Bezug auf eine Produktion großer Mengen, aufgezeigt werden. Als Grundlage für diese Ausarbeitung dienen eine wissenschaftliche Arbeit, in dem die Produktion mit *E. coli* BL21 (DE3) und die anschließende Reinigung eines AMPs durchgeführt wurden und eine Masterarbeit, die auf dieser wissenschaftlichen Arbeit aufbaut^{7 8}. Für die Produktion wird ein Fed-Batch-Prozess in einem 3-Liter Bioreaktor entwickelt. Im Bereich Downstream soll der bestehende Aufreinigungsprozess auf seine Wirtschaftlichkeit untersucht werden. Aus diesem Grund soll eine Massenbilanz für die einzelnen Reinigungsschritte aufgestellt werden. Anhand dieser Massenbilanz und dem Aspekt der Produktion großer Mengen werden Vorschläge erarbeitet, die in nachfolgenden Projekten Anwendung finden können.

3 Theoretische Grundlagen

Um die verschiedenen Aspekte dieser Arbeit zu verstehen und nachvollziehen zu können, werden im Folgenden die wichtigsten Grundlagen geklärt. Dabei werden antimikrobielle Peptide erst allgemein und später das aktuell untersuchte Peptid beschrieben.

3.1 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide gibt es in allen Lebewesen. Sowohl Pflanzen und Tiere, aber auch Bakterien produzieren AMPs als Schutz vor Krankheiten oder im Fall der Bakterien als Abwehr vor anderen Artgenossen. Sie wirken nicht nur gegen Bakterien, sondern auch gegen Pilze und lipidumhüllte Viren. Damit bilden sie einen Teil des Immunsystems. Laut der Datenbank DRAMP wurden bis zum Jahr 2016 4.862 AMPs entdeckt. Bei den Säugetieren allein gibt es über 500 verschiedene Einträge. Produziert werden die AMPs, bei den Säugetieren, in den Abwehrzellen wie zum Beispiel den Epithelzellen. Die AMPs besitzen jedoch eine solche Vielfalt, dass es schwerfällt, sie zu kategorisieren⁹. Im Unterschied zu den Proteinen sind die antimikrobiellen Peptide in der Regel aus 12 bis 50 Aminosäuren aufgebaut⁶.

3.1.1 Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden

Die Aminosäuren des antimikrobiellen Peptides sind größtenteils positiv geladen und hydrophob. Durch die positiven Aminosäuren ergibt sich auch eine positive Nettoladung für das Peptid. Dies ist wichtig für die Spezifität des Antibiotikums. Denn besonders Gram-negative Bakterien besitzen negativ geladene Lipide in und an der Zellmembran, welche die AMPs mit der positiven Ladung anziehen. Die eukaryotischen Zellen besitzen im Gegensatz dazu eine geringere negative Ladung an ihrer Zellmembran. Zusätzlich erschwert das Cholesterin in der Zellmembran die Porenbildung durch AMPs. Lagert sich das AMP an die Zellmembran des Prokaryoten, kommt es zur korrekten Faltung des Peptides durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren und der Zellmembran. Durch das Zusammenwirken mehrerer AMPs findet eine Porenbildung in der Zellmembran statt. Noch ist der Vorgang etwas unklar, welcher zum Absterben der Bakterien führt: die reine Bildung von Poren und das damit verbundene „Auslaufen“ des Bakteriums oder das Eindringen von AMPs in das Bakterium und die dort verursachten Schäden durch Aggregatbildung⁹.

3.1.2 AMP-Produktion heute

Viele Wissenschaftler beschäftigen sich heutzutage mit der Produktion von AMPs und dies aus den oben genannten Gründen. Zur Gewinnung werden Tiere, Pflanzen, Insekten, Hefen und *E. coli* genutzt. Die Produktion mit *E. coli* scheint die erfolgversprechendste zu sein, weil dieser Bakterienstamm am besten charakterisiert ist und viele Möglichkeiten der Expression und der Regulation bietet. Dabei ist *E. coli* ein Bakterienstamm, der nicht gerne Proteine ausschleust und somit den Downstreamprozess erschwert. Außerdem schadet er sich selbst bei der AMP-Produktion, was zu geringen Ausbeuten führen würde. Dies scheinen eher ungünstige Voraussetzungen für eine wirtschaftliche AMP-Produktion. Jedoch gibt es viele Ansätze AMP trotzdem in *E. coli* zu produzieren. Der meistverfolgte Weg geht über die Bildung von Fusionsproteinen aufgrund von zwei Vorteilen: Erstens liegt das AMP in inaktiver Form vor und greift die Zelle nicht an und zweitens wird das Fusionsprotein zur Bildung von Inclusion Bodies genutzt. Die Inclusion Bodies ermöglichen eine leichtere Aufreinigung, weil sie in zwei Schritten von den löslichen Proteinen getrennt werden können. Bis jetzt scheint es keinen Königsweg zu geben und es besteht auch noch Uneinigkeit, mit welchem Protein das AMP am besten als Fusionsprotein ligiert werden sollte. So gibt es schon Fusionsproteine, die in den periplasmatischen Raum von *E. coli* vordringen können und damit eine leichtere Reinigung ermöglichen sollen. Auch ein Ausschleusen des Fusionsproteins ist mittlerweile möglich, indem als Fusionspartner eine katalytische Domäne der Cellulase (Cel-CD) von *Bacillus* sp. eingesetzt wird¹⁰.

3.2 Fusionsprotein ONC-DCless-H6-(P)-NK-2-ALK

Wie schon in der Einleitung erwähnt, bedarf es bei der Produktion des antimikrobiellen Peptids einer Hilfestellung, damit sich das Bakterium bei der Produktion nicht selber schadet. Dafür wurden die Erkenntnisse aus der wissenschaftlichen Arbeit „Rational Design of a Carrier Protein for the Production of Recombinant Toxic Peptides in *Escherichia coli*“ genutzt. Diese beschreibt die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus der Onkonase (ONC-DCless), welche vorher einem Proteindesign unterzogen wurde und dem antimikrobiellen Peptid (GKY20)⁸. Anstatt das AMP GKY20 wird in dieser Arbeit das AMP NK-2 ALK produziert. Das restliche Konstrukt bleibt das gleiche. Eine vereinfachte Darstellung des verwendeten Fusionsproteins ist in Abbildung 1 zu betrachten. Im Folgenden werden die einzelnen Bestandteile des Fusionsproteins näher erläutert.

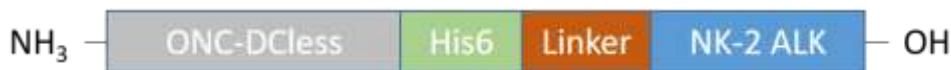


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Fusionsproteins ONC-DCless-H6-(P)-NK-2-ALK, die Onkonase als Carrier Protein (grau), das His-tag für die Aufreinigung (grün), der Linker für die Trennung des Fusionsproteins (rot) und das AMP (blau). Das Fusionsprotein besteht aus 142 Aminosäuren und besitzt eine Größe von 16,6 kDa.

3.2.1 NK-2 ALK (-OH)

Das antimikrobielle Peptid NK-2 ALK (-OH) stammt ursprünglich aus dem Schwein. Jedoch wurden Modifikationen vorgenommen, welche das Peptid stabiler und seine Spezifität erhöhen sollen. Eine höhere Stabilität wird durch verschiedene Modifikationen erreicht. Alle oxidationsanfälligen Aminosäuren wurden ausgetauscht, um die Möglichkeit einer chemischen Veränderung des Peptids bei der Herstellung zu minimieren. Die Spezifität des AMPs soll durch den vermehrten Einsatz von positiv geladenen Aminosäuren erreicht werden. Dafür wurden bestimmte Aminosäuren ausgetauscht⁵. Diese sind in Abbildung 2 rot markiert.



Abbildung 2: Aminosäuresequenz von NK-2 ALK (-OH) mit 27 Aminosäuren. Rot markiert sind die ausgetauschten Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt 3,3 kDa und das Peptid besitzt eine Nettoladung von +11.

3.2.2 ONC-DCless

Die Onkonase ist eine kleine Ribonuklease. Das 104 Aminosäuren enthaltende Protein wurde aus verschiedenen Gründen als Fusionspartner ausgesucht. Auf der einen Seite führt der Einsatz des Proteins zu einem sehr hohen Expressionsniveau (200-250 mg/L) und zur Bildung von Aggregaten, sogenannten Inclusion Bodies. Auf der anderen Seite fällt das Protein bei einem neutralen pH-Wert aus und kann so nach der Spaltung von NK-2 leichter abgetrennt werden. Stark säureanfällige Peptidbindungen wurden durch das Austauschen von Asparaginsäure (D) und Methionin (M) mit anderen Aminosäuren vermieden. Um ungewollte Sulfidbrücken zu verhindern, wurde außerdem die Aminosäure Cystein (C) ausgetauscht. Abbildung 3 zeigt die ausgetauschten Aminosäuren in Rot. Die letzte Aminosäure wurde nicht verwendet (_)⁸.

```
MQEWLTFQKK HITNTREVEY ENILSTNLFH YKEKNTFIYS RPEPVKAILK GIASKNVL  
TSEFYLSEYN VTSRPHYKYL KKSTNKFIVT IENQAPVHFV GVGS_
```

Abbildung 3: Aminosäuresequenz ONC-DCless mit 104 Aminosäuren. Rot markiert sind die ausgetauschten oder entfernten Aminosäuren. Das Protein besitzt eine Größe von 12,2 kDa.

3.2.3 Sonstige Bestandteile des Fusionsproteins

Das Fusionsprotein enthält zusätzlich noch ein His-tag und einen Linker. Das His-tag dient dazu, das Fusionsprotein sehr gut von anderen Proteinen trennen zu können. Es besteht typischerweise aus sechs Histidinen, welche z. B. mit den Metallionen von Nickel und Cobalt einen Komplex bilden. Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, besteht der Linker aus fünf Aminosäuren und ist ausgestattet mit einer Schnittstelle für Proteasen sowie einer chemisch trennbaren Peptidbindung zwischen Asparagin (D) und Prolin (P) (Abbildung 4)⁸.

```
GTGDP
```

Abbildung 4: Aminosäuresequenz des Linkers mit chemisch trennbarer Verbindung (zwischen D und P)

3.3 Vorgehen

Um das Arbeiten mit dem *E. coli*-Stamm zu gewährleisten, soll zuerst eine Arbeitszellbank (working cellbank, WCB) geschaffen werden. Dies verhindert unterschiedliches Verhalten der Bakterien durch verschiedene Chargen.

Das Bakterium soll anschließend in Schüttelkolben kultiviert werden, um eine Routine zu entwickeln, Charakteristika des Bakteriums zu analysieren und gleichzeitig die Vorkultur für den nächsten Schritt zu planen.

Als Nächstes wird der Fokus auf den 3-Liter Bioreaktor gelegt, dabei wird sich mit der Funktionsweise vertraut gemacht und erstmal mittels einer übersichtlichen Weboberfläche Batch-Prozesse gefahren. Im Anschluss wird ein vorhandenes S88-Rezept mit der Software MFCS modifiziert. Mit einem geringen Batchvolumen wird der nächste Schritt vorbereitet. Die Fed-Batch-Versuche am 3-Liter Bioreaktor können danach beginnen und auch hier wird ein eigenes S88-Rezept erarbeitet und verbessert. Das Ziel ist der automatische Ablauf des Fed-Batch-Prozesses und eine Möglichkeit der Modifizierung für die Hochzelldichtekultivierung. Außerdem wird in der letzten Phase der Fed-Batch-Kultivierung die Produktion des AMPs gestartet.

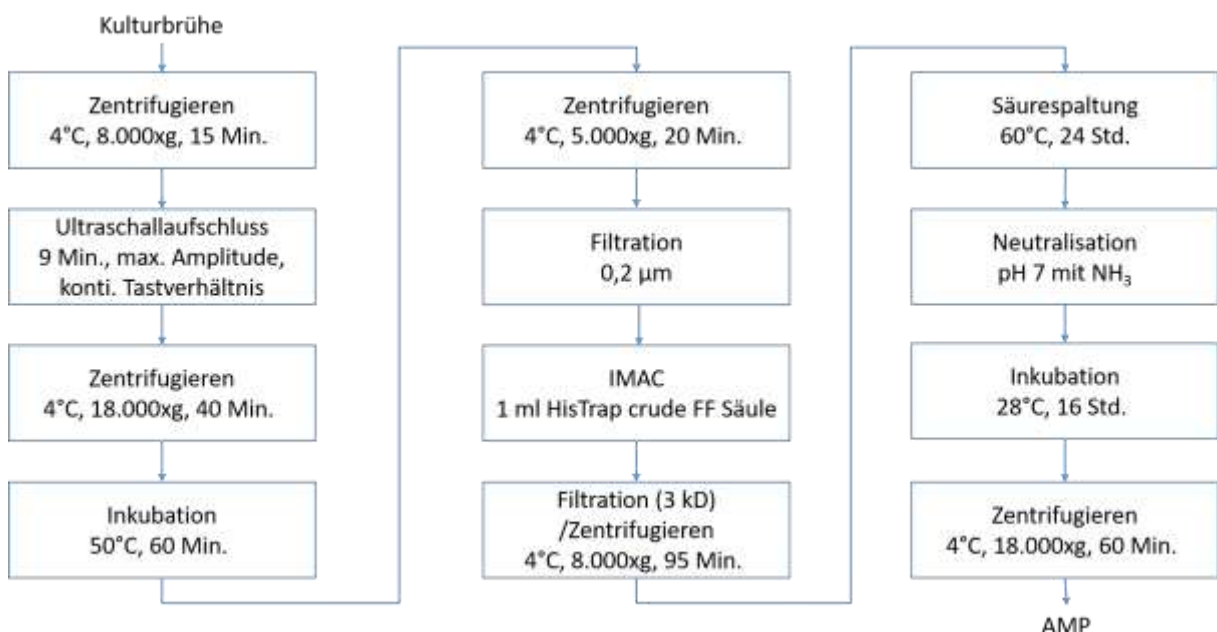


Abbildung 5: Fließschema des Reinigungsprozesses

Bei der Reinigung soll entsprechend dem Protokoll (Masterarbeit Johanna Hardt⁷) gearbeitet werden. Der Ablauf wird in Abbildung 5 gezeigt. Dementsprechend findet der Zellaufschluss mittels Ultraschall statt. Die unlöslichen Bestandteile, wie Zelltrümmer und die Inclusion

Bodies mit dem Produkt, werden durch Abzentrifugieren von den löslichen Bestandteilen getrennt. Im Anschluss sollen die Inclusion Bodies resolubilisiert werden, sodass nach einem erneuten Zentrifugationsschritt das Produkt von den Zelltrümmern getrennt wird.

Mit dem gelösten Produkt findet die Reinigung des Fusionsproteins statt. Dafür wird die Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) genutzt. Um die Säule nicht zu verstopfen wird die Lösung vorher filtriert.

Nach der Chromatographie soll das Fusionsprotein sehr rein vorliegen und daher wird die Säurespaltung vorgenommen, bei welcher sich die Onkonase von dem AMP trennt. Dafür wird das Fusionsprotein aufkonzentriert und der Puffer mit einer Säure stark verdünnt. Die Inkubation geht über 24 h. Anschließend findet eine Neutralisation mit NH_3 statt und es wird erneut inkubiert. Diese Vorgehensweise dient dem Präzipitieren der proteindesignierten Onkonase, die anschließend durch eine Zentrifugation aus der Lösung entfernt werden kann.

4 Material und Methoden

Für ein besseres Verständnis und um einen ersten Überblick über die ausgeführten Experimente zu erhalten, wird im Folgenden die Vorgehensweise erläutert. Diese wird mit den im Anschluss aufgezählten Materialien und Methoden durchgeführt.

4.1 Material

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet. Sie bilden die Grundlage für die nachfolgenden Methoden.

4.1.1 Ansätze und Pufferlösungen

Die verschiedenen Puffer werden mit folgenden Chemikalien und voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) angesetzt. Der pH-Wert wird mit entsprechenden Titrierlösungen eingestellt.

Tabelle 1: PBS-Puffer (Zellaufschlusspuffer)

Komponente	Konzentration (g/L)
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

Tabelle 2: Solubilisierungspuffer

Komponente	Konzentration
Tris-HCl	20 mM
Guanidin-HCl	6 M
1,4 Dithiothreitol	3 mM

Tabelle 3: Equilibrierungspuffer

Komponente	Konzentration
Tris-HCl	20 mM
Guanidin-HCl	6 M

Tabelle 4: Elutionspuffer

Komponente	Konzentration
Tris-HCl	20 mM
Guanidin-HCl	6 M
Imidazol	100 mM

Tabelle 5: Kathodenpuffer (10x) für Tricin-SDS-Gel

Komponente	Konzentration (g/L)
TRIS	125,136
Tricin	179,6
SDS	10

Der Kathodenpuffer wird auf einen pH-Wert von 8,3 titriert.

Tabelle 6: Gelpuffer (3x) für Tricin-SDS-Gel

Komponente	Konzentration (g/L)
TRIS	363
SDS	3,00
NaN ₃	1,20

Der Gelpuffer wird auf einen pH-Wert von 8,4 titriert.

Tabelle 7: Puffer S für Tricin-SDS-Gel

Komponente	Konzentration (g/L)
TRIS	61
SDS	4,02
NaN ₃	1,20

Der Puffer S wird auf einen pH-Wert von 6,8 titriert.

Tabelle 8: Probenpuffer für Tricin-SDS-Gel

Komponente	Konzentration
Puffer S	25 mL/L
SDS	20 g/L
Orange G	0,4 g/L
Glycerol (87 %)	200 mL/L

Tabelle 9: Fixierlösung für Tricin-SDS-Gel

Komponente	Konzentration
Borsäure	24,74 g/L
Glutardialdehyd (25 %)	50 mL/L

Die Fixierlösung wird auf einen pH-Wert von 8,5 titriert.

Der 10x Anodenpuffer (100 mL) für die Tricin-SDS-Gele wurde mit 24,2 g TRIS hergestellt und auf pH 8,9 titriert.

Der TGS-Puffer (Laufpuffer) wurde aus 10x TGS- Puffer hergestellt.

Die Färbelösung (100 mL) wurde mit Roti® -Blue hergestellt. Sie enthielt 3:5 VE-Wasser, 1:5 Methanol und 1:5 Roti® -Blue (5x-Konz.).

Die Entfärbelösung (100 mL) wurde aus 25 mL Methanol (99,8%) und 75 mL VE-Wasser hergestellt.

4.1.2 Medien

Die ersten drei Komponenten der Kulturmedien (Tabellen 11 und 12) wurden eingewogen und in VE-Wasser unter Rühren mit einem Rührfisch gelöst. Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH-Lösung auf 6,6 eingestellt und mit VE-Wasser soweit aufgefüllt, dass nur noch das Volumen der Stocklösungen hinzugegeben werden musste, um das Endvolumen zu erreichen. Die Salzlösungen wurden autoklaviert (121 °C, 200 kPa, 20 min) und im Anschluss die Stocklösungen (separat autoklaviert) hinzugegeben.

Tabelle 10: Stocklösung

Stocklösungen	Konzentration (g/L)
Glucose	695,00
MgSO ₄	117,21
Trace metal	-
- Fe(III)Citrat	6,00
- CoCl ₂	0,14
- MnCl ₂	0,95
- CuCl ₂	0,12
- H ₃ BO ₃	0,30
- Na ₂ MoO ₄	0,21
- Zn(CH ₃ COO) ₂	0,67
- Titriplex III	0,84

Tabelle 11: Vorkulturmedium mit 5,5 g/L Glucose

Komponente	Endkonzentration
KH ₂ PO ₄	13,3 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g/L
Citronensäure (wasserfrei)	1,7 g/L
Trace metal stock	1 mL/L
Glucose stock	7,9 mL/L
MgSO ₄ stock	2,4 mL/L

Tabelle 12: Hauptkulturmedium mit 20 g/L Glucose

Komponente	Endkonzentration
KH ₂ PO ₄	13,3 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g/L
Citronensäure (wasserfrei)	1,7 g/L
Trace metal stock	1 mL/L
Glucose stock	28,8 mL/L
MgSO ₄ stock	2,4 mL/L

Das Vor- und das Hauptkulturmedium wurden auf einen pH-Wert von 6,6 titriert.

Tabelle 13: Feed-Lösung

Komponente	Konzentration (g/L)
Glucose	100
MgSO ₄	3,19

Es kam kein Antibiotikum zum Einsatz, weil dies sehr teuer ist und die Kultivierung über kurze Zeiträume (< 1 Tag) stattfand. Außerdem wurde das Risiko einer Kontamination durch Sterilkupplungen und das Autoklavieren möglichst geringgehalten.

4.1.3 Bakterienstamm

Tabelle 14 zeigt den Bakterienstamm, mit dem die Plasmide amplifiziert und Proteine exprimiert wurden. Das Bakterium wird deshalb für die rekombinante Proteinexpression verwendet, weil ihm die Gene für die beiden Proteasen Lon (aktiv im Zellplasma) und OmpT (aktiv in der äußeren Membran) fehlen, die das Fusionsprotein zerstören könnten. Außerdem besitzt es ein Gen für die T7 RNA Polymerase, welche die Expression des Fusionsproteins ausführt. Dafür ist jedoch ein T7 Promoter und ein T7 Terminator im verwendeten Vektor nötig.

Tabelle 14: Verwendeter Bakterienstamm

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F-ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm</i> (<i>λITS857ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>)	Studier & Moffatt, 1986

4.1.4 Verwendeter Vektor

Der verwendete Vektor (Abbildung 6) ist ein pET30a- Vektor und besteht aus 5671 Basenpaaren. Als wesentliche Bestandteile besitzt er, zusätzlich zu dem Gen für das Fusionsprotein (Kapitel 4.2), einen lac-Operator, ein lacI, einen Teilungsursprung (ori) zusammen mit dem Teilungsende (f1 ori) und eine Kanamycinresistenz (KanR). Außerdem besitzt er die beiden Gene für den in Kapitel 5.2.3 angesprochenen T7 Promoter und den T7 Terminator. Der Lac-Operator und das lacI dienen dazu, dass das Gen des Fusionsproteins erst dann abgelesen wird, wenn sich Laktose oder IPTG im Medium befinden. Damit kann der Produktionsbeginn vom Anwender bestimmt werden.

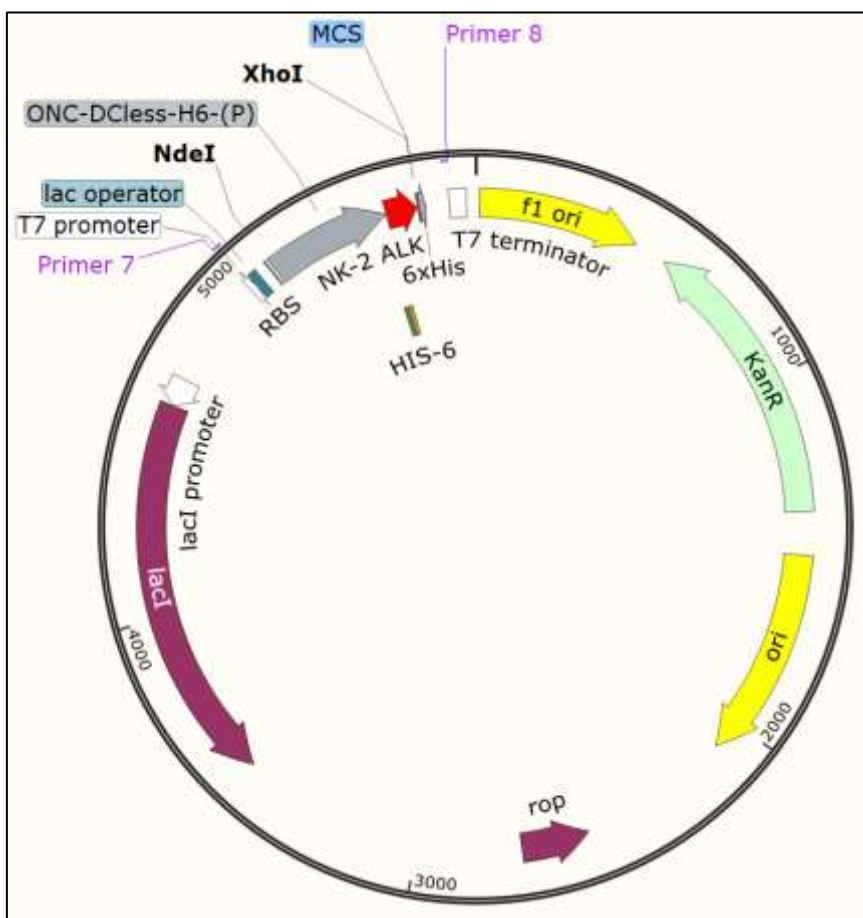


Abbildung 6: Schematische Darstellung des verwendeten Vektors

4.1.5 Bioreaktor

Abbildung 7 zeigt den verwendeten Fermenter. Es handelt sich dabei um einen 3-Liter Bioreaktor aus Glas mit einem Deckel aus Edelstahl und der Data Control Unit (DCU) Biostat A (Sartorius Stedim Systems GmbH). Auf dem Deckel befindet sich der Rührermotor (Bruell & Hilgenfeldt GmbH, Muster), welcher über eine Welle (durch eine Gleitringdichtung) zwei 6-Blatt-Scheibenrührer antreibt. In dem Deckel des Bioreaktors befinden sich acht 10 mm Ports, zwei 19 mm Ports und drei 25 mm Ports.

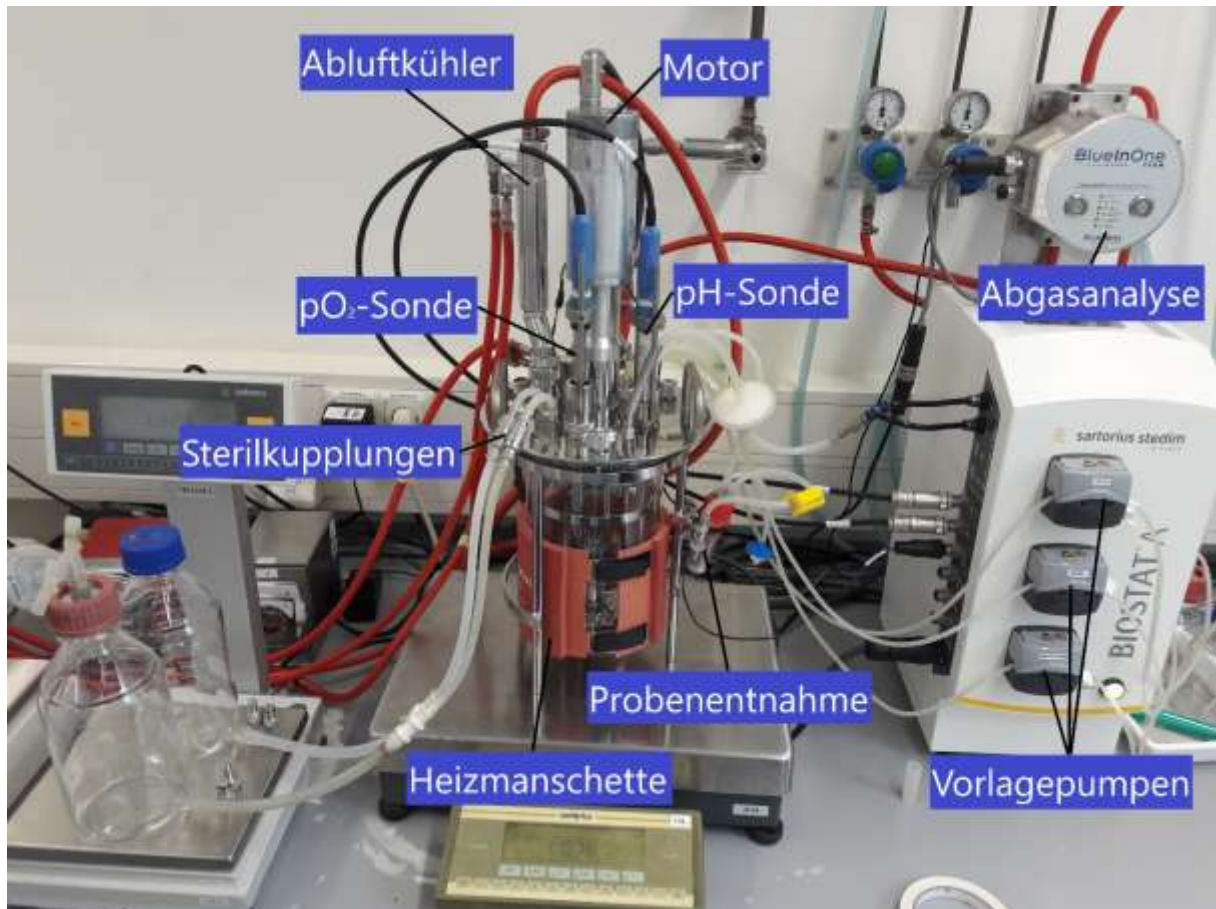


Abbildung 7: 3-Liter Bioreaktor und die DCU Biostat A mit allen Anschlüssen. Der Kühlfinger und der Schaumdetektor sind nicht sichtbar.

Ein Port ist mit einem Tauchrohr für die Probenentnahme belegt, einer mit dem Abluftkühler, einer mit dem Kühlfinger, einer zur Befestigung der Schikanen und einer mit der Zuluft. Die anderen Ports werden durch Sonden oder Zugänge belegt (siehe Abbildung 7). In dem Reaktor werden Online-Messungen von Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck durchgeführt. Außerdem wird der Schaumlevel, durch einen sich schließenden Stromkreis, detektiert und kann durch die Zugabe von Antischaummittel (J673) von dem Biostat A bekämpft werden. Für die Temperaturmessung besitzt die pH-Sonde (Endress + Häuser, Ceraliquid OPS71D) auch einen Temperatursensor (NTC 30k). Der Biostat A regelt die Temperatur über einen

Heizmantel (Sartorius Stedim Systems GmbH, Typ: BB22029) und einen Kühlfinger (Sartorius, Typ BBM003543). Der pH-Wert wird durch die angesprochene pH-Sonde gemessen und mit den Vorlagen Ammoniak (25%, autosteril) und Phosphorsäure (2 M, nicht autosteril) über Schlauchpumpen (rechte Seite in Abbildung 7) am Biostat A eingestellt und geregelt. Die pO₂-Sonde (Endress + Häuser, Oxymax H) misst den pO₂-Wert und regelt diesen mit der Anpassung der Rührerdrehzahl (N_{St}). Der Rührer kann auf Rührerdrehzahlen von 50-1.200 Umdrehungen pro min eingestellt werden. Der Gasstrom (in diesem Fall nur Luft) wird von dem Biostat A geregelt und passiert einen 0,2 µm Filter bevor er durch einen Begasungsring am Boden des Reaktors ins Medium strömt. Die Scheibenrührer zerschlagen und verteilen die Luftblasen im Medium. Die Abluft passiert einen Abluftkühler (Sartorius, Typ: B8846906), in dem der Wasserdampf kondensiert und wieder in den Reaktor zurückfließt. Für den Fall, dass die Schaumdetektion nicht funktioniert, wird die Abluft außerdem durch eine Schaumfalle (hinter dem Bioreaktor) geführt. Im Anschluss strömt das Gas durch einen weiteren 0,2 µm Filter und zur Abgasanalyse (BlueInOne, SN100F851A41000061) bevor die Luft das System verlässt. Die Daten der Abgasanalyse (Abgasmolenbrüche für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid) werden von der Software MFCS gespeichert. Die Probenentnahme findet über ein Probenentnahmeröhrchen (10 mL) statt. Es handelt sich dabei um ein semi-steriles System, bei welchem zwei Schlauchklemmen gegenläufig geöffnet werden. Mit Hilfe einer Spritze mit Spritzenaufsatzfilter wird die Probe über ein Tauchrohr erst in das Probenröhrchen und anschließend in das Probenauffanggefäß gefördert.

4.2 Methoden

In diesem Kapitel wird die Arbeitsweise erläutert. Dabei gibt es drei Schwerpunkthemen, die angesprochen werden. Der Upstreamprozess handelt von der Kultivierung, der Downstreamprozess von der Aufreinigung und die Analysemethoden von der Auswertung der beiden Prozesse.

4.2.1 Upstreamprozess

Das Wort „upstream“ steht im Englischen für „stromaufwärts“ und der Upstreamprozess beschreibt die stromaufwärtsgerichtete Bewegung der Herstellung mit dem Ziel möglichst viel Produkt zu erzeugen. In der Regel bedeuten mehr Zellen mehr Produkt und deshalb soll bei dem Upstream-Prozess eine große Zellmasse erreicht werden. Dabei handelt es sich um einen

Prozess, der in mehreren Schritten stattfindet und bei der Kryokultur beginnt. Wird die Produktion durch eine Induktion gestartet, findet diese meist im letzten Schritt statt. Im Anschluss an den Upstreamprozess folgt der Downstreamprozess, bei welchem das bereits produzierte Produkt gewonnen wird. Meist nimmt die Gesamtmenge an Produkt dabei aufgrund von Verlusten wieder ab.

4.2.1.1 Charakteristika von *E. coli* BL21 (DE3) mit dem verwendeten Vektor

Charakteristika des verwendeten Bakteriums, wie die maximale Wachstumsgeschwindigkeit oder den Ausbeutekoeffizienten, werden durch Schüttelkolbenversuche analysiert. Bei diesen Versuchen wird jede halbe bis ganze h eine Probe genommen und offline das Wachstum mit einer Messung der optischen Dichte (OD) am Photometer analysiert. Die Analysenwerte werden gesammelt, ausgewertet und gegebenenfalls mit vorigen Versuchen verglichen. Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} ,

$$\mu_{\max}(t) = \frac{\ln\left(\frac{c_{XL}(t)}{c_{XL0}}\right)}{t} \quad (1)$$

mit

c_X := Zellkonzentration [gh⁻¹]

t := Zeit [h]

(für den Fall, dass die Zellkonzentration aus der Biotrockenmasse (BTM) berechnet wurde)

$$\mu_{\max}(t) = \frac{\ln\left(\frac{\Delta OD_L(t)}{\Delta OD_{L0}}\right)}{t} \quad (2)$$

mit

ΔOD := Differenz zwischen optischer Dichte (OD) der Nullprobe (z.B. reines Medium) und der Kulturbrühe [-]

(für den Fall, dass die OD bei 600 nm gemessen wurde)

wird bei zwei verschiedenen Temperaturen (30 °C und 37 °C) berechnet. Die Kultivierung bei 30 °C soll im späteren Verlauf dazu dienen, dass die Vorkultur über Nacht laufen kann und die Hauptkultur am nächsten Morgen startet.

4.2.1.2 Vorkultur

Für eine Vorkultur wurden an der Sterilwerkbank 100 mL Vorkulturmedium in einen 1-Liter Schüttelkolben mit Schikanen vorgelegt und mit 200 µL Kryokultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 30 °C und 180 rpm für ca. 16 h im Schüttelschrank inkubiert.

4.2.1.3 Hauptkultur

Die Hauptkultur findet in dem 3-Liter Bioreaktor statt und wird durch das Überführen von 100 mL Vorkultur über eine Sterilkupplung inokuliert. Der Prozess wird durch die Software MFCS gesteuert. Dafür wird ein S88-Rezept aus einer bereits bestehenden Vorlage erstellt.

Die Probenentnahme erfolgt sowohl beim Batch-Prozess, als auch beim Fed-Batch-Prozess stündlich. Dabei werden über das Probenrohr 8 mL entnommen und verworfen (Totvolumen des Probenrohrs) und nochmals 8 mL entnommen, welche der Offline-Analyse dienen.

4.2.1.3.1 Batch-Kultivierung

Bei einer Batch-Kultur, auf Deutsch „Schub“-Kultur, wird ein Medium vorgelegt und das darin enthaltene Substrat von den Zellen aufgebraucht. Zu diesem Zeitpunkt findet die Zellernte statt. Es handelt sich daher nicht um einen kontinuierlichen Prozess, sondern um einen sogenannten Chargenprozess, bei dem Zellen chargenweise abgeerntet werden können.

Bevor eine Batch-Kultur gestartet werden kann, wird ein Teil des Mediums (ohne Glucose, Magnesiumsulfat und Spurenelemente) in den Reaktor gegeben und die pH-Sonde kalibriert. Der andere Teil des Mediums wurde getrennt autoklaviert, um eine bräunliche Färbung des Mediums zu verhindern. Anschließend werden alle Sonden in dem Reaktordeckel befestigt und die Schläuche der Vorlagengefäße angeschlossen. Alle Schläuche (inklusive Probenentnahmeschlauch und Begasungsschlauch) werden abgeklemmt um Gas- und Flüssigkeitsströme in oder aus dem Reaktor zu verhindern. Nur der Abgasschlauch bleibt frei, um einen Druckausgleich zu ermöglichen. Alle Luftfilter werden mit Alufolie abgedeckt, damit sie beim Autoklavieren nicht nass werden. Der Reaktor wird zusammen mit den Vorlagen Antischaummittel und Säure autoklaviert. Das 25 % Ammoniak ist autosteril. Nach dem Autoklavieren wird die Base unter der Sterilwerkbank angeschlossen und das Medium über eine Sterilkupplung komplettiert. Die Sonden, die Kühlung und die Begasung werden

angeschlossen. Im Anschluss kann das entsprechende S88-Rezept von MFCS gestartet werden. Weitere Details zur Batch-Kultivierung wurden erarbeitet und befinden sich deshalb in dem Kapitel Ergebnisse und Diskussion (5.1.2.1).

4.2.1.3.2 Fed-Batch-Kultivierung

Die Fed-Batch-Kultivierung ist eine Erweiterung der Batch-Kultivierung, wobei am Ende der Batch-Kultivierung mit einer Feed-Lösung Glucose in den Reaktor gepumpt wird. Diese Art der Kultivierung wird verwendet, um große Zelldichten zu erreichen. Das Ziel während der sogenannten Zufütterung ist eine konstante zellspezifische Wachstumsrate (μ_{wj}) durch Substratlimitierung. Um die Wachstumsrate konstant zu halten kann die Zufütterpumpe mit oder ohne Regelung betrieben werden. Die Regelung kann zum Beispiel über eine Abgasanalyse erfolgen, bei der die momentane zellspezifische Wachstumsrate errechnet und mit dem Sollwert abgeglichen wird. Der Differenz entsprechend kann die Zufüterraterate gesteigert oder gesenkt werden. Ohne Regelung wird das Zufütterungsprofil schon vor der Kultivierung festgelegt (*open-loop μ -control*). In diesem Fall erfolgt eine Zufütterung ohne Regelung. Für das Zufütterungsprofil wird eine exponentielle Zufüterraterate F_{Rw} ,

$$F_{Rw}(t) = F_{Rwj} \cdot e^{\mu_{wj} \cdot (t - t_j)} \quad (3)$$

mit

F_{Rwj} := Sollwert der Pumpleistung bei Start der Zufütterung [Lh⁻¹]

μ_{wj} := Sollwert spezifische Zellwachstumsrate bei Start der Zufütterung [h⁻¹]

berechnet. Dabei wird aus einem Vorlagegefäß die Feed-Lösung (Tabelle 13) in den Reaktor gepumpt. Die Software MFCS übernimmt beim Start der Zufütterung die Berechnung der Pumpleistung F_{Rj} ,

$$F_{Rj} = \frac{(\mu_{wj} + q_{S/Xm} \cdot y_{X/Sgr}) \cdot V_{Lj} \cdot c_{XLj}}{y_{X/Sgr} \cdot c_{SR}} \quad (4)$$

mit

$q_{S/Xm}$:= Substrataufnahmerate für den Erhaltungsstoffwechsel [gg⁻¹h⁻¹]

$y_{X/Sgr}$:= Wachstumsanteil des Ausbeutekoeffizienten für Zellmasse aus Substrat [-]

V_{Lj} := Volumen der Flüssigphase bei Start der Zufütterung [L]

c_{XLj} := Konzentration an Zellen in der Flüssigphase bei Start der Zufütterung [gL⁻¹]

c_{SR} := Konzentration an Substrat im Reservoir [gL⁻¹]

mit welcher die Glucoselösung in den Reaktor gegeben wird. Die Feed-Lösung enthält ausschließlich Glucose und Magnesiumsulfat (4.1.2). Als Stickstoffquelle dient die Titrierlösung Ammoniak, die während des Prozesses verbraucht wird, um die von *E. coli* produzierte Essigsäure zu neutralisieren.

Bei dem Fed-Batch-Prozess wird die Abgasanalyse (siehe 0) verwendet. Dabei werden die Molenbrüche von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid gemessen und die Daten an MFCS weitergeleitet. In MFCS befinden sich die Formeln für die Sauerstoffeintragsrate (Q_{O_2}), die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (Q_{CO_2}) und den Respirationsquotienten (RQ). Die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} ,

$$Q_{O_2}(t) = Q_{O_2\max}(t) \cdot \frac{x_{OGin}(t) \cdot [1 - x_{CG}(t)] - x_{OG}(t) \cdot [1 - x_{CGin}(t)]}{1 - x_{OG}(t) - x_{CG}(t)} \quad (5)$$

mit

$Q_{O_2\max}$:= maximale Sauerstoffeintragsrate	[gL ⁻¹ h ⁻¹]
x_{O_2in}	:= Sauerstoffmolenbruch am Eingang	[-]
x_{CG}	:= Kohlenstoffdioxidmolenbruch am Ausgang	[-]
x_{OG}	:= Sauerstoffmolenbruch am Ausgang	[-]
x_{CO_2in}	:= Kohlenstoffdioxidmolenbruch am Eingang	[-]

beschreibt den Gasstrom des Sauerstoffs, welcher aus der Luft in das Medium übergeht. Die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate berechnet sich auf die gleiche Weise. Der Respirationsquotient RQ,

$$RQ(t) = \frac{Q_{CO_2}(t) \cdot M_{O_2}}{Q_{O_2}(t) \cdot M_{CO_2}} \quad (6)$$

mit

M_{O_2}	:= molare Masse von Sauerstoff	[gmol ⁻¹]
M_{CO_2}	:= molare Masse von Kohlenstoffdioxid	[gmol ⁻¹]

zeigt das Verhältnis von, bei der Atmung der Zellen, aufgenommenen Sauerstoff und abgegebenen Kohlenstoffdioxid. Dadurch kann Aufschluss über den Stoffwechsel der Zellen gewonnen werden. Bei der Metabolisierung von Glucose liegt der RQ bei eins. Eine Stoffwechselumstellung kann daher häufig am RQ erkannt werden.

Weitere Details zur Fed-Batch-Kultivierung wurden erarbeitet und befinden sich deshalb in dem Kapitel Ergebnisse und Diskussion (5.1.2.3).

4.2.2 Downstreamprozess

Der Downstreamprozess besteht zumeist aus mehreren Schritten. Der Prozess dient im Allgemeinen der Aufreinigung und der Aufkonzentrierung des Produktes. Als Aufreinigung wird hauptsächlich die Abtrennung von Fremdproteinen verstanden. Die in dieser Arbeit verwendeten Aufreinigungsschritte wurden in dem Kapitel Vorgehen (3.3) angesprochen. Die Methoden aus dem Downstreamprozess werden größtenteils wie in der Masterarbeit von Johanna Hardt⁷ durchgeführt. Im Gegensatz zu der Masterarbeit wird jedoch auf die Arbeit unter Stickstoffatmosphäre verzichtet, weil eine Oxidation des AMPs durch das vorangegangene Proteindesign nicht wahrscheinlich erscheint⁵.

4.2.2.1 Zellernte

Die Zellernte findet über das Probenrohr statt. Dafür wird das Probenrohr und der damit verbundene Schlauch mit Kulturbrühe gefüllt und mit Hilfe der Schwerkraft, der Reaktorinhalt in mehrere 250 mL Zentrifugenbecher (unterhalb des Reaktorbodens positioniert) überführt. Dabei werden die Gefäße maximal bis 200 mL aufgefüllt. Anschließend werden die Zentrifugenbecher austariert und bei 4 °C für 15 min mit 8.000xg, zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, während mit dem Pellet weitergearbeitet werden kann.

4.2.2.2 Zellaufschluss

Bei dem Zellaufschluss mittels Ultraschall dienen Frequenzen im Bereich 1-40 kHz dazu, Druckunterschiede im Wasser zu erzeugen, die zum Aufplatzen der Zellen führen. Die Ultraschallwellen werden mit einem Metallstab auf die Zellsuspension übertragen.

Das Zellpellet aus 4.2.2.1 wird in 20 mL PBS-Puffer (4.1.1) zu einer Endkonzentration von 50 gL⁻¹ in einem 50 mL Falcon resuspendiert. Anschließend findet ein Ultraschallaufschluss (Labsonic U) statt. Ein Eisbad wird dafür vorbereitet und das 50 mL Falcon hineingestellt. Der Aufschluss dauert neun min und wird mit maximaler Amplitude und kontinuierlichem Tastverhältnis durchgeführt. Danach wird nochmals zentrifugiert (18.000xg, 40 min, 4 °C). Das Produkt befindet sich im Pellet und der Überstand wird verworfen.

4.2.2.3 Solubilisierung

Die Solubilisierung dient dazu, mit der Hilfe des chaotropen Guanidins die Inclusion Bodies mit dem Fusionsprotein in Lösung zu bringen. Das Pellet aus 4.2.2.2 wird in 20 mL Solubilisierungspuffer (4.1.1) resuspendiert und 60 min bei 50 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wird zentrifugiert (5.000xg, 20 min, 4 °C) und das Pellet verworfen.

4.2.2.4 IMAC

Als Chromatographiemethode wird die immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) angewendet. Im Allgemeinen wird unter der Chromatographie die Trennung von Stoffen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften verstanden. Dabei gibt es eine unbewegliche Phase (stationäre Phase) und eine bewegliche Phase (mobile Phase), welche die stationäre Phase umströmt. Bei der IMAC besitzt die stationäre Phase immobilisierte Metallionen (z. B. Ni²⁺), welche zusammen mit der Aminosäure Histidin einen Chelatkomplex bilden und diese dadurch festhalten. Durch die Aneinanderreihung von Histidinen (Polyhistidine) im Zielprotein kann eine starke Selektivität geschaffen werden. Nach der Bindung des Zielproteins an der stationären Phase, wird die Säule gewaschen, um Fremdproteine aus der Säule zu entfernen. Im Anschluss dient eine hohe Konzentration, eines um die Bindungsstellen konkurrierenden Stoffes (z. B. Imidazol), dem Eluieren des Zielproteins¹¹.

Damit ungelöste Bestandteile nicht die Säule verblocken, wird der Überstand aus 4.2.2.3 mit einem Spritzenaufsatzfilter (0,2 µm) filtriert. Die Lösung wird im Anschluss auf eine Ni-NTA-Säule (HisTrap™ FF crude 1 mL) einer Äkta avant (GE Healthcare) gegeben und mit Equilibrierungspuffer (4.1.1) gewaschen. Ist die UV-Absorption wieder auf die Basislinie abgefallen wird mit dem Elutionspuffer (4.1.1), welcher 100 mM Imidazol enthält, eluiert und das Eluat mit Hilfe eines Fraktionssammlers fraktioniert und anschließend gegebenenfalls gepoolt.

4.2.2.5 Säurespaltung

Generell können Peptidbindungen mit Säure gespalten werden. Es gibt jedoch Peptidbindungen, die aufgrund der Seitenketten der beteiligten Aminosäuren stärker anfällig für eine Säurespaltung sind. Dieses Wissen wird in dem Schritt ausgenutzt, um die säureanfällige Peptidbindung zwischen Asparagin und Prolin zu spalten. Andere leicht säureanfällige Peptidbindungen wurden beim Proteindesign entfernt⁸. Aus dem Pool von 4.2.2.4 werden 500 µL entnommen und mit Hilfe eines Spinfilters (VivaSpin 2, MWCO 3 kDa) die Lösung aufkonzentriert. Dafür wird bei 4 °C für 24 min mit 12.000xg zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und mit 1 mL Essigsäure (0,1 M) bei 60 °C für 24 h inkubiert. Das Fusionsprotein wird dabei gespalten.

4.2.2.6 Neutralisation

Mit Hilfe der Neutralisierung sollen die Spaltprodukte AMP und proteindesignte Onkonase aus 4.2.2.5 voneinander getrennt werden, indem die Onkonase präzipitiert, während das AMP in Lösung bleibt. Die Neutralisierung findet mit Hilfe von NH₃ statt. Von einer Ammoniaklösung mit 2,5 % werden 93,3 µL zur Proteinlösung gegeben und diese gemischt. Es wird angenommen, dass gleiche Molmengen (0,1 mmol) Essigsäure und Ammoniak zu einer Neutralisation (pH-Wert zwischen 6 und 8) führen, auch wenn die Lösungen unterschiedliche pK_S/pK_B-Werte besitzen. Anschließend wird über 16 h bei 28 °C inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (18.000xg, 60 min, 4 °C) bei welchem das Pellet verworfen wird und sich in dem Überstand das gereinigte Produkt befindet.

4.2.3 Analysemethoden

Für die Bewertung der einzelnen Aufreinigungsschritte wird das Verfahren der SDS-PAGE angewendet. Dabei wird einmal mit Tricin gearbeitet und einmal ohne. Die Tricin-SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen kleiner 30 kDa, womit sowohl das Fusionsprotein als Ganzes, als auch das AMP analysiert werden können. Dafür werden verschiedene Gelschichten mit unterschiedlichen Laufeigenschaften verwendet.

4.2.3.1 Tricin- Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) Gelelektrophorese

Für die Tricin-SDS-PAGE werden zuerst der Anodenpuffer, der Kathodenpuffer, die Fixierlösung, die Färbelösung und die Entfärbelösung angesetzt (4.1.1). Anschließend kann das Gel gegossen werden. Dafür werden die drei Lösungen aus Tabelle 15, getrennt voneinander, unter dem Abzug angesetzt. TEMED und APS werden erst kurz vor dem Gießen hinzugegeben.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Tricin-SDS-Gele

Komponente	Trenngel (15 %)	Abstandsgel (9 %)	Sammelgel (4 %)	Einheit
Acryl-/Bisacrylamid (30 %)	5	3	1,33	mL
Gelpuffer (3x)	2,25	3,3	3,3	mL
Glycerol (87 %)	2	1	-	mL
VE-Wasser	0,75	2,7	5,37	mL
TEMED	9	5	5	µL
APS	12	9	9	µL
Volumen/Gel	3	0,5	1	mL

Zuerst wird das Trenngel, anschließend das Abstandsgel und am Ende das Sammelgel gegossen. Alle Schichten werden direkt nacheinander gegossen und erst das fertige Gel polymerisiert für eine h aus. Die Gele werden maximal zwei Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Während der Wartezeit können die Bäder vorbereitet werden (ohne Puffer). Nach dem Aushärten wird der Kamm entfernt und die Gele in die Bäder gestellt (Taschen nach Innen zeigend). Der Kathodenpuffer wird zwischen die zwei Gele einer Konstruktion gegossen und der Anodenpuffer anschließend in die Kammer gegeben.

Die Proben werden zusammen mit dem Probenpuffer aufgeköcht (5 min, 95 °C) und in die Probetaschen gegeben. Zusätzlich wird ein µl Standard aufgegeben (Ultra-low Range Molecular Weight Marker, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH). Pro Gel werden 20 mA angelegt und nach etwa zwei h läuft der Probenpuffer aus dem Gel.

Die Gele können nun entnommen und kurz mit VE-Wasser abgespült werden. Anschließend wird mit der Hilfe eines Spatels eine Glasplatte vorsichtig abgetrennt und die Fransen der Probetaschen abgeschnitten. Die Gele werden in einer Schachtel mit Fixierlösung, auf einem Kippschüttler für 30 min inkubiert. Mit VE-Wasser wird 3 mal 5 min gewaschen und anschließend mit der Färbelösung gefärbt (mind. 3 h).

Für die Auswertung der Gele werden diese auf eine Projektionsplatte gelegt und mit dem Gelscanner Gel Doc™ EZ von Biorad eingescannt. Die Bilder können mit dem Programm Image-Lab bearbeitet und ausgewertet werden. Dafür erkennt es die Proteinbanden und kann auch die Quantität der einzelnen Proteine abschätzen, wenn entsprechende Standards mit aufgetragen werden.

4.2.3.2 Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) Gelelektrophorese

Die einfache SDS-PAGE besitzt einen ähnlichen Ablauf wie 4.2.3.1. Die Gele und Puffer unterscheiden sich jedoch. Für die Analyse mittels SDS-PAGE werden 15%-Gele gegossen. Jedes Gel besteht dabei aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Zuerst wird das Trenngel und anschließend das Sammelgel gegossen (Tabelle 16). Nach jedem Gießvorgang wird mindestens 35 min gewartet. Für die Gelelektrophorese werden die Proben zusammen mit dem Probenpuffer bei 95 °C aufgekocht und anschließend in die Geltaschen gefüllt. Als Marker wird der PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Das Gel läuft bei den Einstellung 200 V, 3 A und 300 W für 2 h, wobei es an ein Kühlsystem angeschlossen ist.

Tabelle 16: Zusammensetzung von zwei Gelen mit jeweils 15% SDS Trenngel und Sammelgel

Komponente	15 % Trenngel	Sammelgel	Einheit
VE-Wasser	2,25	2,07	mL
1,5 M Tris	2,5	-	mL
1,0 M Tris	-	380	µL
Rotiphorese 30	5,04	0,49	mL
10 % SDS	100	30	µL
TEMED	10	3,8	µL
10 % APS	100	30	µL
Volumen/Gel	4,5	1	mL

5 Ergebnisse und Diskussion

Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit präsentiert. Sie werden in der gleichen Reihenfolge dargestellt wie die Methoden.

5.1 Upstreaming

Die Etablierung eines Upstreamprozesses wurde über mehrere Schritte erreicht. Dabei wurde der Prozess von kleinen zu großen Volumina und von einfachen zu komplexen Kultivierungsstrategien entwickelt.

5.1.1 Vorbereitende Experimente

Mit Hilfe einer Schüttelkolbenkultivierung konnte eine WCB erstellt werden, die aus 32 Kryoröhrchen mit 1 mL und acht Kryoröhrchen mit 2 mL Kryokultur (in Glycerin) bestand. Diese wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und für alle folgenden Kultivierungen verwendet.

Zur Etablierung einer Methode für die Vorkultur wurden vier verschiedene Animpfvolumina untersucht: $0,2\text{ }\mu\text{L}$, $0,3\text{ }\mu\text{L}$, $0,4\text{ }\mu\text{L}$ und $0,5\text{ }\mu\text{L}$. Das Animpfvolumen, welches dazu führte, dass die Zellen nach etwa 15 h kurz vor dem Ende der exponentiellen Phase standen, sollte in die Methode eingehen.

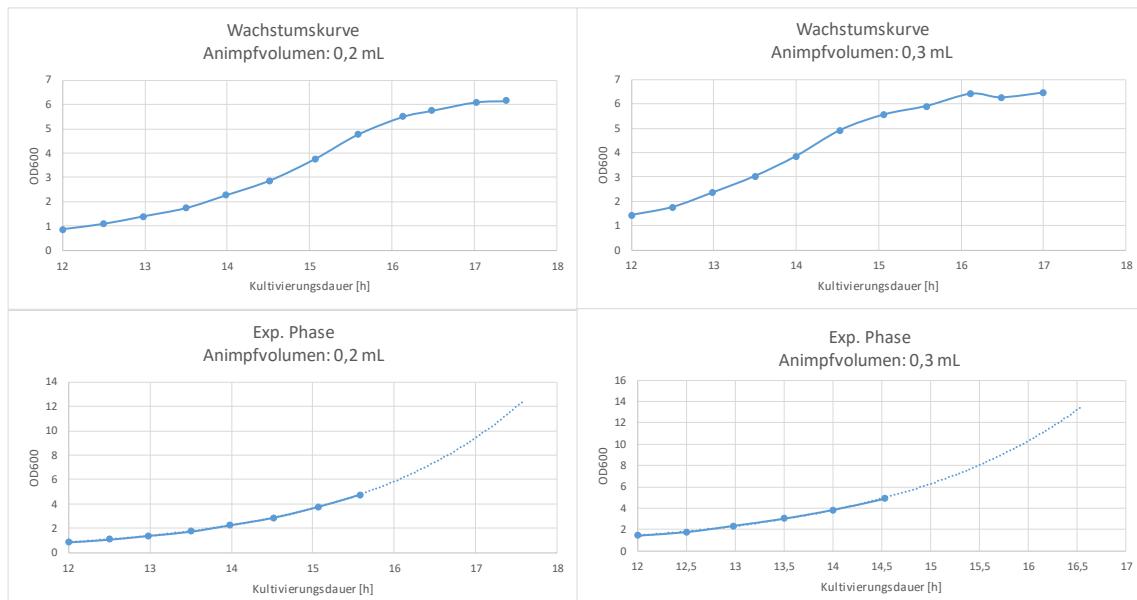


Abbildung 8: Gegenüberstellung der Wachstumskurve (oben) und der exponentiellen Wachstumsphase ab 12 h (unten) bei verschiedenen Animpfvolumina ($0,2\text{ mL}$, $0,3\text{ mL}$). Es wurde bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 180 rpm kultiviert. Die Wachstumskurve zeigt sowohl die exponentielle Phase als auch den Anfang der stationären Phase. Für das Inokulieren werden Zellen aus dem Ende der exponentiellen Phase verwendet.

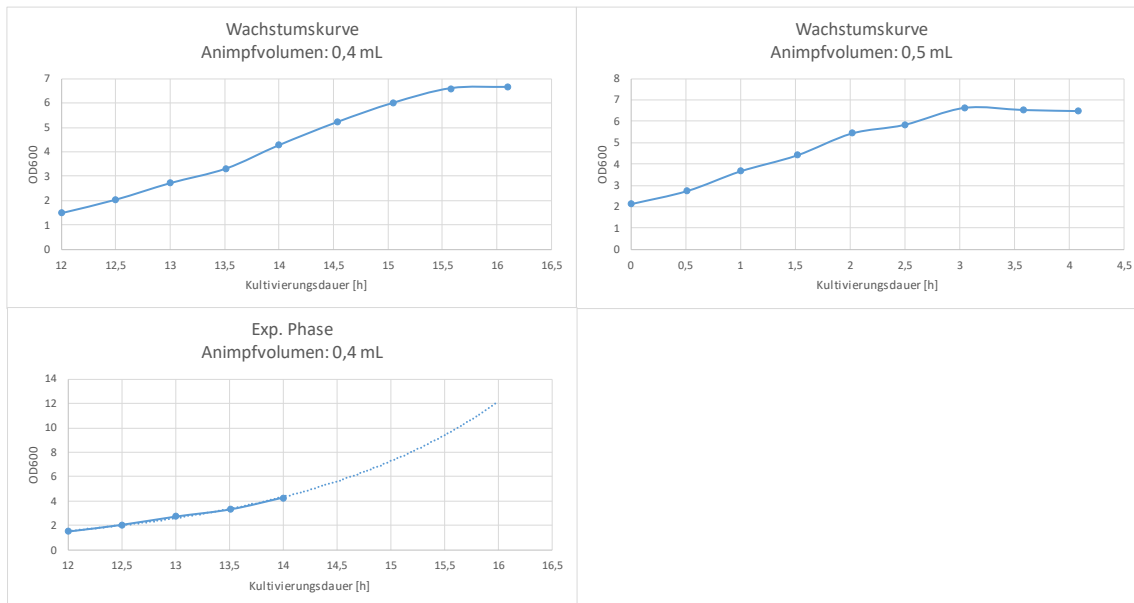


Abbildung 8: Gegenüberstellung der Wachstumskurve (oben) und der exponentiellen Wachstumsphase (nur 0,4 mL) ab 12 h (unten) bei verschiedenen Animpfvolumina (0,4 mL, 0,5 mL). Es wurde bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Die Wachstumskurve zeigt sowohl die exponentielle Phase als auch den Anfang der stationären Phase. Für das Inokulieren werden Zellen aus dem Ende der exponentiellen Phase verwendet.

Abbildungen 8 und 9 zeigen die Wachstumskurven nach den ersten zwölf h. In diesen Stunden wurden keine Proben genommen. Unter den Wachstumskurven befindet sich der Abschnitt der exponentiellen Phase. Bei einem Animpfvolumen von 0,5 mL war nur noch das Ende der exponentiellen Phase sichtbar und wurde deshalb nicht abgebildet. Auch mit 0,4 mL und 0,3 mL Animpfvolumen wurde das Ende der exponentiellen Phase schon nach 14 bzw. 14,5 h erreicht. Beide Volumina kamen daher für die Methode nicht in Frage. Nur bei einem Animpfvolumen von 0,2 mL war die Kultur nach 15 h noch gänzlich in der exponentiellen Phase. Mit einem OD-Wert von etwas unter vier bietet die Zellkultur eine genügend hohe Zellkonzentration, um damit einen Batch-Prozess zu starten. Die Zellen wiesen im Durchschnitt eine maximale zellspezifische Wachstumsrate von $0,48 \text{ h}^{-1}$ auf.

Die Aufnahme einer Wachstumskurve anhand von Biotrockenmasse (BTM) scheiterte, weil die Zellkonzentration im Schüttelkolben sehr gering war und bei einem erhöhten Volumen der Probe die 100 mL im Schüttelkolben nicht ausgereicht hätten.

Das für die Kultivierung gestellte Rezept des Mediums enthielt Thiamin, obwohl *E. coli* BL21 (DE3) nicht Thiamin-auxotroph ist (Genotyp nicht Thi). Aus diesem Grund wurde eine Probekultivierung im Schüttelkolben ohne Thiamin durchgeführt. Diese hat die Theorie bestätigt, weshalb im Folgenden kein Thiamin im Medium eingesetzt wurde.

5.1.2 MFCS S88-Rezept

In dem Programm MFCS können S88-Rezepte eingepflegt werden. Dabei handelt es sich um einen Ablaufplan, den MFCS während einer Kultivierung durchführt. Das Programm befindet sich auf einem Computer, welcher an die DCU (Biostat A) des Bioreaktors angeschlossen ist. Ausgehend von einem S88-Rezept für den Batch-Prozess mit *Pichia pastoris*, wurde das folgende S88-Rezept für *E. coli* entwickelt. Dabei wurden an einigen Stellen neue Schritte eingebaut oder auch modifiziert. Bei allen Schritten wurde versucht, die Übersichtlichkeit zu bewahren, damit Modifikationen im Nachhinein erleichtert werden. Die Einstellungen im S88-Rezept von MFCS werden auf der rechten Seite gezeigt. Während der Bachelorarbeit wurden zwei S88-Rezepte (Batch-Prozess, Fed-Batch-Prozess) erarbeitet. Auf die komplette Darstellung wurde verzichtet, weil sich die Init- und die Batch-Phase der beiden Rezepte stark ähneln. Stattdessen wurden die ersten beiden Phasen des Batch-Prozesses und die letzten Phasen des Fed-Batch-Prozesses dargestellt.

5.1.2.1 Init-Phase

Der erste Schritt der Init-Phase dient dazu, alle Variablen aktiv zu schalten und zu speichern. Der zweite Schritt startet die eingespeicherten Berechnungen. Der dritte Schritt ermöglicht es dem MFCS-Programm, die Steuerung über den Bioreaktor zu übernehmen, womit die Automatisierung ermöglicht wird. Mit dem vierten Schritt werden die Sollwerte eingestellt, die Regler sind jedoch noch nicht aktiv. Dies ist wichtig, weil der aktive pO_2 -Regler vollen Zugriff auf N_{St} und die Begasung hat und sich somit Widersprüche ergeben



Abbildung 9: Schematischer Verlauf der Init-Phase des Rezeptes für einen Batch-Prozess

würden. Aus diesem Grund befinden sich auch die Mode-Einstellung der pO_2 -Regelung im selben Schritt. Außerdem wurde die pH-Regelung ausgestellt, damit diese in den folgenden 20 s nicht schon titriert. Die 20 s Pause wurden deshalb eingebaut, weil die pO_2 -Regelung zum Erhalt des Befehls etwas Zeit braucht und die Rührerdrehzahlregelung im nächsten Schritt angesprochen wird. Zudem werden im letzten Schritt der Init-Phase die Mode-Einstellungen der verbleibenden Regler festgesetzt. Dies dient der Vorbereitung auf die nächste Phase, wobei die Begasung mit O_2 dauerhaft ausgeschaltet bleibt.

5.1.2.2 Batch-Phase

Die Batch-Phase beginnt mit einer Frage der Software MFCS an den Anwender: „pO₂-/pH-Sonden kalibriert, Schlauchklemmen gelöst und Schläuche gefüllt?“ Diese Checkliste hilft dem Anwender und gibt ihm gleichzeitig Zeit, die angesprochenen Tätigkeiten auszuführen. Die Frage wird so lange vom System angezeigt, bis der Anwender diese bestätigt. Bei den „Schläuchen“ handelt es sich um diejenigen, die von den Vorlagengefäßen zu dem Bioreaktor führen. Das Auffüllen der Schläuche konnte über die Weboberfläche von Sartorius durchgeführt werden und ist deshalb so wichtig, weil die Regelung der Pumpen annimmt, dass mit jeder Umdrehung Vorlage in den Reaktor hineinläuft. Auch die gesamte Kalibrierung fand mit Hilfe der Weboberfläche statt. Für die Kalibrierung der pO₂-Sonde haben sich folgende Einstellungen bewährt: 1,6 vvm und 1.000 rpm. Begast wurde zunächst mit Stickstoff für die Einstellung des Nullpunktes und anschließend mit Luft für die Ermittlung der Steilheit. Vor dem Wechsel des Gases wurde gewartet, bis sich keine Änderung des Stromes in der pO₂-Sonde mehr zeigte. Die Messpunkte der Kalibriergeraden wurden notiert, um bei einem Vergleich mit der vorigen Kalibrierung eventuelle Unstimmigkeiten

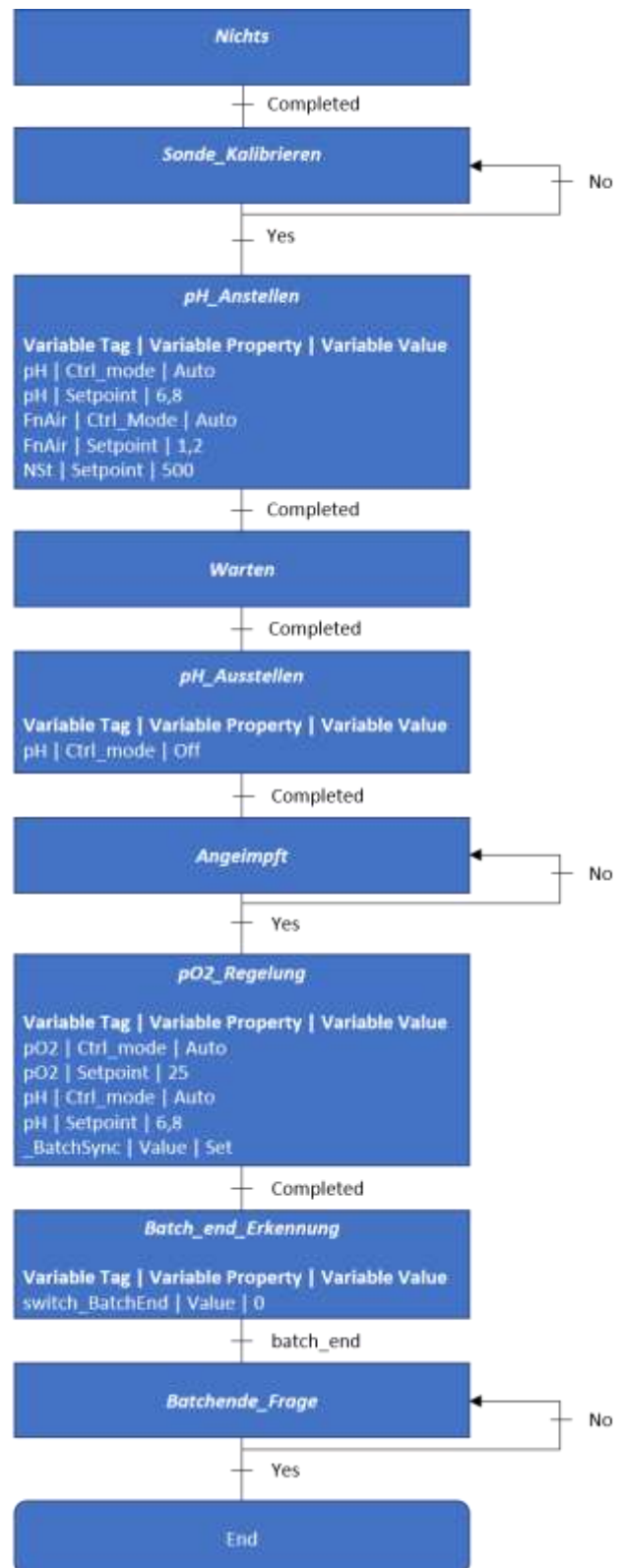


Abbildung 10: Schematischer Verlauf der Batch-Phase des Rezeptes für den Batch-Prozess

zu erkennen. Die pH-Sonde wurde rekaliert, wofür 8 mL des Mediums über das Probenrohr

entnommen und offline der pH-Wert gemessen wurde. Der gemessene Wert wurde mittels der Weboberfläche eingepflegt. Nach dem Kalibrieren wird die pH-Regelung angestellt und die Begasung sowie N_{St} auf ihre Anfangssollwerte gesetzt. Die pH-Regelung bekommt fünf min Zeit, um den Sollwert einzustellen. Anschließend wird der pH-Regler wieder ausgestellt, damit während des Animpfens keine Säure oder Lauge in den Reaktor läuft. Das Animpfen wird über eine Sterilkupplung vollzogen, wobei die Schwerkraft ausgenutzt wird (Animpfgefäß über Reaktordeckel). Der Verbindungsschlauch wurde möglichst dick und möglichst kurz gewählt, damit das Animpfen schnell geschehen konnte und nicht viel Kulturbrühe im Schlauch hängen blieb. Nach dem Animpfen wird die Prozesslaufzeit auf „0“ gesetzt und die pO_2 -Regelung sowie die pH-Regelung eingeschaltet. Die Sollwerte wurden aufgrund der Vollständigkeit nochmals eingepflegt, obwohl die Übersichtlichkeit des Rezeptes darunter leidet. Im darauffolgenden Schritt wird eine Variable auf „0“ gesetzt, die dadurch das Add-on aktiv schaltet. Dieses Programm liest die beiden Werte N_{St} und pO_2 ein. Steigt der pO_2 -Wert auf über 35 % und nimmt im gleichen Zeitraum N_{St} um 40 rpm in einer Minute ab, wird die Variable auf „1“ geändert. MFCS kann dann mit dem nächsten Schritt fortfahren. Dieser Vorgang wird als Batchende bezeichnet, denn die Glukose ist verbraucht und in Folge dessen sinkt der Stoffwechsel von *E. coli* stark ab. Mit einem abnehmenden Stoffwechsel wird auch die Sauerstoffaufnahme (OUR) geringer und der Sauerstoffpartialdruck im Reaktor steigt. Die pO_2 -Regelung führt dazu, dass N_{St} heruntergefahren wird. Es werden beide Werte betrachtet, damit es nicht zu einem verfrühten Ende durch Messabweichungen kommt. Weiterhin wurde ein Schritt mit einer Abfrage („*Batchende_Frage*“) eingebaut, damit eine eventuelle Fehleinstellung nicht direkt zum Versuchsabbruch führt. Nach der Erprobung der Batch-Ende-Erkennung wurde der Schritt mit der Abfrage gelöscht, um einen automatischen Übergang in die Fed-Batch-Phase zu ermöglichen.

5.1.2.3 Fed-Batch-Phase

In der Fed-Batch-Phase werden zuerst die Werte zur Berechnung der anfänglichen Pumpleistung (Gleichung 3) eingelesen und die Pumpe der Feed-Lösung („FR2“) aktiviert. Wie schon im vorigen Kapitel erwähnt, wird der Sollwert aufgrund der Vollständigkeit mit eingepflegt. Die maximale Pumprate wurde mit Hilfe einer Stoppuhr vor dem Versuch ermittelt. Sie beträgt 378 mLh^{-1} . Der Sollwert für die zellspezifische Wachstumsrate wurde aufgrund der hohen maximalen zellspezifischen Wachstumsrate auf $0,25 \text{ h}^{-1}$ festgesetzt. Des Weiteren wurde ein Ausbeutekoeffizient von 0,45 und ein Substratverbrauch für den Erhaltungsstoffwechsel von $0,01 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ angenommen. Mit dem Ausbeutekoeffizienten und der gegebenen Glukosekonzentration im Batch-Prozess werden 9 gL^{-1} Zellmasse erhalten, die im ersten Schritt eingelesen wird. Das bedeutet, dass mit jeder Änderung der Glukosekonzentration im Batch-Prozess, das Rezept modifiziert werden muss. Der nun folgende Schritt stellt eine Variable auf „1“. Damit wird, wie in der Batch-Phase, das Add-on aktiviert. In diesem Fall dient das Add-on der

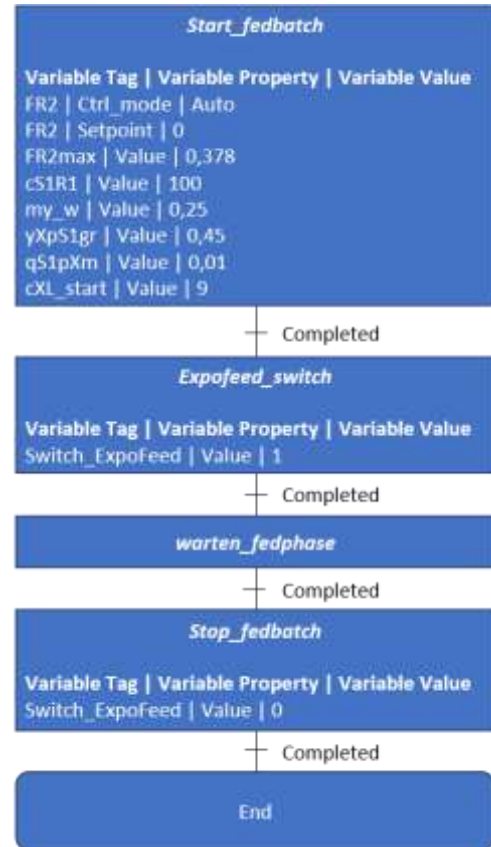


Abbildung 11: Schematischer Verlauf der Fed-Batch-Phase des Rezeptes für den Fed-Batch-Prozess

Einstellung der relativen Pumprate. Das Programm berechnet sowohl die relative Pumprate am Anfang, als auch die exponentielle Steigung. Das Add-on besitzt dafür Zugriff auf die Pumpe „FR2“. Die Fed-Batch-Phase kann nun theoretisch so lange laufen, bis die maximale Pumprate erreicht ist oder der Bioreaktor ein vorher zu definierendes maximales Volumen (Fassungsvolumen des Bioreaktors abzüglich des Volumens der Feed-Lösung für die Produktionsphase) erreicht hat. Um die Wartezeit zu bestimmen, wird vor der Fermentation die gewünschte Zelldichte festgelegt und mit den gegebenen Werten diese Zeit berechnet. Kann die gewünschte Zelldichte mit den gewählten Einstellungen nicht erreicht werden, gibt es die Möglichkeit, die Glukosekonzentration im Reservoir zu erhöhen. Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Pumpe aufgrund sehr niedriger Pumpraten an Genauigkeit verliert und dass sich durch die erhöhte Viskosität der Feed-Lösung eine kleinere maximale

Pumpleistung ergeben wird. Nach der Wartezeit wird die Variable wieder auf „0“ gesetzt und die Pumpe fördert mit gleichbleibender Rate weiter. Eine mögliche Verbesserung könnte herbeigeführt werden, indem genau das ermittelte Volumen an Feed-Lösung in dem Reservoir bereitsteht und eine Fed-Batch-Ende-Erkennung (gleiche Kriterien wie Batch-Ende-Erkennung) eingerichtet wird. Ist das Fed-Batch-Ende erkannt, könnte ein zweites Reservoir mit einer zweiten (oder auch der gleichen) Pumpe angesprochen werden.

5.1.2.4 Production-Phase

Der erste Schritt der Produktionsphase wird dafür genutzt, die pO₂-Regelung abzuschalten, eine neue zellspezifische Wachstumsrate von 0,15 h⁻¹ einzustellen und die vermeintliche Zellkonzentration am Ende der Fed-Batch-Phase (in diesem Fall 15,4 gL⁻¹) einzulesen. Diese Werte dienen der neuen Berechnung der relativen Pumprate. Wie schon bei den vorigen Schritten, wird auch hier 20 s gewartet, wenn nacheinander die pO₂-Regelung und die Rührdrehzahl angesprochen werden. Die Rührdrehzahl wird auf 900 rpm festgesetzt. Diese Einstellung kann nach einigen Versuchen auf einen adäquaten Wert (ausreichende Versorgung mit Sauerstoff) gesetzt werden. Es wird eine Variable von „0“ auf „1“ gesetzt, um die Pumpe mit der neu berechneten relativen Pumprate zu fahren (gleiches Prinzip wie in der Fed-Batch-Phase). Im Anschluss findet die Induktion statt. Für diesen Schritt wird der Anwender benötigt. Dieser muss nun anhand des Flüssigkeitsvolumens (V_L wird von MFCS berechnet) errechnen, wieviel Mol IPTG zur Induktion benötigt werden. Aus Vorexperimenten ist bekannt, dass eine Endkonzentration von 0,4 mMol dabei für die Induktion ausreicht. Über ein Septum wird die entsprechende Menge mit einer Spritze in den Reaktor überführt. Es wird ein Spritzenaufsatzfilter (0,2 µm) verwendet, um eine Kontamination zu vermeiden. Jedoch sollte beachtet werden, dass ein gewisses Volumen (ca. 0,6 mL) in dem Filter verbleibt

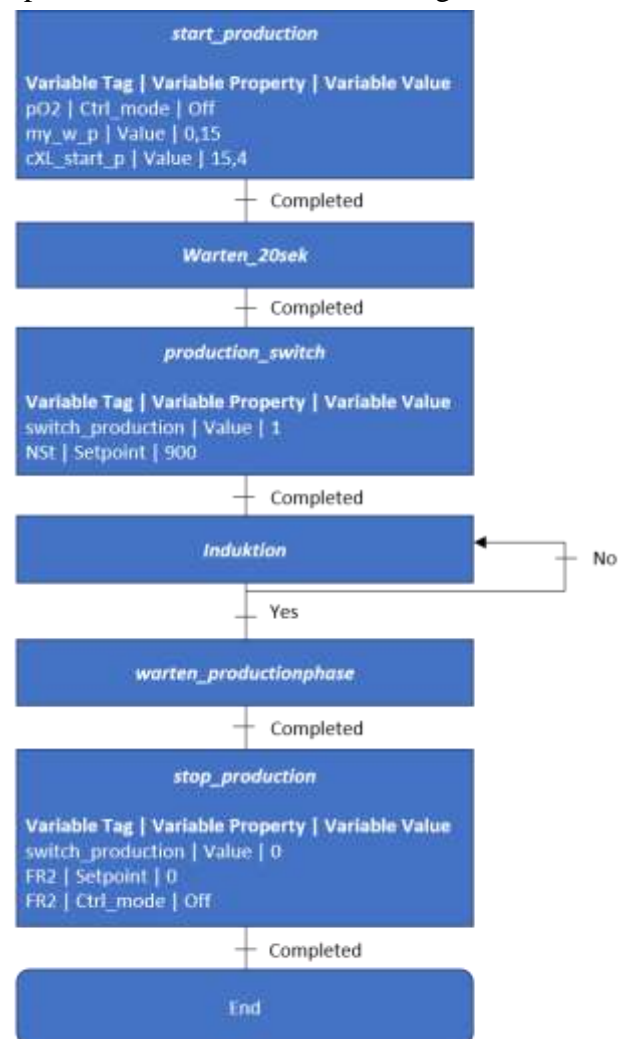


Abbildung 12: Schematischer Verlauf der Production-Phase des Rezeptes für den Fed-Batch-Prozess

und entsprechend mehr angesetzt werden muss. Anschließend startet die Produktionsphase. Genauso wie in der Fed-Batch-Phase wird eine bestimmte Wartezeit eingegeben. Eine optimale Produktionszeit wurde noch nicht ermittelt, aber schon nach einer h konnte Produkt in *E. coli* nachgewiesen werden. Im folgenden Schritt wird die angesprochene Variable wieder auf „0“ gesetzt, die Pumpe „FR2“ ausgeschaltet und ein neuer Sollwert von null für diese eingestellt. Dies dient dazu, dass die Pumpe bei der folgenden Kultivierung durch ausschließliches Aktivieren (Mode-Einstellung: Remote) nicht anfängt zu Pumpen.

5.1.2.5 End-Phase

In der End-Phase wird die Datenspeicherung beendet und die Regler werden ausgeschaltet.

5.1.2.6 Zusammenfassung S88-Rezept

Es wurden zwei funktionierende S88-Rezepte entwickelt: Ein Batch-Prozess und ein Fed-Batch-Prozess. Dabei entstand eine Methode, die in den nachfolgenden Arbeiten genutzt werden kann. Es bestehen noch einige Verbesserungsmöglichkeiten, um den Prozess noch weiter zu automatisieren (siehe oben) und auch die Übersichtlichkeit des Rezeptes kann an einigen Stellen noch verbessert werden, wenn sichergestellt ist, dass der Sollwert und die Mode-Einstellung nicht immer zusammen in einem Schritt auftauchen müssen. Die nachfolgenden AnwenderInnen könnten dann schneller und einfacher Änderungen im S88-Rezept vornehmen.

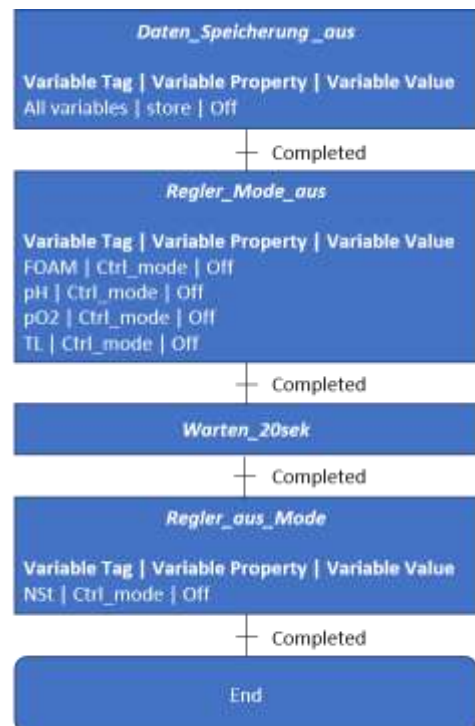


Abbildung 13: Schematischer Verlauf der End-Phase des Rezeptes für den Batch-Prozess

5.1.3 Batch-Fermentation

Die Batch-Fermentationen dienten der Vorbereitung auf die Fed-Batch-Fermentation. Aus diesem Grund fand nur die erste Batch-Fermentation mit einem großen Volumen statt, während bei den anderen mit dem geringstmöglichen Volumen gearbeitet wurde. Die Erkenntnisse der Kultivierung flossen in die Gestaltung des S88-Rezeptes und der Ausstattung des Bioreaktors ein. Zu jeder Kultivierung wurde eine Messdatenübersicht erstellt, um den Prozess visuell darzustellen. In dieser Übersicht sind zusätzlich wichtige Parameter, wie das Füllvolumen (V_{L0}), die Temperatur (ϑ_{LW}), den pH-Wert (pH_w), den pO_2 -Wert (pO_{2w}) und die Begasungsrate (F_{nAirw}), dargestellt. In der Prozessübersicht ist der Verlauf der Rührerdrehzahl (N_{St}), des pH-Wertes, des pO_2 -wertes und c_{XL} (offline) abgebildet. Für die Bestimmung der Zellkonzentration wurde die Biotrockenmasse bestimmt.

5.1.3.1 Kultivierung am 17.04.2018

Mit der ersten Kultivierung sollte das entwickelte S88-Rezept getestet werden. Vor der richtigen Kultivierung fand eine „Trockenübung“ mit Wasser statt, in der das gesamte Rezept durchlaufen wurde.

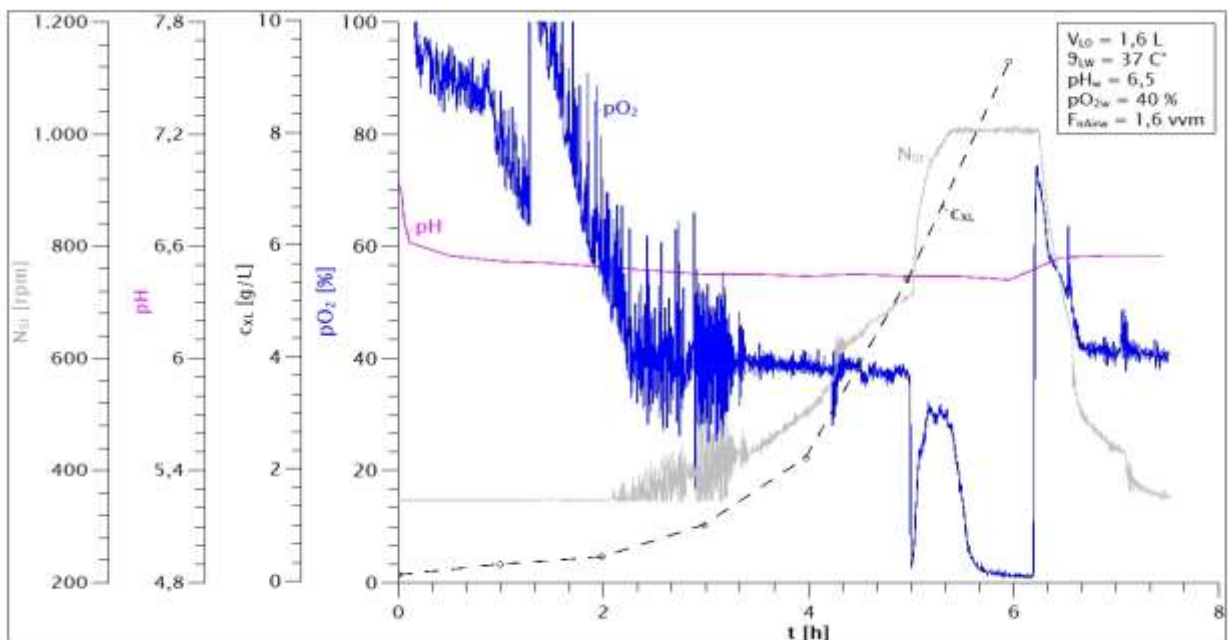


Abbildung 14: Messdatenübersicht der Batch-Kultivierung vom 17.04.2018

Zuerst wurden die pH-Sonde und die pO₂-Sonde kalibriert. Die Kalibrierung der pO₂-Sonde funktionierte nicht richtig, weshalb der pO₂-Wert am Anfang über hundert Prozent lag. Zum Zeitpunkt null wurde angeimpft (Fallen des pO₂-Wertes) und nach etwas mehr als sechs h war der Batch-Prozess vorbei (starkes Ansteigen des pO₂-Wertes). Es ist zu erkennen, dass gleichzeitig mit dem Animpfen die pH-Regelung erfolgte und der Sollwert von pH 6,6 erst nach der Inokulation erreicht wurde. Außerdem zeigte der pH-Wert ein ganz leichtes Sinken während des gesamten Batch-Prozesses, der jedoch in dem Totband (Toleranzbereich des Istwertes) lag. Nach dem Batch-Ende stieg er wieder aufgrund der Verstoffwechslung des vorher produzierten Acetats. Die Zellkonzentration nahm in den ersten fünf h nach dem Animpfen exponentiell zu, während sie in der letzten h nur noch linear anstieg. Dies kann mit dem Sauerstoffpartialdruck begründet werden, der zu diesem Zeitpunkt bei fast null lag und so nur ein lineares Wachstum der Zellen zuließ. Der pO₂-Wert schwankte während des gesamten Prozesses sehr stark, was auf Messstörungen hinweist, die z. B. durch Blasen an der Sonde verursacht worden sein können. Nach etwas mehr als zwei h gab es einen sprunghaften Anstieg des pO₂-Wertes auf etwa hundert Prozent, weil außerplanmäßig eine Rekalibrierung durchgeführt wurde. Die neue und die alte Kalibriergerade wurden miteinander verglichen und daraufhin ein neuer pO₂-Sollwert (40 %) festgelegt. Nach etwa 2,5 h schwankten sowohl die pO₂-Werte als auch die Rührerdrehzahlen sehr stark. Dies war eine Folge der pO₂-Regelung, die wahrscheinlich durch die auch vorher schon starken Schwankungen des pO₂-Wertes gestört wurde. Nach fünf h wurde Schaum detektiert und es erfolgte eine automatische Zugabe von Antischaummittel. Der pO₂-Wert fiel stark ab, weil es sich bei dem Antischaummittel um ein Silikonöl handelt, das sich auf die Grenzschicht zwischen Wasser und Luft setzt und dadurch den Sauerstoffübergang erschwert¹². Durch den Abfall des pO₂-Wertes wurde die Rührerdrehzahl erhöht und erreichte schließlich das Maximum. In der Folge sank der pO₂-Wert wieder, weil die Zellen mehr Sauerstoff verbrauchten als eingetragen wurde (OUR > OTR). Am Ende des Batch-Prozesses, nach etwa 6,5 h stieg der pO₂-Wert bei gleichzeitiger Abnahme der Rührerdrehzahl an. Anschließend sank der pO₂-Wert wieder etwas, woran eine Stoffwechselaktivität (siehe oben) erkannt werden konnte.

5.1.3.2 Kultivierung am 26.04.2018

Das S88-Rezept wurde nach der letzten Kultivierung so geändert, dass die pH-Regelung vor der Inokulation 5 min Zeit hat, den Sollwert einzustellen. Während der Inokulation ist sie aus und wird danach wieder angeschaltet. Außerdem wurde dem Rezept die Batch-Ende-Erkennung hinzugefügt. Auch an den Sonden wurden neue Einstellungen umgesetzt. Die Sensitivität der Schaumdetektion wurde herabgesetzt und die pO_2 -Sonde etwas höher gesetzt, damit sich nicht so schnell Blasen an der Sondenspitze sammeln können. Der Bioreaktor bekam einen zweiten Anschluss für eine Sterilkupplung, damit das Inokulum und das Medium separat angeschlossen werden können und dadurch die Kontaminationsgefahr geringgehalten wird. Außerdem wurde ein mechanischer Schaumzerstörer eingebaut. Bei dieser Fermentation wurde ein Anfangsvolumen von 750 mL gewählt, um die Batch-Phase eines Fed-Batch-Prozesses nachzustellen. Das Animpfvolumen von 100 mL wurde hingegen nicht verändert.

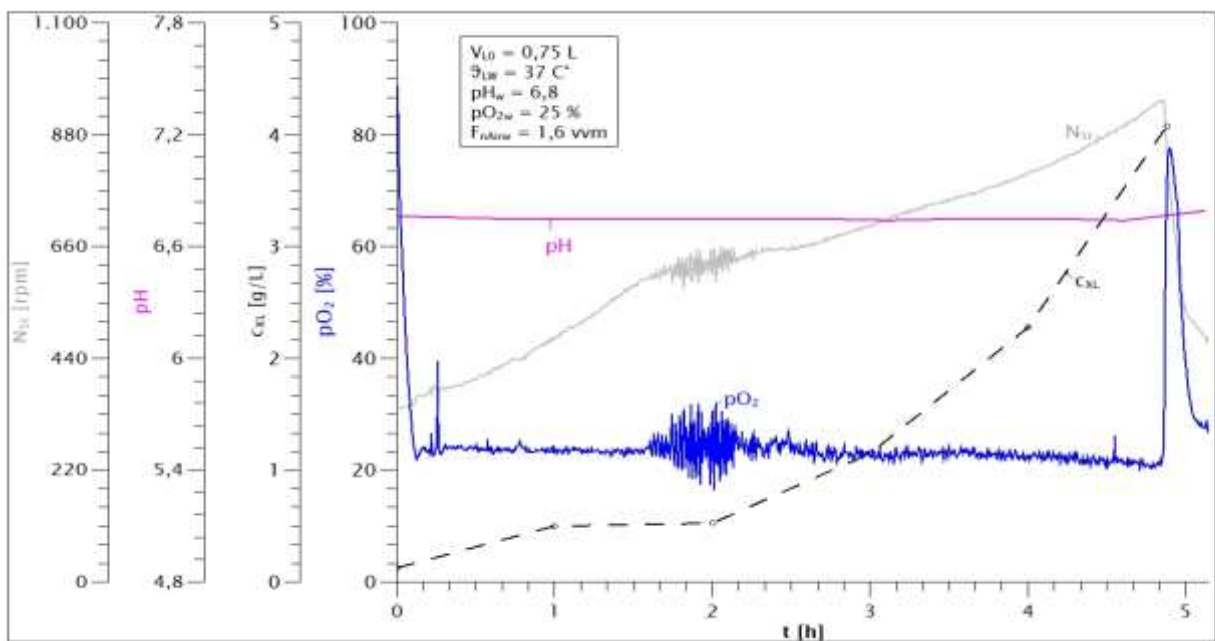


Abbildung 15: Messdatenübersicht der Batch-Kultivierung vom 26.04.2018

Die Messdatenaufnahme verlief deutlich ruhiger (ohne große Schwankungen) als die der vorigen Fermentation. Dies deutet auf den Erfolg der umgesetzten Maßnahmen hin. Jedoch gab es auch bei dieser Fermentation nach etwa zwei h Probleme mit der pO_2 -Regelung. Die Rührerdrehzahl sowie der pO_2 -Wert schwankten für etwa eine h. Schon eine halbe h vorher zeigt der Verlauf der Zellkonzentration kein Wachstum. Zusätzlich konnte ein exponentieller Anstieg der Rührerdrehzahl bis zur Störung und nach der Störung festgestellt werden. Jedoch war die Steigung des zweiten exponentiellen Anstiegs geringer. Eventuell ist zu dem Zeitpunkt

der Störung ein wachstumshemmender Stoff (z.B. Ethanol von der Reinigung) in das Medium gelangt und der unerwartete Wachstumsstopp der Zellen hat die Regelung beeinflusst. Sollte es sich um Ethanol gehandelt haben, erklärt sich auch, warum am Ende der Fermentation (Stunde 4-5) das Wachstum wieder deutlich anstieg. Denn dieses wäre bis dahin verdampft gewesen. Der pO_2 -Wert sank in den ersten 20 min auf 25 % ab, wodurch direkt die pO_2 -Regelung aktiv wurde und die Rührerdrehzahl anstieg. Dies lag daran, dass im Gegensatz zu dem vorigen Versuch ein geringeres Volumen im Reaktor vorlag. Damit war weniger Sauerstoff im Medium gelöst und konnte schneller aufgebraucht werden. Außerdem tauchte nur noch ein (anstatt zwei) Scheibenrührer in das Medium ein und gleichzeitig verringerte sich die Verweilzeit der Luft im Medium. Die Batch-Ende-Erkennung hat zum richtigen Zeitpunkt das Batchende erkannt und wurde damit erfolgreich implementiert. Es wurden viele dienliche Änderungen vorgenommen, jedoch sollte bei den weiteren Versuchen die Anzahl der Änderungen verringert werden, um deren direkte Auswirkungen analysieren zu können.

5.1.3.3 Kultivierung am 17.05.2018

Bei der dritten und damit letzten Batch-Fermentation wurde die Synchronisation der Messdaten bei der Inokulation in das S88-Rezept eingebaut, um die Messdatenanalyse zu erleichtern. Außerdem wurde die Rührerdrehzahl auf 500 rpm hochgesetzt, damit ein langsamer Abfall des pO_2 -Wertes gewährleistet wird. Alle anderen Einstellungen blieben gleich.

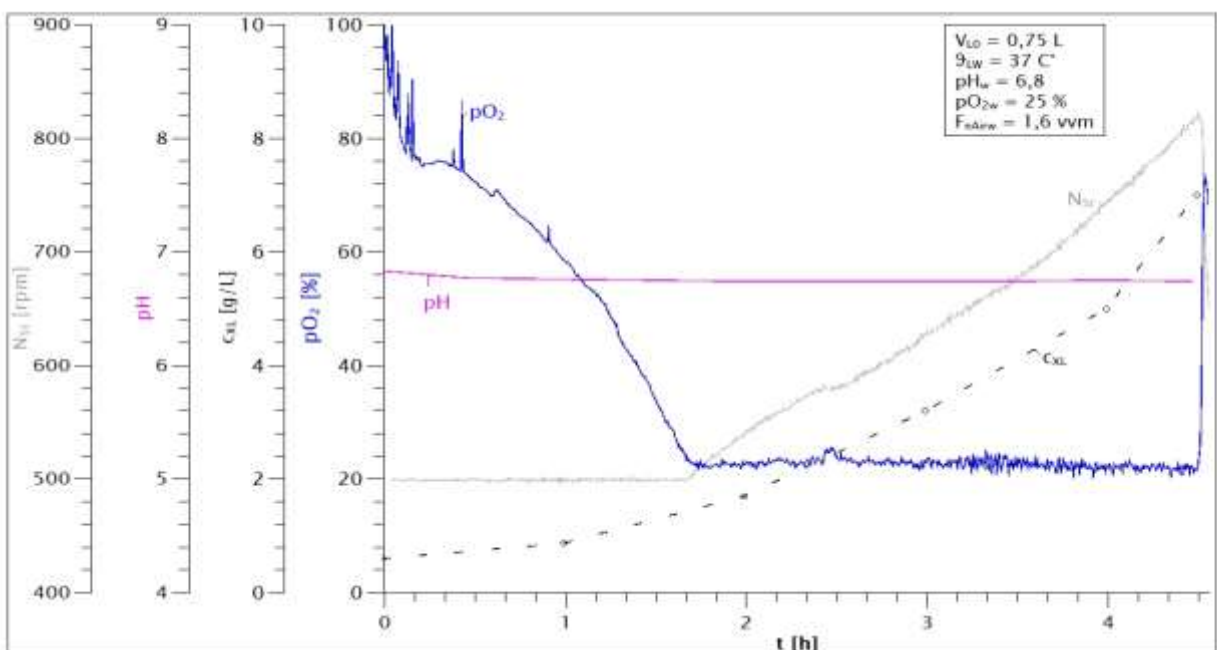


Abbildung 16: Messdatenübersicht der Batch-Kultivierung vom 17.05.2018

Der pO_2 -Wert zeigte zuerst einen starken Abfall auf etwa 75 %. Danach sank er langsamer bis 25 % erreicht wurden und die pO_2 -Regelung mit der stetigen Erhöhung von N_{St} den pO_2 -Wert hielt. Insgesamt stieg N_{St} auf etwa 820 rpm und erreichte damit nicht die maximale Rührerdrehzahl. Der pH-Wert konnte bei seinem Sollwert gehalten werden und die Zellkonzentration nahm exponentiell zu. Nach vier h und 30 min konnte das Batchende von dem Add-on detektiert werden und die Fermentation wurde beendet. Diese Fermentation verlief ohne Komplikationen und aus diesem Grund folgte die Erarbeitung eines Fed-Batch-Prozesses.

5.1.4 Fed-Batch-Fermentation

Für die Entwicklung eines Fed-Batch-Prozesses wurde sich des S88-Rezeptes aus der Batch-Fermentation bedient. Dieses S88-Rezept wurde um zwei Phasen erweitert: die Fed-Batch-Phase und die Produktions-Phase. Um mehr Informationen aus den Versuchen herauszuholen und die Prozesse zu optimieren, wurde mit der Abgasanalytik gearbeitet und dessen Werte analysiert. Zur Veranschaulichung der Versuche dienen wieder die Messdatenübersichten. Die Zeitachse wurde zur besseren Übersichtlichkeit in die drei Phasen Batch-Phase, Fed-Batch-Phase und Produktions-Phase eingeteilt.

5.1.4.1 Kultivierung vom 29.05.2018

Nachdem das S88-Rezept um die angesprochenen Schritte erweitert wurde, ist eine weitere „Trockenübung“ mit Wasser durchgeführt worden. Dabei sind, wie bei der ersten Batch-Kultivierung, das Batch-Ende und das Fed-Batch-Ende simuliert worden. Anschließend wurde dieser Versuch gestartet.

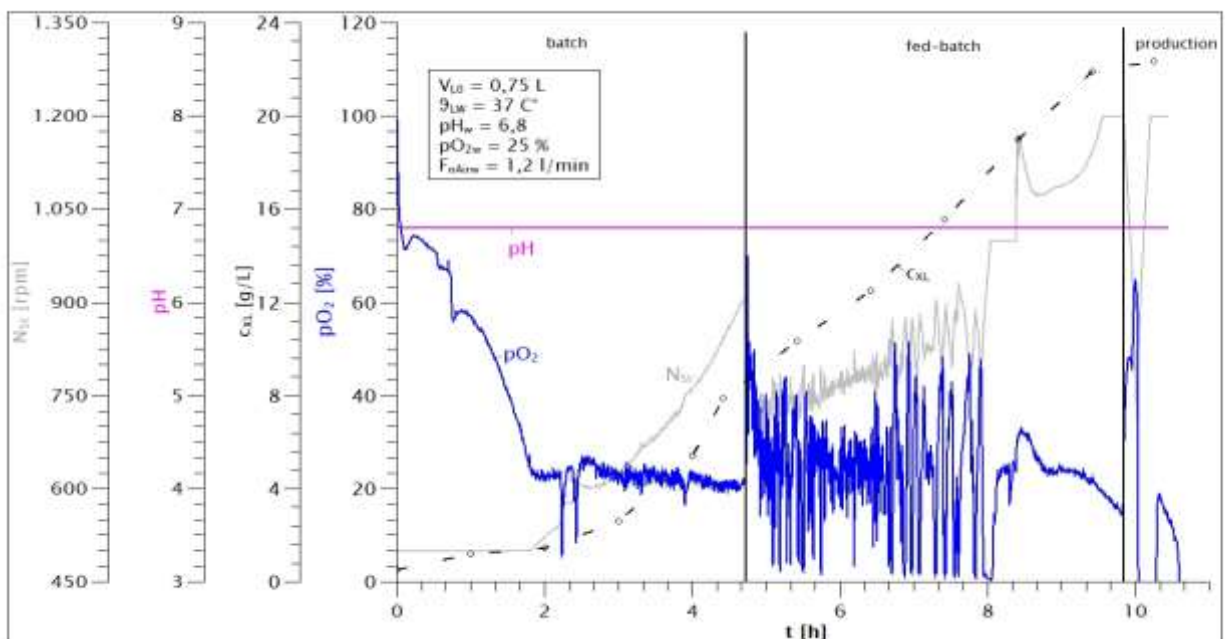


Abbildung 17: Messdatenübersicht der Fed-Batch-Kultivierung am 29.05.2018

Die Batch-Phase verlief weitestgehend wie geplant, jedoch sank der pO_2 -Wert ohne ersichtlichen Grund manchmal ab und erholte sich dann wieder. Das Batch-Ende wurde von dem Add-on erkannt und die Zufütterung gestartet. Der pO_2 -Wert schwankte sehr stark, was darauf zurückzuführen ist, dass die Pumprate der Feed-Lösung sehr gering war. Durch eine sehr geringe Pumprate brauchte es etwas Zeit (>4 s), bis sich ein Tropfen von dem Zulauf löste und ins Medium fiel. Daraufhin stieg der Stoffwechsel der Zellen und der pO_2 -Wert sank. Anschließend war die Glucose verbraucht und es dauerte etwas, bis neue Glucose hinuntertropfte. In dieser Zeit fand kein Stoffwechsel statt und der pO_2 -Wert stieg. Entsprechend verhielt sich die Rührerdrehzahl. In Stunde acht wurde Schaum detektiert und Antischaummittel hinzugegeben. Wie erwartet, sank der pO_2 -Wert auf „0“ und die Rührerdrehzahl stieg auf das Maximum (1.000 rpm). Der pO_2 -Wert konnte sich daraufhin kurzzeitig wieder seinem Sollwert annähern. Als er jedoch nochmals zu Sinken begann, wurde die maximale Rührerdrehzahl auf 1.200 rpm erhöht. Nach kurzer Zeit wurde auch dieses

Maximum erreicht und daher die Produktionsphase eingeleitet. Dies führte zu dem gewünschten Effekt: einem Ansteigen des pO_2 -Wertes und dem gleichzeitigen Abfall der Rührerdrehzahl. Nach etwa zehn h stieg das Schaumlevel sehr stark, aber der Schaumdetektor reagierte nicht, woraufhin manuell Antischaummittel hinzugegeben werden musste. Das führte zum nochmaligen dauerhaften Einbruch des pO_2 -Wertes und der Versuch wurde beendet.

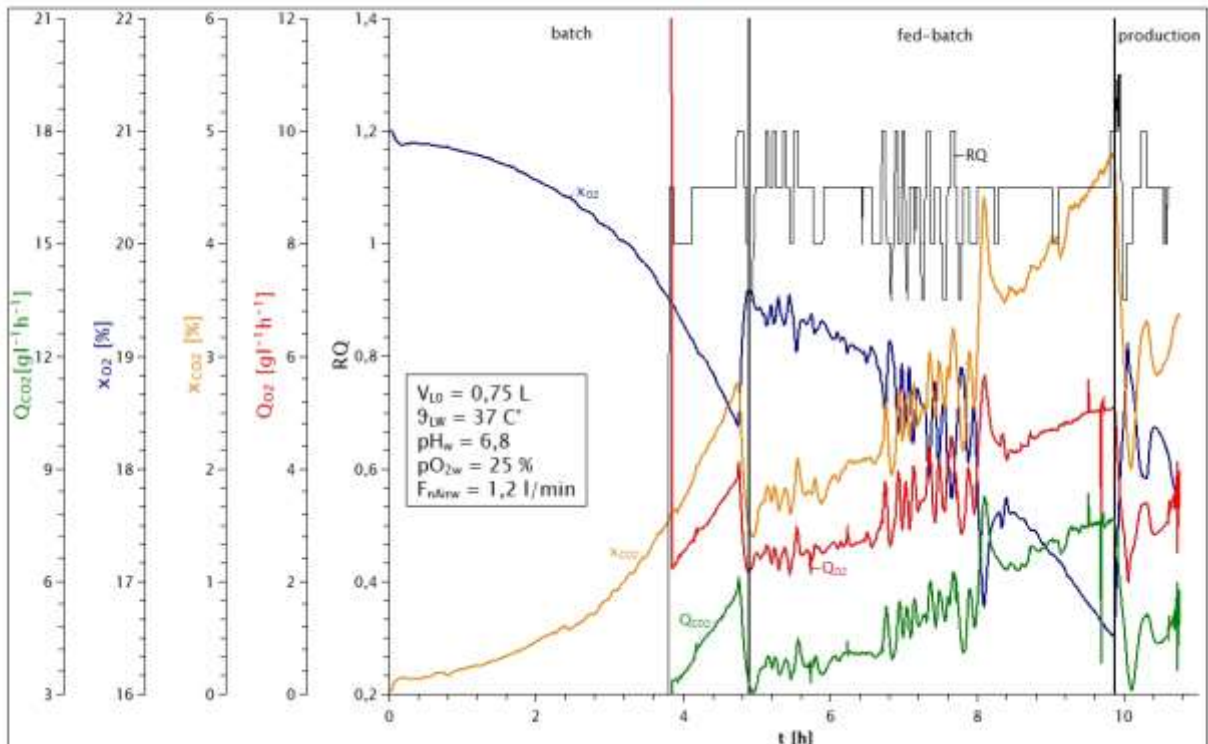


Abbildung 18: Messdatenübersicht des Abgassensors der Fed-Batch-Kultivierung vom 29.05.2018. Aufgetragen sind die Abgasmolenbrüche für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid und die daraus berechneten Werte für die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} , die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate Q_{CO_2} sowie der Respirationsquotient RQ.

Bei diesem Versuch wurde die Abgasanalyse genutzt und führte zu den in Abbildung 18 dargestellten Werten. Nach etwa vier h konnten zusätzlich zu den Molenbrüchen, durch die Anpassung eines fehlerhaften Wertes in MFCS, auch die anderen Werte Q_{O_2} , Q_{CO_2} und RQ berechnet werden. In der Messdatenübersicht wird das Zusammenspiel der einzelnen Messwerte deutlich sichtbar. So sinkt der Sauerstoffmolenbruch in den ersten fünf h im gleichen Maße, wie der Kohlenstoffdioxidmolenbruch zunimmt. Dies deutet daraufhin, dass weder Sauerstoff, noch Kohlenstoffdioxid im Medium akkumuliert wurden. Auch das Wachstum in der Batch-Phase kann sehr gut nachvollzogen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase eine gleichbleibende Sauerstoffaufnahme und auch eine gleichbleibende Kohlenstoffdioxidproduktionsrate hatten. Damit verhält sich die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate in dieser Phase proportional zur Zellzahl. Mit einem exponentiellen Verlauf zeichnet sie daher das exponentielle Wachstum

der Zellen nach.

Durch die Substratlimitierung in der Fed-Batch-Phase nahm der Sauerstoffmolenbruch im Abgas zu und wies somit auf eine gesunkene Sauerstoffaufnahme hin. Der Kohlenstoffdioxidmolenbruch sank etwas stärker ab, als der Sauerstoffmolenbruch zunahm. Dies kann durch die Sauerstoffaufnahme des Mediums erklärt werden, denn zum gleichen Zeitpunkt stieg der pO_2 -Wert an (Abbildung 17). In der Fed-Batch-Phase begannen alle Abgaswerte aufgrund des pO_2 -Wertes zu schwanken. Jedoch blieb die Tendenz dieselbe: Der Sauerstoffmolenbruch nahm ab und der Kohlenstoffdioxidmolenbruch nahm zu. Die Sauerstoffübertragungsrate, sowie die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate verhielten sich entsprechend.

Mit Einsetzen der Produktionsphase wiederholte sich das Bild am Anfang der Fed-Batch-Phase. Der Respirationsquotient lag im Durchschnitt bei 1,1. Damit lag die Kohlenstoffdioxidproduktion der Zellen über der Aufnahme von Sauerstoff. Der Wert weicht zwar vom ideellen Wert eins ab, aber dies ist in der Praxis sehr üblich. Die Betrachtung des RQ-Wertes ist nur dann sinnvoll, wenn im Reaktor ein Fließgleichgewicht besteht und kein Sauerstoff oder Kohlenstoffdioxid akkumuliert wird. Die Sauerstoffakkumulation ist an dem pO_2 -Wert zu erkennen und aus diesem Grund sind starke Sprünge im pO_2 -Wert ein Anzeichen für ungenaue RQ-Werte.

5.1.4.2 Kultivierung am 07.06.2018

Für diese Fed-Batch-Kultivierung (Abbildung 19) wurde der Zugang der Feed-Lösung mit einem Schlauch bis zum Boden verlängert, um ein Schwanken des pO_2 -Wertes in der Fed-Batch-Phase (siehe oben) zu verringern. Außerdem sollte vor dem Beginn der Fed-Batch-Phase eine definierte Menge von 0,3 mL Antischaummittel manuell in den Reaktor gegeben werden, damit sich der pO_2 -Wert eventuell schneller erholen könnte (gegebenenfalls nicht erst so stark fällt). Als letzte Modifikation wurde in der Produktionsphase das S88-Rezept so geändert, dass die pO_2 -Regelung ausgeschaltet und eine feste Rührerdrehzahl von 900 rpm eingestellt wird. Der Versuch wurde im Rahmen eines parallel laufenden Masterprojektes durchgeführt. Eine vollständige Auswertung der Kultivierung befindet sich in dem Abschlussbericht des Masterprojektes.

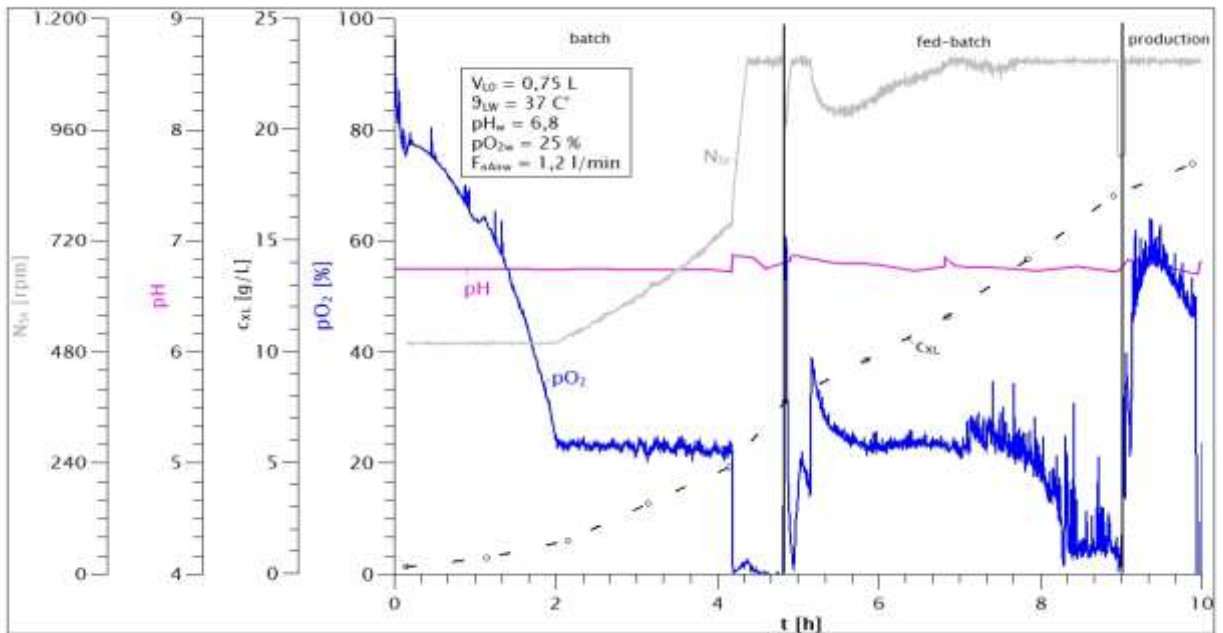


Abbildung 19: Messdatenübersicht der Fed-Batch-Kultivierung am 07.06.2018

5.2 Downstreaming

Die in dem Kapitel 4.2.2 beschriebenen Methoden wurden für den Downstreamprozess angewandt. Von jedem Reinigungsschritt wurde eine Probe genommen und eingefroren. Nach der gesamten Aufreinigung wurde eine Analyse mittels SDS-PAGE durchgeführt. Im Folgenden wird erst der Versuchsablauf beschrieben und anschließend die SDS-PAGE ausgewertet. Im Anschluss dient eine Massenbilanz der Übersicht des Downstreamprozesses.

5.2.1 Durchführung der Reinigungsschritte

Für den Ultraschallaufschluss wurde zuerst eine Zellkonzentration von 500 gL^{-1} verwendet. Bei der anschließenden Solubilisierung und Zentrifugation stellte sich heraus, dass sich kein Pellet sondern ein zäher Schleim gebildet hatte. Dieser machte die Entnahme des Überstandes unmöglich. Weder eine längere Zentrifugationszeit, noch eine höhere Zentrifugalkraft führten zu dem gewünschten Pellet. Aufgrund dessen wurde in dem folgenden Versuch mit einer Zellkonzentration von 50 gL^{-1} gearbeitet. Auch diesmal bildete sich nach der Solubilisierung der oben genannte Schleim, jedoch konnte ein Großteil (ca. 17,5 mL) des Überstandes entnommen werden. Dieser wurde mit einem $0,2 \mu\text{m}$ Filter filtriert, wobei vier Filter gebraucht (durch Verstopfen) wurden, um die gesamte Lösung zu filtrieren. Dabei gingen etwa 2,4 mL verloren. Der Rest der Proteinlösung wurde auf die IMAC gegeben.

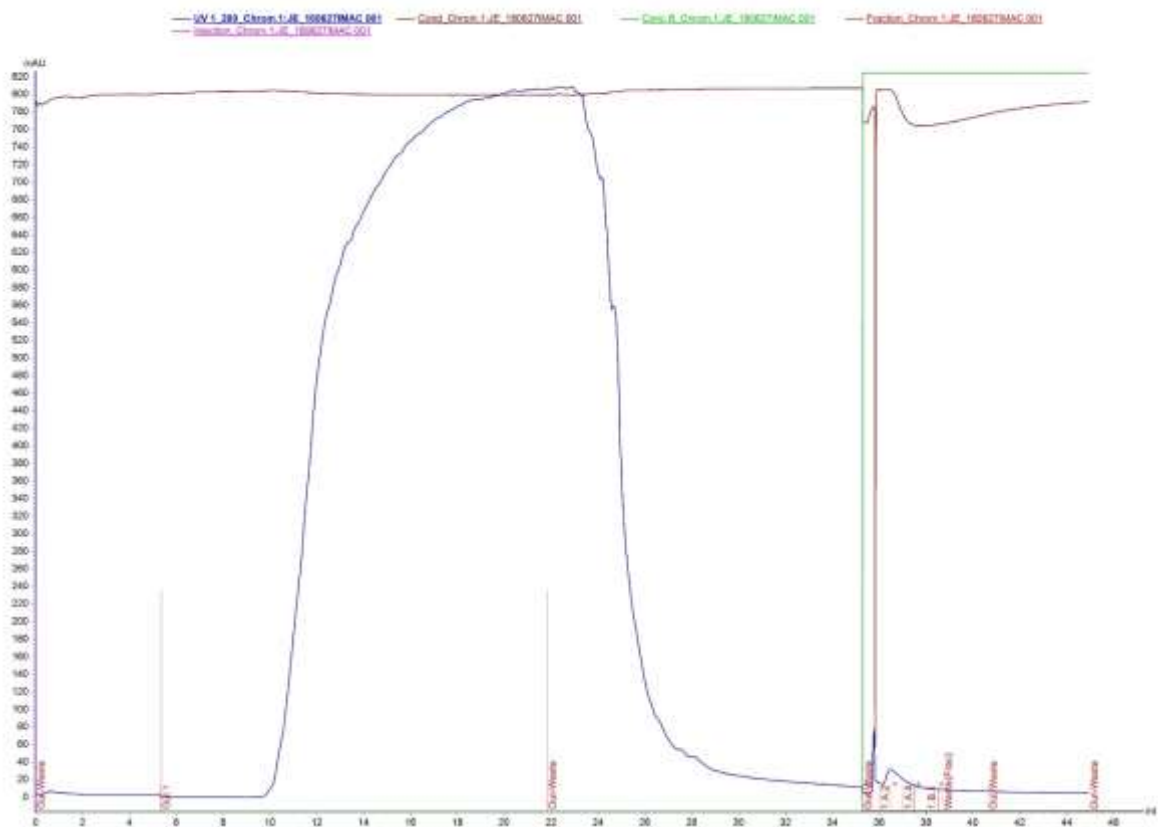


Abbildung 20: Erster Durchlauf einer Metallaffinitätschromatographie mit der NiNTA-Säule HisTrap™ FF crude (1 mL). Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris und 6 M Guanidin, während der Elutionspuffer 20 mM Tris, 6 M Guanidin und 100 mM Imidazol enthielt.

Das Eluieren nach ca. 35 min setzte keine größeren Proteinmengen frei, weshalb davon ausgegangen wurde, dass das Fusionsprotein nicht an die Säule gebunden hat und sich im Durchlauf befand. Die Säule war eventuell nicht mehr bindungsfähig, weil die nötigen Nickelionen bei vorigen Durchläufen herausgewaschen wurden. Diese Annahme wurde

aufgrund der blassen Farbe der Säule getroffen. Die Säule wurde ausgetauscht und der aufgefangene Durchlauf (ca. 15 mL) auf die neue Säule gegeben.

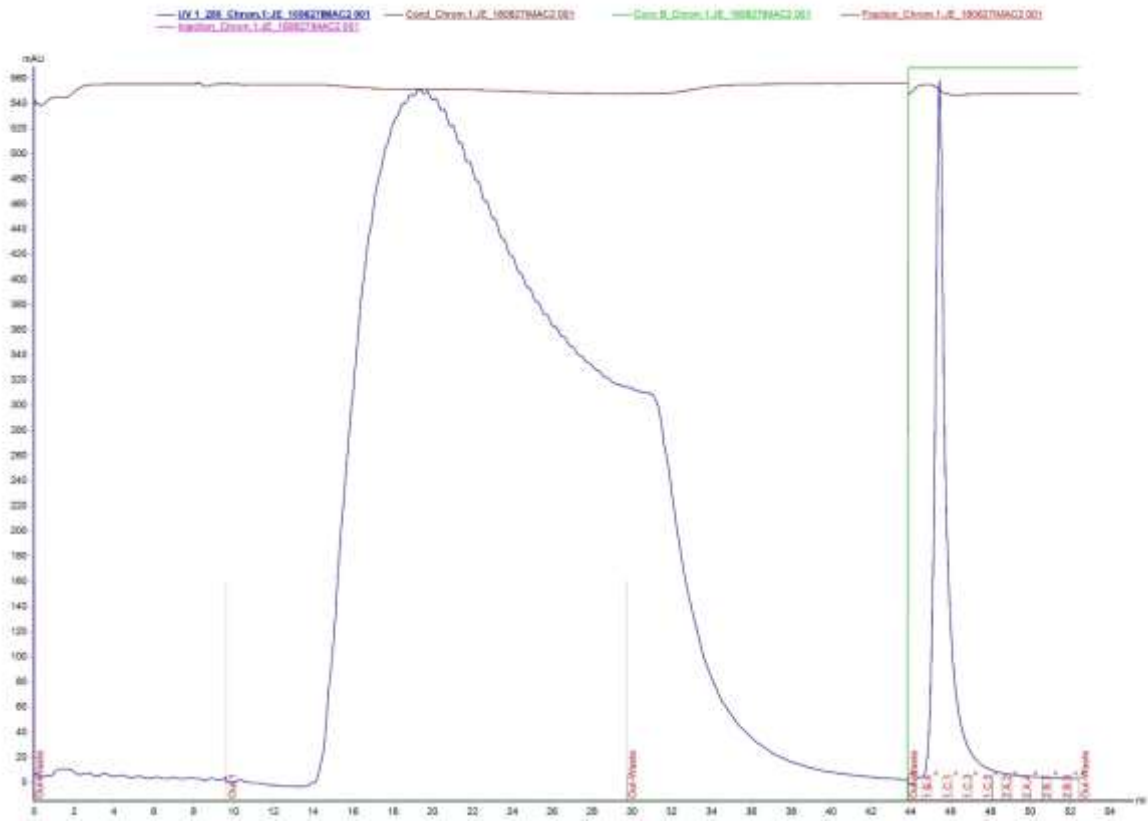


Abbildung 21: Zweiter Durchlauf (gesamt) einer Metallaffinitätschromatographie mit der ausgetauschten Säule HisTrap™ FF crude (1 mL). Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris und 6 M Guanidin, während der Elutionspuffer 20 mM Tris, 6 M Guanidin und 100 mM Imidazol enthielt.

Diesmal war ein hoher Peak bei der Elution zu erkennen und es wurde angenommen, dass es sich dabei um das Fusionsprotein mit dem His-tag handelte. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und später gepoolt.

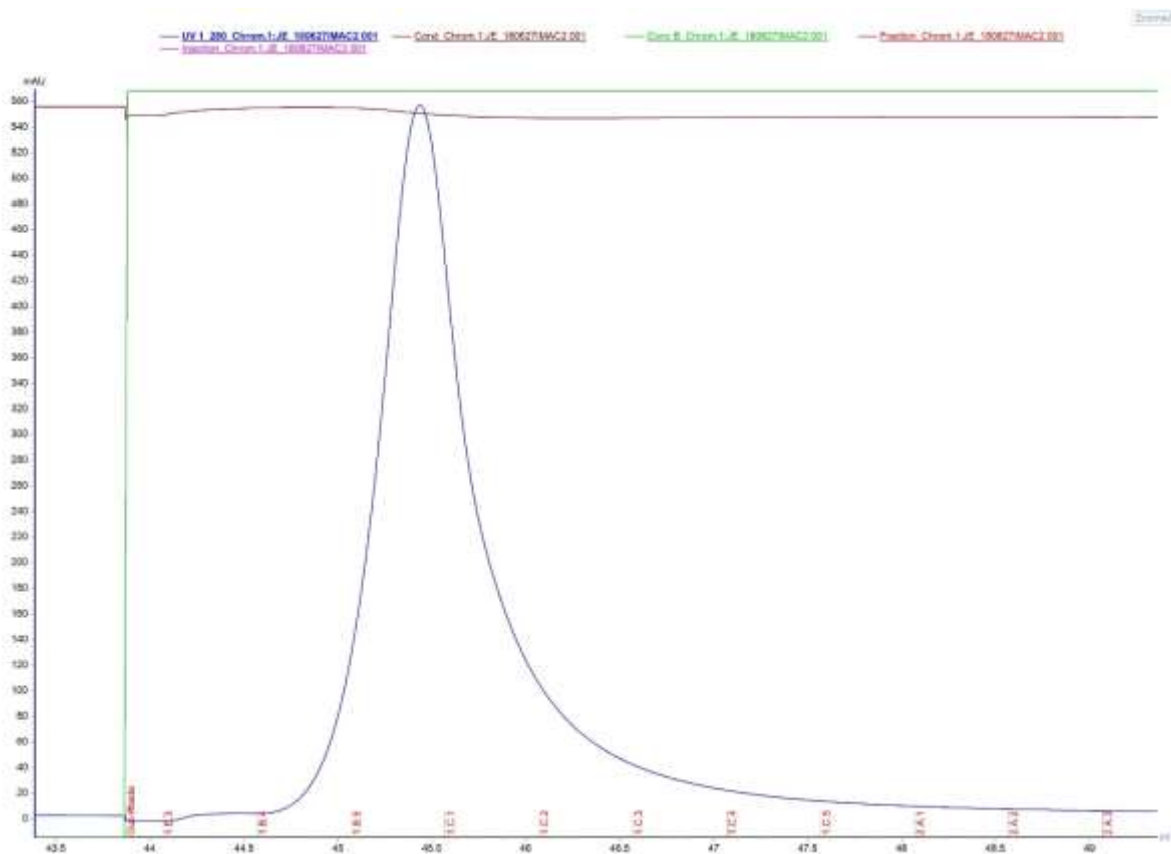


Abbildung 22: Zweiter Durchlauf (Ausschnitt des Eluats) einer Metallaffinitätschromatographie mit der ausgetauschten Säule HisTrap™ FF crude (1 mL). Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris und 6 M Guanidin, während der Elutionspuffer 20 mM Tris, 6 M Guanidin und 100 mM Imidazol

Der Elutionspeak zeigte ein geringes Tailing. Aus diesem Grund wurden die drei Fraktionen 1.B.5, 1.C.1 und 1.C.2 gepoolt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine Verdünnung aufgrund des Poolens hingenommen werden kann, denn der nachfolgende Schritt (Umpufferung) führte wieder zu einer Aufkonzentrierung der Proteine und ein gewisses Ausgangsvolumen (ca. 0,5 mL) war für diesen Schritt notwendig. Durch einen Pool mit einem Gesamtvolumen von 1,5 mL konnte ein Zweitversuch möglich gemacht werden. Für die Umpufferung wurden 0,5 mL der Proteinlösung auf einen Spinfilter (Sartorius Stedim Systems GmbH, VivaSpin 2, MWCO 5 kDa) aufgetragen und insgesamt 24 min bei 4 °C mit 12.000xg zentrifugiert. Die Methode damit nicht laut der Vorgabe⁷ durchgeführt. Dies hatte zum einen den Hintergrund, dass nur die oben genannten Spinfilter für Volumen kleiner 2 mL zur Verfügung standen und für das Zurückhalten des Fusionsproteins ausreichen sollten (molekulare Masse des Fusionsproteins / MWCO > 2). Außerdem empfahl die Anleitung diese Einstellungen der Zentrifuge. Es blieb ein Überstand von ca. 60 µL. 30 µL wurden eingefroren und die restlichen 30 µL mit 1 mL Essigsäure (0,1 M) vermennt und inkubiert. Am nächsten Tag befanden sich nur noch etwa 0,7 mL im Eppendorfgefäß und dieses war leicht geöffnet. Es wurde vermutet, dass Druck im Eppendorfgefäß durch die Verdampfung der Essigsäure

entstand und den Deckel leicht aufgedrückt hatte. Wahrscheinlich ging auch ein Teil des Fusionsproteins verloren. Es wurden wieder 0,3 mL Essigsäure und die angedachte Menge an Ammoniak für die Neutralisierung hinzugegeben. Für die Messung des pH-Wertes wurden 5 µL auf ein pH-Papier (pH 1-14) gegeben, weil das Gesamtvolumen (> 1 mL) zu gering war, um eine pH-Elektrode zu nutzen. Durch das pH-Papier konnte der pH-Wert auf ungefähr sieben geschätzt werden. Die Lösung wurde anschließend inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Zentrifugationsschritt durchgeführt und es konnte ein deutliches Pellet gesehen werden. Dabei sollte es sich um die proteindesignte Onkonase handeln. Der Überstand sollte das gereinigte AMP enthalten. Er wurde abgenommen und das Pellet in 0,1 M Essigsäure resuspendiert, um die Proteinzusammensetzung später prüfen zu können.

5.2.2 SDS-PAGE

Alle Proben mit einer hohen Konzentration an Guanidin (Ü2, P2, Ü3, P3, Ü4, DIMAC, Eluat, Rückst. und Filtrat) wurden vor der Analyse mit der SDS-PAGE von diesem durch eine Alkoholfällung befreit. Das Guanidin hätte ansonsten die Analyse negativ beeinflusst, weil es bei Kontakt mit dem Probenpuffer zu Ausfällungen kommt. Für die Ethanol-fällung wurden 5 µL Probe in ein 1,5-mL Eppendorfgefäß gegeben und mit 1 mL eiskaltem Ethanol (100 %) vermengt. Diese Lösung wurde für eine h in den Gefrierschrank gestellt. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe 5 min bei 4 °C mit 16.000xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde der gesamte Vorgang noch einmal wiederholt. Das Restethanol im 1,5-mL Eppendorfgefäß wurde über Nacht im Abzug bei Raumtemperatur verdampft. Das Pellet wurde dann in 24 µL PBS-Puffer resuspendiert und wie alle anderen Proben behandelt (siehe 4.2.3.2).

Die Proben des Downstreamprozesses wurden mit zwei 15%-SDS Gelen analysiert. Abbildung 23 zeigt die Proben bis zum Zeitpunkt der Chromatographie, während Abbildung 24 die Proben von und nach der Chromatographie zeigt.

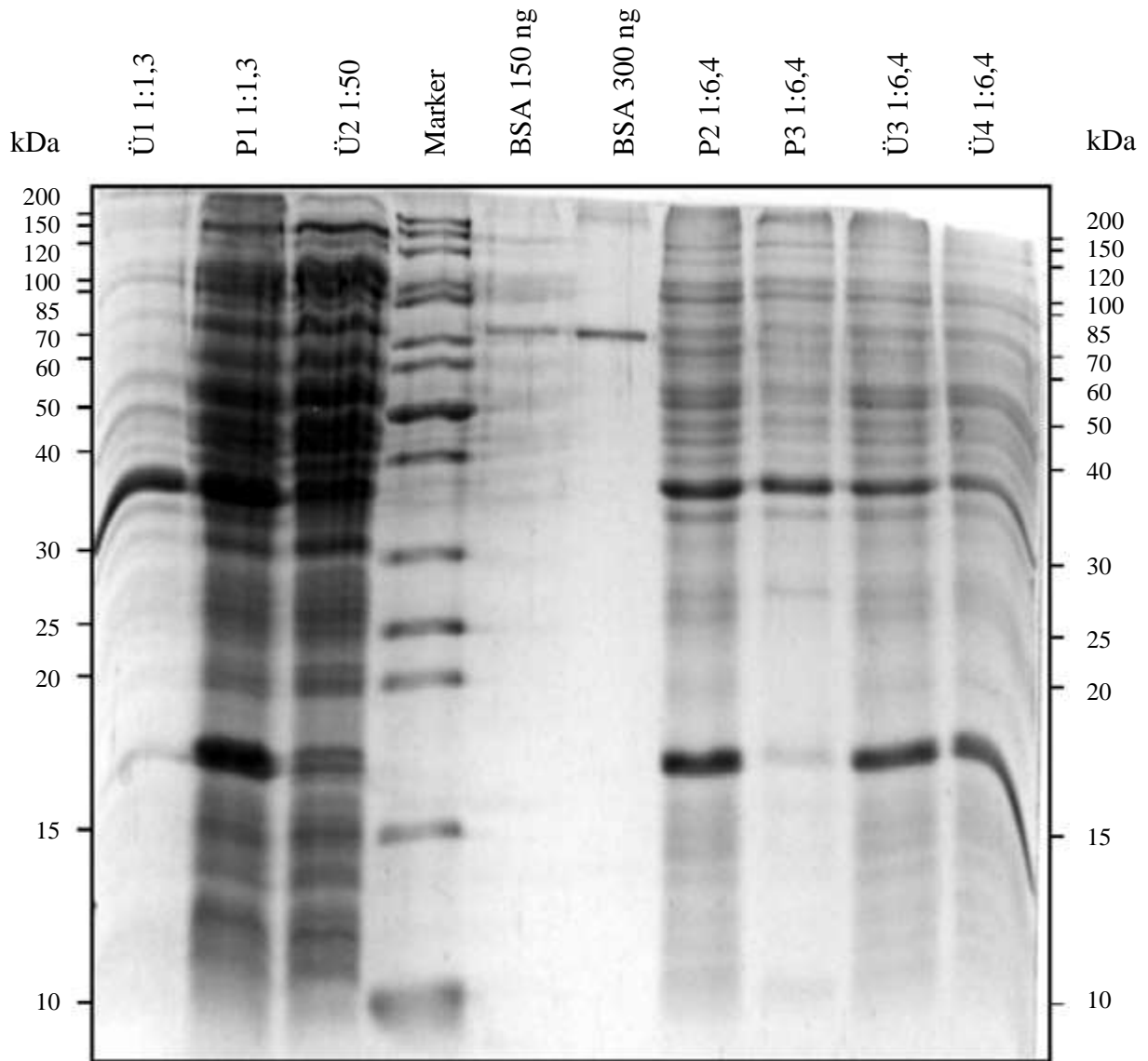


Abbildung 23: 15%-SDS Gel mit Proben des ersten Teils des Downstreamprozesses. In der fünften und sechsten Lane befindet sich BSA mit unterschiedlichen Massen als Standard. Das Gel lief bei 200 V für 2 h und als Marker (Lane 4) diente der PageRuler™ Unstained Protein Ladder von Thermo Scientific.

Durch das Zentrifugieren der Zellbrühe sollte das Medium mit den darin gelösten Proteinen von den Zellen getrennt werden. Damit wurde zugleich eine Umpufferung vorbereitet. Dies führte zu dem Überstand Ü1 (Medium) und dem Pellet P1 (Zellen). Pellet 1 musste für die Analyse mittels Ultraschall (neun min, maximale Amplitude, kontinuierliches Tastverhältnis) aufgeschlossen werden, weil das Aufkochen vor der Probenaufgabe nicht ausreichte, um die Zellen zu zerstören. Daher ist das Proteom (alle Proteine des Bakteriums) in Lane zwei zu

finden. Der Überstand wurde nicht verdünnt und enthielt größtenteils die gleichen Proteine, wie das Pellet 1. Diese lagen jedoch in einer geringeren Konzentration vor, während die Verhältnisse der Proteine, außer bei einem, ungefähr die gleichen waren. Das Protein bei etwa 17,5 kDa hatte einen deutlich höheren verhältnismäßigen Anteil im Pellet 1 und war nur schwach im Überstand erkennbar. Es wurde davon ausgegangen, dass bei der Zentrifugation einige Zellen zerstört wurden und ihre Proteine in das Medium entlassen haben. Bei dem Protein mit etwa 17,5 kDa handelte es sich sehr wahrscheinlich um das Fusionsprotein, denn es besitzt eine molekulare Masse von 16,6 kDa und wurde überexprimiert.

Nach dem Zellaufschluss wurde ein zweites Mal zentrifugiert, um die löslichen (Ü2) von den unlöslichen (P2) Proteinen zu trennen. Es wird davon ausgegangen, dass das Fusionsprotein nach der Expression akkumuliert und Inclusion Bodies bildet, welche eine höhere Dichte als das Medium besitzen und durch die Zentrifugation pelletiert wurden.

Das Pellet P2 bestätigte diese Annahme indem das Fusionsprotein als deutlich erkennbare Bande auftrat. Gleichzeitig nahm die Gesamtproteinmenge ab, denn obwohl das Pellet P2 geringer als der Überstand Ü2 verdünnt wurde, zeigte sich keine Überladung des Gels, sondern klar definierte Banden. Der Überstand Ü2 wurde 1:50 verdünnt. Die Proteinzusammensetzung ähnelt sehr stark der von Pellet 1. Jedoch ist die Bande bei 17,5 kDa deutlich geringer von Überstand 2. Im Pellet 1 zeigte sich eine dicke Bande, während der Überstand Ü2 zwei Banden in dem Bereich aufwies. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die dicke Bande in Pellet P1 auch aus zwei Proteinen bestand, wobei eines überexprimiert wurde. Es kann vermutet werden, dass sich das Fusionsprotein auch in dem Überstand befand und dass es ein weiteres Protein mit der Molekularmasse von etwa 17,5 kDa gab.

Nach der Resolubilisierung wurde nochmals zentrifugiert, um die Probe von Zelldebris zu befreien. Dabei enthielt das Pellet P3 ungefähr die gleichen Proteine, wie der Überstand Ü3, jedoch war im Pellet P3 die Bande des Fusionsproteins sehr gering, im Vergleich zu der Bande in dem Überstand Ü3.

Der Überstand Ü4 entstand durch das Filtrieren mit einem Spritzenaufsatzfilter (0,2 µm). Es wurden dadurch weder Proteine abgetrennt, noch veränderte sich ihre Konzentration entscheidend. Die Proteinlösung wurde jedoch deutlich klarer und konnte über die Säule der IMAC laufen, ohne diese durch ungelöste Partikel zu verstopfen oder zu verunreinigen.

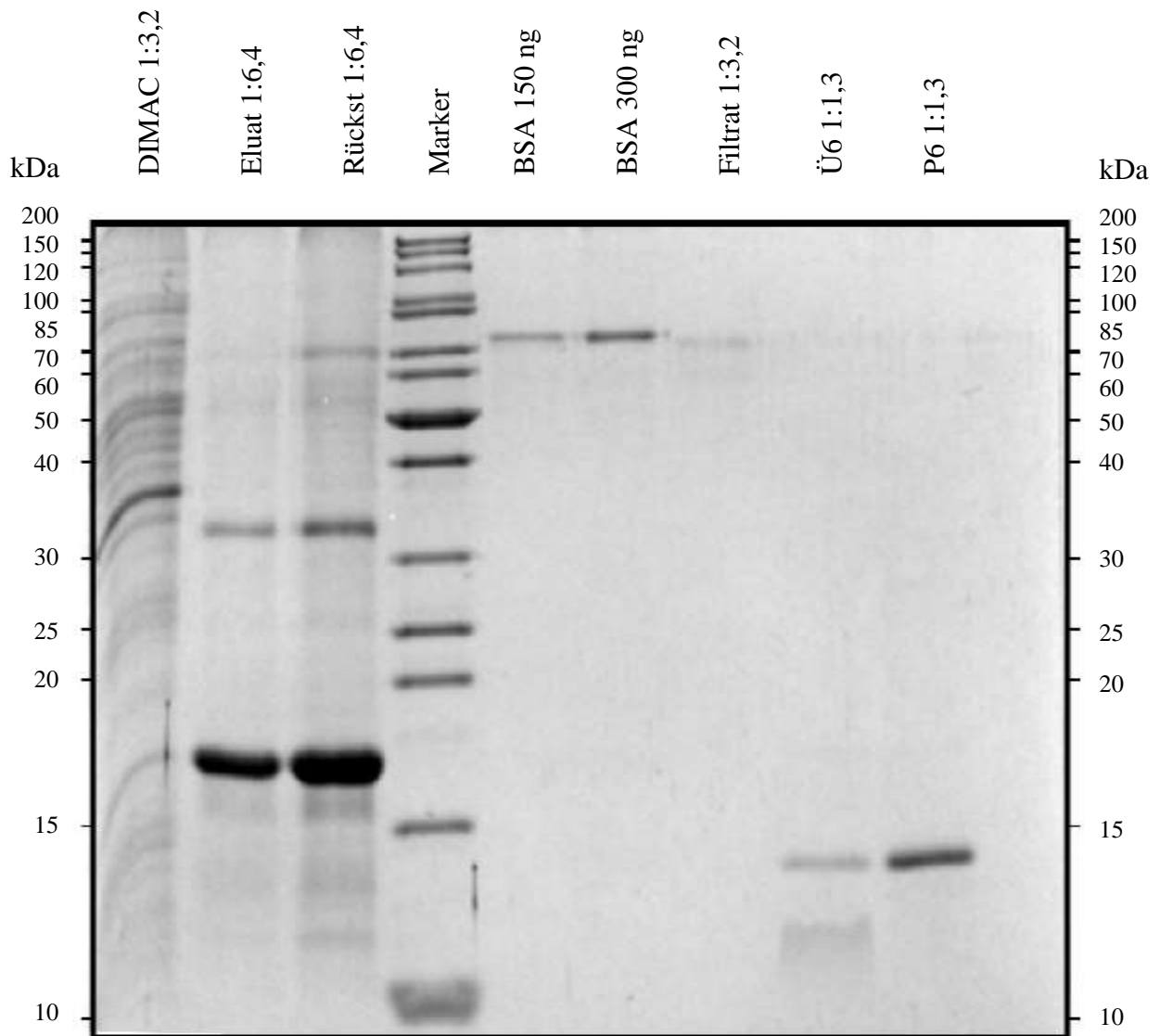


Abbildung 24: 15%-SDS Gel mit Proben des zweiten Teils des Downstreamprozesses. In der fünften und sechsten Lane befindet sich BSA mit unterschiedlichen Massen als Standard. Das Gel lief bei 200 V für 2 h und als Marker (Lane 4) diente der PageRuler™ Unstained Protein Ladder von Thermo Scientific.

Der Durchlauf der IMAC (Abbildung 24: DIMAC) wies die gleichen Proteine, wie der Überstand Ü4 auf. Jedoch war nur eine sehr schwache Bande in etwa auf der Höhe des Fusionsproteins sichtbar. Dabei handelte es sich sehr wahrscheinlich um das Protein, welches auch in dem Überstand Ü2 dicht über dem Fusionsprotein eine Bande bildete. Das Eluat zeigte eine starke Bande auf Höhe des Fusionsproteins und zusätzlich eine Bande bei etwa 34 kDa. Nach dem Aufkonzentrieren mit dem Spinfilter wurden beide Banden noch stärker und es zeigte sich auch eine dritte Bande bei etwa 70 kDa. Bei den zusätzlichen zwei Banden könnte es sich um Oligomere bestehend aus dem Fusionsprotein handeln (Dimer und Tetramer). Dafür spricht, dass die Metallaffinitätschromatographie eine sehr spezifische Aufreinigungsmethode ist und

das Eluat nur einen scharfen Peak zeigte (5.2.1). Eine Oligomerisierung durch kovalente Bindungen ist jedoch ausgeschlossen, weil jegliche Cysteine entfernt wurden und keine Disulfidbrücken gebildet werden können. Das Fusionsprotein ist durch die proteindesignte Onkonase jedoch sehr hydrophob und so könnten hydrophobe Wechselwirkungen zu einer Oligomerisierung geführt haben. Diese Wechselwirkungen müssten sehr stark gewesen sein um die denaturierenden Verhältnisse im Probenpuffer zu widerstehen. Außerdem stellt sich die Frage, warum keine Trimere sichtbar waren. Eventuell funktioniert nur das Zusammenspiel von zwei Fusionsproteinen, weil die hydrophoben Seitenketten durch den Partner verdeckt werden und erst ein zweites Dimer führt dazu, dass die Entropie des Oligomers weiter sinkt. Die These könnte mit der Hilfe eines Westernblots, mit einem entsprechenden Antikörper, überprüft werden.

Das Filtrat zeigte nur eine schwache Bande auf der Höhe von BSA, die wahrscheinlich aus der Nachbartasche übergelaufen war. Ansonsten war keine Bande erkennbar, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der Spinnfilter mit einem Molecular-Weight-Cut-Off (MWCO) von 5 kDa alle Proteine zurückgehalten und damit seine Funktion erfüllt hat.

Es wurden zwei Standards BSA aufgetragen, um die Masse des gespaltenen Fusionsproteins abzuschätzen. Mit dem Programm Image-Lab wurde die Fläche und die Intensität der Banden gemessen und das Volumen des dabei entstehenden dreidimensionalen Körpers berechnet. Anschließend wurde eine Kalibriergerade mit den beiden Standards erstellt und dabei die in Tabelle 17 dargestellten Werte erhalten. Diese dienen nur einer Annäherung und können nicht als absolute Werte gesehen werden, denn die Anzahl der basischen Seitenketten der Aminosäuren ist für die Farbtintensität ausschlaggebend.

Tabelle 17: Proteinmengen der einzelnen Banden auf dem 15% SDS-Gel, BSA wurde als Standard gewählt

Lane	Protein	Volumen	Masse (ng)
5	BSA Standard	126.360	150
6	BSA Standard	224.352	300
8	ONC	126.864	151
9	ONC	500.040	722

Im Überstand Ü6 konnte eine Bande ausgemacht werden. Dabei handelte es sich sehr wahrscheinlich um die proteindesignte Onkonase. Mit einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa entsprach es ungefähr den erwarteten 13,3 kDa. Der Überstand Ü6 sollte eigentlich nur AMP enthalten und im SDS-Gel keine Bande zeigen, weil es mit 3,3 kDa zu klein ist und daher aus dem Gel hinausläuft. Laut dem Programm Image-Lab lag die Proteinmenge der

proteindesignten Onkonase bei etwa 151 ng. Es wird davon ausgegangen, dass durch eine längere Zentrifugationszeit die Proteinmenge an proteindesignter Onkonase reduziert werden könnte. Pellet 6 hingegen sollte eine Bande der proteindesignten Onkonase zeigen und diese war auch sichtbar. Laut dem Programm Image-Lab lag die Proteinmasse bei ungefähr 722 ng und damit fast fünfmal höher als im Überstand Ü6. Diese Probe war 1:1,3 verdünnt und die Geltasche wurde mit 15 µL beladen. Damit würde sich eine Proteinkonzentration von ca. 60 mgmL⁻¹ errechnen. Wenn davon ausgegangen wird, dass im gleichen Verhältnis AMP gebildet wurde, müsste sich ungefähr 1/5 (16,6 kDa / 3,3 kDa) dieser Proteinkonzentration im Überstand Ü6 befinden.

Die Pelletierung der proteindesignten Onkonase kann durch die angesprochene erhöhte Zentrifugationszeit noch verbessert werden. Es wird vermutet, dass die Reinheit von Überstand Ü6 dadurch steigen könnte. Das Prinzip der Präzipitation von der proteindesignten Onkonase scheint zu funktionieren.

5.2.3 Tricin-SDS-PAGE

Mit dem Tricin-Gel wurden der Überstand Ü6 und das Pellet P6 untersucht. Dabei wurde das Gel mit den Proben von zwei Versuchen beladen. Beide Versuche starteten mit dem Eluat der IMAC. Bei dem ersten Versuch misslang die Neutralisierung aufgrund einer zu hohen Ammoniakkonzentration, sodass die Lösung stark basisch wurde. Um eventuell einen Teilerfolg zu erzielen, wurde die Probe trotzdem inkubiert und zentrifugiert. Bei dem zweiten Versuch hatte die Lösung nach der Säurespaltung an Volumen verloren, jedoch konnte dies kompensiert und auch eine erfolgreiche Neutralisierung durchgeführt werden.

Das Tricin-Gel beinhaltet außerdem in der ersten Lane 750 ng AMP als Standard und in der zweiten Lane den Marker. Die dritte und die sechste Lane wurden freigelassen, um ein eindeutiges Ergebnis zu erzielen.

Die Markerproteine in der zweiten Lane konnten nicht sehr gut voneinander getrennt werden. Sowohl die beiden kleinsten Banden, als auch die beiden mittleren Banden waren nicht eindeutig zuzuordnen. Außerdem liegt die Bande des Standards bei etwa 6 kDa, obwohl das AMP nur 3,3 kDa Masse besitzt. Aus diesem Grund können mit diesem Gel keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Trotzdem wurde das Gel interpretiert.

Pellet P6 zeigte in Lane vier zwei Banden, eine bei etwa 15 kDa und eine weitere bei etwa 5 kDa. Dieses Pellet stammte aus dem Erstversuch und es kann vermutet werden, dass durch die sehr basische Lösung sowohl die proteindesignte Onkonase, als auch das AMP ausgefallen

sind. Bei dem anschließenden Zentrifugationsschritt könnte das AMP auch pelletiert worden sein. Aus diesem Grund könnte in Lane fünf keine Proteinbande aufgefunden worden sein. Lane sieben zeigte eine starke Bande bei etwa 15 kDa und dies ließ darauf schließen, dass es sich um die proteindesignte Onkonase handelte. Eine Bande mit einem kleineren Molekulargewicht konnte nicht gesehen werden. AMP wurde dem zu Folge eventuell nicht pelletiert oder besaß nur eine sehr kleine Konzentration. In Lane acht konnten zwei Banden lokalisiert werden. Eine

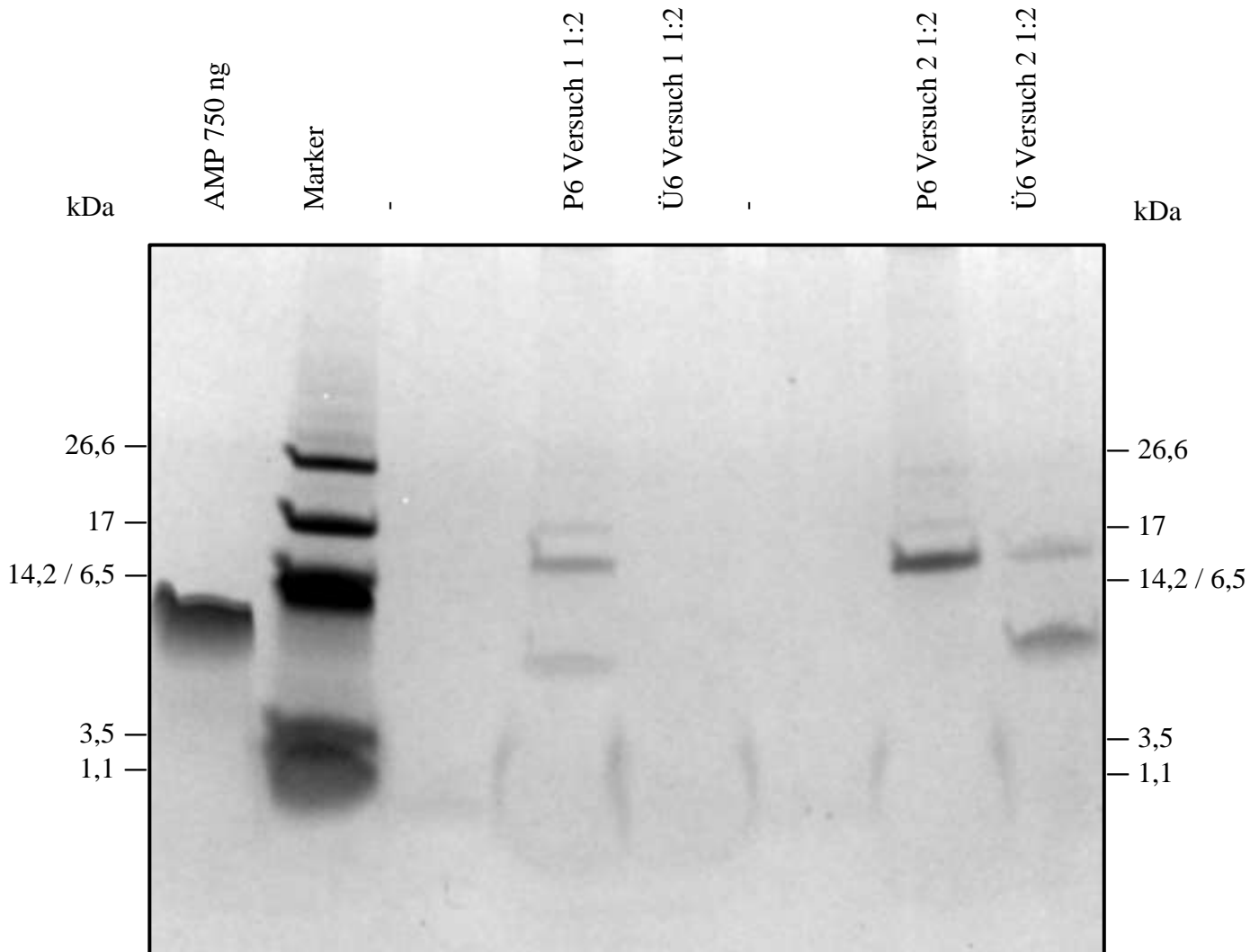


Abbildung 25: Tricin-SDS Gel mit Proben der zwei Versuche einer Säurespaltung und einer anschließenden Neutralisierung, in der ersten Lane befinden sich 750 ng synthetisiertes AMP. Das Gel lief mit 20 mA für eine h und 45 min und als Marker (Lane 2) diente der Ultra-low Range Molecular Weight Marker von Sigma Aldrich.

Bande bei etwa 15 kDa und eine weitere bei etwa 6 kDa. Die zweite Bande war deutlich stärker ausgeprägt und deutete auf das AMP hin, während die erste Bande nur sehr schwach zu sehen war und wahrscheinlich die proteindesignte Onkonase darstellte.

Mit dem Standard wurde eine Ein-Punkt-Kalibrierung durchgeführt, die nicht sehr genau ist, jedoch eine Richtung angeben kann.

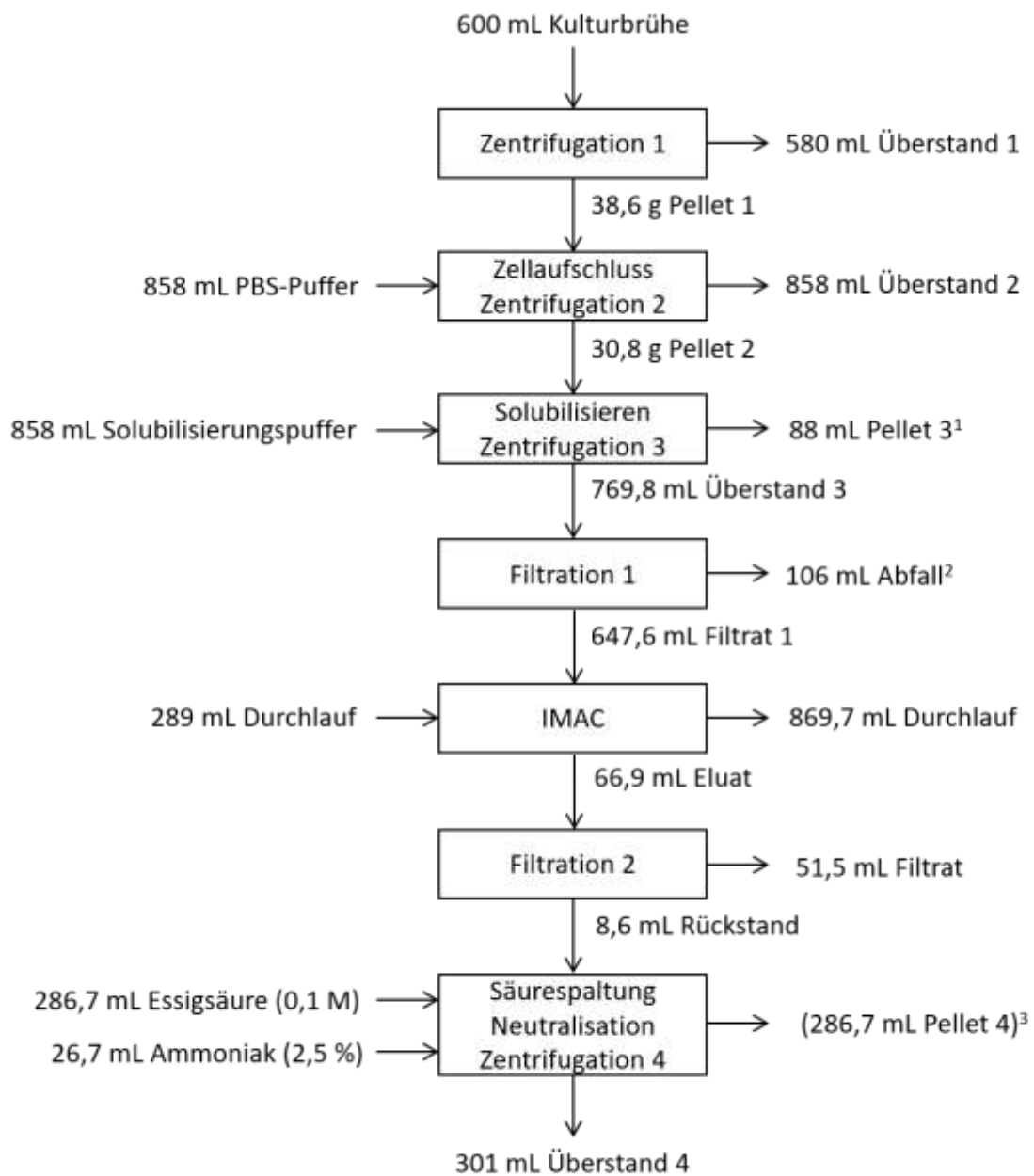
Tabelle 18: Proteinmengen der einzelnen Banden auf dem Tricin-SDS-Gel, AMP wurde als Standard gewählt

Lane	Protein	Volumen	Masse (ng)
1	AMP Standard	10.262.867	750
8	AMP	3.493.425	128

Der Tabelle 18 ist zu entnehmen, dass das AMP in Lane acht ungefähr 130 ng aufwies. Diese Mengenangabe müsste etwas genauer sein, als die von der proteindesignten Onkonase im vorangegangenen Kapitel (5.2.2), weil hier mit einem AMP Standard gerechnet wurde anstatt mit BSA. Trotzdem werden nachfolgend die beiden Werte miteinander verglichen, um eine eventuelle Tendenz zu erkennen. Der Überstand Ü6 wurde 1:2 verdünnt und die Geltasche mit 20 µL beladen. Daraus errechnet sich eine Proteinkonzentration von 13 mgmL⁻¹. Die proteindesignte Onkonase hatte eine Proteinkonzentration von ungefähr 60 mgmL⁻¹ im Pellet P6. Beide ermittelten Werte sind nur grobe Schätzwerte und doch entspricht das Verhältnis der Konzentrationen ungefähr der Voraussage 1/5 (13/60) aus Kapitel 5.2.2.

5.2.4 Flussdiagramm

In Abbildung 26 wurde ein Flussdiagramm dargestellt in dem davon ausgegangen wird, dass die gesamte entnommene Kulturbrühe mit dem beschriebenen Aufreinigungsprozess bearbeitet wird. Mit einem Blick fällt auf, dass das Volumen vom Anfang (600 mL) bis zum Ende nur um die Hälfte (301 mL) reduziert wurde. Dies kann daher keine starke Konzentrierung des Produkts zur Folge haben. Dies liegt daran, dass der gesamte beschriebene Prozess mit nur 0,9 g Biofeuchtmasse durchgeführt wurde (Gründe in Kapitel 5.2.1 beschrieben). Der Aufreinigungsschritt mit der IMAC und die darauffolgende Einengung des Proteins führten zu der stärksten Konzentrierung des Fusionsproteins, jedoch musste dieses noch gespalten werden. Die dafür notwendige Umpufferung ging einher mit einer starken Verdünnung (etwa 1:33). Aus diesem Grund war es erstaunlich, dass trotz der starken Verdünnung AMP und Onkonase im Überstand Ü6 und im Pellet P6 nachgewiesen werden konnten. Wenn von einer AMP Konzentration von 13 mgmL⁻¹ nach dem letzten Schritt ausgegangen wird, wären mit 600 mL Kulturbrühe etwa 3,9 g AMP hergestellt worden. Dies würde 10 % der Biofeuchtmasse entsprechen. Der Wert erscheint nicht realistisch und hängt sehr wahrscheinlich mit den angesprochenen Unsicherheitsfaktoren zusammen⁸.



¹ schleimähnlich

² Volumen, welches im Spritzenaufsatzfilter verbleibt

³ in 286,7 mL Essigsäure (0,1 M) resuspendiert

Abbildung 26: Flussdiagramm des Aufreinigungsprozesses bestehend aus sieben Aufreinigungsschritten. Es handelt sich um hypothetische Volumina und Massen die entstehen würden, wenn der in dieser Arbeit beschriebene Prozess 42,9-mal durchgeführt werden würde.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte das Fusionsprotein ONC-DCless-H6-(P)-NK-2-ALK erfolgreich hergestellt werden. Für den Upstreamprozess wurde zuerst eine Batch-Kultivierung für *E. coli* BL21 (DE3) am 3-Liter Bioreaktor entwickelt. Dafür wurde ein S88-Rezept erstellt und erprobt. Fehler im S88-Rezept wurden behoben und kleinere Umbauten am Bioreaktor wurden für eine erleichterte Bedienung durchgeführt. Im Anschluss konnte eine Fed-Batch-Kultivierung etabliert werden. Dafür wurde die Methode der Batch-Kultivierung abgeändert und verfeinert. Dazu gehörte die Erweiterung des S88-Rezeptes und der Add-ons von MFCS. Die Fertigstellung der Fed-Batch-Methode beinhaltete außerdem die Aufnahme der Produktionsphase. Die Durchführung der Fed-Batch-Kultur führte zu einer Kulturbrühe, die für den Aufreinigungsprozess genutzt werden konnte.

Der Downstreamprozess beinhaltete den Zellaufschluss mit Ultraschall, das Solubilisieren von Inclusion Bodies, das Durchführen einer Metallaffinitätschromatographie sowie die Säurespaltung des Fusionsproteins. Die einzelnen Schritte konnten mit Hilfe von SDS-Gelen auf ihren Erfolg hin überprüft werden. Die Annahme, dass sich das Fusionsprotein in Inclusion Bodies befindet, konnte auf diese Weise bestätigt werden. Das Abtrennen von Zellebris gestaltete sich als schwierig und wurde durch die Herabsenkung der Zellkonzentration beim Ultraschallaufschluss bewältigt. Nach dem Tausch einer wahrscheinlich „ausgebluteten“ Chromatographiesäule konnte das Fusionsprotein mit der IMAC von anderen Proteinen getrennt werden. Aufgrund mehrerer verbleibender Banden im SDS-Gel wurde eine Oligomerisierung des AMPs vermutet. Die anschließende Säurespaltung konnte durchgeführt werden, wobei Verbesserungspotenzial offengelegt wurde. Die Neutralisierung mit Ammoniak führte zu der gewünschten Präzipitation der proteindesignten Onkonase und diese konnte von dem AMP getrennt werden. Eine Auswertung der Massen der Proteinbanden mit dem Programm Image-Lab wurde durchgeführt, jedoch wurden die Ergebnisse eher als grobe Richtung gedeutet. Der Produktionsprozess hat gezeigt, dass mit der Bildung dieses Fusionsproteins AMP in *E. coli* hergestellt und aufgereinigt werden kann.

7 Ausblick

Zukünftig sollten weitere Tricin-Gele angefertigt werden um eindeutigere Aussagen über die Spaltprodukte des Fusionsproteins treffen zu können.

Außerdem sollte ein Agardiffusionstest durchgeführt werden, damit die Aktivität des hergestellten AMPs bewiesen werden kann.

Eine Gesamtproteinkonzentration von jedem Schritt sollte mit Hilfe eines Bradford-Tests durchgeführt werden, damit die Analyse der einzelnen Aufreinigungsschritte an Qualität gewinnt. Es könnte zusätzlich ein passenderes Protein als Standard eingesetzt werden, wenn die Quantität des Fusionsproteins gemessen werden soll. Damit nimmt die Aussagekraft der quantitativen Analyse zu.

Damit bei der Säurespaltung zukünftig keine Lösung verloren geht, sollte diese in einem 15 mL Falcon stattfinden. Dieser besitzt einen Schraubverschluss, der sich durch Druck nicht so schnell öffnet. Für eine größere Reinheit von dem Überstand Ü6 sollte die Zentrifugationszeit auf mindestens 120 min verlängert werden.

Um eine größere Menge zu produzieren, könnte ein kontinuierlicher Ultraschallaufschluss eingesetzt werden. Außerdem kann man versuchen die solubilisierten Proteine direkt auf die Ni-NTA Säule zu geben, ohne die Lösung vorher zu filtrieren. Diese Funktionalität verspricht der Hersteller der Säule (HisTrap™ FF crude 1 mL). Das Umpuffern des Eluats kann mit einer Gelchromatographie versucht werden. Dabei wird die Lösung zwar auch verdünnt, aber die Gelchromatographie kann für größere Volumina eingesetzt werden als der Spinfilter.

8 Literaturverzeichnis

1. Ulber, R. & Soyez, S. Vom Wein zum Penicillin- 5000 Jahre Biotechnologie. *Chem. Unserer Zeit* (2004).
2. Feuerpfeil, I., Lopez-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E. & Szewzyk, R. Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* (1999). doi:10.1007/s001030050057
3. Wilson, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology* (2014). doi:10.1038/nrmicro3155
4. Czekalski, N., Von Gunten, U. & Bürgmann, H. Antibiotikaresistenzen im Wasserkreislauf. Ein Überblick über die Situation in der Schweiz. *Aqua Gas* (2016).
5. Gross, S., Wilms, D., Krause, J., Brezesinski, G. & Andrä, J. Design of NK-2-derived peptides with improved activity against equine sarcoid cells. *J. Pept. Sci.* (2013). doi:10.1002/psc.2540
6. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* (2002). doi:10.1038/415389a
7. Hardt, J. Untersuchung der Expression des antimikrobiellen Peptids NK-2 ALK in *Escherichia coli* BL21(DE3). (Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, 2018).
8. Pane, K. *et al.* Rational design of a carrier protein for the production of recombinant toxic peptides in *Escherichia coli*. *PLoS One* (2016). doi:10.1371/journal.pone.0146552
9. Epanand, R. M. & Vogel, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (1999). doi:10.1016/S0005-2736(99)00198-4
10. Yu, H., Li, H., Gao, D., Gao, C. & Qi, Q. Secretory production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* using the catalytic domain of a cellulase as fusion partner. *J. Biotechnol.* (2015). doi:10.1016/j.jbiotec.2015.09.012
11. Bornhorst, J. A. & Falke, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* (2000). doi:10.1126/scisignal.2001449.Engineering

12. Pelton, R. A review of antifoam mechanisms in fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2002). doi:10.1038/sj.jim.7000293

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Fusionsproteins ONC-DCless-H6-(P)-NK-2-ALK, die Onkonase als Carrier Protein (grau), das His-tag für die Aufreinigung (grün), der Linker für die Trennung des Fusionsproteins (rot) und das AMP (blau). Das Fusionsprotein besteht aus 142 Aminosäuren und besitzt eine Größe von 16,6 kDa.....	11
Abbildung 2: Aminosäuresequenz von NK-2 ALK (-OH) mit 27 Aminosäuren. Rot markiert sind die ausgetauschten Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt 3,3 kDa und das Peptid besitzt eine Nettoladung von +11.	11
Abbildung 3: Aminosäuresequenz ONC-DCless mit 104 Aminosäuren. Rot markiert sind die ausgetauschten oder entfernten Aminosäuren. Das Protein besitzt eine Größe von 12,2 kDa.	12
Abbildung 4: Aminosäuresequenz des Linkers mit chemisch trennbarer Verbindung (zwischen D und P).....	12
Abbildung 5: Fließschema des Reinigungsprozesses.....	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung des verwendeten Vektors.....	19
Abbildung 7: 3-Liter Bioreaktor und die DCU Biostat A mit allen Anschlüssen. Der Kühlfinger und der Schaumdetektor sind nicht sichtbar.....	20
Abbildung 8: Gegenüberstellung der Wachstumskurve (oben) und der exponentiellen Wachstumsphase ab 12 h (unten) bei verschiedenen Animpfvolumina (0,2 mL, 0,3 mL). Es wurde bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Die Wachstumskurve zeigt sowohl die exponentielle Phase als auch den Anfang der stationären Phase. Für das Inokulieren werden Zellen aus dem Ende der exponentiellen Phase verwendet.	31
Abbildung 9: Schematischer Verlauf der Init-Phase des Rezeptes für einen Batch-Prozess ...	33
Abbildung 10: Schematischer Verlauf der Batch-Phase des Rezeptes für den Batch-Prozess	35
Abbildung 11: Schematischer Verlauf der Fed-Batch-Phase des Rezeptes für den Fed-Batch-Prozess.....	37
Abbildung 12: Schematischer Verlauf der Production-Phase des Rezeptes für den Fed-Batch-Prozess.....	38
Abbildung 13: Schematischer Verlauf der End-Phase des Rezeptes für den Batch-Prozess ...	39
Abbildung 14: Messdatenübersicht der Batch-Kultivierung vom 17.04.2018.....	40
Abbildung 15: Messdatenübersicht der Batch-Kultivierung vom 26.04.2018.....	42
Abbildung 16: Messdatenübersicht der Batch-Kultivierung vom 17.05.2018.....	43
Abbildung 17: Messdatenübersicht der Fed-Batch-Kultivierung am 29.05.2018.....	45

Abbildung 18: Messdatenübersicht des Abgassensors der Fed-Batch-Kultivierung vom 29.05.2018. Aufgetragen sind die Abgasmolenbrüche für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid und die daraus berechneten Werte für die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} , die Kohlenstoffdioxidproduktionsrate Q_{CO_2} sowie der Respirationsquotient RQ.....	46
Abbildung 19: Messdatenübersicht der Fed-Batch-Kultivierung am 07.06.2018.....	48
Abbildung 20: Erster Durchlauf einer Metallaffinitätschromatographie mit der NiNTA-Säule HisTrap™ FF crude (1 mL). Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris und 6 M Guanidin, während der Elutionspuffer 20 mM Tris, 6 M Guanidin und 100 mM Imidazol enthielt.....	49
Abbildung 21: Zweiter Durchlauf (gesamt) einer Metallaffinitätschromatographie mit der ausgetauschten Säule HisTrap™ FF crude (1 mL). Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris und 6 M Guanidin, während der Elutionspuffer 20 mM Tris, 6 M Guanidin und 100 mM Imidazol enthielt.	50
Abbildung 22: Zweiter Durchlauf (Ausschnitt des Eluats) einer Metallaffinitätschromatographie mit der ausgetauschten Säule HisTrap™ FF crude (1 mL). Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris und 6 M Guanidin, während der Elutionspuffer 20 mM Tris, 6 M Guanidin und 100 mM Imidazol.....	51
Abbildung 23: 15%-SDS Gel mit Proben des ersten Teils des Downstreamprozesses. In der fünften und sechsten Lane befindet sich BSA mit unterschiedlichen Massen als Standard. Das Gel lief bei 200 V für 2 h und als Marker (Lane 4) diente der PageRuler™ Unstained Protein Ladder von Thermo Scientific.....	53
Abbildung 24: 15%-SDS Gel mit Proben des zweiten Teils des Downstreamprozesses. In der fünften und sechsten Lane befindet sich BSA mit unterschiedlichen Massen als Standard. Das Gel lief bei 200 V für 2 h und als Marker (Lane 4) diente der PageRuler™ Unstained Protein Ladder von Thermo Scientific.....	55
Abbildung 25: Tricin-SDS Gel mit Proben der zwei Versuche einer Säurespaltung und einer anschließenden Neutralisierung, in der ersten Lane befinden sich 750 ng synthetisiertes AMP. Das Gel lief mit 20 mA für eine h und 45 min und als Marker (Lane 2) diente der Ultra-low Range Molecular Weight Marker von Sigma Aldrich.....	58
Abbildung 26: Flussdiagramm des Aufreinigungsprozesses bestehend aus sieben Aufreinigungsschritten. Es handelt sich um hypothetische Volumina und Massen die entstehen würden, wenn der in dieser Arbeit beschriebene Prozess 42,9-mal durchgeführt werden würde.	60

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PBS-Puffer (Zellaufschlusspuffer)	15
Tabelle 2: Solubilisierungspuffer	15
Tabelle 3: Equilibrierungspuffer	15
Tabelle 4: Elutionspuffer	15
Tabelle 5: Kathodenpuffer (10x) für Tricin-SDS-Gel.....	16
Tabelle 6: Gelpuffer (3x) für Tricin-SDS-Gel.....	16
Tabelle 7: Puffer S für Tricin-SDS-Gel.....	16
Tabelle 8: Probenpuffer für Tricin-SDS-Gel.....	16
Tabelle 9: Fixierlösung für Tricin-SDS-Gel.....	16
Tabelle 10: Stocklösung	17
Tabelle 11: Vorkulturmedium mit 5,5 g/L Glucose	17
Tabelle 12: Hauptkulturmedium mit 20 g/L Glucose.....	18
Tabelle 13: Feed-Lösung	18
Tabelle 14: Verwendeter Bakterienstamm	18
Tabelle 15: Zusammensetzung der Tricin-SDS-Gele.....	29
Tabelle 16: Zusammensetzung von zwei Gelen mit jeweils 15% SDS Trenngel und Sammelgel	30
Tabelle 17: Proteinmengen der einzelnen Banden auf dem 15% SDS-Gel, BSA wurde als Standard gewählt	56
Tabelle 18: Proteinmengen der einzelnen Banden auf dem Tricin-SDS-Gel, AMP wurde als Standard gewählt	59