



Antonia Lakowitz (Autor)

# Skalenübergreifende Produktion und Sekretion rekombinanter Proteine mit Stämmen der Gattung *Bacillus*



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7573>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Antikörper und Antikörperfragmente .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Anwendung von Antikörpern in Therapie, Diagnostik und Analytik .....	3
2.1.2	Gewinnung von Antikörpern .....	4
2.1.3	Struktur von Antikörpern .....	5
2.1.4	Antikörperfragmente und ihre Anwendung .....	6
2.1.5	Modellantikörperfragment D1.3 scFv .....	7
<b>2.2</b>	<b>Penicillin-G-Acylase .....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Vorkommen der Penicillin-G-Acylasen .....	7
2.2.2	Industrieller Einsatz der Penicillin-G-Acylasen .....	8
2.2.3	Struktur und Funktion der Penicillin-G-Acylasen .....	9
2.2.4	Penicillin-G-Acylase aus <i>B. megaterium</i> ATCC14945 .....	10
<b>2.3</b>	<b>Green fluorescent protein (GFP).....</b>	<b>11</b>
<b>2.4</b>	<b>Die Gattung <i>Bacillus</i> als Produktionssystem.....</b>	<b>12</b>
2.4.1	Eigenschaften der Gattung <i>Bacillus</i> .....	12
2.4.2	<i>Bacillus megaterium</i> .....	13
2.4.3	<i>Bacillus licheniformis</i> .....	14
2.4.4	<i>Bacillus subtilis</i> .....	14
2.4.5	Mechanismen der Proteinsekretion in <i>Bacillus</i> -Stämmen .....	16
2.4.6	Vorteile und Herausforderungen bei der Proteinproduktion und –sekretion mit Vertretern der Gattung <i>Bacillus</i> .....	18
2.4.7	Produktion und Sekretion pharmazeutisch relevanter rekombinanter Proteine mit <i>Bacillus</i> -Stämmen .....	19
2.4.8	Xylose-induzierbares Operon von <i>B. megaterium</i> .....	22
<b>2.5</b>	<b>Kinetik des mikrobiellen Wachstums und der Produktbildung im Batch-Prozess ....</b>	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b>Sauerstoffeintrag bei Kultivierungen .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>31</b>
3.1.1	Stämme .....	31
3.1.2	Plasmide .....	32
3.1.3	Chemikalien .....	33
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Kultivierung .....	35
3.2.1.1	Medien und Medienzusätze .....	35
3.2.1.2	Sterilisation .....	36
3.2.1.3	Stammhaltung .....	36
3.2.1.4	Vorkulturen und Inokulation .....	37
3.2.1.5	Kultivierungssysteme .....	38
3.2.1.6	Probenentnahme, -verarbeitung und -lagerung .....	39



3.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	39
3.2.2.1	Konstruktion der Plasmide pRBBm177, pALBm1, pALBm3, pALBm4 und pALBm5 ..	39
3.2.2.2	Präparation von DNA .....	40
3.2.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	42
3.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion .....	42
3.2.2.5	Amplifizierung des <i>pac</i> -Gens über Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	43
3.2.2.6	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	44
3.2.2.7	Ligation.....	45
3.2.2.8	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	46
3.2.2.9	Transformationen .....	46
3.2.3	Analytische Methoden .....	51
3.2.3.1	Optische Dichte .....	51
3.2.3.2	Biotrockenmassekonzentration .....	51
3.2.3.3	<i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC) .....	52
3.2.3.4	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	53
3.2.3.5	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i> (IMAC) .....	56
3.2.3.6	Präzipitation extrazellulärer Proteine .....	57
3.2.3.7	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (SDS-PAGE) .....	57
3.2.3.8	Densitometrie .....	58
3.2.3.9	Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ im Rührkesselreaktor .....	59
3.2.3.10	Penicillin-G-Acylase-Assay .....	60
3.2.3.11	Kinetische Analyse der D1.3 scFv-Produktion.....	61
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Methoden-Anpassung.....</b>	<b>63</b>
4.1.1	Zusammensetzung des Minimalmediums zur Produktion rekombinanter Proteine in <i>Bacillus</i> -Stämmen.....	63
4.1.2	Anpassung des ELISA zur Quantifizierung des Antikörperfragments D1.3 scFv .....	64
4.1.3	Messsystem für das Assay zur Quantifizierung der Penicillin-G-Acylase.....	66
<b>4.2</b>	<b>Rekombinante Produktion und Sekretion des Antikörperfragments D1.3 scFv.....</b>	<b>69</b>
4.2.1	Konstruktion des Plasmids pRBBm117 zur rekombinanten D1.3 scFv-Produktion und -sekretion .....	69
4.2.2	D1.3 scFv-Produktion und -sekretion in rekombinatem <i>B. megaterium</i> .....	70
4.2.2.1	Charakterisierung der rekombinanten D1.3 scFv-Produktion und -sekretion in Schüttelkolben.....	70
4.2.2.2	Scale-up und Scale-down der rekombinanten D1.3 scFv-Produktion und -sekretion mit <i>B. megaterium</i> .....	72
4.2.3	D1.3 scFv-Produktion und -sekretion in rekombinatem <i>Bacillus licheniformis</i> .....	74
4.2.4	D1.3 scFv-Produktion und -sekretion in rekombinatem <i>Bacillus subtilis</i> .....	76
4.2.4.1	Eignung des Plasmids pRBBm117 und Einfluss von Proteasen auf die D1.3 scFv-Produktion und -sekretion .....	77
4.2.4.2	Rekombinante D1.3 scFv-Produktion und -sekretion in Mikrotiterplatten, Schüttelkolben und Rührkesselreaktoren .....	79
4.2.5	Raum-Zeit-Ausbeute während der rekombinanten D1.3 scFv-Produktion und -sekretion .....	83
4.2.6	Produktbildungskinetik der rekombinanten D1.3 scFv-Produktion und -sekretion in rekombinanten <i>Bacillus</i> -Stämmen .....	84
<b>4.3</b>	<b>Rekombinante Produktion und Sekretion einer Penicillin-G-Acylase .....</b>	<b>87</b>
4.3.1	Konstruktion von rekombinanten Plasmiden für die Produktion und Sekretion einer Penicillin-G-Acylase.....	87

X



4.3.2	Rekombinante Pac-Produktion und -sekretion mit <i>Bacillus megaterium</i> und <i>Bacillus subtilis</i> .....	89
4.3.3	Einfluss des Signalpeptids und des His <sub>6</sub> -Tags auf die rekombinante Pac-Produktion und -sekretion .....	91
4.4	<b>Rekombinante Produktion von intrazellulärem GFP .....</b>	<b>96</b>
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>101</b>
6	<b>LITERATUR .....</b>	<b>105</b>