



Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Antikörper und Antikörperfragmente	3
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
2.2	Penicillin-G-Acylase	7
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
2.3	Green fluorescent protein (GFP).....	11
2.4	Die Gattung <i>Bacillus</i> als Produktionssystem.....	12
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
2.5	Kinetik des mikrobiellen Wachstums und der Produktbildung im Batch-Prozess	24
2.6	Sauerstoffeintrag bei Kultivierungen	26
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Material	31
3.1.1	Stämme	31
3.1.2	Plasmide	32
3.1.3	Chemikalien	33
3.2	Methoden.....	35
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
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	63
4.1	Methoden-Anpassung.....	63
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
4.2	Rekombinante Produktion und Sekretion des Antikörperfragments D1.3 scFv.....	69
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
4.3	Rekombinante Produktion und Sekretion einer Penicillin-G-Acylase	87
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 ₆ -Tags auf die rekombinante Pac-Produktion und -sekretion	91
4.4	Rekombinante Produktion von intrazellulärem GFP	96
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	101
6	LITERATUR	105