

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Proteinproduktion mittels Präzisionsfermentation.....	3
2.2 Bovines β -Lactoglobulin als Hauptmolkenprotein der Kuhmilch.....	5
2.2.1 Struktur und Denaturierungsverhalten von bovinen BLG.....	6
2.2.2 Amyloides Aggregationsverhalten.....	7
2.2.3 Ligandenbindung von bovinem BLG.....	9
2.2.4 Rekombinante Produktion von bovinem BLG.....	10
2.3 <i>Escherichia coli</i> als Gram-negativer Proteinproduktionswirt.....	13
2.3.1 Das T7-Expressionssystem.....	14
2.3.2 Mechanismen der Disulfidbrücken-Bildung in <i>E. coli</i>	15
2.3.3 <i>Inclusion bodies</i> (IBs).....	16
2.4 <i>Bacillus subtilis</i> als Gram-positiver Produktionswirt.....	18
2.4.1 Das Xylose-Operon.....	20
2.4.2 Der Sec-Sekretionsweg in <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.4.3 Mechanismen der Disulfidbrücken-Bildung in <i>Bacillus subtilis</i>	22
2.4.4 Einsatz genomreduzierter <i>Bacillus subtilis</i> Stämme zur rekombinanten Proteinproduktion.....	24
3 Materialien und Methoden.....	26
3.1 Stämme.....	26
3.2 Plasmide.....	26
3.3 Primer und Oligonukleotide.....	28
3.4 Chemikalien.....	29
3.5 Medien und Medienzusätze.....	32
3.6 Mikrobiologische Methoden.....	33
3.6.1 Sterilisation.....	33
3.6.2 Stammhaltung.....	33
3.6.3 Kultivierungen.....	33
3.6.3.1 <i>Escherichia coli</i> Kultivierungen.....	33
3.6.3.2 <i>Bacillus subtilis</i> Kultivierungen.....	35
3.6.4 Zellernte und Zellaufschluss.....	35
3.6.5 Isolierung, Waschen und Lösen von <i>Inclusion bodies</i>	36
3.6.5.1 Prozess bei der Variante rBLG-C.....	36
3.6.5.2 Prozess bei N-terminalen BLG-Peptiden.....	36

3.7 Molekularbiologische Methoden	36
3.7.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	36
3.7.2 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	36
3.7.3 Herstellung und Transformation von kompetenten <i>Bacillus subtilis</i> -Zellen	37
3.6.3.1 Herstellung und Transformation natürlich kompetenter <i>Bacillus subtilis</i> -Zellen	37
3.7.3.2 Herstellung und Transformation von <i>Bacillus subtilis</i> -Protoplasten.....	38
3.7.4 Quantifizierung von DNA.....	40
3.7.5 Polymerase-Kettenreaktion	40
3.7.6 Positionsspezifische Mutagenese mit der QuikChange™-Methode.....	40
3.7.7 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
3.7.8 Phosphorylierung und Ligation neu synthetisierter DNA.....	42
3.7.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA	42
3.7.10 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	42
3.8 Analytische und proteinbiochemische Methoden	43
3.8.1 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.8.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration	43
3.8.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	43
3.8.4 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	43
3.8.5 Ionenaustauschchromatographie	44
3.8.5.1 Proteinreinigung über eine Schwerkraftsäule.....	44
3.8.5.2 Halbautomatische Proteinreinigung mittels ÄKTA-System.....	45
3.8.6 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).....	45
3.8.7 Glutathion-Agarose-Affinitätschromatographie	45
3.8.8 Größenausschlusschromatographie.....	46
3.8.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.8.10 Densitometrie.....	48
3.8.11 Western Blot und N-terminale Sequenzierung	49
3.8.12 Proteinpräzipitation	49
3.8.12.1 Trichloressigsäure-Fällung.....	49
3.8.12.2 Ammoniumsulfat-Fällung.....	50
3.8.13 Hydroxylamin-Spaltung	50
3.8.14 Dialyse	51
3.8.15 Gefriertrocknung.....	51
3.9 Methoden zur Protein-Charakterisierung	51
3.9.1 Zirkulardichroismus	51
3.9.2 Intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz	52

3.9.3 Retinol-Assay	53
3.9.4 Extrinsische 8-Anilinnaphthalin-1-sulfonsäure (ANS)-Fluoreszenz	53
3.9.5 Thioflavin-T (ThT) Assay.....	53
4 Ergebnisse und Diskussion	55
4.1 Produktion und Charakterisierung rekombinanter β -Lactoglobulin-Varianten.....	55
4.1.1 Rekombinante Produktion von β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten mit <i>Escherichia coli</i>	55
4.1.2 Struktur-Analyse rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten.....	60
4.1.2.1 Sekundärstruktur rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten	61
4.1.2.2 Tertiärstruktur rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten.....	62
4.1.2.3 Quartärstruktur rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten	66
4.1.2.4 Hitze-Denaturierungsverhalten von β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten.....	67
4.1.3 Retinol-Bindeeigenschaften von β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten	69
4.1.4 Amyloide Aggregation rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten.....	71
4.1.4.1 Amyloide Aggregation bei pH 2,0 (Hoppenreijts et al. 2023b).....	72
4.1.4.2 Amyloide Aggregation bei pH 7,0 (Hoppenreijts et al. 2023a)	73
4.1.4.3 Methodenetablierung zum Nachweis amyloider Aggregation im reduzierten Maßstab	74
4.1.5 Kernergebnisse der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der BLG-Varianten.....	76
4.2 Rekombinante Produktion von N-terminalen β -Lactoglobulin Peptiden in <i>E. coli</i>	80
4.2.1 Produktion eines N-terminalen BLG-Peptides fusioniert an einen Glutathion-S-Transferase-Tag	81
4.2.2 Produktion von BLG-Peptiden über <i>Inclusion bodies</i>	82
4.2.2.1 Etablierung der Hydroxylamin-Spaltung in rekombinantem rBLG-C	83
4.2.2.2 Modifizierung von rBLG-C	84
4.2.3 Steigerung der <i>Inclusion body</i> -Ausbeute mittels Hochzelldichtekultivierung	86
4.2.3.1 Optimierung des Kultivierungsmediums.....	86
4.2.3.2 Kultivierung im Batch-Betrieb	88
4.2.3.3 Fed-Batch mit exponentiellem Feed	89
4.2.3.4 Fed-Batch mit pH-stat Feed-Zugabe.....	91
4.2.3.5 Vergleich der Fed-Batch-Strategien	93
4.2.4 Produktion von BLG-Peptiden mit His-Tag.....	96
4.3 <i>Bacillus subtilis</i> : Produktion, Reinigung und Charakterisierung von rekombinantem β -Lactoglobulin	99
4.3.1 Konstruktion des Plasmids pSBBs01 zur rekombinanten Produktion von BLG in <i>Bacillus subtilis</i>	100
4.3.2 Produktion und Sekretion von β -Lactoglobulin mittels konventioneller <i>Bacillus subtilis</i> -Stämme	100

4.3.2.1 Reinigung von sekretiertem rBLG.....	102
4.3.2.2 Strukturelle Charakterisierung von sekretiertem rBLG.....	104
4.3.3 Produktion und Sekretion von β -Lactoglobulin mittels genomreduzierter <i>Bacillus subtilis</i> - Stämme	105
5 Zusammenfassung und Ausblick	113
6 Literatur	116
7 Anhang.....	128