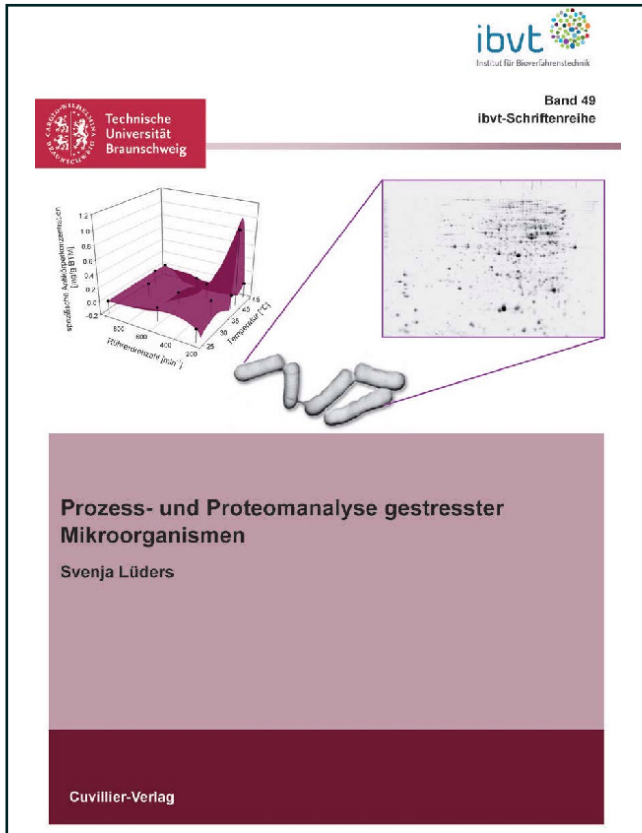




Svenja Lüders (Autor)

# Prozess- und Proteomanalyse gestresster Mikroorganismen



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/678>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-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 .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Theorie.....</b>	<b>4</b>
3.1	Stationäre <i>Escherichia coli</i> Hitzeschockantwort in kontinuierlicher Bioreaktorkaskade	4
3.1.1	Die <i>Escherichia coli</i> Hitzeschockantwort.....	4
3.1.2	Stationärphase und generelle Stressantwort .....	6
3.1.3	Die kontinuierlich betriebene Bioreaktorkaskade .....	7
3.2	Rekombinante Antikörperproduktion in <i>Bacillus megaterium</i> .....	8
3.2.1	SFB 578 - Vom Gen zum Produkt.....	8
3.2.2	<i>Bacillus megaterium</i> .....	9
3.2.3	Produktion und Sekretion homologer und heterologer Proteine in der Gattung <i>Bacillus</i> .....	11
3.3	Aufbau, Herstellung und therapeutische Anwendung von Antikörpern.....	14
3.4	Die rekombinante Proteinproduktion in <i>Bacillus megaterium</i> .....	17
3.5	Proteomanalyse .....	18
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
4.1	Chemikalien.....	21
4.2	Bakterienstämme und Plasmide .....	21
4.3	Medien und Medienzusätze .....	23
4.4	Kultivierung.....	25
4.4.1	Sterilisation .....	25
4.4.2	Vorkulturen .....	25
4.4.3	Kryokulturen .....	25
4.4.4	Kultivierung in der Mikrotiterplatte .....	26
4.4.5	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> in einer kontinuierlichen Bioreaktorkaskade .....	26
4.4.6	Batch-Kultivierung <i>Bacillus megaterium</i> .....	28
4.4.6.1	Bioreaktoren.....	28
4.4.6.2	Anlagenkonfiguration .....	29
4.4.6.3	Batch-Kultivierung .....	29
4.4.6.4	On-line Analytik.....	30

4.5	Experimentelles Design .....	30
4.5.1	Einfluss des mechanischen Stresses und der Temperatur auf die Produktion des Antikörperfragmentes scFv D1.3 in <i>B. megaterium</i> .....	31
4.6	Kultivierungsbegleitende Analytik .....	33
4.6.1	Bestimmung der Biotrockenmasse .....	33
4.6.2	Bestimmung der optischen Dichte .....	33
4.6.3	Messung des Glukosegehalts im Medium .....	33
4.6.4	Durchflusszytometrie.....	34
4.6.5	Messung externer Metabolite mittels high performance liquid chromatography (HPLC) .....	34
4.6.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	35
4.7	Proteinanalytik.....	36
4.7.1	Probenvorbereitung für die Proteinanalytik.....	36
4.7.2	Zellaufschluss.....	36
4.7.3	Extraktion der Proteine.....	37
4.7.4	Anreicherung von Membranproteinen.....	38
4.7.4.1	Anreicherung von Membranproteinen mittels Triton-X-114.....	38
4.7.4.2	Anreicherung von Membranproteinen mittels Natriumcarbonat .....	38
4.7.4.3	Anreicherung von Membranproteinen mittels Rehydratationspuffer .....	39
4.7.5	Isoelektrische Fokussierung.....	39
4.7.6	Separation der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese .....	40
4.7.7	Spaltung und Identifikation der Proteine .....	40
4.7.8	Eindimensionale SDS-Gelelektrophorese.....	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>43</b>
5.1	Proteomanalyse der stationären <i>Escherichia coli</i> Hitzeschockantwort.....	43
5.1.1	Biochemische Analyse der stationären Hitzeschockantwort.....	43
5.1.2	Proteine der oxidativen Stressantwort .....	47
5.1.3	Proteine der Zellhülle .....	48
5.1.4	Proteinbiosynthese und Chaperone.....	50
5.1.5	Enzyme des Energiestoffwechsels .....	52
5.1.6	Proteine der Aminosäurebiosynthese .....	55
5.1.7	Zusammenfassung: Die stationäre <i>Escherichia coli</i> -Temperaturstressantwort.....	57
5.2	Analyse und Optimierung der Antikörperfragmentproduktion in <i>Bacillus megaterium</i> .....	60
5.2.1	Variation des Induktionszeitpunktes der Antikörperfragmentproduktion.....	61
5.2.2	Produktion des Antikörperfragmentes im Schüttelkolben .....	64
5.2.3	Produktion des Antikörperfragmentes im Bioreaktor .....	65

5.2.4	Einfluss der Temperatur und des mechanischen Stresses auf die rekombinante Proteinproduktion .....	66
5.2.5	Durchflusscytometrische Analyse .....	71
5.2.5.1	Zellaktivitätsmessung mittels DIBAC <sub>4</sub> (3)-Fluoreszenzfärbung .....	71
5.2.5.2	Durchflusscytometrische Analyse der Zellgröße.....	74
5.3	<i>Bacillus megaterium</i> Kultivierungen unter optimierten Produktionsbedingungen .....	78
5.3.1	Vergleich der Antikörperfragmentproduktion in Minimal- und Komplexmedium	78
5.3.2	Reduktion des mechanischen Stresses und der Begasungsrate in der Produktionsphase.....	79
5.4	<i>Bacillus megaterium</i> Proteomanalyse.....	83
5.4.1	Proteomanalyse der heterologen Proteinproduktion im Bioreaktor.....	85
5.4.1.1	Enzyme des Zentralstoffwechsels .....	86
5.4.1.2	Proteine des Aminosäure- und Proteinmetabolismus und der allgemeinen Stressantwort.....	89
	Zusammenfassung .....	93
5.4.2	Einfluss des mechanischen Stresses auf die rekombinante Proteinproduktion	93
5.4.2.1	Einfluss des mechanischen Stresses zum Zeitpunkt der Induktion der heterologen Proteinproduktion.....	94
5.4.2.2	Einfluss des mechanischen Stresses in der Produktionsphase des rekombinanten Antikörperfragmentes.....	101
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Symbolverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>117</b>