

1 Einleitung

Mikroorganismen leben in einer sich ständig ändernden Umwelt und sind somit permanenten Stresssituationen ausgesetzt, denen sie mit verschiedensten Anpassungsmechanismen widerstehen. Die Gesamtheit der in der Umgebung der Zelle auftretenden Umwelteinflüsse wird als Environom bezeichnet. Veränderungen verschiedener Faktoren wie der Temperatur, des pH-Werts und der Nährstoff- und Wasserverfügbarkeit beeinflussen die Mikroorganismen. Besonders das Wachstum und die Produktivität sind von entscheidender Bedeutung für die Biotechnologie und die Bioverfahrenstechnik.

Die mikrobielle Hitzeschockantwort ist für viele Anwendungen, z.B. die Temperatur-induzierte heterologe Proteinproduktion wichtig. Die Hitzeschockantwort kann sich aufgrund der gleichzeitigen Synthese molekularer Chaperone, Proteasen und anderer Hitzeschockproteine und somit zusätzlichem Verbrauch von Energie auf die Synthese und Stabilität der produzierten Proteine auswirken. Eine erhöhte Proteinproduktion unter Temperaturstressbedingungen kann zusätzlich zu Aminosäuremangel führen, wodurch die Proteaseaktivität erhöht wird. Dies kann zu einem schnelleren Abbau der synthetisierten Proteine führen und somit die Produktivität herabsetzen. Die verstärkte Expression von Chaperonen hingegen kann stabilisierend auf die produzierten Proteine wirken. Ein weitreichendes Verständnis der Hitzeschockantwort auch in Kombination mit weiteren Stressfaktoren ausgelöst durch die heterologe Proteinproduktion sowie des im Bioreaktor auftretenden und bisher wenig untersuchten mechanischen Stresses kann zur weiteren Optimierung des gesamten Prozesses führen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teilprojekte. Im ersten Teilprojekt wurde die Temperaturstressantwort von *Escherichia coli* in einer kontinuierlichen Bioreaktorkaskade untersucht und im zweiten Projekt die heterologe Antikörperproduktion in *Bacillus megaterium* unter erhöhter Kultivierungstemperatur. Es soll anhand dieser zwei Modellorganismen die Wichtigkeit gezeigt werden, mikrobielle Stresssituationen sowie die heterologe Proteinproduktion als zusätzlichen Stressfaktor zu analysieren, um mikrobielle Prozesse besser zu verstehen und sich die Kenntnis zur Verbesserung zu Nutze zu machen. Vor allem mittels Proteomanalyse können

wichtige Erkenntnisse zur mikrobiellen Stressantwort gewonnen werden, die zur Identifikation prozessrelevanter Regulationen führen können.

2 Aufgabenstellung

Im Teilprojekt „**Stationäre *Escherichia coli* Hitzeschockantwort in kontinuierlicher Bioreaktorkaskade**“ wurden die Zellen in einer kontinuierlich betriebenen Bioreaktorkaskade, bestehend aus einem ersten Wachstumsreaktor und einem nachgeschalteten Stressbioreaktor, kultiviert. Die Versuchsanordnung ermöglichte es, die Zellen einem konstanten, definierten Temperaturstress bei einer konstanten Durchflussrate auszusetzen. Die Analyse der *E. coli* Hitzeschockantwort erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese bei einer Stresstemperatur von 47,5°C und einer konstanten Durchflussrate von 0,225 h⁻¹. Als Referenzsystem diente der Wachstumsbioreaktor mit einer Kultivierungstemperatur von 37°C. Die Proteomanalyse zeigte, dass unter den definierten Bedingungen in kontinuierlicher Kultivierung eine Vielzahl von Stressfaktoren auftreten. Neben Chaperonen und Proteasen, wurden veränderte Proteinexpressionslevel aus den verschiedensten Stoffwechselbereichen der Zelle identifiziert.

Im zweiten Teilprojekt „**Rekombinante Antikörperproduktion in *Bacillus megaterium***“ war die Analyse und die Optimierung der rekombinanten Proteinproduktion des Lysozym-spezifischen Antikörperfragmentes D1.3 scFv in *Bacillus megaterium* das Ziel. Zunächst erfolgte die Auswahl des geeigneten Stammes und des Induktionszeitpunktes der rekombinanten Proteinproduktion. Die rekombinante Antikörperfragmentproduktion wurde anschließend vom Schüttelkolben auf den Bioreaktor übertragen und signifikant gesteigert. Zur Optimierung der heterologen Proteinproduktion wurde die Rührerdrehzahl im Bereich von 250 min⁻¹ (178,5 W/m³) bis 1000 min⁻¹ (6515,4 W/m³) und die Kultivierungstemperatur im Bereich von 25°C bis 45°C variiert. Der durch die Rührerdrehzahl auf die Zellen wirkende mechanische Stress beeinflusste die Produktivität, die Aktivität, die Zellgröße sowie das Wachstum entscheidend. Die Proteomanalyse lieferte erste Erkenntnisse des mechanischen Stresses sowie des Einfluss der heterologen Proteinproduktion auf die Zellen.

3 Theorie

3.1 Stationäre *Escherichia coli* Hitzeschockantwort in kontinuierlicher Bioreaktorkaskade

3.1.1 Die *Escherichia coli* Hitzeschockantwort

Mikroorganismen leben in einer sich ständig ändernden Umwelt. Einer der auftretenden Stressfaktoren ist die Veränderung der Umgebungstemperatur. Eine Erhöhung der Temperatur löst in Bakterien eine Hitzeschockantwort aus, die es ihnen ermöglicht, sich an die veränderten Umweltbedingungen anzupassen und den Temperaturstress in einem gewissen Bereich zu überleben (37, 38, 51, 91). Die *E. coli* Hitzeschockantwort wurde 1978 durch die Neidhardt und Yura entdeckt. Sie benutzten ein- und zwei-dimensionale Gele zur Untersuchung der durch Hitze induzierten Proteine in Batch-Schüttelkolbenexperimenten (206, 315). Nach der Temperaturerhöhung wird in *E. coli* die Synthese von mehr als 20 Hitzeschockproteinen induziert (37, 38, 51, 91). Diese liegen unter normalen Wachstumsbedingungen schon in der Zelle vor und werden vermehrt produziert, wenn das Signal vorliegt. Nach der Adaptionsphase nimmt die Synthese der Hitzeschockproteine ab und erreicht ein stationäres Level (38, 91). Hitzeschockproteine schützen die Zellbestandteile bei erhöhten Temperaturen. Typische Hitzeschockproteine sind Chaperone und Proteasen, die die Proteinfaltung vermitteln, eine Rückfaltung teilweise denaturierter Proteine ermöglichen und denaturierte Proteine abbauen (37, 38, 51, 91). Die meisten Hitzeschockproteine in *E. coli* stehen unter der Kontrolle des alternativen Sigmafaktors σ^{32} (σ^H) (**Abb. 3.1**) (320). Dieser stellt eine Untereinheit der RNA-Polymerase dar und bindet spezifisch an Hitzeschockpromotoren (51, 100).