

Biotechnologische Produktion von humanen Strukturproteinen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Pia Gellermann, M.Sc.

[2021]

Referent: Prof. Dr. rer. Nat. Thomas Scheper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität

Korreferentin: Dr. rer. nat. Janina Bahnemann

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität

Tag der Promotion: 14.12.2020

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich herzlich bei **Prof. Dr. Thomas Scheper** für die Möglichkeit, meine Promotion in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, für das Bereitstellen dieses interessanten Themas sowie für die freundliche Unterstützung während der Promotion.

Für die inhaltliche Hilfsbereitschaft sowie die Übernahme des Korreferats danke ich **Dr. Janina Bahnemann**. Bei **PD Dr. Ulrich Krings** möchte ich mich für die Unterstützung für die Massenspektrometrie sowie für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Ein besonders herzlicher Dank geht an **Dr. Iliyana Pepelanova**. Durch deine inhaltliche und mentale Unterstützung konnte ich die Zeit genießen und habe gleichzeitig viel von deinen inspirierenden Ideen und Denkweisen lernen können. Umso schöner ist es, dass wir nach meiner Promotionszeit weitere Kooperationen anstreben. Ich freue mich drauf!

Martina Weiß und **Martin Pähler** möchte ich für die Unterstützung bei experimentellen Arbeiten und die weiteren Hilfen bedanken. Ohne **Cornelia Alic**, **Christiane Hellwig**, **Ulrike Dreschel**, **Thorleif Hentrop**, **Dr. Ivo Havlik**, **Dr. Michael Dors**, **Thorsten Stempel** und **Friedbert Gellermann** würde der Institutsalltag nicht reibungslos verlaufen. Bei Frau **Dr. Antonina Lavrentieva**, **Dr. Christian Ude**, **Dr. Caroline Schneider Barthold**, **Dr. Sabrina Grünert**, **Dr. Zhaopeng Li** und **Dr. Chantal Brämer** möchte ich mich ebenfalls bedanken. Durch die interessant geführten wissenschaftlichen Diskussionen und die Hilfsbereitschaft im Laboralltag konnte ich meine Forschung mit großer Freude fortführen und meinen Wissenshorizont erweitern. **Svenja Bothe**, **Julia Käsehagen**, **Linda Jansen-Olliges Janin Korn** und **Ethan Overfelt** möchte ich für die engagierte und hilfreiche Mitarbeit im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten danken. Ein weiteres Danke geht an meine Arbeitskollegen, die dieses Institut erst zu dem machen was es ist – ein Ort mit vielen spannenden Forschungsfeldern, interessanten Persönlichkeiten, Organisationstalenten, zielstrebigen Brauern, entstandenen Freundschaften, Problemlösern, Nachteulen – ihr seid super, vielen Dank! Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen engsten Kollegen **Marline Kirsch**, **Kimia Ekramzadeh**, **Elsa Gewohn**, **Svenja Bolten** und **Sarah Schreiber**. Danke für die Freundschaft und die besonderen Momente, die wir alle in tiefer Erinnerung behalten werden. Danke auch an meine Bürokollegen **Tobias Steinwedel**, **Marc Prante**, **Torsten Schüling**, **Anton Enders**, **Jonas Austerjost**, **Ingo de Vries**, **Lukas**

Raddatz und Bastian Quaas. Viele schöne Anekdoten sind in den letzten drei Jahren entstanden, die wir uns noch Jahre später erzählen werden. Eine Zeit voller schönen Erinnerungen und toller Arbeitsatmosphäre. Der nächste besonders große Dank geht an die Menschen, die mich das gesamte Studium begleitet haben und denen ich viele zu verdanken habe. **Ina Siller, Doris Hermes und Sabrina Metze.** Ich kann mir keine tolereren Freunde vorstellen. Ohne Euch wäre ich nicht an diesen Punkt gelangt.

Ein besonderer Dank geht an meine **Eltern**, meine **Schwester** und an die kleine **Thea**, die mir in jeglicher Hinsicht den Rücken gestärkt und an meinen Weg geglaubt haben. Danken möchte ich auch meinem Freund **Markus** für seine Geduld und sein offenes Ohr. Danke, dass Ihr immer für mich da seid.

Kurzfassung

Proteine, die aus der natürlichen extrazellulären Matrix gewonnen werden, wie Gelatine, kommen in der klinischen Forschung zum Einsatz. Gewöhnlich wird Gelatine aus tierischem Material gewonnen, wodurch das Risiko einer pathogenen Übertragung und einer uneinheitlichen Produktqualität von Charge zu Charge besteht. Eine rekombinante Produktion in Hefe umgeht diese Nachteile, indem die Herstellung mit reproduzierbarer Qualität in tierkomponentenfreien Medien gewährleistet wird. Ein gelatinemimetisches Protein (GelMP), das auf der Alphakette des menschlichen Kollagen I basiert, wurde in *Komagataella phaffii* unter der Kontrolle des Promotors der Methanol-induzierbaren Alkoholoxidase (AOX1) geklont. Ein produzierender Klon wurde ausgewählt und die Produktion auf einen 30-L-Maßstab hochskaliert. Das GelMP wurde in das Kultivierungsmedium sekretiert, und die Endausbeute betrug 3,4 g/L. Das Zielprotein wurde direkt aus dem zellfreien Medium durch eine Cross-Flow Filtration gewonnen. Neben dem Gelatine-mimetischen Protein wurde ein Fibrin-basiertes Protein rekombinant hergestellt. Die Fibrinogen- γ -Kette (FGG) ist eine von drei Proteinketten, die das Blutgerinnungsprotein Fibrinogen bilden. FGG zeichnet sich durch interessante biologische Funktionen aus, wie z.B. die Bindung von Integrinen, Leukozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und dem Wachstumsfaktor FGF-2. In dieser Arbeit wurde rekombinantes FGG als Biomaterial auf Fibrinbasis in *Escherichia coli* hergestellt. Die Gensequenz der menschlichen Fibrinogen γ - Kette wurde Codon optimiert, synthetisiert und in *E. coli* eingebracht. Das FGG wurde im 10 L Kultivierungsmaßstab als *Inclusion bodies* produziert. Die IBs wurden solubilisiert und mittels Zwei-Schritt-Chromatographie auf eine Reinheit von $> 90\%$ aufgereinigt. In Zellkulturexperimenten förderte sowohl das rekombinante FGG als auch das Gelatine-mimetische Protein die Adhäsion und Proliferation von aus Fettgewebe gewonnenen mesenchymalen Stammzellen (AD-MSCs). Der funktionelle Unterschied ist von nativem Fibrinogen und tierischer Gelatine nicht zu unterscheiden. Das GelMP und FGG sind Alternativen zur Herstellung und Gewinnung von humanbasierten Strukturproteinen für den Einsatz in der regenerativen Medizin.

Stichworte: Gelatine-mimetisches Protein, rekombinante Gelatine, *Komagataella phaffii*, rekombinante Fibrinogen Gamma Kette; *Escherichia coli*; Fibrinogen, Biomaterial

Abstract

Proteins derived from the natural extracellular matrix, such as gelatin, are frequently used in clinical research. Usually collagen and gelatin are derived from animal material, which carries the risk of pathogenic transmission and suffers from inconsistent product quality from batch to batch. Recombinant production in yeast avoids these disadvantages by ensuring reproducible quality production in animal component-free media. A gelatin-mimetic protein (GelMP) based on the alpha chain of human collagen I was cloned in *Komagataella phaffii* under the control of the promoter of methanol-inducible alcohol oxidase (AOX1). A producing clone was selected and production was scaled up to a 30 L scale. The GelMP was secreted into the culture medium and the final yield was 3.4 g/L. The target protein was recovered directly from the cell-free medium by crossflow filtration. In addition to the gelatin mimetic protein, a fibrin-based protein was produced recombinantly. The fibrinogen- γ -chain (FGG) is one of three protein chains that form the blood clotting protein fibrinogen. FGG is characterized by interesting biological functions, such as the binding of integrins, leukocytes, platelets, fibroblasts, endothelial cells and the growth factor FGF-2. In this work recombinant FGG was produced as a fibrin-based biomaterial in *Escherichia coli*. The gene sequence of the human fibrinogen- γ -chain was codon optimized, synthesized and inserted into *E. coli*. The FGG was produced as inclusion bodies in 10 L cultivation scale. The IBs were solubilized and purified to a purity of > 90 % by two-step chromatography. In cell culture experiments, both recombinant FGG and gelatin mimetic protein promoted the adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells (AD-MSCs) derived from adipose tissue. The functional difference cannot be distinguished from native fibrinogen and animal derived gelatin. GelMP and FGG are alternatives for the production and extraction of human-based structural proteins for use in regenerative medicine.

Keywords: Gelatin mimetic protein, recombinant gelatin, *Komagataella phaffii*, recombinant fibrinogen gamma chain; *Escherichia coli*; fibrinogen, biomaterial, cell culture coating

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Kurzfassung.....	III
Abstract	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	1
Einleitung und Zielsetzung	4
1.1 Einleitung.....	4
1.2 Zielsetzung.....	5
1 Theoretische Grundlagen	6
1.1 Gelatine und Kollagen.....	7
1.1.1 Struktur von Gelatine und Kollagen.....	8
1.1.2 Produktion von rekombinantem Kollagen/Gelatine	10
1.2 Fibrinogen.....	12
1.2.1 Übersicht Struktur und Funktion von Fibrinogen.....	13
1.2.2 Produktion von rekombinantem Fibrinogen.....	15
1.3 Kollagen-, Gelatine- und Fibrinogen-basierte <i>Bioinks</i>	16
2 Experimentelle Arbeiten – Biopolymer GelMP	22
2.1 Kultivierung von <i>Komatagaella phaffii</i> und Proteinproduktion von GelMP im Technikumsmaßstab.....	24
2.2 Downstream Processing (DSP)	28
2.2.1 Entsalzung mittels Größenausschlusschromatographie.....	29
2.2.2 Entsalzung und Aufkonzentrierung mittels Cross-Flow-Filtration.....	30
2.3 Produktanalytik.....	30
2.3.1 Proteinstabilität.....	30
2.3.2 Strukturcharakterisierung.....	33
2.4 Anwendung als Biomaterial.....	36

2.4.1	Biokompatibilität.....	36
2.4.2	Zelladhäsionsassay	37
2.5	Fazit – Biopolymer GelMP	40
3	Experimentelle Arbeiten – Biopolymer FGG.....	41
3.1	Kultivierung und Proteinproduktion von FGG in <i>Escherichia coli</i>	43
3.1.1	Fazit Kultivierungsarbeiten	47
3.2	Downstream Processing.....	49
3.2.1	Zellernte, Isolierung und Solubilisierung der Inclusion Bodies.....	50
3.2.2	Aufreinigung des rekombinanten FGGs mittels Zwei-Schritt-Chromatographie.....	52
3.2.3	Umpufferung.....	62
3.2.4	Fazit der Aufreinigung von FGG	63
3.3	Produktanalytik.....	65
3.3.1	Crosslinking von FGG mittels Faktor XIII.....	65
3.3.2	Stabilitätstest	65
3.4	Charakterisierung von FGG in der Zellkultur als Biomaterial	67
3.4.1	Biokompatibilität von FGG.....	68
3.4.2	Adhäsionsverhalten der AD-MSCs auf FGG beschichteter Oberfläche	70
3.4.3	Proliferationsverhalten der AD-MSCs auf FGG-beschichteter Oberfläche	71
3.4.4	Morphologische Betrachtung der hAD-MSCs auf FGG-beschichteter Oberfläche	73
3.5	Fazit – Biopolymer FGG.....	76
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	78
A	Materialien.....	84
A.1	Chemikalien.....	84
A.2	Laborgeräte	88
A.3	Verbrauchsmaterialien.....	92

A.4 Puffer, Lösungen und Medien	94
A.5 Verwendete Kits.....	105
A.6 Software	105
A.7 Zelllinien.....	106
B Methoden.....	106
B.1 Arbeiten mit <i>Komatagaella phaffii</i>	106
B.1.2 Kultivierungsarbeiten-GelMP	106
B.2 Downstream Processing-GelMP	108
B.2.1 Umpufferung mittels Größenausschlusschromatographie.....	108
B.2.2 Dialyse und Aufkonzentrierung mit Cross-Flow Filtration.....	108
B.2.3 Trocknung von GelMP	108
B.3 Arbeiten in der Zellkultur - GelMP	109
B.3.1 Zelladhäsions Experimente-GelMP	109
B.3.2 Biokompatibilität von GelMP durch quantitativen Assay - GelMP ..	109
B.4 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	110
B.4.1 Kultivierungsarbeiten-FGG	110
B.4.1.1 Fermentationsvorbereitung und Durchführung	111
B.5 Downstream Processing-FGG	112
B.5.1 Zellernte und Isolierung von Inclusion Bodies.....	112
B.5.2 Solubilisierung von Inclusion Bodies.....	112
B.5.3 Metallchelate-Affinitätschromatographie (HiTrap Column 5 mL)	113
B.5.4 Größenausschlusschromatographie.....	114
B.5.5 Umpufferung und Aufkonzentrierung	114
B.6 Arbeiten in der Zellkultur - FGG.....	114
B.6.1 Beschichtung der Zellkulturplatten mit Proteinlösung.....	114
B.6.2 Kultivierung und Passagieren der hAD-MSCs.....	115
B.6.3 CTB-Assay (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay)	115
B.6.4 FGG-Beschichtungsversuche mit hAD-MSCs	116

B.7 Proteinanalytik.....	118
B.7.1 N-terminale Sequenzierung-GelMP.....	118
B.7.2 Bichinchoninic Acid Protein Assay-GelMP.....	118
B.7.3 Chemische Modifizierung des GelMP.....	118
B.7.4 SDS-PAGE.....	119
B.7.5 Coomassie-Färbung	119
B.7.6 Bradford-Test Assay.....	119
B.7.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Densitometrie.....	120
B.7.8 Rheologie.....	120
B.7.9 CD-Spektrometrie.....	120
B.7.10 Differential-Scanning-Fluorometry (DSF).....	120
C Zusätzliche experimentelle Daten.....	121
Verzeichnisse	124
Abbildungsverzeichnis.....	124
Literaturverzeichnis.....	131
Unterstützende Arbeiten	144
Curriculum Vitae.....	145
Publikationsliste.....	146

Abkürzungsverzeichnis

μmax	Maximale Wachstumsrate
AIEX	Anionenaustausch Chromatographie
AOX	Alkohol Oxidase
Arg	Arginin
ASC	<i>Adipose Stromal Cells</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CTB	<i>CellTiter-Blue</i> [®]
DO	<i>Dissolved Oxygen</i>
DSP	Downstream Processing
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FGG	<i>Fibrinogen Gamma chain</i>
GelMA	Gelatin-Methacryloyl
GelMP	Gelatine mimetisches Protein
Gly	Glycin
HaCaT	<i>Human keratinocyte cell line</i>
HIC	Hydrophobe Interaktions Chromatographie
His	Polyhistidin-Tag
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>

IB	<i>Inclusion Bodies</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Marker
MC3T3-E1	<i>osteoblastic cell line</i>
MHDS	<i>multi-head deposition system</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NIH-3T3	<i>Murine Embryo Fibroblast cell line</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PCL	Polycaprolacton
PEG	Polyethylenglycol
PGP	Prolin-Glycin-Prolin
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SMC	<i>Smooth muscle cells</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

UV	Ultraviolett
vvm	Vessel Volumen pro Minute
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Kollagen – das Material, das unseren Körper zusammenhält und gleichzeitig unsere Zellen beherbergt – biotechnologisch herstellen und in der regenerativen Medizin einsetzen? Eine „vegetarische Alternative“ für die Herstellung von Gewebe erzeugen? Diese Fragestellung wird bereits in einigen Forschungsgruppen bearbeitet und in den Medien diskutiert. Proteine, die aus der natürlichen extrazellulären Matrix gewonnen werden, wie Kollagen oder Gelatine, sind in der klinischen Forschung weit verbreitet, da die therapeutische Wirkung gegenüber synthetischen Materialien deutlich höher ist. Zellen sind in der Lage, auf der Basis dieser Materialien zu adhären, zu wachsen und mit den *Scaffolds* zu interagieren. Für gewöhnlich werden Kollagene und Gelatine aus tierischem Material gewonnen, wodurch die Gefahr der Kontamination durch Pathogene (Prionen, Viren) deutlich erhöht ist und die schwankende Qualität von Charge zu Charge besteht. Daher werden vermehrt Alternativen zur tierischen Gelatine gesucht, um diesem Nachteil entgegenzuwirken. Eine Produktion in Hefe umgeht diese Nachteile, indem die Herstellung mit reproduzierbarer Qualität ohne tierische Bestandteile gewährleistet wird.

Neben Kollagen-basierten Biomaterialien sind Fibrin-basierte Biomaterialien besonders interessant für die regenerative Medizin, da diese natürlichen Materialien stabile Netzwerke ausbilden und im Bereich der Wundheilung und Gefäßprothesen eingesetzt werden. Besonders interessant ist die Möglichkeit, das Fibrinnetzwerk vollständig im Körper abzubauen, sodass Implantate nach längerer Zeit gezielt durch körpereigene Strukturen ersetzt werden können. Die Herausforderung ist die Gewinnung des Fibrinogens, da es aus menschlichem Blut isoliert wird. Die Menge an gewonnenem Fibrinogen ist limitiert und die Qualität des Proteins unterscheidet sich je nach Blutquelle. Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten alternativen Proteine könnten die tierisch produzierte Gelatine bzw. das Fibrin-basierte Material aus humanem Blut im Bereich Biomedizin ersetzen.

1.2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten rekombinante Biopolymere in einfachen Mikroorganismen unter Verwendung von Medien ohne tierischen Ursprung hergestellt werden. Dabei soll die Produktion von rekombinantem Fibrinogen (FGG) mit einem *Escherichia coli*-Kultivierungsprozess und die Produktion von rekombinantem GelMP mittels *K. phaffii* hochskaliert werden, sodass das gewonnene Material in der Zellkultur eingesetzt werden kann. In vorhergegangenen Arbeiten wurde das rekombinante FGG und GelMP bereits in *E. coli* bzw. *K. phaffii* eingebracht und in kleinem Maßstab hergestellt. In Anlehnung an diese Forschungsarbeiten war das Ziel die Biomaterialien im Technikumsmaßstab herzustellen und dabei eine möglichst hohe Ausbeute und Reinheit zu erzielen. Die Aufreinigung der beiden Produkte sollte möglichst effizient und kostengünstig sein und gleichzeitig eine Reinheit $> 90\%$ erreicht werden. Das FGG besitzt in der Proteinsequenz einen His-Tag und wird als IBs in *E. coli* produziert, sodass für die Aufreinigung verschiedene chromatographische Methoden getestet werden sollten. Das GelMP besitzt keine Tags und wird während des Herstellungsprozesses aus der Zelle sekretiert. Dementsprechend mussten für diesen Prozess geeignete Aufreinigungsmethoden gefunden werden, um das GelMP von Medienbestandteilen und anderen Proteinen zu trennen. Sowohl das FGG als auch das GelMP sollten charakterisiert werden und mit hoher Reinheit in der Zellkultur auf Biokompatibilität getestet werden und als Beschichtungsmaterial eingesetzt werden, um der „vegane“ Gelatine und einer rekombinanten Alternative zu humanem Fibrinogen einen Schritt näher zu kommen.

1 Theoretische Grundlagen

In den letzten Jahren konnten durch die Entwicklung von Biomaterialien für Implantate, Gewebestrukturen oder personalisierte Medizin enorme Fortschritte im Bereich *Tissue Engineering* erreicht werden. Diese Materialien unterstützen nicht nur das Wachstum von Zellen, sondern dienen auch als Ersatz für beschädigtes Gewebe. Unter den verschiedenen Biomaterialien haben diejenigen, die aus natürlichen biologischen Quellen hergestellt werden, erhebliche Vorteile (biologisch abbaubar, biokompatibel, zell-adhäsiv) und werden daher häufig verwendet [1]–[4]. Zu den natürlichen Biomaterialien gehören sowohl Protein-basierte wie z.B. Kollagen, Laminin, Elastin, Fibrin und Gelatine als auch Polysaccharid-basierte, wie z.B. Glykosaminglykan, Alginat oder auch Chitosan. Die Vielseitigkeit der natürlichen Polymere ermöglicht vielfältige Anwendungen und Kombinationen mit mehreren Molekülen, um für jeden Anwendungsbereich die passende Eigenschaft zu erhalten.

Kollagen und Fibrinogen sind weit verbreitete Proteine in der Extrazellulären Matrix (ECM) und verleihen der Struktur die erforderliche Festigkeit und Elastizität. Diese Eigenschaften werden in Zellkultursystemen oder im Bereich *Tissue Engineering* genutzt. Die Quelle dieser Proteine ist hauptsächlich tierischen Ursprungs und kann in großen Mengen hergestellt werden. Viele Aspekte bezüglich der mechanischen Eigenschaften, der Vorbehandlung und der Standardisierung dieser Biomaterialien müssen noch verbessert werden, um die Produkte im klinischen Bereich anwenden zu können. Heutzutage ermöglicht die Biotechnologie die Entwicklung und Herstellung neuer Biopolymere, sodass die Eigenschaften des Produktes – Mechanik, Abbau, Porosität, Zellinteraktion, Biokompatibilität – individuell angepasst werden können (Abbildung 1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei dieser rekombinanten Proteine hergestellt und in der Zellkultur als Biomaterial angewandt. Es handelt sich dabei um das GelMP, ein gelatine-artiges Biopolymer und das FGG, eine rekombinante Fibrinogen Gamma Kette.

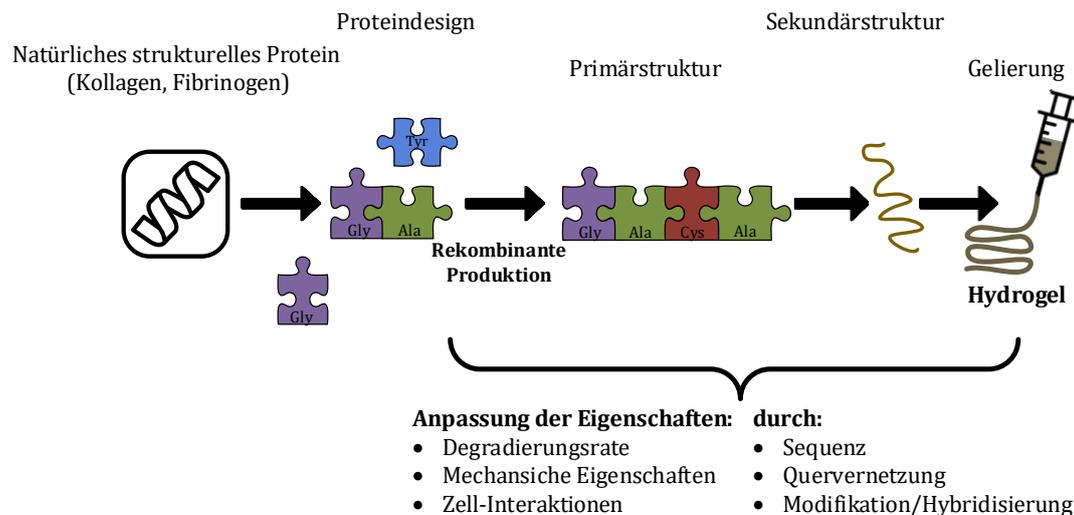


Abbildung 1: Schematisches Modell zu Herstellung von rekombinanten Hydrogelen. In Anlehnung an Jungst *et. al.*

In diesem Abschnitt wird daher Hintergrundwissen über Gelatine, Kollagen und Fibrinogen gegeben sowie die biotechnologische Produktion der Biopolymere in verschiedenen Expressionssystemen gezeigt. Zuletzt werden Kollagen-, Gelatine- und Fibrinogen-basierte Bioinks vorgestellt, die im Bereich *3D-Bioprinting* verwendet werden. Außerdem wird gezeigt, welche rekombinanten Kollagene bereits kommerziell erhältlich sind.

1.1 Gelatine und Kollagen

Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein und macht fast ein Drittel der gesamten Proteinkonzentration im menschlichen Körper aus [5]. Es bildet den größten Bestandteil der extrazellulären Matrix und ist für verschiedene Signal- und Strukturfunktionen im menschlichen Körper verantwortlich. Gelatine ist ein Derivat von Kollagen, dass durch die irreversible Denaturierung von Kollagenproteinen gewonnen wird. Dabei entstehen zufällige Strukturbereiche (*random-coil*), weshalb Gelatine weniger organisiert ist als Kollagen, aber dennoch ähnliche molekulare Zusammensetzungen aufweist [6]. Gelatine ist leicht verfügbar und kann aus verschiedenen Quellen (Rinderknochen, Fisch, Schweinehaut) gewonnen werden [7]. Es hat eine offene Struktur und ähnliche Funktionen wie das Kollagen und wird daher häufig in Zell- und Gewebekulturen verwendet. Kollagen sorgt für eine enorme Zugfestigkeit und strukturelle Integrität im Bindegewebe, in Sehnen und in der Haut [8]. Außerdem enthält Kollagen essentielle Domänen für die Anheftung von Integrinen, die in der Zellmembran vorhanden sind und für die Induktion und Initiierung wichtiger molekularer Signalwege verantwortlich sind.

1.1.1 Struktur von Gelatine und Kollagen

Kollagen ist ein Strukturprotein, das aus drei spiralförmigen, stabförmigen, linkshändigen Helices besteht. Diese sind ineinander verdreht und bilden zusammen eine rechtshändige, quartäre Struktur aus [9]. Insgesamt gibt es 28 verschiedene Kollagentypen, wobei der Großteil zu Kollagen Typ I, II und III gehört [10]. Das Kollagen Typ I ist am häufigsten aufzufinden und befindet sich hauptsächlich im Muskel- und Bindegewebe. Kollagen enthält sich wiederholende Gly-X-Y-Triplets, in denen jedes X und Y beliebige Aminosäuren, am häufigsten jedoch Prolin bzw. Hydroxyprolin, darstellen [5]. Je nachdem, welche Aminosäure auf der X und Y-Position vorhanden ist, hat dies Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des Kollagens. Außerdem wird das Prokollagen posttranslational modifiziert, bevor es zu Tropokollagen wird, das letztendlich zu Kollagenfibrillen vernetzt werden kann (Abbildung 2) [5]. Diese post-translationalen Modifikationen sind essentiell dafür, dass die drei einsträngigen Prokollagenmoleküle miteinander assoziieren und entweder heterotrimerisches oder homotrimerisches Tropokollagen bilden [5], [11]. Für die thermische Stabilität des dreifach helikalen Prokollagens sorgt die Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin [12]. Für die Ausbildung zu Fibrillen ist die Hydroxylierung des Lysins zu Hydroxylysin notwendig, da es für die Kondensation der Kollagenmoleküle sorgt [8], [13], [14]. Am Hydroxylysin wird das Molekül ebenfalls glykosyliert. Ohne die Hydroxylierung kommt es nicht zur Ausbildung von Kollagenfibrillen. Lysin und Prolin werden durch zwei Enzyme, die Lysylhydroxylase und die Prolyl-4-Hydroxylase hydroxyliert, dabei wird Ascorbat als Kofaktor benötigt [14], [15].

Da Gelatine denaturiertes Kollagen ist, handelt es sich hierbei um ein lineares Protein mit unterschiedlichen Molekulargewichten (15-250 kDa). Durch partielle thermische und chemische Hydrolyse des Kollagens entsteht Gelatine. Durch die Hydrolyse der Peptidbindungen werden die Polypeptidketten verkürzt und die Spaltung von inter- und

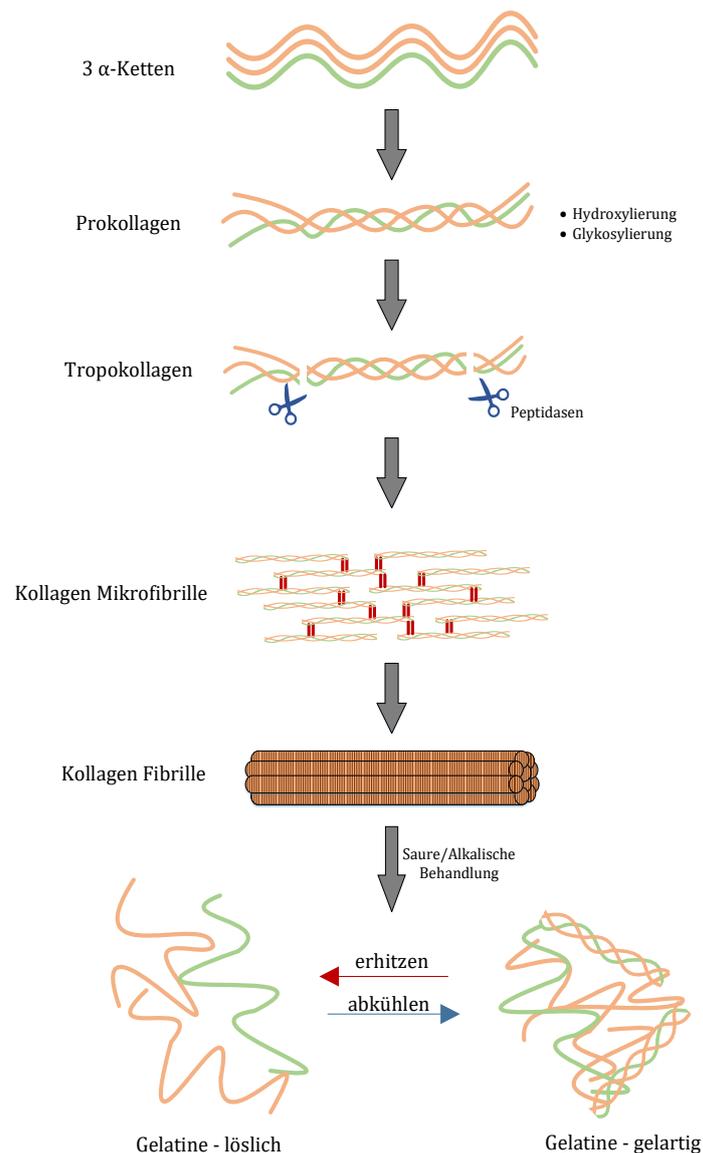


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kollagenstruktur. 2 α -Ketten (hier sind zwei $\alpha 1$ -Ketten und eine $\alpha 2$ -Kette repräsentativ für Typ-I-Kollagen dargestellt). Die drei Ketten werden intrazellulär zu einer Tripelhelix geformt (Prokollagen). Das Prokollagen wird durch die Entfernung der N- und C-Propeptide über Peptidasen in Tropokollagen umgewandelt. Durch Selbstorganisation und kovalente Quervernetzungen werden Kollagenmikrofibrillen gebildet (10-300 nm). Kollagenfibrillen, die durch Aggregation der Kollagenmikrofibrillen entstehen, haben einen Durchmesser von 0,5-3 μm . (adaptiert von [133]). Die Kollagenfibrillen sind unlöslich und können durch saure (Gelatine A) oder alkalische (Gelatine B) Vorbehandlung verarbeitet werden. Die gewonnene Gelatine kann einen reversiblen Sol-Gel-Übergang durchlaufen durch einen Hitze-Kühl-Prozess [134].

intramolekularer Quervernetzungen sorgt für die partielle Auflösung der helikalen Strukturen. Die Zusammensetzung der Sekundärstruktur hängt von dem Herstellungsprozess und dem verwendeten Kollagenrohmaterial ab [16]. Eine Gemeinsamkeit von Kollagen und Gelatine ist beispielsweise die Arg-Gly-Asp-Erkennungssequenz, die an mehrere Integrinproteine bindet und so die Anheftung, Migration und das Überleben der Zellen unterstützt [6], [17]. Des Weiteren ist die geringe Präsenz von aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) eine wichtige Ähnlichkeit. Das Fehlen dieser Aminosäuren ist ein Hauptfaktor für die geringe Antigenität und Toxizität von Kollagen und Gelatine [18], [19]. Gelatine ist ein typisches thermosensitives Hydrogel, da es einen reversiblen Sol-Gel-Übergang zwischen hohen (z.B. 37°C) und niedrigen (z.B. 4°C) Temperaturen durchläuft. Um ein stabiles Gel-Netzwerk vor allem bei physiologischen Temperaturen zu erzeugen, lässt sich die Gelatine chemisch modifizieren. Eine weit verbreitete Methode ist dabei die Modifizierung mit Methacrylat-Gruppen. Das entstandene Gelatinemethacryloyl (GelMA) ist ein photovernetzbares Hydrogel, das strukturstabile Konstrukte bildet [20]. Aufgrund der dualen Eigenschaft der Thermosensitivität und der Photovernetzbarkeit ist GelMA ein vielversprechendes Material für die Anwendung im Bereich *Tissue Engineering* und *Bioprinting*.

1.1.2 Produktion von rekombinantem Kollagen/Gelatine

Aufgrund der aufgezeigten Vorteile von Kollagen und Gelatine werden diese für viele biomedizinische Anwendungen, wie beispielsweise Wundverbände, Transplantatbeschichtungen, Medikamentenfreisetzung, *Bioprinting* oder auch im Bereich *Tissue Engineering* angewandt [21]–[23]. Trotz der breiten Anwendung der Biomaterialien ist die Verwendung hinsichtlich der Herkunft und Art ihrer Herstellung riskant. Bei der Gewinnung von Kollagen und den Derivaten aus tierischem Material besteht das Risiko, dass bei Anwendung allergische Reaktionen hervorgerufen werden oder Krankheitserreger (Viren, Prionen) übertragen werden könnten. Ein weiterer Nachteil ist die Variabilität des Kollagens. Je nach Alter und physiologischem Zustand des Ursprungsgewebes verändert sich das Protein in Struktur und Größe. Durch die kommerzielle Herstellung mittels alkalischer oder saurer Extraktion kommt es zu großen Unterschieden von Charge zu Charge [24]. Diese Schwankungen sind besonders problematisch in Bezug auf die medizinische Anwendung und sind eine der größten Herausforderungen in diesem Bereich [25].

Um die oben genannten Nachteile des natürlichen Kollagens/Gelatine aus tierischem Ursprung zu umgehen, werden derzeit rekombinant hergestellte Kollagene/Gelatine in verschiedenen Organismen entwickelt. Es konnte bereits rekombinantes Kollagen I in transgenen Mäusen, Tabakpflanzen, Seidenwürmern, Insekten-Zelllinien und Säugetierzellen hergestellt werden [25]. Außerdem wurden bereits einfache Mikroorganismen für die Produktion von rekombinantem Kollagen verwendet (Bakterien, Hefe), um höhere Ausbeuten zu erzielen und Produktionskosten herabzusetzen [26]. Die Komplexität helikaler Kollagene erschwert jedoch die Einbringung in mikrobielle rekombinante Systeme [27]. Um das korrekt gefaltete Kollagen Typ I – Protein herzustellen ist es notwendig zusätzliche Untereinheiten des Enzyms Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) zu klonieren. Myllyharju *et al.* [28] ist es gelungen, humanes Kollagen Typ I, II und III durch die zusätzliche Einbringung des Enzyms P4H in Hefe zu produzieren und in der Zellkultur anzuwenden [29]. Es konnte die dreifach helikale Struktur nachgewiesen werden, jedoch konnte das Protein nicht aus der Hefezelle exportiert werden [28]. Die derzeitige Herstellung von Gelatine ist die Extraktion von Kollagen aus tierischem Gewebe, wodurch sich eine heterogene Mischung aus Polypeptiden ergibt, die sich in Größe und Ladung unterscheiden. Bei der Verwendung von mikrobiellen Systemen zur Herstellung rekombinanter Gelatine, werden Fragmente des Kollagens mit definierter Länge und Zusammensetzung verwendet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die rekombinante Gelatine als Ersatz für tierische Gelatine für medizinische Anwendungen verwendet werden kann. Wertén *et al.* konnte mit *K. phaffii* als Expressionssystem einen „Kollagen inspirierten Triblock-Kopolymer“ herstellen für den Einsatz als Hydrogel [30]–[32]. Eine Übersicht über die bereits hergestellten Protein-basierten Polymere in *K. phaffii* liefert Wertén *et al.* in einem kürzlich erschienenen Review [33]. Der Fokus dieser Arbeit lag in der Produktion eines stabilen, temperaturabhängigen Hydrogels. Es handelt sich um ein kollagenähnliches Produkt, das in seiner Aminosäurezusammensetzung optimiert wurde. Als hydrophobe Aminosäure ist lediglich Prolin enthalten während vermehrt die hydrophilen Aminosäuren Asparagin und Glutamin eingesetzt wurden. Des Weiteren wurde die Sequenz mit repetitiven Endblöcken versehen, die bei Temperaturänderung zu Tripelhelices trimerisieren.

Angesichts der hohen Nachfrage nach Kollagen und Gelatine besteht die Notwendigkeit, neue Methoden zu entwickeln, um große Mengen rekombinante Kollagene und Gelatine auf konsistente und effiziente Weise biotechnologisch herzustellen.

1.2 Fibrinogen

Fibrinogen wird in der Leber von Wirbeltieren gebildet und ins Blutplasma ausgeschüttet. Das Protein gehört zu der Gruppe der Akute-Phase-Proteine und ist für die Hämostase, Wundheilung, Entzündung, Angiogenese und andere biologische Funktionen essentiell. Fibrinogen ist Teil der Gerinnungskaskade und wird durch eine enzymatische Reaktion mit Thrombin zum unlöslichen Protein Fibrin umgewandelt [34]. Die unlöslichen Aggregate (Gerinnsel) blockieren geschädigte Blutgefäße und verhindern Blutungen. Außerdem ist Fibrinogen für die Aggregation von Blutplättchen notwendig, der erste Schritt zur Blutstillung. Die Fibrinogen-Moleküle können mit hoher Affinität an die Integrin-Rezeptoren auf aktivierten Thrombozyten binden, sodass die bifunktionellen Fibrinogenmoleküle als Brücken zur Verbindung von Thrombozyten wirken [34]. In seinen verschiedenen Funktionen als Gerinnungs- und Haftprotein ist das Fibrinogen an vielen intermolekularen Interaktionen beteiligt und besitzt spezifische Bindungsstellen für mehrere Proteine und Zellen. Durch die einfache Extraktion aus dem Blut und die minimale immunologische Abstoßung ist Fibrinogen ein geeignetes Biomaterial für biomedizinische Anwendungen. In der klinischen Anwendung wird Fibrinogen beispielsweise als Zweikomponenten-Kleber verwendet [35]. Auch im Bereich Geweberekonstruktion und *3D-Bioprinting* ist das Fibrinogen bereits als Biomaterial angewandt worden, beispielsweise für Hauttransplantationen [36], [37], für die Ausbildung von kardiovaskulären Strukturen [38]–[42], als Knochen- und Knorpelgewebe [43]–[47] oder auch für die Regeneration des Nervensystems [48]–[51].

1.2.1 Übersicht Struktur und Funktion von Fibrinogen

Fibrinogen ist ein Plasmaglykoprotein (340 kDa), das als Polymer eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung einnimmt. Während der Koagulation erfolgt die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin über eine Thrombin-vermittelte proteolytische Spaltung, bei der intermediäre Fibrillen und anschließend Fasern produziert werden, die eine bemerkenswerte biochemische und mechanische Stabilität für Gerinnsel bieten. Fibrinbildung -struktur und -stabilität werden durch verschiedene genetische, biochemische und Umweltfaktoren reguliert, was eine dynamische Kinetik der Fibrinbildung und -struktur ermöglicht. Zwischen dem Prozess der Blutgerinnung und der Fibrinolyse (Abbildung 3) muss stets ein Gleichgewicht herrschen, da es sonst zu Thrombosen oder Blutungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen kommen könnte [52].

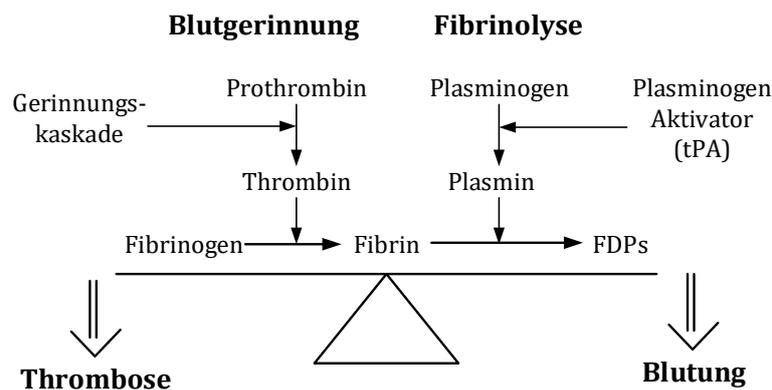


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Gleichgewichts zwischen der Blutgerinnung und der Fibrinolyse. Das Gerinnsel wird über eine Kaskade enzymatischer Reaktionen gebildet, das Prothrombin zu dem proteolytischen Enzym Thrombin aktiviert und das lösliche Fibrinogen wird zum unlöslichen Fibrin (Blutgerinnung). Das Fibrin Gerinnsel wird durch Plasmin proteolytisch gespalten und aufgelöst. (In Anlehnung an Weisel *et al.*)

Strukturell gesehen ist Fibrinogen ein hantelförmiges Hexamer, das aus drei verschiedenen Polypeptidketten besteht ($A\alpha$, $B\beta$ und γ). Diese kommen jeweils zweimal vor und bestehen aus 610 ($A\alpha$), 461 ($B\beta$) und 411 (γ) Aminosäuren. Des Weiteren besteht das Protein aus zwei D-Domänen, die über spiralförmige Peptidketten mit einer zentralen E-Domäne verbunden sind [53]. Interessanterweise hat das Fibrinogen zahlreiche funktionelle Peptidsequenzen, durch die es mit verschiedenen umgebenden Molekülen interagieren kann. In der $B\beta$ -Kette gibt es beispielsweise eine Region ($B\beta$ 15-42), die verschiedene Zell-Matrix Interaktionen vermittelt, wodurch es zu Endothelwachstum, Proliferation [54] und Thrombozytenausbreitung [55] kommen kann. Die Peptidsequenz des Arginin-

Glycin-Aspartats (RGD), die für die Zelladhäsion weit verbreitet ist, ist in der $A\alpha$ Kette des Fibrinogens und befindet sich an der Stelle A 95-98 (RGDF) und A 572-575(RGDS).

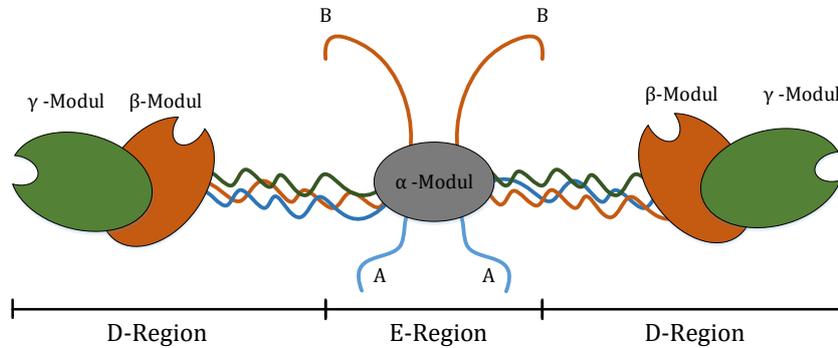


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fibrinogens. In Anlehnung an Parry *et al.*

Die Fibrinogen Gamma Kette (FGG)

Die γ -Kette des Fibrinogens hat die Eigenschaft mit verschiedenen Zelltypen zu interagieren und besitzt Bindestellen für Rezeptormoleküle (Integrine), die auf der Zelloberfläche vorkommen und für die Zell-Zell-Kommunikation und die Zell-Matrix-Interaktion zuständig sind [56]. In Abbildung 5 sind die bis hier ermittelten Bindestellen aufgelistet.

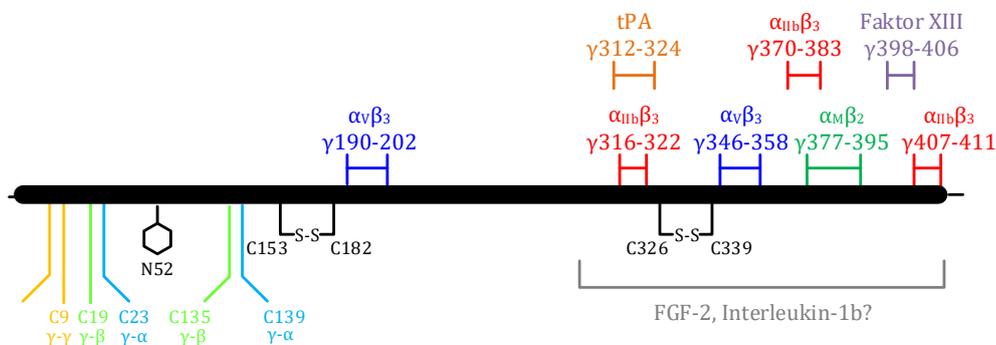


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fibrinogen- $\gamma\gamma$ -Kette. Im N-terminalen Bereich bildet die $\gamma\gamma$ -Kette Disulfidbrücken mit der zweiten $\gamma\gamma$ -Kette (gelb), mit der $\beta\gamma$ -Kette (hellgrün) und der $\alpha\gamma$ -Kette (hellblau). Gezeigt sind die Bindestellen für die Integrine $\alpha_M\beta_3$ (dunkelgrün), $\alpha_{IIb}\beta_3$ (rot) und $\alpha_v\beta_3$ (blau), für den Plasminogen Aktivator tPA (orange), den Crosslinking Faktor XIII (lila) und dem Wachstumsfaktor FGF-2 (grau). Die Bindung von Interleukin-1b an die γ -Kette konnte noch nicht vollständig charakterisiert werden. Basierend auf [57].

Eine wichtige Bindestelle auf der γ -Kette ist für die Interaktion mit Thrombozyten (407-411) zuständig. Diese Bindung ist entscheidend für die Bildung eines stabilen Blutgerinnsels während der Hämostase [57]. Die Bindung zwischen Fibrinogen und den Leukozyten findet über das Integrin $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1) statt und initiiert die Migration und Proliferation von Leukozyten. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet an die γ -Kette und wird auf der Oberfläche

von Endothelzellen exprimiert. Die Interaktion der Endothelzellen mit Fibrinogen spielt eine entscheidende Rolle in der Angiogenese, Wundheilung und Tumorentstehung. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der Wachstumsfaktor FGF-2 im C-terminalen Bereich der γ -Kette bindet. Dieser spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Endothelzellen [58]. Durch die hohe Anzahl an Bindestellen an der Fibrinogen- γ -Kette, nimmt diese Struktur eine entscheidende Rolle in der Interaktion des Fibrinogens mit den umliegenden Zellen ein und ist essentiell für die Plasmin gesteuerte Fibrinolyse und die Quervernetzung mit dem Faktor XIII [59]. Die vielen Interaktionen zeigen, dass die γ -Kette sehr interessant für die rekombinante biotechnologische Herstellung ist.

1.2.2 Produktion von rekombinantem Fibrinogen

Die Gewinnung von Fibrinogen aus Blutplasma stellt große Herausforderungen hinsichtlich der gleichbleibenden Qualität und des Risikos in Bezug auf Kontamination mit Viren oder Prionen dar [60]. Für die Anwendung als Biomaterial besteht großes Interesse ein fibrinogenartiges Produkt zu entwickeln, das die gleichen physikalischen Eigenschaften aufweist und gleichzeitig reproduzierbar ist. Es wurden bereits mehrere Expressionssysteme getestet, in denen Fibrinogen und fibrinogenartige Produkte rekombinant hergestellt wurden. Neben der Produktion in Hefe [61], wurden ebenfalls transgene Tiere [62] und Säugetierzellen als Expressionssystem verwendet [63]. Jedes Expressionssystem hat sowohl Vorzüge als auch Nachteile. Die komplexe Struktur des Proteins und die zugehörigen posttranslationalen Modifikationen stellen eine große Herausforderung hinsichtlich der rekombinanten Produktion dar. Säugetierzellen als Expressionssystem bieten einige Vorteile für die Produktion von Fibrinogen, da bestehende Qualitätskontrollen und Erfahrungen aus der Herstellung kommerzieller Antikörper-Medikamente vorhanden sind. Für die Produktion von Biopharmazeutika ist die Erzielung einer hohen Reinheit sowie die Begrenzung von Abbau- und Ausbeuteverlusten von besonderer Bedeutung. Es konnten bereits durch die Verwendung einer CHO-Zelllinie Ausbeuten von 1,3 g/L erreicht werden [63]. Um den Prozess zu vereinfachen und die spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Fibrinogenkette zu nutzen, wird ebenfalls die Produktion einzelner Fibrinogenketten in Betracht gezogen. Die α - und γ -Kette konnten bereits in *E. coli* in kleineren Maßstäben hergestellt werden [64], [65]. Die Ketten wurden einzeln hergestellt, um Erkenntnisse über die jeweiligen Domänen zu erlangen. In verschiedenen Ansätzen zur Herstellung von rekombinantem Fibrinogen wurde bereits die Verwendbarkeit in der Zell-

kultur nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes Fibrinogen aus der Milch von transgenen Kühen einen positiven Einfluss auf das Wachstum von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) hat [66][62]. Mithilfe des rekombinanten Fibrinogens konnten die MSCs subkutan in Mäuse eingebracht werden und es zeigte sich, dass durch die Fibrin-Matrix die MSCs eine verbesserte Anhaftung an der Injektionsstelle zeigten.

1.3 Kollagen-, Gelatine- und Fibrinogen-basierte *Bioinks*

In den letzten Jahren hat für die Herstellung von komplexen Strukturen für die Regeneration von Weichgewebe das *3D-Bioprinting* großes Interesse gewonnen. Die Technik des 3D-Biodrucks eröffnet neue Möglichkeiten hinsichtlich der personalisierten strukturellen, mechanischen und biologischen Eigenschaften auf dem Gebiet der Geweberegeneration und Bildung von Organstrukturen. Es geht um die Erzeugung biologischer Strukturen durch einen computergestützten Prozess zur Strukturierung und Zusammenstellung lebender und nicht lebender Materialien mit einer vorgegebenen 3D-Struktur [67]. Dieses Forschungsgebiet hat das Potential einige der größten Herausforderungen des *Tissue Engineering* zu überwinden, wie z.B. die Erzeugung großer Konstrukte einschließlich gefäßähnlicher Strukturen für die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der eingebetteten Zellen. Eine wichtige Komponente des 3D-Drucks sind die *Bioinks* – druckbare Biomaterialien, die sich nach dem Druck verfestigen, um die Formtreue der gewünschten Struktur zu gewährleisten. Wichtige Faktoren für die Wahl der Biotinte sind die Druckpräzision, Stabilität, mechanische Festigkeit und Elastizität. In Abbildung 6 ist dargestellt, dass *Bioinks* bei physiologischen Temperaturen präzise druckbar sein müssen und gleichzeitig milde Vernetzungs- oder Geliereigenschaften aufweisen, um zusätzlich biokompatibel und biodegradierbar zu sein.

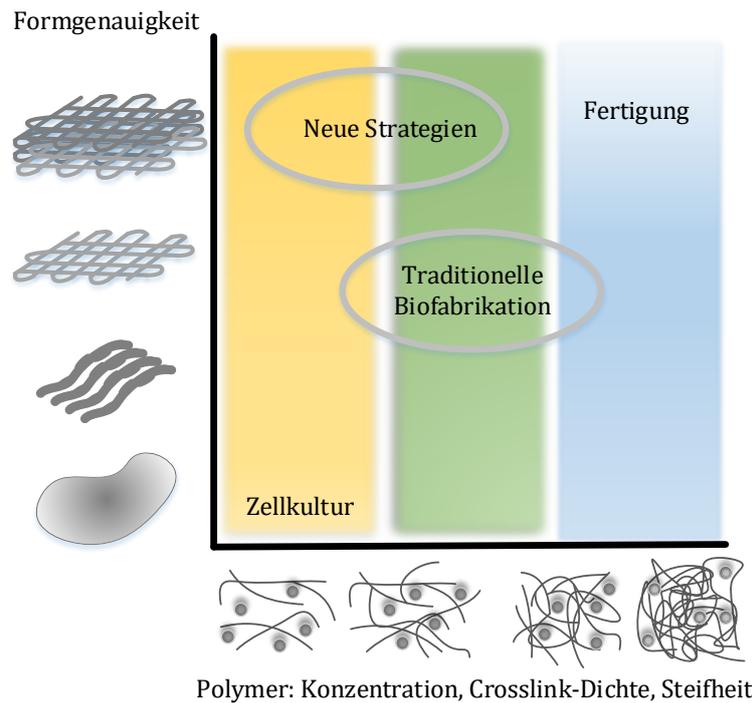


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Charakteristika für die Herstellung von Biotinte. In Anlehnung an Copyright 2013, Wiley-VCH

Alle diese Eigenschaften, und insbesondere die zelluläre Affinität, machen Gelatine und Fibrinogen zu vielseitigen Materialien für Anwendungen im *Tissue Engineering* und *Bioprinting*. Für Bioprint-Anwendungen wird Gelatine in einem breiten Spektrum als *Bio-ink*-Material oder im Verbund mit anderen Polymeren verwendet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Proteinbasierte Biomaterialien als Biotinte.

Biomaterial	Quervernetzung	Zielgewebe	Zelltyp	Bioprint-Methode	
Kollagen Typ I	pH Temperatur	Haut	NIH-3T3 Fibroblasten und Keratinozyten Zelllinie (HaCaT)	Laser-basiert	[68]
		Knochen	MSCs	drop-on-demand	[69]
		Knochen Leber	hASCs und Preosteoblasten (MC3T3-E1)	Extrusion	[70]

Gelatine	Temperatur	Gefäße	HUVECs	Mehrkopf-Beschichtungs-	[71]
	Licht (Methacryliert)			system (MHDSs)	
		Knorpel	MSCs	Extrusion	[72]
		Aorta Klappe	SMCs	Extrusion	[73]
Fibrinogen	Fibrinogen+ Thrombin		Nicht spezifisch	Inkjet	[74]
		Knorpel	Gelenkchondrozyten (Kaninchen)	Inkjet	[75]
		Gefäße	ASCs und endotheliale Kolonie-Bildung	Laser-basiert	[76]

Darüber hinaus wird auch die modifizierte Form, die chemisch vernetzt werden kann, für das *Bioprinting* angepasst, wie z.B. Gelatinemethacryloyl (GelMA) [77]. Kolesky *et al.* verwendete als Hauptmatrix GelMA und testete eine alternative Methode, um mehrere Zelltypen in vaskuläre Strukturen mittels Mehrkopf-Beschichtungssystem (MHDS) einzubetten [71]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die Verwendung von GelMA die Bildung von Faserknorpel-ähnlichem Gewebe positiv beeinflusst. Hier konnte neben der Ausbildung von Strukturen mit hoher Elastizität, eine hohe Zellviabilität der MSCs nach dem Biodruck nachgewiesen werden [72]. In einer anderen Studie wurden Gelatine-Alginat-Hydrogele für das Bioprinting von zellbeladenen Aortenklappen-Kanälen verwendet. Die gedruckten Konstrukte entsprachen nahezu den klinischen Dimensionen. Die Herausforderung lag darin, das optimale Verhältnis zwischen Gelatine und Alginat im Hydrogel zu finden, um die höchste Druckqualität und ein optimales Zellwachstum zu erreichen [73].

Koch *et al.* verwendete Kollagen zur Herstellung von 3D-Hautgewebekonstrukten mittels Laser-basiertem *Bioprinting* [68]. Dabei zeigte sich, dass die Lebensfähigkeit und morphologische Funktion zweier Zelllinien (Fibroblasten und Keratinozyten) in einem sol-

chen Konstrukt ausgebildet werden könne und die Herstellung multizellulärer Gewebestrukturen vielversprechend ist (Tabelle 1). Außerdem wurde Kollagen mittels extrusionsbasierter Plattform gedruckt und es konnte gezeigt werden, dass kollagenreiche Matrices für die Osteogenese geeignet sind [69]. Kollagen in Kombination mit Alginat konnte ebenfalls als Bioink verwendet werden [70].

Neben Kollagen und Gelatine wird ebenfalls Fibrinogen für die Herstellung funktioneller Gewebestrukturen zum Ersatz geschädigter Gewebe verwendet. Der Nachteil bei der Verwendung von reinem Fibrinogen sind oftmals die fehlenden mechanischen Eigenschaften des Proteins. Aus diesem Grund wird Fibrinogen häufig in Kombination mit synthetischen Polymeren verwendet, um erhöhte mechanische Festigkeit und verlangsamte Biodegradation zu erreichen. Diese Hybridmaterialien kombinieren die natürliche Bioaktivität von Fibrinogen mit speziellen, abstimmbaren Eigenschaften, die von der synthetischen Komponente ausgehen (Tabelle 1). Nakamura *et al.* kombinierten Fibrin mit Alginat, um zum einen die zelluläre Verträglichkeit zu gewährleisten und zum anderen die Druckqualität des Inkjet-Druckers durch Alginat zu verbessern [74]. Um die mechanischen Eigenschaften von Knorpelgewebe zu optimieren, wurde in einer weiteren Studie ein Konstrukt mit weiteren Hilfsmitteln über drei Schritte hergestellt. Zunächst wurde Polycaprolacton (PCL) als Gerüststruktur vorgelegt. Anschließend wurden Chondrozyten in ein Fibrin-Kollagen-Gemisch eingeschlossen und auf die PCL-Schicht gedruckt. Es konnte festgestellt werden, dass ein solches Hybridsystem die mechanischen Eigenschaften verbessert und die Viabilität der Zellen nicht beeinträchtigt wird und es somit für die Bildung komplexer Gewebe verwendet werden kann [75]. Ein weiterer Zusatz, der in einer Studie verwendet wurde, ist Hyaluronsäure. Dieser Zusatz wurde mit Fibrinogen kombiniert und mit Endothelzellen und ASCs versetzt. Durch einen Laser-basierten Bioprint wurden einzelne Schichten der unterschiedlichen Zelllinien gedruckt, wobei die Zellen interagieren konnten und so Gefäß-ähnliche Strukturen entstanden sind [76]. Die hier dargestellten Anwendungen von Gelatine und Fibrinogen als Bioink zeigen, dass die Biomaterialien in einem breiten Spektrum angewendet werden [78]. Einige wenige Bioinks sind bereits kommerziell erhältlich und es wird erwartet, dass im Laufe der nächsten Jahre aufgrund des großen Interesses einige dazukommen werden (Tabelle 2). Trotz der bereits erzielten Fortschritte gibt es weitere relevante Engpässe, die überwunden werden müssen. Es muss eine ausreichende Vaskularisierung vorhanden sein, um den Austausch

von Nährstoffen und Abfallprodukten zu gewährleisten, größere Strukturen sollten geschaffen werden und die Bioprint-Methoden sollten präziser werden. Die Verwendung von natürlicher Gelatine und Fibrinogen haben den Nachteil, dass immer das Risiko der pathogenen Übertragung besteht und sich die Qualität von Charge zu Charge unterscheidet und deshalb kein einheitliches Protokoll für die Anwendung als Bioink erstellt werden kann.

Tabelle 2: Kommerziell erhältliche Bioinks (Collagen, Gelatine, Fibrinogen).

Firma	Ort	Produkt	Herkunft	
Advanced	USA, CA	Lifeink® 200	neutralisiertes Typ I Kollagen	[79]
BioMatrix		Lifeink® 240	Typ I Kollagen, sauer	
		PhotoGel®	Methacrylierte Gelatine	
		PhotoCol®	Methacryliertes Kollagen	
Sigma-Aldrich (Merck)	USA, MO	TissueFab®	Methacrylierte Gelatine	[80]
Allevi	USA, PA	GelMA	Methacrylierte Gelatine	[81]
Bioink Solutions, Inc.	Südkorea	Gel4Cell	Gelatine-basiert	[82]
CELLINK®	USA, MA	CELLINK FIBRIN	Fibrin und Fibrinogen	[83]
		CELLINK SKIN	Fibrin, Fibrinogen und Thrombin	
		Coll 1	Typ I Kollagen	
		GelMA	Methacrylierte Gelatine	

Um dieser Problematik entgegenzuwirken könnten rekombinant hergestellte Biomaterialien eingesetzt werden. In diesem Bereich sind in Bezug auf Kollagen, Gelatine und Fibrinogen derzeit keine Bioinks kommerziell erhältlich. In Tabelle 3 sind einige kommerziell erhältliche Kollagene nicht tierischen Ursprungs aufgelistet, die in Bereichen der Wundheilung, Hornhauterblindung und Kosmetik eingesetzt werden. Daher liegt in diesem Bereich noch großes Potential, um effiziente 3D-Konstrukte mittels rekombinantem Bioink zu produzieren.

Tabelle 3: Kommerziell erhältliches, nicht tierisches Kollagen.

Firma	Ort	Produkt	Herkunft	Anwendung	
CollPlant Ltd	Israel	Verge-nix TM FG	Rekombinantes humanes Kollagen I aus Tabakpflanze	Wundheilung	[62] [64]
FibroGen	USA, CA	FG-5200 ^a	Rekombinantes humanes Kollagen aus <i>K. phaffii</i>	Hornhauterblindung	[87]
Geltor	USA, CA	Collume [®]	Rekombinantes Kollagen aus <i>Podocoryna carnea</i>	Kosmetik	[88]
Fujifilm	JapanColl	Cellnest TM	Rekombinantes humanes Kollagen I aus <i>K. phaffii</i>	Regeneration von Knochen, Knorpel, Haut und Blutgefäßen	[89]

^a Das Produkt befindet sich in der Pilot-Phase.

Deshalb wurde in dieser Arbeit ein rekombinantes Gelatin-artiges Protein (GelMP) in *K. phaffii* und eine rekombinante Fibrinogen-Gamma-Kette (FGG) in *E. coli* hergestellt. Die Vorteile der Herstellung von rekombinanten Biomaterialien in einfachen Mikroorganismen sind die Virus-freie und kosteneffiziente Produktion in großen Mengen, einheitliche Eigenschaften und eine definierte Struktur für eine weitere chemische Modifikation.

2 Experimentelle Arbeiten – Biopolymer GelMP

Als Alternative zur tierischen Gelatine wurde ein Prozess zur Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung des rekombinanten Gelatine-artigen Proteins GelMP entwickelt.

In einer vorherigen Arbeit wurde bereits das GelMP designt, mithilfe eines Expressionsvektors in einen methylotrophen *Komatagaella phaffii*-Stamm (GS115-GelMP) integriert und anschließend ein produzierender Stamm (Mut⁺) selektiert [90]. Bei GelMP handelt es sich um ein Protein, dass aus einem Abschnitt des humanen Kollagen Typ I sowie zwei endständigen Domänen aus Prolin-Glycin-Prolin-Wiederholungen (PGP) besteht. Der Hauptteil des Proteins besteht aus 400 Aminosäuren der α -1-Kette des humanen Kollagen Typ I. Die PGP-Domänen sollen für die Ausbildung von Helices und damit für die Vernetzung der Moleküle sorgen. Der Expressionsvektor enthält außerdem ein α -mating-factor-Sekretionssignal, sodass das GelMP aus der Hefezelle *K. phaffii* sekretiert wird.

Tabelle 4: Informationen zu GelMP.

Gensequenz	400 AS aus α -1-Kollagen + (PGP)-Wiederholungen
Theoretisches Molekulargewicht	40 kDa
Beobachtetes Molekulargewicht (SDS-PAGE)	75 kDa
Theoretischer pI	5,81
Bindender Antikörper	Anti-Kollagen I
N-Glykosylierungen	Keine nachgewiesen

Der ausgewählte Stamm wurde bereits in Schüttelkolben- und in 2 L-Reaktorkultivierungen hinsichtlich der Proteinproduktion optimiert. Dabei wurde ein Fed-Batch-Prozess durchgeführt, wobei in der Batchphase für die Biomasseproduktion Glycerol als Nährstoffquelle verwendet wurde. In der Fed-Batch-Phase wurde Methanol sowohl als Nährstoffquelle als auch für die Induktion des AOX-Promotors zur Produktion von GelMP verwendet. Ein optimales Zellwachstum und die höchste Proteinproduktion konnten mit einer Temperatur von 30°C und einem pH-Wert von 5 erreicht werden (Abbildung 7).

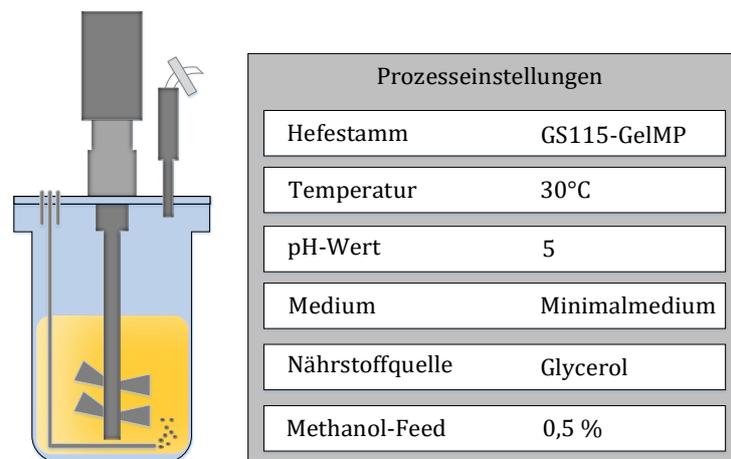


Abbildung 7: Übersicht der bereits optimierten Kultivierungsparameter im 2 L-Maßstab aus einer vorherigen Arbeit [90].

Außerdem wurde bereits ein Methanol-Sensor für die Regulierung des Methanol-Feeds (99,6 % Methanol, 0,4 % PTM₁) integriert. Dadurch konnte mit einer konstanten Methanolkonzentration (0,5 %) induziert werden, sodass eine gleichmäßige Proteinproduktion und eine höhere Produktivität erreicht wurde. Das sekretierte GelMP konnte bereits mittels Western Blot und Massenspektrometrie nachgewiesen werden [90].

An die oben genannte GelMP-Entwicklung aus der vorhergegangenen Arbeit konnte angeknüpft werden. Die Erkenntnisse wurden berücksichtigt, sodass in den nachfolgenden Kapiteln die Ergebnisse des Prozesses zur Herstellung von GelMP im Technikumsmaßstab, die anschließende Charakterisierung und die Anwendung als Biomaterial gezeigt werden.

Der biotechnologische Prozess besteht aus drei Teilgebieten:

- Kultivierungsprozess im Technikumsmaßstab
- Downstream Processing (DSP)
- Produktanalytik und Charakterisierung der Bioaktivität

Neben der Kultivierung im Technikumsmaßstab (30 L), wird die Aufreinigungsstrategie mittels Cross-Flow-Filtration und Proteinstrukturanalysen gezeigt. Im letzten Abschnitt dieses Kapitels wird die Anwendung des GelMPs in der Zellkultur dargestellt. Dabei werden die Biokompatibilität und die Fähigkeit von Zellen, auf dem Material zu adhären, untersucht. In der nachfolgenden Abbildung ist der entwickelte Gesamtprozess der GelMP-Herstellung dargestellt und wird im weiteren Verlauf detaillierter beschrieben (Abbildung 8).

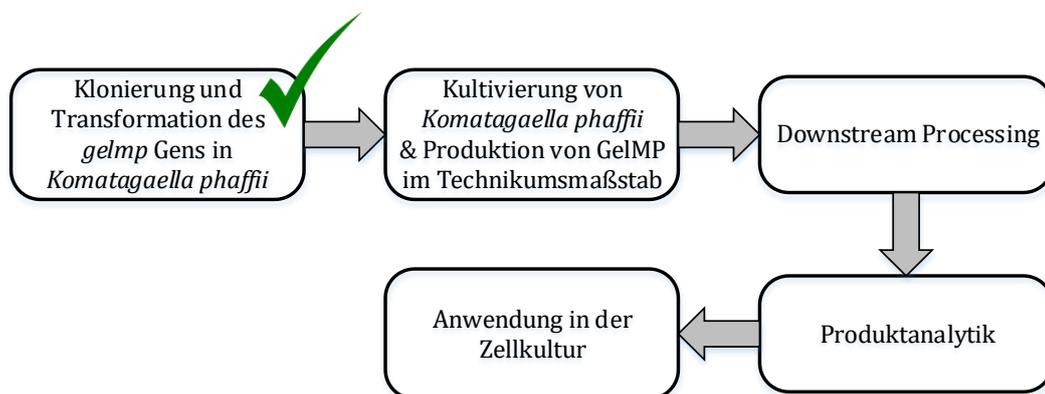


Abbildung 8: Übersicht über den Prozess zur Herstellung und Charakterisierung von GelMP. Die Klonierung und Transformation des *gelp* Gens wurde bereits in einer vorherigen Arbeit durchgeführt [90]. Diese Arbeit startet mit der Kultivierung zur Produktion von GelMP im größeren Maßstab und endet mit der Anwendung des GelMPs in der Zellkultur.

2.1 Kultivierung von *Komatagaella phaffii* und Proteinproduktion von GelMP im Technikumsmaßstab

Die Produktion des GelMP wurde bereits in kleinerem Maßstab (siehe Kapitel 2) durchgeführt und Parameter wie Temperatur, pH, Medium/Nährstoffquelle, Induktionsbedingungen wurden optimiert und ein Methanolsensor integriert. Auf Grundlage dieser etablierten Größen sollte der Prozess im größeren Maßstab (30 L) durchgeführt werden, um die Skalierbarkeit des Prozesses zu prüfen und gleichzeitig größere Mengen des Produktes herzustellen. Mit Hilfe des Edelstahlreaktorsystems BiostatC (Sartorius, Göttingen)

konnte der Prozess vom 2 L-Maßstab in den 30 L-Maßstab übertragen werden. Die Prozesseinstellungen aus der vorherigen Arbeit wurden auf den 30 L-Kultivierungsmaßstab übertragen. Während des Prozesses wurden pH, Gelöstsauerstoff, Rührerdrehzahl, Temperatur und die Nährstoffzufuhr kontrolliert, um eine optimale Prozessüberwachung zu gewährleisten (Abbildung 9).

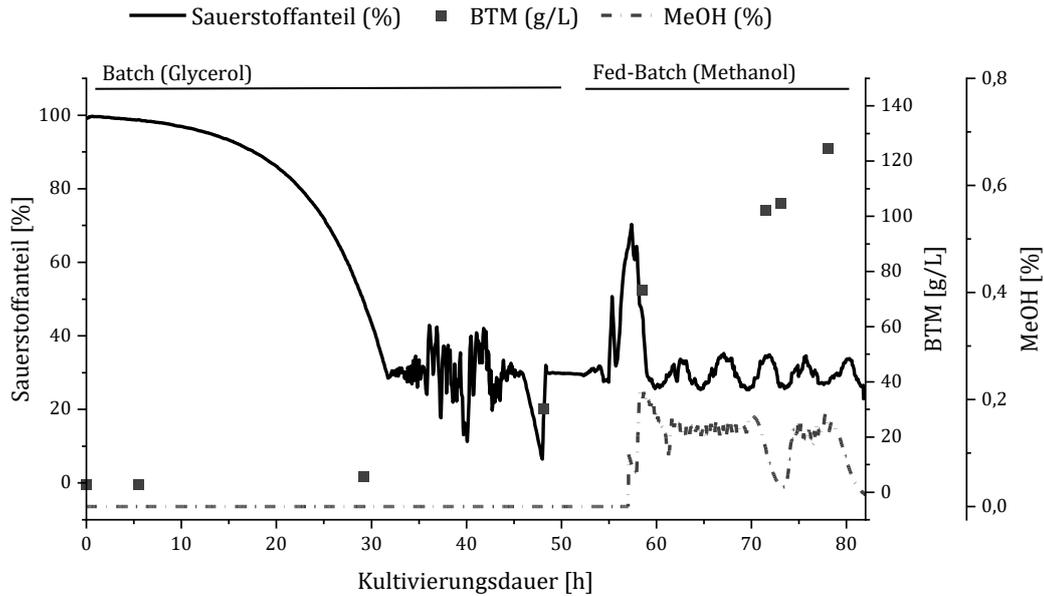


Abbildung 9: Online und Offline Analytik einer 30 L Fed-batch-Kultivierung von *K. phaffii* im BiostatC plus Bioreaktor. Der Gelöstsauerstoff wurde während der Kultivierung über 30% gehalten und über die Rührerdrehzahl und den Sauerstoffanteil in der Zuluft kontrolliert. Die Batch Phase endete nach einer Kulturzeit von 55 h was durch einen kurzzeitigen Anstieg des Gelöstsauerstoff sichtbar wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Feed Lösung (Methanol) zugegeben. Die Methanolkonzentration wurde durch einen Methanolsensor mit Feedback Loop über 0,1 % gehalten. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund limitierender Pumpraten nicht erreicht werden.

Die Kultivierung erfolgte in zwei Phasen. In der ersten Glycerin-Batch-Phase wurde der Gelöstsauerstoff über eine Rührerkaskade auf 30 % eingestellt. Der pH-Wert wurde konstant auf 5 reguliert und die Temperatur lag über dem gesamten Prozess bei 30°C. Nach einer Kultivierungsdauer von etwa 55 h wurde das Glycerol vollständig verstoffwechselt, was durch den kurzzeitigen Anstieg des Gelöstsauerstoffgehalts sichtbar wurde (Abbildung 9, nach 55 h). Die zweite Phase wurde durch die kontinuierliche Zugabe von Methanol eingeleitet (57 h). Durch die Methanol-Regelung des implementierten Methanolsensors konnte eine konstante Methanolkonzentration über den gesamten Feed-Verlauf gezeigt werden (~0,1 %). Die Feed-Rate konnte während des Prozesses nicht erhöht werden, da das Pumpsystem die Feed-Lösung in Verbindung mit dem Schlauchdurchmesser bereits maximal zugeführt hat. Die Gelöstsauerstoffkonzentration konnte nach

55 h nicht mehr über die Rührerdrehzahl erhöht werden. Es musste zusätzlich Sauerstoff in den Prozess eingebracht werden, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Durch die kontinuierliche Induktion mit Methanol kam es zu einem stetigen Anstieg der Biomasse und der damit gekoppelten Proteinproduktion. Nach 80 h wurde eine BTM von 131,3 g/L, eine OD_{600} von 450 und eine Proteinkonzentration von 3 g/L erreicht. Eine Stunde nach Beginn der Methanolinduktion (57 h Kultivierungsdauer) konnte die Produktion des GelMP (75 kDa) durch ein SDS-Gel nachgewiesen werden (Abbildung 10).

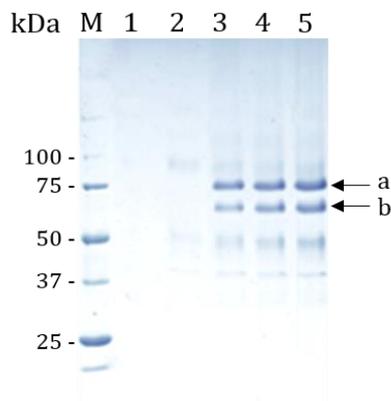


Abbildung 10: (A) SDS-PAGE vom Kulturüberstand der 30 L Fed-Batch-Kultivierung. 1: Glycerol-Batch Phase vor Induktion (48 h Kultivierungsdauer). 2: Induktion mit Methanol $t=57$ h; 3: $t=72$ h; 4: $t=78$ h; 5: $t=80$ h. M: Größenstandard-Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard.

Das beobachtete Molekulargewicht (SDS-PAGE) von ca. 75 kDa ist größer als das theoretische Molekulargewicht des GelMP von 40,7 kDa. In der Literatur wurde bereits ausführlich beschrieben, dass Kollagen-ähnliche Proteine und synthetische Gelatine im SDS-Gel ein- bis vierfach höher wandern als ihr tatsächliches Molekulargewicht [91], [92]. Eine zusätzliche Erklärung für diese Beobachtung könnte die Glykosylierung des Proteins sein. Diese Hypothese wurde bereits durch einen PNGase-F Assay widerlegt [90]. Ein weiterer Grund für dieses Phänomen könnte die Hydrophobizität und die Form des Proteins sein. Die Theorie besagt, dass sich durch die hydrophile Eigenschaft des Proteins die SDS-Bindungskapazität und damit die Migrationsrate verändert. Um diesen Effekt zu untersuchen wurden die Carbonsäure-Seitenketten des GelMPs durch Methanol/Salzsäure-Lösung verestert (Protokoll siehe B.7.3 Chemische Modifizierung des GelMP). Durch die Veresterung konnte das behandelte GelMP in der SDS-PAGE etwa 10 kDa weiter wandern als das unbehandelte GelMP (Abbildung 11). Demzufolge ist die hydrophile Eigenschaft des GelMPs ein Faktor dafür, dass das GelMP ein größeres beobachtetes Molekulargewicht in der SDS-PAGE aufweist.

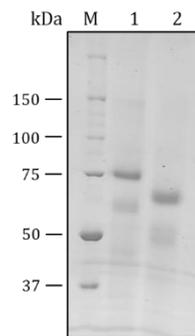


Abbildung 11: Veresterung von Carboxylaminosäure-Seitenketten aus dem GelMP Protein, 1: unmodifiziertes GelMP; 2: Verestertes GelMP. M: Größenstandard - Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard.

Neben der Hauptbande bei 75 kDa (Abbildung 10, Bande a) wird eine weitere Proteinbande bei 65 kDa (Bande b) beobachtet. Beide Proteinbanden wurden mittels N-terminaler Sequenzierung analysiert. Diese hat gezeigt, dass es sich bei beiden Banden um Fragmente des GelMPs handelt. Die Bande (a) entspricht der erwarteten Aminosäuresequenz des GelMP Proteins (Proteinsequenz GelMP siehe Anhang C), während es sich bei Bande (b) um ein kleineres Fragment des GelMP (ab GFPGPKGAAG) handelt (Tabelle 5). Das kleinere GelMP Fragment wird möglicherweise durch den proteolytischen Abbau erzeugt, da die *random-coiled*-Struktur der unhydroxylierten Gelatine anfällig für diesen proteolytischen Abbau ist [30]. Der proteolytische Abbau erfolgt voraussichtlich bereits in der Zelle, da proteasehemmende Reagenzien im Medium keinen Einfluss auf den Abbau zeigten. Eine Strategie zur Verhinderung des proteolytischen Abbaus wäre die Veränderung des Expressionsstamms zu einem Protease-defizienten Stamm (SMD1168) oder eine Veränderung der Aminosäuresequenz von GelMP mittels Proteinengineering, wodurch das Protein gegen den intrazellulären proteolytischen Abbau geschützt werden könnte.

Tabelle 5: N-terminale Sequenzierung; Analyse der Bande (a) und Bande (b) aus der SDS-PAGE (GelMP-Produktion) von der 30 L-Kultivierung.

Position in Sequenz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bande a (75 kDa)	R/Y	Y	E	F	P	G	P	P	G	P
Bande b (63 kDa)	G	F	P	G	P	K	G	A	A	G

Fazit Kultivierungsarbeiten

Zusammenfassend konnte der Prozess zur Herstellung von rekombinantem GelMP in einen 30 L-Maßstab übertragen werden. Um den Prozess weiterhin robust durchzuführen, sollte die Methanolzufuhr für die Weiterentwicklung an den Prozessmaßstab angepasst werden. Bei einer 30 L Kultivierung sollte ein größerer Schlauchdurchmesser und damit eine höhere Pumprate für die Substratzufuhr gewählt werden, sodass eine konstante Substratzufuhr sichergestellt werden kann. Die Ausbeute des extrazellulär produzierten GelMP lag bei 3 g/L. Im nächsten Abschnitt wird die Aufreinigung des sekretierten GelMPs beschrieben.

2.2 Downstream Processing (DSP)

Das GelMP wurde während der Kultivierung ins Medium sekretiert. Nach Abschluss der Kultivierung wurde die Zellmasse durch Zentrifugation abgetrennt. Das im Kulturüberstand befindliche sekretierte Protein konnte anschließend über zwei verschiedene Methoden aufbereitet werden. Zum einen wurde die Größenausschlusschromatographie (SEC) getestet und zum anderen, für größere Proteinmengen, die Cross-Flow-Filtration. Die einstufige Aufreinigung des GelMP konnte gewählt werden, da neben dem Zielprotein und den zugehörigen Fragmenten nur geringe Mengen an Verunreinigungen im verwendeten Minimalmedium vorhanden waren.

2.2.1 Entsalzung mittels Größenausschlusschromatographie

Um das GelMP von allen weiteren Bestandteilen im Kulturüberstand zu isolieren, wurde zunächst mittels SEC umgepuffert. Das Protein wurde von allen Bestandteilen, die kleiner als das Protein sind, getrennt und in PBS-Puffer überführt. Die Elution des GelMP während der SEC ist in Abbildung 12A dargestellt. Die Zielfraktion, in der sich das GelMP befindet, ist im ersten Peak (1) wiederzufinden. Der zweite Peak (2) enthält lediglich Kulturrückstände und Salze (Abbildung 12B, Nr.3). Dies wird auch durch den Anstieg der Leitfähigkeit deutlich (Abbildung 12A). Beide Hauptfragmente des GelMPs wurden in der gleichen Fraktion isoliert. Dies war zu erwarten, da die Auslösung der SEC zu gering ist, um Proteine mit diesem geringen Unterschied in der Molekularmasse zu trennen.

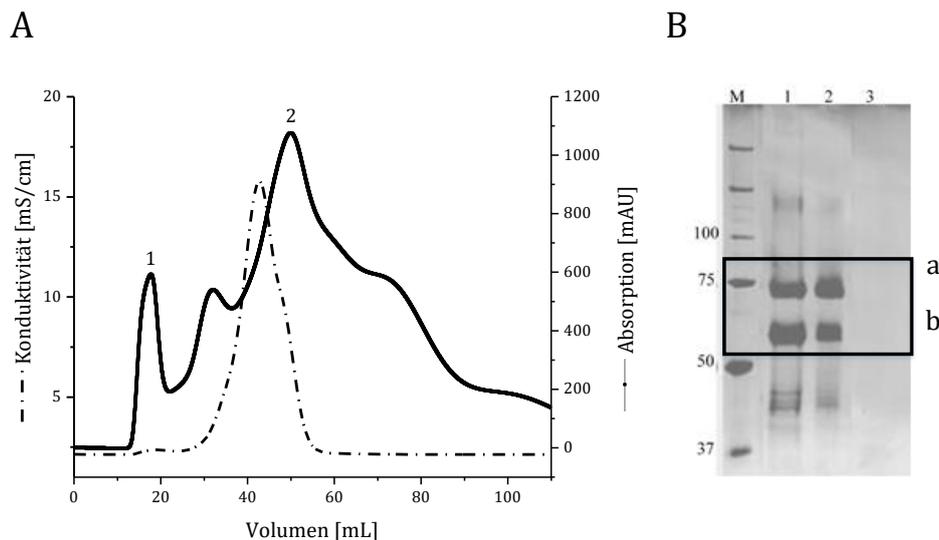


Abbildung 12: Umpufferung des GelMP durch Größenausschlusschromatographie (HiPrep Desalting Säule). (A) Chromatogramm der SEC. Es wurde die Konduktivität (gestrichelte Linie) und die Absorption (durchgezogene Linie) betrachtet. (B) SDS-PAGE der SEC. M: Größenstandard – Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard; 1: Kulturüberstand, der auf die SEC Säule aufgetragen wurde. 2: Peak (1) aus der SEC mit aufgereinigtem GelMP. 3: Peak (2) aus der SEC. Diese Fraktionen weisen keine Proteinbande im SDS-Gel auf.

Weitere Verfahren zur Trennung der beiden GelMP-Fragmente, beispielsweise durch fraktionierte Fällungen oder alternative chromatographische Verfahren (HIC; AIEX), führten nicht zum gewünschten Ergebnis. Beide Proteinfragmente weisen nur einen geringen Unterschied in der Molekularmasse auf (40,7 kDa zu 34,2 kDa) und haben sehr identische Eigenschaften, was problematisch für ein chromatographisches Trennverfahren

ist. Da das GelMP-Fragment jedoch die Funktionalität des Proteins als Gelatine-artiges Protein nicht beeinträchtigt, wurden beide Proteine gemeinsam aufgereinigt und für alle nachfolgenden Experimente verwendet.

2.2.2 Entsalzung und Aufkonzentrierung mittels Cross-Flow-Filtration

Um größere Volumina des Kulturüberstandes zu verarbeiten und niedermolekulare Stoffe vom Protein zu trennen, wurde die Cross-Flow-Ultrafiltration (Sartoflow® Smart, Sartorius Stedim Biotech GmbH) verwendet. Der Kulturüberstand (1 L) wurde gegen Reinstwasser dialysiert und 10-fach aufkonzentriert (Endvolumen: 100 mL). Die verwendete Filterkassette hatte eine Membranausschlussgrenze von 30 kDa, sodass kleinere Bestandteile vom Protein getrennt wurden. Durch nachträgliches Spülen des Systems konnte rückständiges GelMP aus dem System entfernt werden, wobei das Endvolumen wieder leicht angestiegen ist. Das gewonnene Konzentrat wurde im Anschluss lyophilisiert.

2.3 Produktanalytik

Um weitere Informationen über das rekombinante GelMP zu erhalten, wurde das Protein hinsichtlich verschiedener Eigenschaften analysiert. Ein Anwendungsbereich dieses Proteins sollte die Verwendung als Biomaterial im Bereich Zellkultur oder Tissue Engineering sein. Durch die Richtlinien im Bereich der Medizinprodukte ist es unabdingbar, genauere Informationen über das Protein vorzuweisen. Daher wurden in diesem Abschnitt neben Stabilitätstests weitere rheologische Strukturanalysen und Konformationsuntersuchungen durchgeführt.

2.3.1 Proteinstabilität

Schmelzpunktanalyse

Um den Einfluss des pH-Wertes des Puffersystems auf die Proteinstabilität zu untersuchen, wurde das GelMP mittels nanodifferenzieller Scan-Fluorimetrie (nanoDSC) untersucht. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, das unter Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren die Stabilität eines Proteins bestimmen kann. Durch eine Temperaturerhöhung der Probe kommt es zur Strukturveränderung des GelMP, sodass die aromatischen Aminosäurereste des Proteins die Position in der Sekundärstruktur wechseln. Diese Veränderung kann durch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (350 nm /330 nm) detektiert werden [93]. Die höchste Schmelztemperatur des GelMPs wurde im PBS-Puffer

bei pH 7,4 ($T_m = 69\text{ °C}$) beobachtet (Abbildung 13). Die gezeigten Peaks weisen darauf hin, dass sich das GelMP vollständig entfaltet hat.

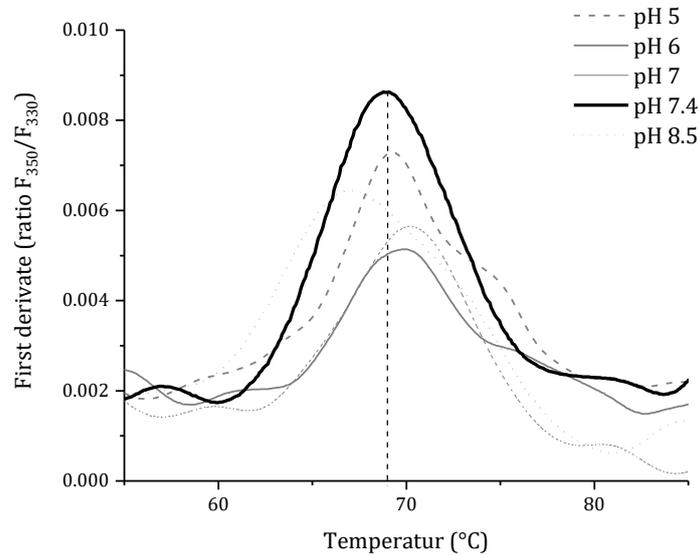


Abbildung 13: Schmelzpunktanalyse von GelMP in verschiedenen Puffersystemen mit verschiedenen pH-Werten. Die Analyse erfolgte mittels nanoDSC.

Die beobachtete Schmelztemperatur ist höher als diejenige, die für Triblock-Proteinpolymere mit $(PGP)_9$ -Wiederholungen, ähnlicher Molekulargröße und unter Verwendung der Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC) nachgewiesen wurde ($T_m = 42\text{ °C}$) [31]. Beim Vergleich der Werte muss jedoch beachtet werden, dass es nicht immer möglich ist, die Übergangstemperaturen zwischen DSC und Differential Scanning Fluorimetry (DSF) direkt zu vergleichen. Hier sind zusätzliche Faktoren wie die thermische Scanrate zu berücksichtigen [94].

Lagerungsstabilität

Das GelMP sollte für die weitere Verwendung in einem stabilen Zustand vorliegen. Demzufolge ist es wichtig zu prüfen, bei welcher Temperatur das Protein stabil in Lösung vorliegt und unter welchen Bedingungen es gelagert werden sollte. Diese Erkenntnis ist gerade im Zusammenhang mit der Anwendung im biomedizinischen Bereich wichtig, da das Protein als Gerüst- und Beschichtungsprotein genutzt werden soll. Dazu wurde eine 10 %-ige GelMP-Lösung sterilfiltriert und die Stabilität bei 21°C und bei 4°C über mehrere Tage untersucht. In Abbildung 14 ist ein deutlicher Stabilitätsunterschied des GelMPs zwischen den beiden genannten Temperaturen zu erkennen.

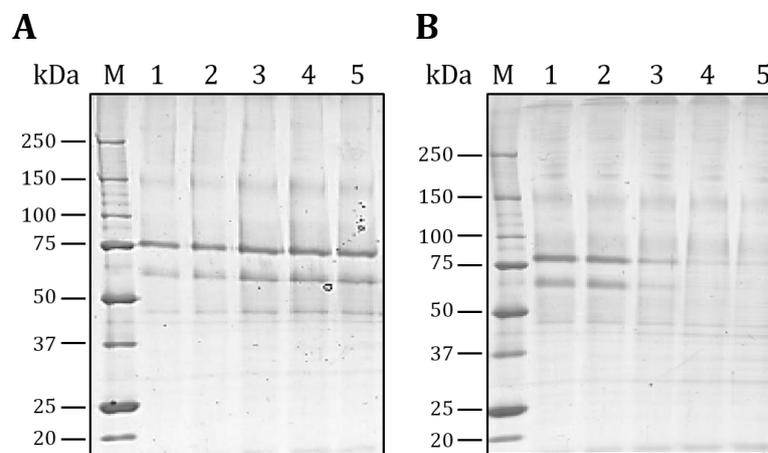


Abbildung 14: Stabilität GelMP (10 %) in PBS-Puffer; (A) Lagerung der 10 %igen GelMP-Lösung über fünf Tage (1-5) bei 4°C; (B) Lagerung der 10 %igen GelMP-Lösung über fünf Tage (1-5) bei 21°C (RT).

Abbildung 14A zeigt, dass das GelMP bei 4°C über fünf Tage stabil bleibt, während bei Raumtemperatur (Abbildung 14B) ab Tag drei ein deutlicher Verlust des Proteins im SDS-Gel zu erkennen ist. Demnach sollte das GelMP für weitere Anwendungen im Kühlschrank gelagert werden, um den Abbau des Proteins zu verhindern.

Pufferscreening

Die Stabilität des Proteins ist ebenfalls vom Puffersystem abhängig. GelMP besitzt einen theoretischen pI-Wert von 5,81. Für die Anwendung in der Zellkultur sollte das Puffersystem im physiologischen Bereich liegen (pH 7,4), sodass die Zellen keinem zusätzlichen Stress ausgesetzt werden. Um die Stabilität des GelMP bei verschiedenen pH-Werten zu testen, wurde es in verschiedenen Puffersystemen gelöst und die Aggregatbildung in der Lösung durch Absorptionsmessung bei 340 nm untersucht (Abbildung 15). Die Zugabe von NaCl und Tween 20 hatte keine Auswirkung auf die Löslichkeit des Proteins bis pH-Wert 7,5. Ab einem pH-Wert von 7,5 konnte ein leichter Anstieg der Aggregatbildung gezeigt werden und demzufolge eine schlechtere Löslichkeit des GelMPs nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Schmelzpunktanalyse, sodass das GelMP in PBS-Puffer gelöst werden kann und stabil in Lösung bleibt.

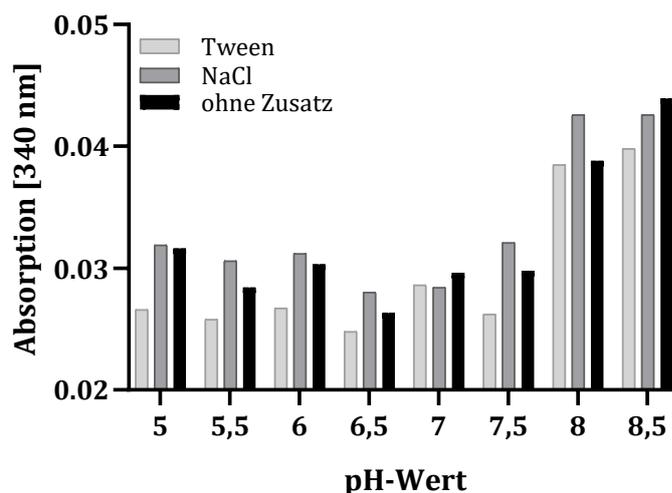


Abbildung 15: Löslichkeit des GelMP (500 µg/mL) in verschiedenen Puffersystemen. pH 5 und 5,5: Acetat Puffer; pH 6 und 6,5: MES Puffer; pH 7: MOPS Puffer; pH 7,5: PBS Puffer; pH 8 und 8,5: Tris-HCl Puffer – jeweils 50 mM.

2.3.2 Strukturcharakterisierung

Um weitere Eigenschaften des rekombinant hergestellten GelMP zu charakterisieren, wurden rheologische Untersuchungen und CD-Spektrometrie Analysen durchgeführt. Im nachfolgenden Abschnitt konnten Aussagen über die Gelieigenschaften, die Stabilität und die Faltung des Proteins getroffen werden.

Rheologie

Für weitere Anwendungen im medizinischen Bereich, sollte das GelMP die Eigenschaft besitzen, eine gelartige Struktur auszubilden. Die Gelbildung (Viskoelastizität) ist von der Wechselwirkung zwischen Netzwerk und umgebener Flüssigkeit abhängig. Ein Gel ist durch die Eigenschaft charakterisiert, dass das Netzwerk seine äußere Gestalt beibehält und elastische Eigenschaften besitzt. Der Vorgang einer kontinuierlichen Phasenumwandlung dieser Lösungen (Sol) zu einem viskoelastischen Festkörper (Gel) wird als Gelierung bezeichnet. Die Ausbildung der gelartigen Struktur von GelMP soll durch Wechselwirkung der einzelnen hydrophilen Polymerketten erreicht werden. Mithilfe der Rheologie können beispielsweise Hydrogele hinsichtlich ihrer viskoelastischen Eigenschaften geprüft werden. Dazu wird die Probe einer sinusförmigen oszillierenden Scherbeanspruchung unterworfen. Diese wird durch das Speichermodul G' und das Verlustmodul G'' wiedergegeben. Während das Speichermodul für die Energie steht, die in der Deformation des Materials gespeichert wird, ist das Verlustmodul die Energie, die während der Deformation verloren geht. Die Energie wird für die strukturelle Änderung der Probe oder als Wärme in die Umgebung freigegeben [95]. Für die Untersuchung der Geliereigenschaft wurde das GelMP (10 %-ig) bei 15°C über 20 h mittels Rheometer gemessen (Abbildung 16).

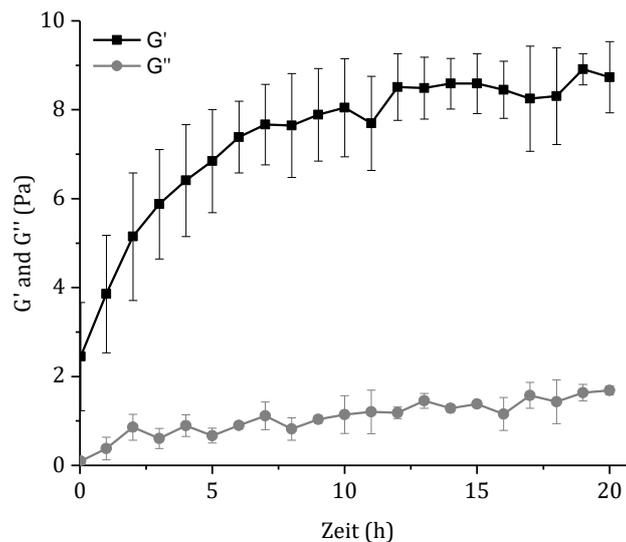


Abbildung 16: Rheologische Messung von GelMP bei 15°C über 20 h. Das GelMP ist in PBS-Puffer in einer 10%-igen Lösung angesetzt.

Für diese Messung wurde eine 10 %-ige Lösung des Proteins angesetzt. Die Abbildung 16 zeigt, dass das Speichermodul deutlich über dem Verlustmodul liegt und demnach eine leichte Gelbildung nachgewiesen werden kann. Das rekombinante GelMP verhält sich ähnlich wie ein Gelatinemimetikum, indem es bei längerer Inkubationszeit bei Temperaturen unter 37°C ein schwaches Gel ausbildet. Es konnte ein maximaler Wert von etwa 9 Pa nach 20 h erreicht werden.

CD-Spektrometrie

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur des Proteins wurden *circular dichroism* (CD)-Spektren für GelMP, humanes Kollagen I, hitzedenaturiertes Kollagen und Gelatine aufgenommen (Abbildung 17). Lediglich humanes Kollagen I (gestrichelte Linie) zeigte bei $\lambda = 225$ nm eine positive Elliptizität und bei einem Minimum unter 200 nm eine positive Elliptizität, was auf das Vorhandensein einer Tripelhelix-Konformation hinweist [96]. Beim GelMP konnte dieses charakteristische Spektrum bei keiner geprüften Temperatur (Abbildung 17) nachgewiesen werden.

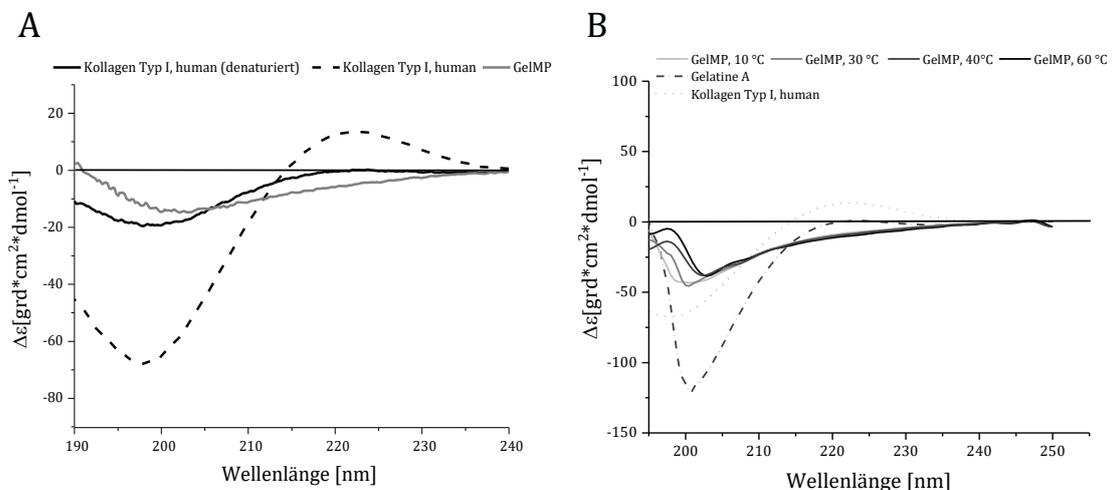


Abbildung 17: (A) CD-Spektrum von humanem Kollagen I, vom denaturierten Kollagen und vom rekombinanten GelMP. (B) CD-Spektrum vom rekombinanten GelMP (10-60°C), von Gelatine A und vom humanen Kollagen I. Es wurde ein UV-Spektrum (190-240 nm) aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/mL.

Die PGP-Wiederholungen und der nicht-hydroxylierte Kollagenmittelblock des GelMP führen zu einer zufälligen *random-coil* Konformation des Proteins. Ähnliche Ergebnisse wurden von Werten *et al.* erzielt, die ein Triblock-Design-Protein auf Basis von PGP-Wiederholungen und einem zufälligen Mittelblock konstruierten, der auch keine positive Elliptizität im Bereich $\lambda = 215 - 240$ nm zeigte [31]. Kollagen-artige Proteine auf Basis

von PGP-Wiederholungen können bei niedrigen Temperaturen und verlängerten Inkubationszeiten Tripelhelices bilden. Diese Neigung wird stark erhöht, wenn stabilisierende Eigenschaften wie eine Faltdomäne [97] oder ein mimetischer Cystinknoten [98] in das Proteindesign eingebracht werden. Da das GelMP keine dieser stabilisierenden Eigenschaften besitzt, verbleibt das Protein in einer *random-coil*-Struktur.

2.4 Anwendung als Biomaterial

Um das Potential des rekombinanten GelMPs als Alternative zu tierischer Gelatine in der Zellkultur zu untersuchen, wurde im nachfolgenden Abschnitt die Biokompatibilität des Proteins getestet. Außerdem wurde untersucht, ob eine GelMP-Beschichtung sich positiv auf das Adhäsionsverhalten und das Zellwachstum der AD-MSCs in der Zellkultur auswirkt und somit der kommerziell erhältlichen Gelatine ähnelt. Über kommerzielle Gelatine ist bekannt, dass Stammzellen mit den entsprechenden Integrinen auf dieser Beschichtung anhaften.

2.4.1 Biokompatibilität

Um GelMP in der Zellkultur einsetzen zu können, war es wichtig, die Biokompatibilität zu untersuchen. Die hAD-MSCs wurden mit GelMP, Gelatine und Rinderserumalbumin (BSA) als Zusatz im Medium in einem IncuCyte® Live-Cell Analysesystem kultiviert. Es wurden alle zwei Stunden mikroskopische Bilder aufgezeichnet. Die kinetische Überwachung der Zytotoxizität und Apoptose der Zellen erfolgte in Anwesenheit des Caspase 3/7 Apoptosis Assay Reagenzes (Sartorius, Göttingen). Nach einer Inkubationszeit von 60 h zeigten die Aufnahmen und die quantitative Analyse der Apoptose (Anzahl der grünen Objekte/Bild) (Abbildung 18), dass die mit GelMP-, Gelatine- und BSA-behandelten Zellen alle ähnliche Entwicklungen der Zellkonfluenz zeigen (Abbildung 18A) und nicht toxisch gegenüber hAD-MSCs sind (Abbildung 18B). Das rekombinante GelMP fungiert als ein typisches natürliches extrazelluläres Matrix-Protein (ECM) und ist für Zellen ungiftig.

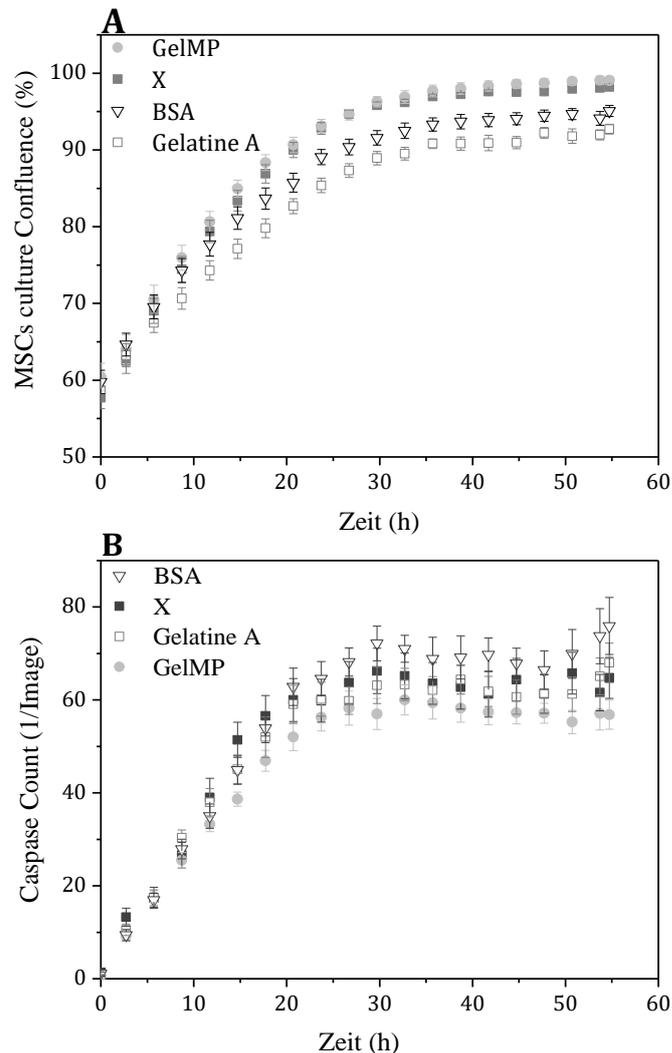


Abbildung 18: (A) Zeitliche Zellkonfluenz-Untersuchung mit einer hAD-MSC-Zelllinie. Das Medium wurde mit verschiedenen Zusätzen (GelMP, BSA, Gelatine A und ohne Zusatz) behandelt. (B) Die Anzahl der durch Caspase-3/7 gefärbten Zellen wurde über die Zeit aufgenommen und als Fluoreszenzobjekt aufgetragen; n=3 Wells pro Datenpunkt gezeigt; X= Kontrolle, ohne Zusatz.

2.4.2 Zelladhäsionsassay

Nachdem die Biokompatibilität von GelMP bestätigt war, sollte geprüft werden, wie sich eine GelMP-Beschichtung auf das Adhäsionsverhalten von hAD-MSC auswirkt. Die Adhäsion der Zellen an der extrazellulären Matrix oder an anderen Zellen ist für das Wachstum, die Kommunikation und das Überleben von Säugerzellen unerlässlich [99]. Zunächst wurde das GelMP in Lösung gebracht (2 g/L, PBS-Puffer, pH 7,4) und in die zu beschichteten Wells gegeben. Als Positivkontrolle wurde eine Gelatine-A-Lösung (2 g/L, PBS Puffer, pH 7,4) in weitere Wells gegeben. Bei der Negativkontrolle handelte es sich

um eine BSA-Lösung und weitere Wells blieben als weitere Negativkontrolle unbeschichtet.

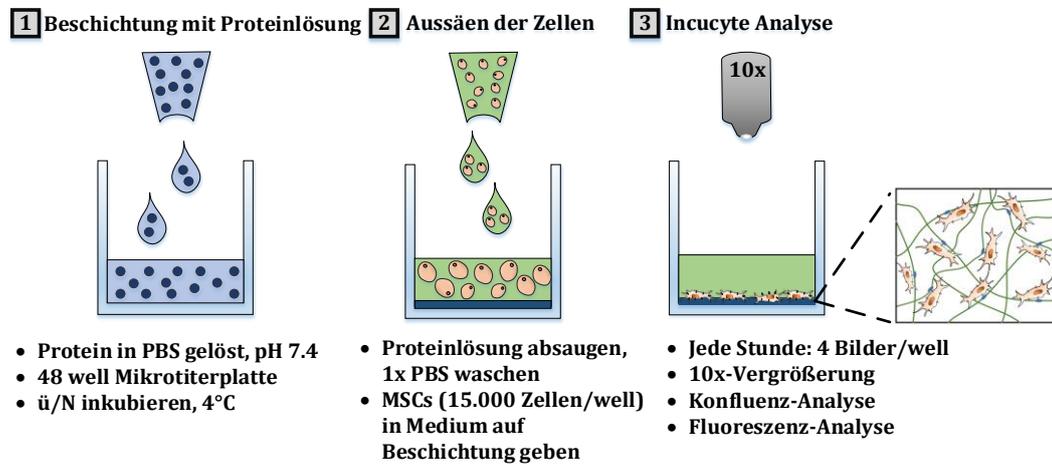


Abbildung 19: Ablauf des Zelladhäsionsassays mittels IncuCyte-Mikroskop. (1) Die Proteinlösungen (GelMP, BSA, Gelatine A) werden in eine Well-Platte gegeben und 12 h bei 4°C inkubiert. (2) Die Proteinlösung wird abgesaugt und hAD-MSCs werden mit Medium auf die verschiedenen Beschichtungen ausplatziert und über 60 h bei 37°C, 5 % CO₂ mit einem IncuCyte-Mikroskop überwacht. (3) Jede Stunde werden pro Well 4 Bilder aufgenommen (10x Vergrößerung). Von den aufgenommenen Bildern werden mittels IncuCyte-Software Konfluenz- und Fluoreszenz-Analysen durchgeführt.

Über BSA ist bekannt, dass das Protein keine Integrin-Bindestellen besitzt, sodass Zellen auf dieser Oberfläche nicht adhären können. Nach 12 h bei 4°C wurden die Proteinlösungen aus den Wells entfernt und anschließend die hAD-MSCs auf die verschiedenen Oberflächen ausgesät. Für den Adhäsionsassay wurde die Bindung und Proliferation der hAD-MSCs auf den verschiedenen Zellkulturbeschichtungen in Echtzeit mit dem IncuCyte®-Mikroskop überwacht. Wie in Abbildung 21 dargestellt, ist eine erhöhte Zellproliferation auf der GelMP- und Gelatine A-Oberfläche zusehen, während das Zellwachstum auf der BSA-Oberfläche und der unbeschichteten Kunststoffoberfläche eingeschränkt ist. Am Ende der 20 h Kultivierungszeit zeigten die hAD-MSC auf den GelMP- oder Gelatine- beschichteten Wells eine fast doppelt so hohe Konfluenz wie die hAD-MSCs, die auf unbeschichteten Oberflächen wachsen. Auf Gelatine- und GelMP-Beschichtungen zeigen die Zellen eine Standardwachstumskurve mit bis zu 100 % Zellkonfluenz nach 60 h, während die Zellen, die auf den unbeschichteten und BSA-beschichteten Oberflächen wachsen, eine Zellkonfluenz von 45 % erreichen (Abbildung 21A). Die hAD-MSCs, die auf BSA und unbeschichteten Oberflächen wachsen, konnten nicht effizient an der Oberfläche haften und neigten zur Agglomeratbildung (Abbildung 21B).

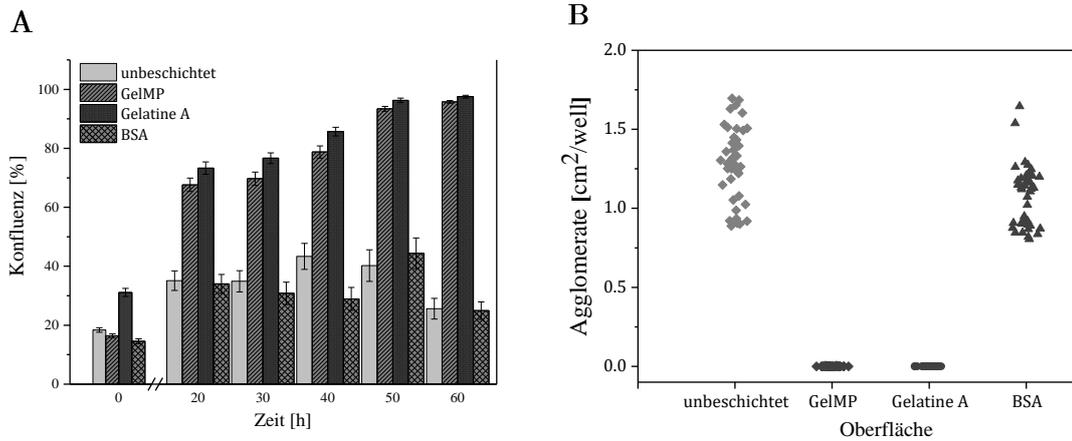


Abbildung 21: (A) Echtzeit Konfluenz Untersuchung mit einer hAD-MSC Zelllinie. Zellproliferation auf vier verschiedene Oberflächenbeschichtungen (GelMP, Gelatine A, BSA und X=unbeschichtet). Die Zellproliferation wurde 60 h durch das IncuCyte System in einem Inkubator (5 %CO₂, und 37°C) beobachtet. (B) Agglomeratbildung der hAD-MSCs auf den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen.

Darüber hinaus zeigten die hAD-MSCs, die auf GelMP und Gelatine A adhärten, eine ähnliche längliche und spindelförmige Morphologie (Abbildung 20).

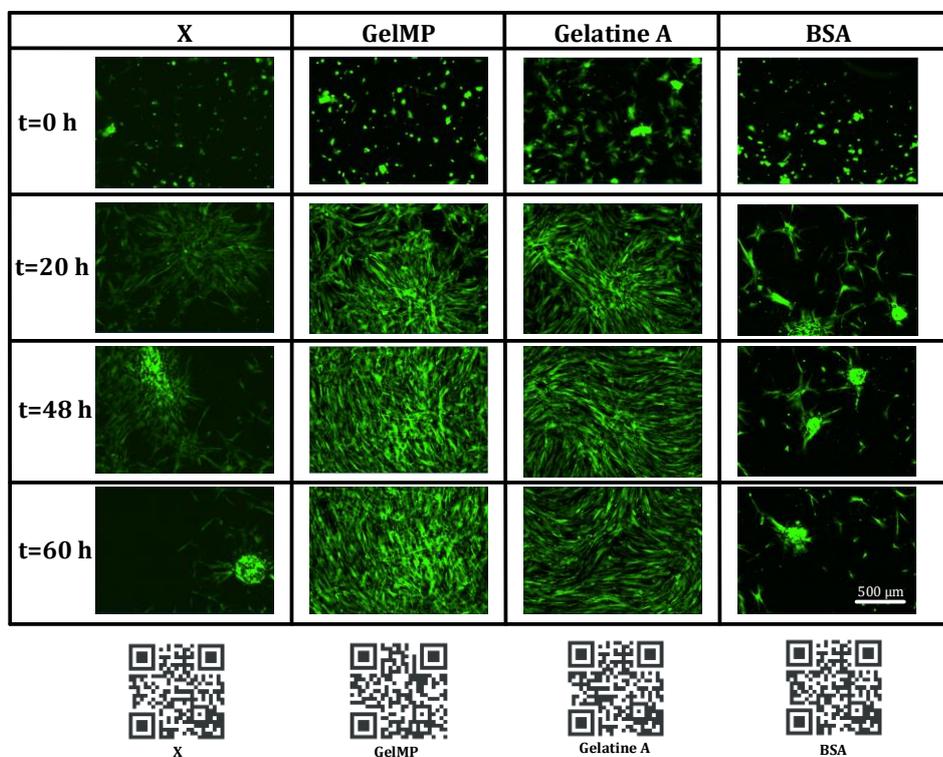


Abbildung 20: Zellmorphologische Untersuchung auf GelMP, BSA, Gelatine A und unbeschichteter Oberfläche nach 0, 20, 48 und 60 h Kultivierungsdauer. Scale bar 500 µm. Die Videos zum Zellwachstum und Adhäsionsprozess können über die beigefügten QR Codes aufgerufen werden.

Die Experimente zur Biofunktionalität konnten zeigen, dass das rekombinante GelMP ungiftig und biokompatibel ist und die Performance nicht von den tierischen Materialien wie Gelatine zu unterscheiden ist.

2.5 Fazit – Biopolymer GelMP

Das GelMP konnte im großen Maßstab (30 L) produziert, aufgereinigt und charakterisiert werden. Durch die 30 L Fed-Batch-Kultivierung konnten ~3 g/L GelMP produziert werden, sodass die Produktanalytik und die weiteren Anwendungen als Biomaterial aus einer Charge durchgeführt wurden. Das extrazellulär produzierte Protein konnte durch die Verwendung der Cross-Flow Filtration (Sartocon Hydrosart®, Sartorius) von unerwünschten Medienbestandteilen und Nebenprodukten getrennt und anschließend lyophilisiert werden. Die N-terminale Sequenzierung hat gezeigt, dass neben dem 75 kDa großen GelMP ein kleineres Fragment des Proteins hergestellt wird, dies aber keine negative Auswirkung in der Anwendung als Biomaterial hat. Bei GelMP handelt es sich um ein Protein, das ein leichtes Gel bildet, das stabil im Puffer bis zu ~69°C ist und eine Sekundärstruktur ähnlich wie kommerziell erwerbliche Gelatine aufweist. Die PGP-Wiederholungen und der nicht-hydroxylierte Kollagenmittelblock führen zu einer zufälligen *random-coil* Konformation des Proteins. Die Modifizierung des GelMP könnte der nächste Schritt sein, um das Produkt als Biotinte im 3D-Bioprint testen zu können.



Abbildung 22: Prozess zur Herstellung von GelMP und die mögliche weitere Modifizierung und Anwendung als Bioink.

3 Experimentelle Arbeiten – Biopolymer FGG

Als Alternative zu humanem Fibrinogen wurde ein Prozessablauf zur Herstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der rekombinanten Fibrinogen-Gamma-Kette (FGG) entwickelt.

Das FGG besteht aus einer Gensequenz, die der Sequenz von Codon 94 bis Codon 412 des Gens der humanen Fibrinogen- γ -Kette entspricht. Dieser Abschnitt codiert den C-terminalen Bereich der Kette, an dem die wichtigen Bindestellen zur Steuerung der Wundheilung liegen. Am N-Terminus des Konstruktes befindet sich ein Histidin-Tag, der aus 10 Histidin-Resten besteht und für die Aufreinigung des produzierten Proteins verwendet wird.

In einer vorhergegangenen Arbeit wurde das FGG bereits designt und heterolog in *E. coli* Tuner™ (DE3) produziert [100]. Dieser Stamm ist eine Mutante des Stamms BL21 (DE3) [101]. Durch die Deletion des Lactosepermeasegens *lacZY* wird eine konzentrationsabhängige Steuerung der Induktion möglich [102]. Das über ein Expressionsvektor pET-16b eingebrachte *fgg* Gen steht unter der Kontrolle des T7-Promotors, der hohe Produktionsraten ermöglicht [103]. Die T7-Polymerase steht unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors und wird über IPTG-Zugabe induziert. Die Produktion erfolgt intrazellulär unter Bildung von *Inclusion Bodies* (IBs) und wurde bereits in einer vorherigen Arbeit in einer 2 L-Batch-Kultivierung durchgeführt. Die Ausbeute von FGG während des Prozesses betrug 251,48 mg/L unter Verwendung von 30 g/L Substratlösung (Glucose). Nach der Aufreinigung des FGGs mittels Affinitätschromatographie (IMAC) konnte lediglich eine Reinheit von 55 % erreicht werden. Des Weiteren wurde mittels *on-column-Refolding* eine Methode getestet, um FGG während der Affinitätschromatographie in seine native Form zurückzuführen. Problematisch war dabei, dass das FGG währenddessen auf der Säule ausfiel. Außerdem konnte die Rückfaltung des Proteins nicht nachgewiesen werden.

Die bereits durchgeführten Klonierungs- und Kultivierungsarbeiten wurden berücksichtigt, um in dieser Arbeit die Ausbeute von FGG während des Kultivierungsprozesses zu steigern. Außerdem sollte Ziel dieser Arbeit sein, die Reinheit des FGGs durch Einführung mehrere Aufreinigungsschritte zu erhöhen und das Protein hinsichtlich der Stabilität und funktioneller Eigenschaften zu charakterisieren.

Dazu wurde der Produktionsprozess von einem 2L-Batch-Kultivierungsmaßstab auf einen 10L-Kultivierungsmaßstab übertragen. Neben der bereits eingeführten Affinitätschromatographie wurde ein weiterer chromatographischer Schritt eingeführt, um die Reinheit des FGGs zu erhöhen. Nach der Zwei-Schritt-Chromatographie und einer nachfolgenden Umpufferung in einen physiologischen Puffer sollte das FGG charakterisiert werden sowie erste Anwendungen als Biomaterial getestet werden. Dabei wurde die Biokompatibilität des FGG als Supplement in Zellkultursystemen geprüft und das FGG als Oberflächenbeschichtung für adhärent wachsende Stammzellen getestet. In Abbildung 23 ist der Gesamtprozess zur Herstellung und Aufreinigung von FGG dargestellt. Die einzelnen Schritte des Prozesses werden in den nachfolgenden Kapiteln genauer beschrieben.

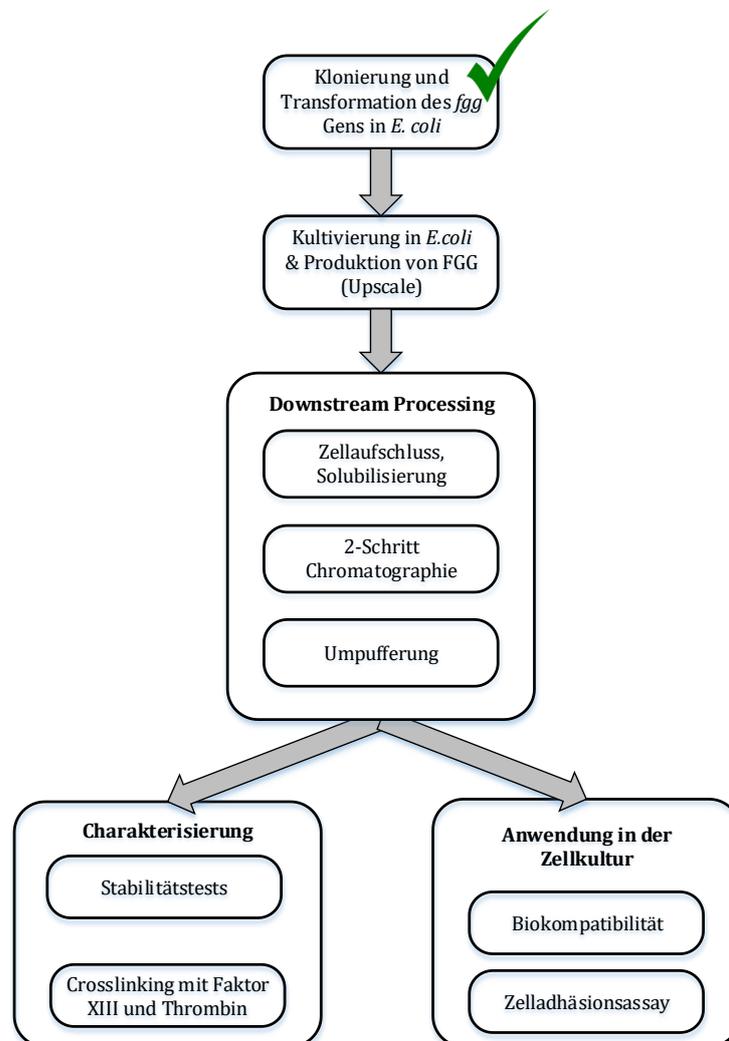


Abbildung 23: Gesamtprozess der FGG-Herstellung und Anwendung in der Zellkultur.

3.1 Kultivierung und Proteinproduktion von FGG in *Escherichia coli*

Neben der Klonierung und Transformation von FGG in *E. coli*, konnten in vorherigen Arbeiten Kultivierungsparameter im 2 L-Maßstab optimiert werden (Abbildung 24). Die hier aufgeführten Parameter wurden für die weitere Übertragung in einen größeren Herstellungsmaßstab berücksichtigt.

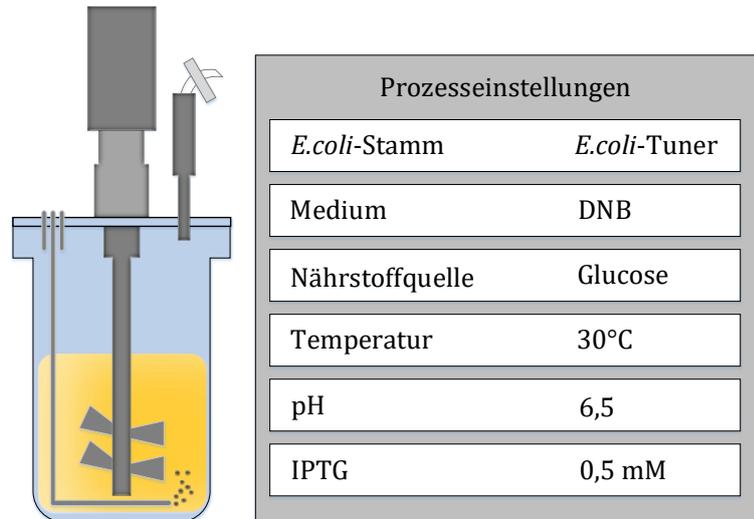


Abbildung 24: Optimierte Parameter einer 2L-Batch-Kultivierung aus vorhergehenden Arbeiten [100]. Weitere Details befinden sich im Anhang.

Um größere Mengen für die Charakterisierung und Analysen des FGG zu erhalten, wurde der Kultivierungsprozess in dieser Arbeit auf einen 10 L-Maßstab übertragen.

Kultivierung im 10 L-Bioreaktor

Für die Kultivierung im 10 L Maßstab wurde geprüft, ob die Prozesseinstellungen aus der 2 L-Kultivierung (Abbildung 24) übertragen werden können. Alle nachfolgenden Kultivierungen wurden im gleichen Reaktorsystem durchgeführt (Biostat® C, Sartorius Stedim Biotech GmbH).

Batch-Prozess

Zunächst wurde für die Produktion von FGG eine Batch-Kultivierung im 10 L Maßstab durchgeführt. Mit einer Startkonzentration von 10 g/L Substratlösung (Glucose) wurde der Prozess mit einer OD_{600} von 0,1 gestartet. In der nachfolgenden Abbildung 25 werden sowohl die Online- als auch die Offline-Daten der Kultivierung gezeigt.

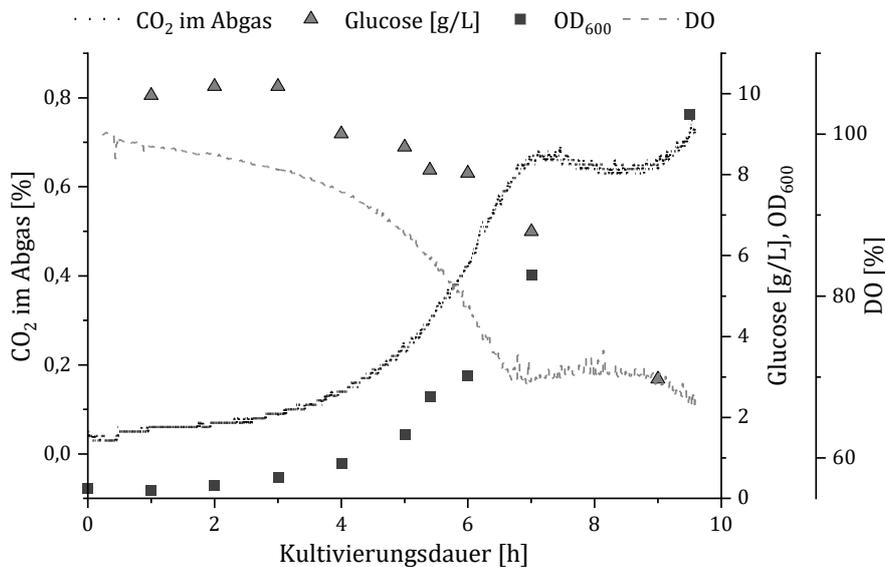


Abbildung 25: Online- und Offline Daten einer 10 L Batch Kultivierung im Edelstahlreaktor. Die Substratanfangskonzentration (Glucose) beträgt 10 g/L. pH-Wert: 6,5. Der Gelöstsauerstoff (DO) nahm mit zunehmender Biomassenkonzentration (gezeigt OD_{600}) ab. Durch die Stoffwechselaktivität veränderte sich die CO_2 -Konzentration im Abgas. Die Glucose-Konzentration ist über den gesamten Kultivierungsverlauf gesunken. Die Induktion mittels IPTG erfolgte nach 5 Stunden Kultivierungsdauer.

Es wurde eine konstante Rührerdrehzahl (600 rpm) gewählt und die Begasungsrate lag über den gesamten Prozess bei 10 L/min (1vvm). In den ersten vier Stunden erfolgte die Adaption der Organismen an die Kultivierungsumgebung (lag-Phase). Im Anschluss ging die Kultur in ein exponentielles Wachstum über. Die Induktion mittels IPTG (0,5 mM) erfolgte nach 5 h Kultivierung bei einer OD_{600} von 2,5. Nach Verbrauch des Substrates (Glucose) wurde der Prozess nach 10 h abgebrochen und die Zellsuspension geerntet. Es wurde eine Biotrockenmasse (BTM) von 3,6 g/L erreicht. Die Ausbeutekoeffizienten bestätigen, dass der Prozess von einem 2 L- auf einen 10 L Maßstab übertragen werden konnte (Tabelle 6). Der Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat ($Y_{x/S}$) lag bei der

Batch-Kultivierung im 10 L-Maßstab bei 0,33 g BTM/g Glucose und lag somit im Bereich der 2 L Kultivierung aus [100]. Um das Wachstum zu verlangsamen und Stoffströme verstärkt in die heterologe Proteinproduktion zu lenken, wurde neben dem Batch-Prozess ein Fed-Batch-Prozess durchgeführt.

Tabelle 6: Vergleich der Kultivierungsergebnisse der 10 L-Batch-Kultivierung mit der 2 L-Batch-Kultivierung aus [100].

Batch Kultivierungen	10 L	2 L aus [100]
Wachstumsrate	0,39 h ⁻¹	0,48 h ⁻¹
Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$	0,33 g/g	0,285 g/g
Ausbeutekoeffizient $Y_{P/S}$	0,01 g/g	0,011 g/g
Ausbeutekoeffizient $Y_{P/X}$	0,032 g/g	0,038 g/g
Proteinkonzentration	110 mg/mL	108 mg/mL
Glucose	10 g/L	10 g/L
BTM	3,4 g/L	2,85 g/L
OD	9,5	8,34
Produktionsphase	4 h	4 h
Kultivierungsdauer	10 h	9 h

Fed-Batch-Prozess

Nach der Produktion des FGG mittels Batch-Kultivierung sollten für weitere Anwendungen höhere Produktausbeuten generiert werden. Während bei der Batch-Kultivierung die Medienbestandteile im Bioreaktor vorgelegt werden, können bei Fed-Batch-Prozessen Substrate (Glucose) kontinuierlich zugeführt werden, um höhere Endkonzentrationen an Biomasse zu erreichen und somit mehr IBs zu produzieren. Durch die Niedrighaltung der Substratkonzentration kann eine Substratinhibierung der Wachstumsrate verhindert werden [104].

Der Prozess startet mit einer Batch-Phase. Dazu wurde eine Glucosestartkonzentration (10 g/L) festgelegt und bis zum Verbrauch der Glucose im Batch-Betrieb kultiviert (Abbildung 26). Nach etwa 8 h wurde in den Fed-Batch-Betrieb gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt kam es zu einem kurzzeitigen Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration, ein Anzeichen für die vollständige Verstoffwechslung der Glucose.

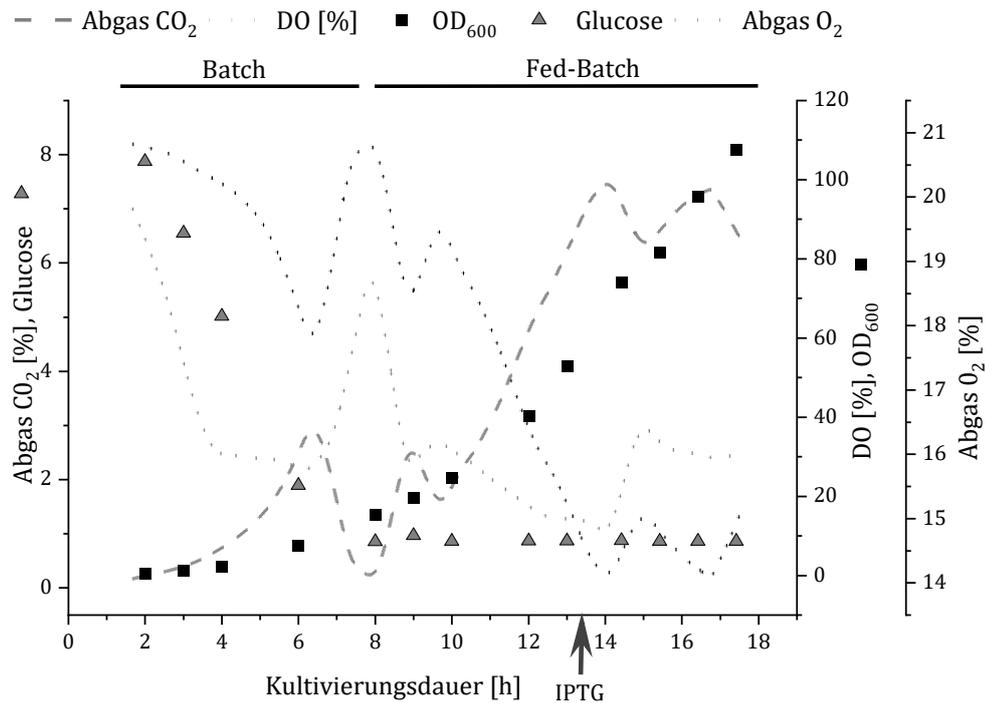


Abbildung 26: Online- und Offline Daten einer *E. coli* Fed-Batch-Kultivierung für die Produktion von FGG. Nach 13,5 h Kultivierungsdauer wurde mit IPTG induziert. Nach weiteren 4 h wurde der Prozess beendet und die Zellen geerntet. Der Gelöstsauerstoff (DO) nahm mit zunehmender Biomasse ab. Durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien veränderte sich die O₂- und CO₂-Konzentration im Abgas.

Die Zugabe der Feed-Lösung (650 g/L Glucose-Lösung) erfolgte über eine konstante Feed-Rate von 1,2 mL/min. Nach ~13 h wurde mit IPTG induziert, sodass für ~4 h FGG produziert werden konnte. Der Gelöstsauerstoffgehalt wurde über die Rührerdrehzahl gesteuert. Nach 18 h wurde die Kultivierung abgebrochen, da die maximale Rührerdrehzahl (1000 rpm) erreicht wurde und der Gelöstsauerstoffgehalt durch einen zu hohen Sauerstoffverbrauch nicht mehr konstant gehalten werden konnte. Durch das lineare Zellwachstum der Bakterien und das kontinuierliche Zuführen der Glucose-Feed-Lösung in der Fed-Batch Phase, wurde 10-fach so viel Biomasse (37,1 g/L) gebildet als im Batch-Betrieb. Der Ausbeutekoeffizient Biomasse/Substrat lag bei 0,86. In Abbildung 27 ist die

SDS-PAGE zur Bildung der IBs während der Induktion mittels IPTG gezeigt. Bei ca. 50 kDa ist eine eindeutige Proteinbande zu erkennen, die auf das produzierte FGG schließt. Die FGG-Konzentration wurde densitometrisch bestimmt und lag bei 1,3 g/L.

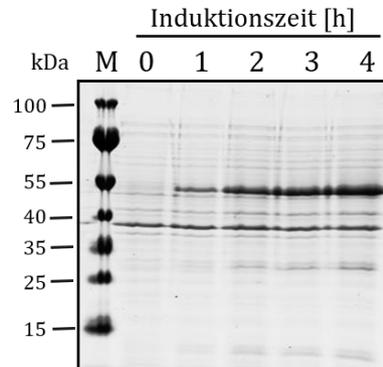


Abbildung 27: SDS-Gel der 10 L Fed-Batch-Kultivierung. Proteinproduktion nach 4 h Induktion mit IPTG. Bei ca. 55 kDa ist eine eindeutige Proteinbande zu erkennen. Das FGG befindet sich in der unlöslichen Fraktion und liegt als IB vor.

Insgesamt konnte mit dem gezeigten Fed-Batch-Prozess eine höhere FGG-Konzentration als im Batch-Prozess erreicht werden. Des Weiteren werden durch die Produktion mittels Fed-Batch Kosten gesenkt, da pro Kultivierung deutlich höhere Biomasseausbeuten erreicht werden können. Die Feeding-Strategie könnte optimiert werden, um den Schwankungen hinsichtlich Glucosekonzentration und Gelöstsauerstoff im Prozess besser entgegenzuwirken. Die Steuerung könnte über das Programm ORK (Online Runge-Kutta) Feeder 1000 (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) erfolgen. Das entwickelte Programm basiert auf dem Monod-Modell und die Differentialgleichungen wurden durch das Programm numerisch unter Nutzung des Runge-Kutta-Verfahrens der vierten Ordnung gelöst [105]. Dazu könnte ein Online-Sensor in Bezug auf die Glucosekonzentration integriert werden oder die Feed-Rate an den Gelöstsauerstoff gekoppelt werden.

3.1.1 Fazit Kultivierungsarbeiten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das FGG im 10 L-Batch- und Fed-Batch als IBs hergestellt werden konnte. Durch die Fed-Batch-Kultivierung wurde ausreichend FGG produziert, um die weiteren Aufreinigungs- und Charakterisierungsschritte aus einem Batch durchführen zu können. In Tabelle 7 werden die Batch- und die Fed-Batch-Kultivierung nochmals gegenübergestellt.

Tabelle 7: Daten und Ergebnisse der rekombinanten *E. coli* Batch- und Fed-Batch-Kultivierung zur Produktion von FGG im Vergleich.

10 L Kultivierung	Batch	Fed-Batch
Biotrockenmasse	3,4 g/L	37,1 g/L
Wachstumsrate	0,39 h ⁻¹	0,57 h ⁻¹
Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$	0,33	0,86
Ausbeutekoeffizient $Y_{P/S}$	25,1 mg/g	112 mg/g
Ausbeutekoeffizient $Y_{P/X}$	74,4 mg/g	129 mg/g
Proteinkonzentration	0,11 g/L	1,3 g/L
OD ₆₀₀	28,5	109
Produktionsphase	4 h	4 h
Kultivierungsdauer	14	18
Menge der Feed-Lsg.	-	670 mL
Glucose-Konzentration	10 g/L	56 g/L

Es konnte gezeigt werden, dass mittels Fed-Batch-Kultivierung eine wesentlich höhere Biotrockenmasse (37,1 g/L) produziert wurde. Außerdem ist die FGG-Konzentration im Fed-Batch Prozess höher, sodass innerhalb von 18 h Kultivierungsdauer 10-fach mehr FGG produziert werden kann.

3.2 Downstream Processing

In einer vorhergegangenen Arbeit wurden bereits erste Untersuchungen zur Aufreinigung von FGG durchgeführt. Da das FGG intrazellulär in IBs produziert wird, wurden zunächst die *E. coli*-Zellen aufgeschlossen und die IBs solubilisiert. Als Detergenz wurde Harnstoff (3 M) eingesetzt und die Solubilisierung wurde über die *freeze-thaw*-Methode durchgeführt. Da sich am FGG ein His-Tag befindet, konnte das Protein anschließend über eine Affinitätschromatographie (IMAC, Nickel-Ionen, HisTrap 1 mL) aufgereinigt werden. Zudem wurde ein Renaturierungsansatz durch *On-column-Renaturation* getestet. Dabei wurde das FGG während der IMAC ohne denaturierendes Agens in eine stabile lösliche Form überführt. Insgesamt konnte eine Reinheit von 51 % des FGG erzielt werden.

Für den Einsatz als Biomaterial sollte das Ziel der Aufreinigung sein, eine höhere Reinheit des FGG zu erzielen und die IBs in größerem Maßstab aufzureinigen und in eine lösliche Form zu überführen. Dementsprechend wurden die bereits erzielten Ergebnisse der vorherigen Arbeit berücksichtigt, um die Aufreinigung weiterzuentwickeln (Abbildung 28).

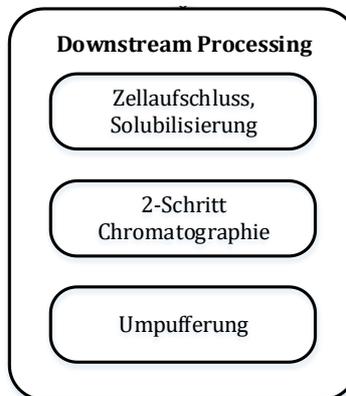


Abbildung 28: Ablauf des DSP. Nach dem Zellaufschluss und der Solubilisierung der IBs erfolgt eine Zwei-Schritt-Chromatographie, bei der zunächst die IMAC angewandt wurde und im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt wurde. Abschließend erfolgt die Umpufferung der aufgereinigten Probe zur Entfernung des Harnstoffes und zur Überführung in einen physiologischen Puffer für die weitere Anwendung in der Zellkultur.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die gesamte Aufreinigung des FGG die produzierten IBs des Fed-Batch-Prozesses verwendet. Die *E. coli* Zellen wurden aufgeschlossen und die gewonnenen IBs solubilisiert. Um die Löslichkeit des FGG zu verbessern wurde die Harnstoffkonzentration, während der Solubilisierung erhöht (5 M). Um die Reinheit des

FGG zu erhöhen wurde zusätzlich zur Affinitätschromatographie ein weiterer chromatographischer Aufreinigungsschritt - die Größenausschlusschromatographie – eingeführt. Dieser Schritt sollte das FGG von kleineren Fragmenten trennen. Das *on-column-Refolding* aus der vorhergegangenen Arbeit wurde nicht in den Aufreinigungsprozess integriert, da das Entfernen des Harnstoffs zu starken Proteinverlusten führt. Stattdessen wurden die Puffersysteme, während der chromatographischen Aufreinigung mit Harnstoff (5 M) versetzt und erst im Anschluss das Detergenz entfernt. Für die Anwendung als Biomaterial wurden verschiedene Umpufferungsstrategien getestet, um den Harnstoff aus dem System zu entfernen und das Protein möglichst stabil in Lösung zu halten.

3.2.1 Zellernte, Isolierung und Solubilisierung der Inclusion Bodies

Nach der Kultivierung konnte die Zellmasse durch Zentrifugation abgetrennt werden. Danach erfolgte die Weiterverarbeitung der Zellpellets. Das FGG wird in IBs hergestellt, sodass die Zellen aufgeschlossen werden mussten und drei Waschschritte mit dem Waschpuffer folgten, um weitere Zellreste zu entfernen. Ziel war es, die IBs in einem möglichst

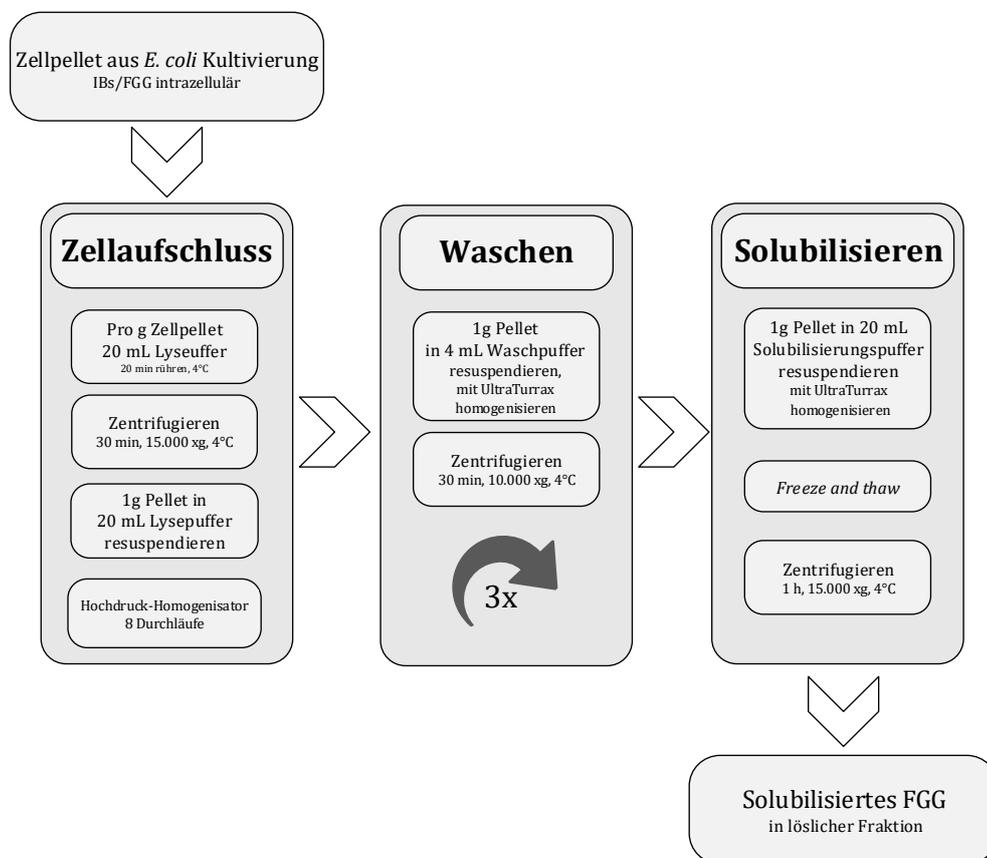


Abbildung 29: Ablauf von Zellaufschluss und Solubilisierung der IBs nach der Kultivierung mit *E. coli*. Die Zellen werden aufgeschlossen und die enthaltenen IBs gereinigt und solubilisiert.

reinen Zustand vorzufinden, um die Weiterverarbeitung des Proteins zu erleichtern. In Abbildung 29 ist das etablierte Protokoll zur Gewinnung der IBs dargestellt.

Nach Zellaufschluss folgten drei Wasch- und Zentrifugationsschritte (Puffer siehe Kapitel A.4) um die IBs von den Zellresten zu trennen. Im Waschpuffer ist unter anderem Triton enthalten, das die Zellmembran zerstört und EDTA zur Auflösung der Lipopolysaccharide aus der Zellmembran [106]. Die Effizienz der einzelnen Schritte wird durch die SDS-PAGE in Abbildung 30 deutlich. Durch die Waschschritte konnten intrazelluläre Proteine und Zellbestandteile von den IBs getrennt werden. In der unlöslichen Fraktion zeichnet sich eine deutliche Bande bei ca. 50 kDa ab, welche mit der Größe des FGGs übereinstimmt. Die aufgereinigten IBs wurden für weitere Anwendungen solubilisiert.

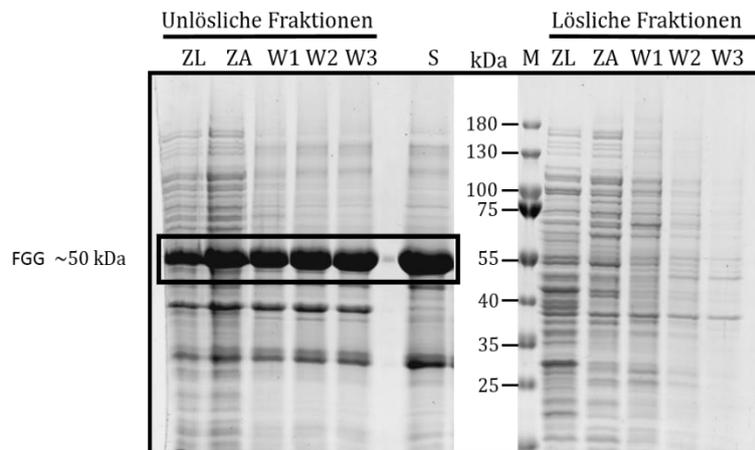


Abbildung 30: SDS-PAGE der Zellyse, der Waschschritte und der Solubilisierung nach der Kultivierung von FGG mittels *E. coli*. ZL = Vor Zellyse; ZA = Nach Zellyse; W1-3 = Waschschritte 1-3; S = Nach Solubilisierung; M= Größenstandard (ThermoFisher Prestained Protein Ladder). 10 μ L Proben-, 5 μ L Größenstandard. Die Banden im Bereich des FGG (ca. 50 kDa) wurden hervorgehoben.

Mit 5 M Harnstoff im Solubilisierungspuffer (siehe Kapitel A.4) konnten die IBs gelöst werden und das Protein lag ungefaltet vor. Die IBs wurden dazu in dem Solubilisierungspuffer homogenisiert und für 16 Stunden bei -20°C eingefroren und anschließend bei 21°C aufgetaut. Durch diese *freeze-thaw-cycle* Methode konnte das unlösliche FGG in Lösung gebracht werden. Die Methode ist durch das langsame Einfrieren und Auftauen des Proteins eine schonende Methode und gleichzeitig ist diese Methode im Vergleich zu herkömmlichen Denaturierungsmethoden effizienter, da größere Mengen Protein solubilisiert werden [107]. Vor dem Zellaufschluss konnte eine Reinheit des FGG von 35 % mittels densitometrischer Analyse bestimmt werden. Nach dem Zellaufschluss und mithilfe der eingeführten Wasch- und Solubilisierungsschritte konnte die Reinheit des Proteins auf

56 % gesteigert werden. Die Ausbeuteberechnung ergab sich aus dem Feuchtgewicht der Zellpellets (VZ) sowie dem Feuchtgewicht der IBs nach dem dritten Waschschrift (W3). Die Ausbeute an IBs beträgt 33 %. Neben der Ausbeutebestimmung wurde die Proteinkonzentration der solubilisierten IBs mittels Bradford-Test bestimmt. Die Konzentration lag bei ca. 4 mg/mL. Ein Großteil der Verunreinigungen konnte entfernt werden, jedoch sollten im weiteren Verlauf chromatographische Methoden getestet werden, um eine verbesserte Reinheit des FGG zu erzielen.

3.2.2 Aufreinigung des rekombinanten FGGs mittels Zwei-Schritt-Chromatographie

Das FGG wurde solubilisiert und soll nun weiter aufgereinigt werden. Neben dem Zielprotein FGG befinden sich noch weitere zelleigene Proteine in der Lösung, die sich durch die vorher angewendeten Waschschrift nicht entfernen ließen. Aus diesem Grund folgen chromatographische Aufreinigungsschritte, die das FGG Protein von diesen Verunreinigungen separieren soll. Der erste chromatographische Schritt ist die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Da sich am FGG ein His10-Affinitätstag befindet, konnte diese Methode verwendet werden. Im Anschluss daran wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt, um kleinere Fragmente vom FGG zu trennen und die Reinheit zu steigern.

Schritt 1: Affinitätschromatographie

In der vorherigen Arbeit von Sabrina Grünert [100] wurde bereits eine Affinitätschromatographie mit den solubilisierten IBs durchgeführt. In ihrer Arbeit wurde ein TBS-Puffersystem und Nickel-Ionen als Metallchelate in der Affinitätschromatographie getestet. Es konnte lediglich eine Reinheit von 51 % erreicht werden.

Um die Reinheit zu erhöhen und die Proteinverluste zu verringern wurden in dieser Arbeit die in Abbildung 31 aufgelisteten Parameter untersucht.

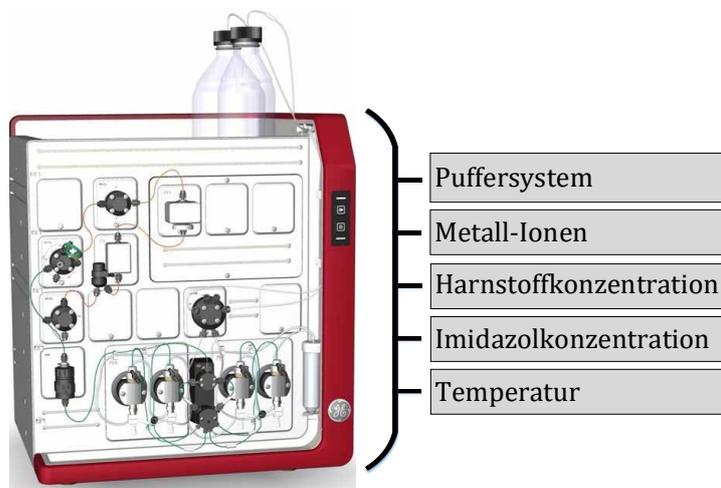


Abbildung 31: Prozessparameter, die für die Aufreinigung mittels IMAC mit dem Äkta-Pure-System untersucht wurden [135].

Für die Optimierung des Aufreinigungsprotokolls (siehe [100]) wurden zunächst das Puffersystem (TBS-, MOPS-, Natriumphosphat-Puffer) und die Wahl der immobilisierten Metall-Ionen (Nickel-, Cobalt-, Zink-, Kupfer-Ionen) während der Affinitätschromatographie variiert. Im weiteren Verlauf wurden die Harnstoff- und Imidazolkonzentration im Puffersystem und die Umgebungstemperatur getestet und im Anschluss das optimierte System auf eine größere Affinitätssäule (5 mL) übertragen.

Wahl des Puffersystems

Zunächst wurden verschiedene Puffersysteme für die IMAC getestet. Neben dem bisher verwendeten Tris-HCl-Puffer sind MOPS- und Natriumphosphatpuffer (50 mM, 150 mM NaCl, pH 8) eingesetzt worden, um die Bindeeffizienz des FGGs an die Säule zu testen [108]. Bei der Säule handelt es sich um eine HisTrapTMHP-Säule (1 mL, GE). Durch die densitometrische Analyse und die Beobachtungen aus den Chromatogrammen konnte gezeigt werden, dass das Tris-HCl- und das Natriumphosphat-Puffer System am besten geeignet sind, um FGG mittels IMAC aufzureinigen (Abbildung 32A,B). Es ergab sich mit dem Tris-HCl-Puffersystem eine Reinheit von 63,5 % und mit dem Natriumphosphat-Puffersystem eine Reinheit von 57,5 %, während durch das MOPS-Puffersystem kein FGG eluiert werden konnte. Dies könnte sowohl an der Instabilität des Proteins im Puffer liegen als auch an der Fehlfaltung des Proteins, sodass keine Bindung an die

Säulenmatrix möglich ist. Dieser Trend spiegelt sich ebenfalls in der Elutions-Peakfläche im Chromatogramm wider (Abbildung 32A).

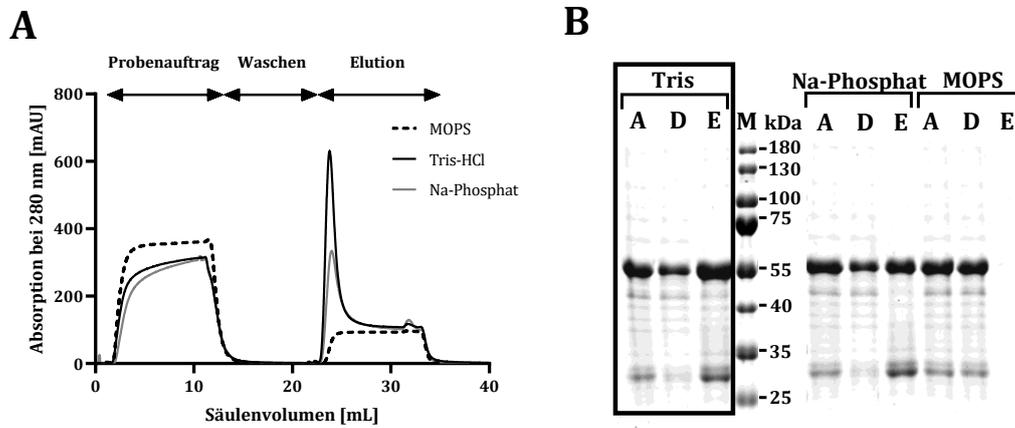


Abbildung 32: Chromatographische Aufreinigung von FGG mittels IMAC. (A) Chromatogramm der FGG-IMAC-Aufreinigung mit drei verschiedenen Puffersystemen (MOPS-, Natriumphosphat und Tris-HCl-Puffer). Elution erfolgt isokratisch mit 250 mM Imidazol. (B) Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung.

Mit dem Tris-HCl- und dem Natriumphosphat-Puffersystem kann am meisten Protein an die Säule binden und somit durch die Elution mit Imidazol die größte Menge Protein gewonnen werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde das Tris-HCl-Puffersystem verwendet.

Tabelle 8: Vergleich der Peakflächen und der densitometrisch ermittelten Reinheiten bei der Durchführung der IMAC mit verschiedenen Puffersystemen.

Puffersystem	Reinheit	Peakfläche ^a [mAU*mL]
Tris-HCl	63,5 %	583,5
Natriumphosphat	57,5 %	319,5
MOPS	/	0

^a Nach Abzug der Eigenabsorption des zur Elution verwendeten Imidazols.

Wahl der immobilisierten Metall-Ionen

Neben dem Puffersystem wurde geprüft, wie sich die unterschiedlichen Metall-Ionen (Zink, Kupfer, Cobalt und Nickel) auf der Affinitätsäule auf das Bindeverhalten des FGGs auswirken. Es ist bekannt, dass die Stärke der Bindung zwischen Protein und den Metall-Ionen von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Unter anderem sind die Struktur und Eigenschaft des Zielproteins und der vorhandene Affinitäts-Tag entscheidend für eine effiziente Aufreinigung. Außerdem sind der pH-Wert und die Zusammensetzung des Bindepuffers entscheidend. Nickel-Ionen weisen die stärkste Wechselwirkung zu Histidin-markierten Proteinen auf, für bestimmte Anwendungen können je nach Proteinausbeute oder Proteinreinheit andere Metall-Ionen besser geeignet sein (Abbildung 33).

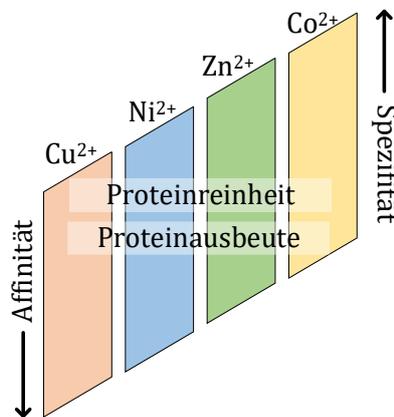


Abbildung 33: Inverse Assoziation von Affinität/Kapazität und Spezifität von Metallionen für His-tags. In Anlehnung an [109].

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden die vier Metall-Ionen (Zink, Kupfer, Cobalt und Nickel) auf eine HiTrap-Säule (1 mL, GE) immobilisiert und das solubilisierte FGG im Tris-HCl-Puffersystem auf die jeweiligen Säulen aufgetragen. Die Elutionspeaks in Abbildung 34A zeigen, dass die immobilisierten Nickel- und Zink-Ionen für die Aufreinigung des FGGs am besten geeignet sind. Die densitometrische Analyse der Elutionsfraktionen unterstützt diese Beobachtung (Abbildung 34B). Die Cobalt- und Kupfer-Ionen konnten im Vergleich deutlich weniger FGG während der chromatographischen Aufreinigung binden.

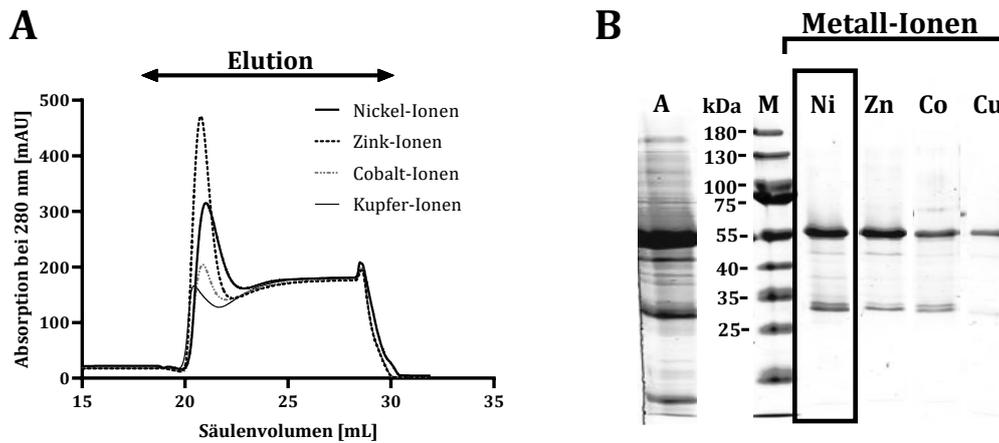


Abbildung 34: (A) Chromatogramm der FGG-Aufreinigung mit vier unterschiedlich immobilisierten Metall-Ionen (Nickel, Cobalt, Kupfer und Zink-Ionen). Die IMAC-Durchläufe wurden mit der HiTrap™ IMAC HP-Säule, 1 mL im TBS-Puffersystem durchgeführt. Probenauftragsvolumen: 1 mL. Flussrate: 1mL/min. Die Elution erfolgte isokratisch mit 250 mM Imidazol. (B) Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung. A: Auftrag – aufgetragen sind Proben der solubilisierten IBs.

Die Ausbeute und Reinheit wurden densitometrisch bestimmt (Tabelle 9) und bestätigten die Beobachtungen. Alle weiteren chromatographischen Untersuchungen wurden mit Nickel-beladener Säule durchgeführt.

Tabelle 9: Analyse der Elutionsfraktionen durch densitometrische Bestimmung der SDS-PAGE. Ausbeute- und Reinheitsbestimmung der Elutionsfraktionen der Chromatographie mit Nickel-, Zink-, Cobalt- und Kupfer- Metallionen.

Metallionen	Nickel	Zink	Cobalt	Kupfer
Ausbeute in %	86,2	83,5	64,5	44,2
Reinheit in %	89,8	86,1	83,8	90,9

Optimierung von Temperatur, Harnstoff- und Imidazolkonzentration

Um die Bedingungen zur Aufreinigung von FGG zu verbessern, wurden der Einfluss der Temperatur, der Harnstoffkonzentration im Bindepuffer und die Imidazolkonzentration im Elutionspuffer und die damit resultierende FGG-Ausbeute untersucht (Abbildung 35).

Zunächst wurden zwei verschiedene Temperaturen während der Aufreinigung getestet. Die Veränderung der Umgebungstemperatur von 10°C auf 20°C soll bewirken, dass sich die Bindung zum Säulenmaterial verbessert. Dazu wurde eine FGG Probe auf die His-Trap-Säule aufgetragen und lediglich die Temperatur des IMAC-Durchlaufes verändert. In Abbildung 35A ist anhand des Elutionspeak bei 80 mL Säulenvolumen deutlich zu erkennen, dass die IMAC bei 20°C durchgeführt werden muss, da bei niedrigeren Temperaturen das FGG nicht an die Säule bindet und somit kein Protein in der Elutionsfraktion wiederzufinden ist.

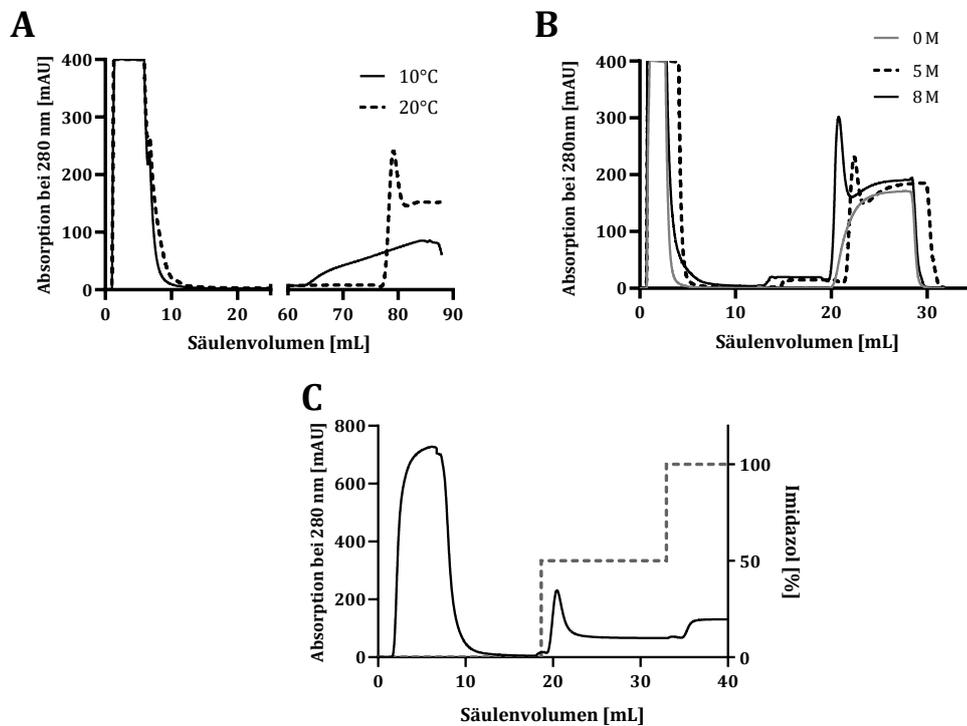


Abbildung 35: Chromatogramme der Affinitätschromatographie von FGG. (A) Chromatographische Aufreinigung von FGG mit verschiedenen Umgebungstemperaturen (10°C, 20°C). (B) Chromatographische Aufreinigung von FGG mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen im Bindepuffer (0 M, 5 M, 8 M). (C) Chromatographische Aufreinigung von FGG mit einem Imidazolgradienten während der Elution. 100 % Imidazol entsprechen 500 mM Imidazol.

Um das Ausfallen des FGG auf der Säule zu verhindern, wurde das gesamte Puffersystem mit Harnstoff versetzt. In Abbildung 35B sind die Ergebnisse der IMAC dargestellt, bei der zwei verschiedene Harnstoffkonzentrationen (5 M, 8 M) im Puffersystem getestet wurden. Ohne Zusatz von Harnstoff bindet kein FGG an die Säule und dementsprechend wurde kein Protein bei 20 mL Säulenvolumen eluiert. Mit 5 M und 8 M Harnstoff konnte das FGG an die Säule binden. Im Chromatogramm sind daher deutliche Elutionspeaks

bei 20 mL Säulenvolumen zu sehen. Für die weiteren Aufreinigungsschritte wurde eine Harnstoffkonzentration von 5 M gewählt, da neben dem hohen Verbrauch des Harnstoffs (8 M) starke Ablagerungen des Harnstoffes im FPLC-System nicht zu verhindern sind.

Zuletzt wurde geprüft, mit welcher Imidazolkonzentration das FGG eluiert und ob durch eine Vorstufe mit geringerer Imidazolkonzentration Verunreinigungen eluieren. Um dies zu testen wurde ein Stufengradient verwendet (250 mM, 500 mM). In Abbildung 35C ist deutlich zu sehen, dass zur vollständigen Elution lediglich 250 mM ausreichen, um das FGG isokratisch von der Säule zu verdrängen. Verunreinigungen konnten mit der Vorstufe nicht entfernt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IMAC (1 mL, HisTrap) am effizientesten mit einem Tris-HCl-Puffersystem (50 mM, pH 8, 150 mM NaCl) mit Harnstoff (5 M) als Zusatz durchgeführt werden kann. Die höchste Reinheit und beste Ausbeute wurde mit einer Nickel-beladenen Säule, 21°C Umgebungstemperatur und einer Imidazolkonzentration von 250 mM im Elutionspuffer erreicht. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden genutzt, um das System auf eine 5 mL-Affinitätssäule zu übertragen.

Übertragung auf eine 5 mL HisTrapTM-HP Säule

Die optimierten Bedingungen aus den vorherigen Kapiteln zur Aufreinigung von FGG mittels Affinitätschromatographie wurden im weiteren Verlauf auf eine größere Säule (5 mL, HisTrapTM-HP) übertragen. Durch die Übertragung auf eine größere Säuleneinheit können größere Mengen FGG aufgereinigt werden, was unter anderem wichtig ist in Bezug auf die Anwendung als Biomaterial, da in diesem Bereich große Mengen des aufgereinigten Proteins benötigt werden. Die Parameter konnten auf die 5 mL Säule übertragen werden und aus der Analyse des Elutionspeaks mittels SDS-PAGE wird deutlich, dass das FGG Protein an die Säulenmatrix gebunden hat und durch die Elution mit Imidazol von der Säule verdrängt wurde (Abbildung 36).

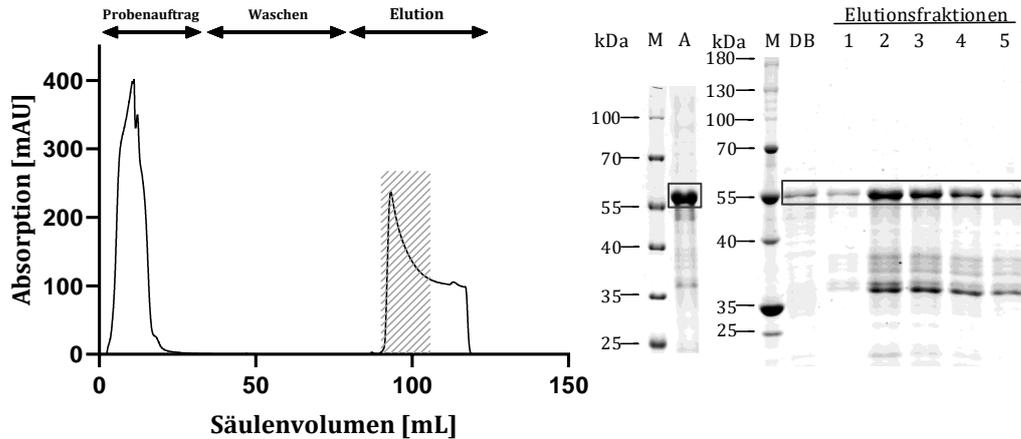


Abbildung 36: (A) Chromatogramm vom IMAC Lauf mit 5 mL HisTrap™-Säule. Injektionsvolumen 10 mL (3,9 mg/mL), Imidazolkonzentration=250 mM. In Dunkelgrau der Elutionspeak markiert. (B) Zugehöriges SDS-Gel. A= Auftrag, DB = Durchbruch, 1-5: Elutionsfraktionen (dunkelgrau) M= Marker (ThermoFisher Prestained Protein Ladder); 10 µL Proben- und 5 µL Markervolumen.

Neben dem FGG sind weitere Proteinfragmente in den Elutionsfraktionen detektiert worden. Für die densitometrische Berechnung der Reinheit wurde daher sowohl die FGG-Hauptbande als auch die FGG-Fragmente miteinbezogen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammenfassung der densitometrischen Reinheitsbestimmung der Auftrags- und Elutionsfraktion der IMAC mit 5 mL Histrap™-Säule in Bezug auf das FGG Protein.

	Reinheit [%]		Ausbeute [%]
	FGG	FGG+Fragment	FGG
Solubilisiertes FGG (Auftrag)	56,4 %	69,8 %	100 %
Elutionspeak	64,3 %	83,8 %	26,7 %

Deutlich wird, dass bei alleiniger Betrachtung der FGG-Hauptbande, die Reinheit lediglich um 8 % erhöht werden konnte. Auch unter Einbezug der FGG-Fragmente ist die Reinheit nach der IMAC um lediglich 14 % gestiegen. Demzufolge ist die Aufreinigung mittels IMAC möglich, die Reinheit des FGGs steigt in diesem Zusammenhang aber nur minimal. Zur Beurteilung der Ausbeute wurde die Proteinkonzentration vor und nach der IMAC mittels Bradford-Test ermittelt. Im Anschluss wurde diese mit dem Volumen

und der Reinheit verrechnet (Tabelle 10). Es ergibt sich eine Proteinausbeute nach der IMAC von ca. 27 %.

Zusammenfassend hat die Reinheitsanalyse und Ausbeutebestimmung ergeben, dass die Aufreinigung von FGG mittels Affinitätschromatographie sowohl mit einer 1 mL- als auch 5 mL-Säule durchgeführt werden konnte. Die erreichte Reinheit des FGG Proteins (64 %) könnte für die Anwendung als klinisches Material problematisch sein, sodass ein weiterer Aufreinigungsschritt integriert werden sollte. Der Reinheitsunterschied zwischen gereinigten IBs und dem Protein nach Affinitätschromatographie ist zu gering. Demnach ist der Schritt der Affinitätschromatographie keine wirkliche Verbesserung hinsichtlich der Produktqualität. Der hohe Produktverlust deutet darauf hin, dass ein Teil des FGG keinen His-Affinitätstag besitzt oder der HisTag durch die Proteinfaltung sterisch nicht zugänglich ist. Die optimierten Prozessparameter aus den vorhergehenden Kapiteln sind im Anhang B (B.5.3 Metallchelat-Affinitätschromatographie (HiTrap Column 5 mL)) zusammengefasst.

Schritt 2: Größenausschlusschromatographie

Um kleinere Fragmente vom FGG zu trennen und damit die Reinheit zu erhöhen, wurde als weiterer Aufreinigungsschritt die Größenausschlusschromatographie (SEC, HiLoad® Superdex® 75 pg) verwendet. Dabei handelt es sich um poröses Material, das Proteine, Peptide und andere Biomoleküle, die ein relatives Molekulargewicht von 3000 bis 70000 aufweisen, effizient und schnell auftrennen kann [110]. Für die Auftrennung mittels SEC wurden die Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie (siehe S.58) mit Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8, 150 mM NaCl, 5 M Harnstoff) auf die Säule aufgetragen. In Abbildung 37A ist zu erkennen, dass die Probe in zwei Peaks aufgetrennt wurde. Während sich in Peak B die Rückstände des Elutionspuffers aus der IMAC befinden (Imidazol),

ist in Peak A das FGG enthalten. Durch den vergrößerten Ausschnitt (Abbildung 37B) sind zwei Peaks zu erkennen, die sich überlagern (Säulenvolumen 45-60 mL).

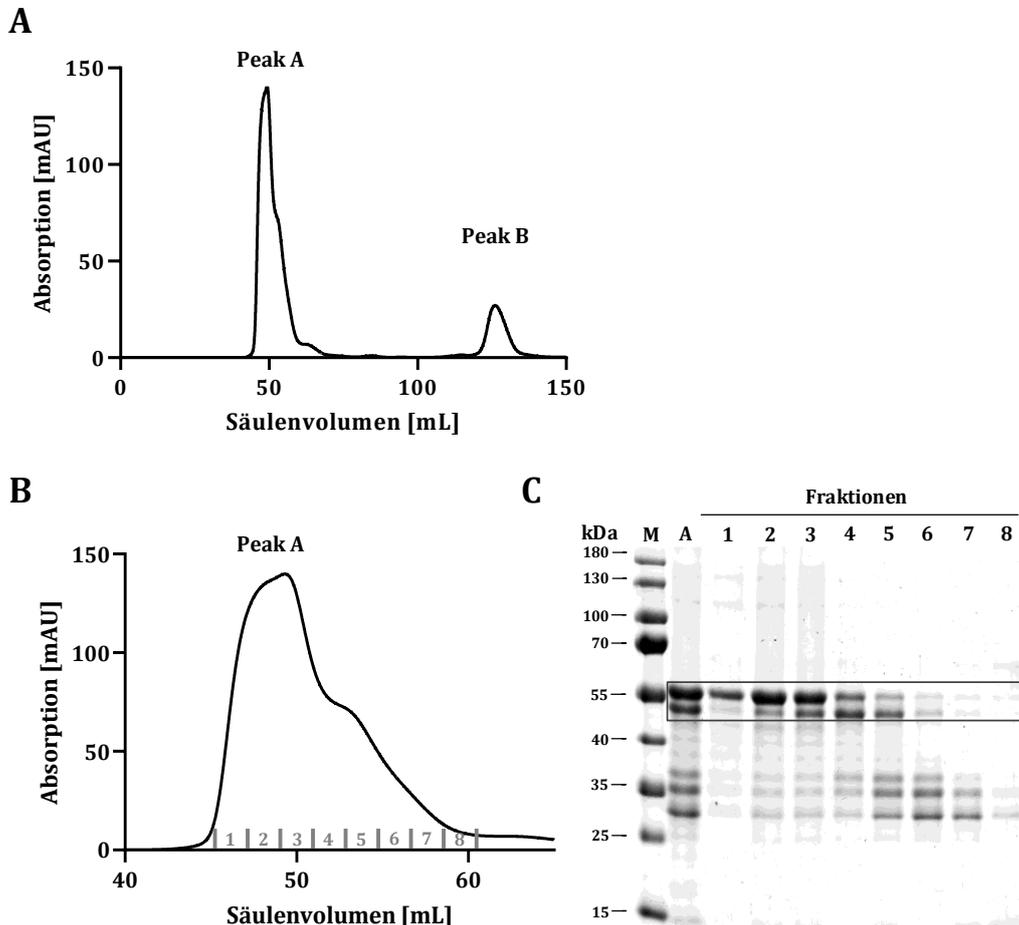


Abbildung 37: (A) Größenausschlusschromatographie (SEC, HiLoad® Superdex® 75 µg) mit einem Auftragsvolumen von 5 mL. Flussrate: 0,8 mL/min. Probenauftrag: Elutionsfraktion der Affinitätschromatographie (siehe Seite 58). (B) Vergrößerter Ausschnitt des Chromatogramms (A). 1-8 entsprechen den Fraktionsnummern, die mittels SDS PAGE (C) analysiert wurden. Die Reinheit des FGG wurde densitometrisch bestimmt.

Die Analyse der einzelnen Fraktionen zeigt, dass kleinere Fragmente bei ca. 35 kDa abgetrennt werden konnten. Mit der SEC konnte eine deutliche Steigerung der Reinheit (91,4 %) des FGG im Vergleich zu der IMAC erzielt werden (Abbildung 37C, Fraktion 1). Zur Beurteilung der Ausbeute wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test ermittelt und im Anschluss mit dem Volumen und der Reinheit verrechnet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Bestimmung der FGG Ausbeute für die SEC Fraktionen 1-3.

	Probenauftrag	F1	F1-F3
Konz. Bradford-Test [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1000	200	350 ^a
Menge FGG in [μg]	2804,79	365,78	1795,7
Ausbeute FGG [%]	100	13	63
Reinheit [%]	64,3	91,4	86

Die berechnete Ausbeute zeigt, dass mit Steigerung der Reinheit der Verlust an FGG größer wird. Werden die Fraktionen F2 und F3 zusätzlich zur Fraktion F1 berücksichtigt, so erhöht sich die Ausbeute auf 63 %. Die Reinheit der Probe sinkt dementsprechend auf 86 %. Für jede individuelle Anwendung ist es daher sinnvoll, die geeignete Kombination aus Ausbeute und Reinheit zu finden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mittels SEC eine hohe Produktreinheit des FGG (91,4 %) erreicht wurde. Es könnte weiterhin untersucht werden, ob der erste Aufreinigungsschritt ausgelassen werden sollte und die gelösten IBs direkt auf die SEC Säule aufgetragen werden sollten. Somit würde man sich den Produktverlust durch den Schritt sparen und gleichzeitig das FGG in hoher Reinheit erhalten.

3.2.3 Umpufferung

Im Anschluss an die chromatographische Aufreinigung wurde ein Pufferwechsel durchgeführt, um den Harnstoff zu entfernen und das FGG in einen physiologischen Puffer zu überführen. Für die weitere Anwendung in der Zellkultur ist die Verwendung eines physiologischen Puffers essenziell. Daher war es wichtig zu prüfen, wie sich das FGG im physiologischen Puffer verhält, da durch Entfernen des Harnstoffs die Löslichkeit des Proteins problematisch sein könnte. Daher wurde der PBS-Puffer mit drei unterschiedlichen Zusätzen versetzt (L-Arginin, BSA und Magnesiumchlorid/Calciumchlorid). L-Arginin soll einen positiven Einfluss auf die Protein-Löslichkeit haben, indem es Protein-Protein und Protein-Oberflächen Interaktionen unterdrückt [111]. BSA wird ebenfalls häufig zur Stabilisierung von Lösungen verwendet, da es unspezifische Bindungen des

Proteins verhindert [112]. Da die Ionenstärke ebenfalls einen Einfluss auf die Löslichkeit von Proteinen hat, wurde außerdem untersucht, ob der Zusatz von Magnesium- und Calciumionen die Löslichkeit des FGG verbessert [113]. Die Überführung des FGG in den jeweiligen Puffer erfolgte über eine Vivaspin® Diafiltrationseinheit. Im Anschluss wurde die FGG-Ausbeute über die SDS-PAGE sowie durch Messung der Proteinkonzentration vor und nach der Umpufferung bestimmt (Abbildung 38).

Weder der Zusatz von BSA noch von L-Arginin oder den zweiwertigen Ionen hat zu einer

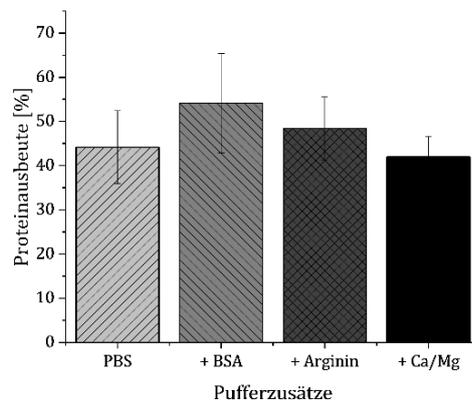


Abbildung 38: Proteinausbeute nach der Umpufferung des FGG Proteins (Elutionsfraktion der IMAC) mit Vivaspin® Ultrafiltrations-Einheiten in PBS Puffer (pH 7.4) mit L-Arginin, BSA oder MgCl₂/CaCl₂. Ausbeuteberechnung über Konzentrationsbestimmungen vor und nach der Umpufferung sowie densitometrische Analyse der SDS-PAGE.

signifikant höheren FGG-Ausbeute geführt. Nach Umpufferung in PBS-Puffer lag die Ausbeute bei etwa 50 %. Im Anschluss an die Umpufferung wurde die FGG-Lösung für die Verwendung in der Zellkultur sterilfiltriert.

3.2.4 Fazit der Aufreinigung von FGG

Das heterolog exprimierte FGG wurde zunächst in einer 10L-Fed-Batch-Kultivierung in IBs hergestellt. Die *E. coli* Zellen wurden mittels Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen und die IBs durch ein optimiertes Protokoll gereinigt und mithilfe von Harnstoff solubilisiert. Nach dem Zellaufschluss und der Solubilisierung konnte eine Reinheit des FGG von 56,5 % festgestellt werden. Es folgte eine Zwei-Schritt Chromatographie, um die Reinheit des Proteins zu steigern. Im ersten Schritt wurde eine IMAC durchgeführt. Nach mehreren Optimierungsschritten hinsichtlich Umgebungstemperatur, Harnstoffkonzentration, Imidazolkonzentration, Puffersystem und Wahl der Metall-Ionen konnte die Reinheit des FGG nicht signifikant erhöht werden (64,3 %). Ein Teil des Proteins scheint

unter allen getesteten Bedingungen nicht die nötige Affinität zur Säule aufzuweisen, da in jedem Versuchsansatz ein Teil des Proteins im Durchbruch nachgewiesen werden konnte. Grund dafür könnte sein, dass der His-Tag nicht zugänglich ist und dadurch keine Interaktion mit der Säule möglich ist. Bei dem zweiten chromatographischen Schritt handelte es sich um die SEC, mit der eine Reinheit von 91,4 % erreicht wurde. Das FGG konnte durch Größenausschluss von niedermolekularen Proteinen getrennt werden. Für klinische Anwendung könnte eine höhere Reinheit nötig sein, sodass das FGG in diesem Bereich verwendet werden kann. Eine Produktreinheit von 91,4 % geht jedoch mit hohem Produktverlust einher. Werden bei der SEC mehrere Fraktionen betrachtet, so könnte durch Verzicht von einem geringen Maße an Reinheit eine Steigerung der Gesamtausbeute auf das Fünffache erreicht werden. Daher ist es sinnvoll, dass für jede Anwendung des rekombinanten FGG individuell zwischen Reinheit und Ausbeute abgewogen werden sollte.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Reinheiten und Ausbeuten der einzelnen Aufreinigungsschritte.

	Reinheit FGG	Gesamtausbeute
Solubilisierung der IBs	56,4 %	100 %
IMAC	64,3 %	26,7 %
SEC	91,4 %	3,5 %

Da die IMAC keine signifikante Verbesserung der Aufreinigung von FGG hervorgebracht hat, könnte eine andere Strategie in Betracht gezogen werden. Interessant wäre die direkte Nutzung der IBs, so wäre der Produktverlust minimal und die Kosten der Aufreinigung könnten gespart werden – sofern die Reinheit des Proteins im Bereich <70 % genügt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Weg der chromatographischen Aufreinigung gezeigt werden konnte, womit lösliches FGG in hoher Reinheit gewonnen werden kann. Die Überführung des aufgereinigten Proteins in einen physiologischen Puffer und die anschließende Sterilfiltration ermöglichen die Charakterisierung des Proteins in der Zellkultur.

3.3 Produktanalytik

3.3.1 Crosslinking von FGG mittels Faktor XIII

Eine Möglichkeit das rekombinant hergestellte FGG zu charakterisieren ist, zu schauen, inwiefern das FGG durch Zugabe von Faktor XIII und Thrombin polymerisiert. Wie im nativen Fibrinogen, befinden sich im FGG Vernetzungsstellen (Gln398 und Lys406), die für die Polymerisation frei zugänglich sein müssen. Dazu wurde die Polymerisation des FGG (170 µg/mL) mit Faktor XIII (0,5 mg/mL, 1,1 U/mL) und mit der Zugabe von Thrombin (0,1 U/mL) eingeleitet. Die Reaktion wurde bei 37°C und in 50 mM TBS-Puffer (pH 7,4) durchgeführt und in Intervallen durch Zugabe von 1 % SDS und 2 % 2-Mercaptoethanol beendet. Vor Zugabe von Faktor XIII und Thrombin wurde allein FGG mit 1 % SDS und 2 % 1-Mercaptoethanol als Kontrolle versehen. Anhand der SDS-PAGE-Analyse konnte gezeigt werden, dass das FGG vernetzt werden konnte und nach 30 min Dimere (ca. 100 kDa) und FGG-Strukturen mit höherem Molekulargewicht ausgebildet wurden.

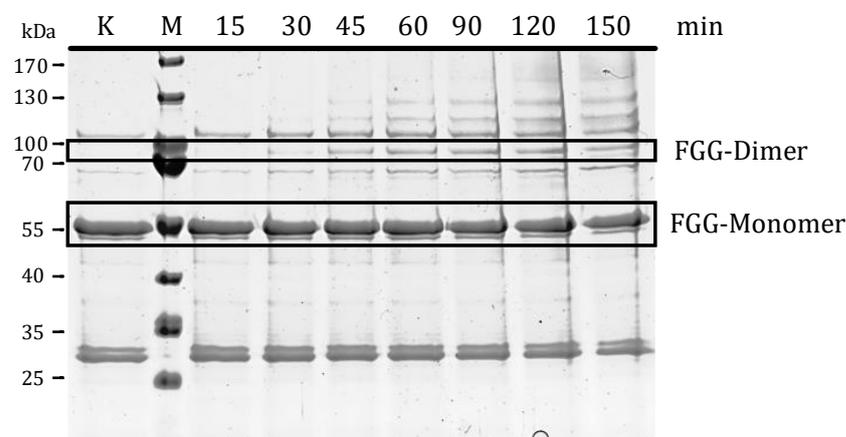


Abbildung 39: Polymerisationstest des rekombinanten FGG mit FXIII. Die Proben wurden nach direkter Zugabe von Thrombin und Faktor XIII (K) und nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C aufgetragen.

3.3.2 Stabilitätstest

Neben der Funktionalität des FGGs wurde die Lagerungsstabilität des Proteins geprüft. Dazu wurde das Protein in verschiedene Puffersysteme überführt und über mehrere Tage bei 21°C (RT) gelagert. Zum einen wurde das Protein in TBS-Puffer mit 5 M Harnstoff als Zusatz und zum anderen in PBS-Puffer ohne Zusatz gelagert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten (Tag 0, 2, 4) wurde mittels SDS-PAGE analysiert, wieviel FGG sich in Lösung

befindet (Abbildung 40). Die Konzentrationsbestimmung des FGGs in PBS-Puffer ergab, dass nach vier Tagen nur noch 10 % des Proteins in Lösung vorlag. Währenddessen lag das FGG im Puffer mit Harnstoff über den gesamten Zeitraum in Lösung vor. Diese Feststellung unterstützt die vorher erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Instabilität des Proteins ohne Zusatz von Detergenzien.

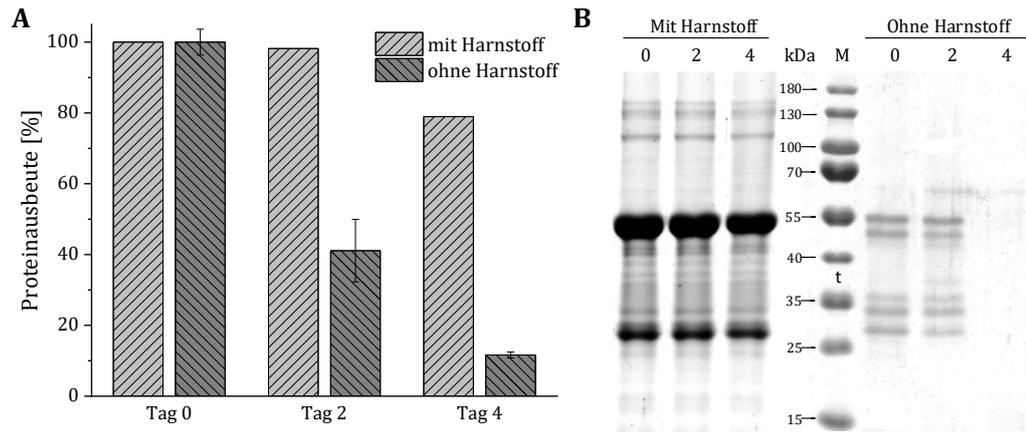


Abbildung 40: Analyse der Lagerungsstabilität von FGG in verschiedenen Puffersystemen (Tris-HCl-Puffer mit Harnstoff (5 M) als Zusatz, PBS-Puffer ohne Harnstoff, beides pH 8) bei Raumtemperatur nach 0, 2 und 4 Tagen. (A) Berechnung der Ausbeute über Konzentrationsberechnungen mit Bradford-Test und densitometrischen Analysen der SDS-PAGE (B) SDS-PAGE. 0=Tag 0; 2=Tag 1; 4=Tag 4 M= Größenstandard (ThermoFisher Prestained Protein Ladder). 10 μ L Proben- und 5 μ L Markervolumen.

3.4 Charakterisierung von FGG in der Zellkultur als Biomaterial

Das rekombinante FGG könnte eine Alternative zu kommerziell erwerblichem Fibrinogen darstellen, indem es in der Zellkultur als Oberflächenbeschichtung verwendet wird oder durch weitere Modifikationen als Biotinte im Bereich 3D-Biodruck eingesetzt werden könnte. Nachdem das FGG in *E. coli* produziert und mittels Zwei-Schritt Chromatographie aufgereinigt werden konnte, sollten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Biokompatibilität und der Verwendung als Beschichtungsmaterial durchgeführt werden (Abbildung 41).

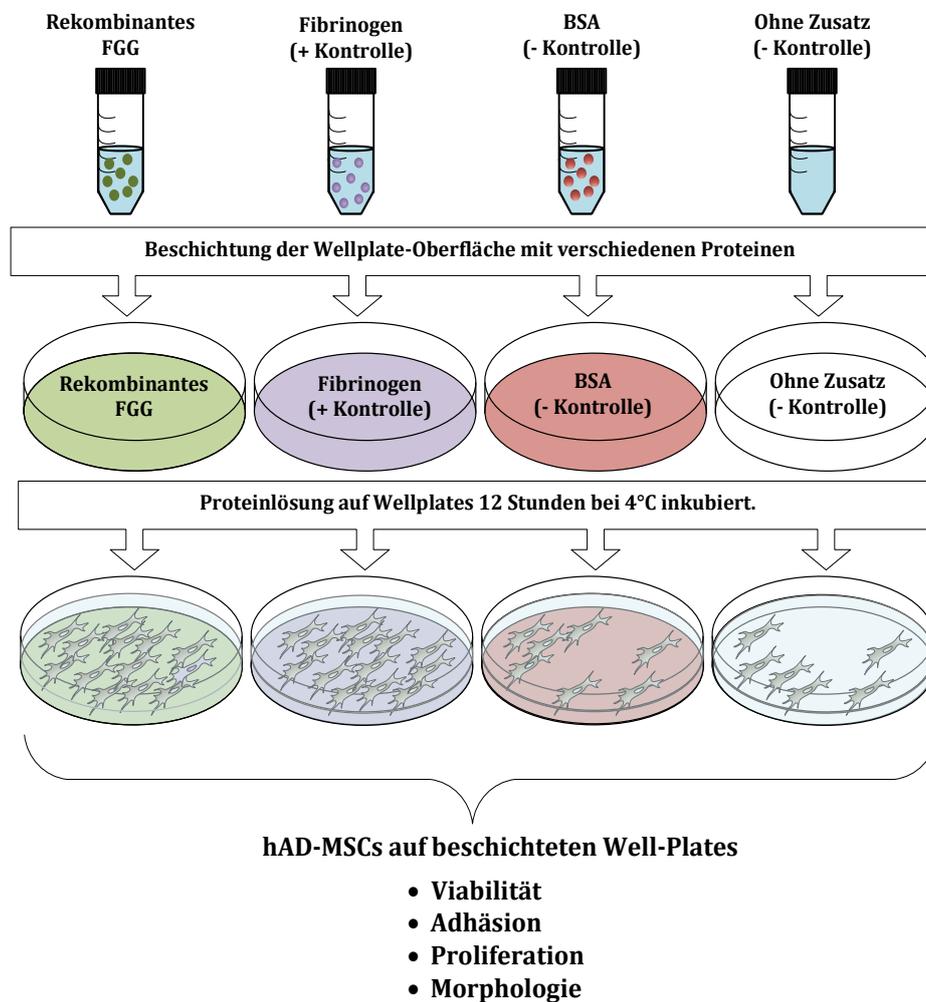


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Beschichtungs- und Biokompatibilitätsuntersuchungen. Neben dem rekombinant produzierten FGG wurde Fibrinogen als Positiv- und BSA als Negativkontrolle verwendet.

Die hohe Anzahl an Integrin-Bindestellen in der FGG-Sequenz ist für die Nutzung von FGG als Beschichtungsmaterial besonders interessant, da sich auf Stammzellen Integrine

befinden und diese an die Integrin-Bindestellen des FGGs binden können. Für die nachfolgenden Versuche wurde nach der Aufreinigung eine Umpufferung durchgeführt, um FGG vom Harnstoff zu befreien und in einen physiologischen Puffer zu überführen. Das FGG wurde in der Zellkultur auf Biokompatibilität und als Oberflächenbeschichtung in Bezug auf adhärente mesenchymale Stammzellen getestet (hAD-MSCs) (Versuchsaufbau, Abbildung 41). Als Positiv-Kontrolle wurde kommerziell erhältliches Fibrinogen verwendet und als Negativ-Kontrolle BSA. Das BSA besitzt keine Integrin-Bindestellen, sodass die hAD-MSCs keine Möglichkeit haben mit dem FGG zu interagieren. Die Wellplatten wurden mit einer Proteinkonzentration von 500 µg/mL beschichtet (12 h, 4°C). Nachdem die Proteinlösung entfernt wurde, wurde mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend hAD-MSCs auf die jeweiligen Oberflächen ausplattiert. Die Zellen auf der FGG-Oberfläche wurden in den nachfolgenden Kapiteln hinsichtlich Viabilität, Adhäsion, Proliferation und Morphologie untersucht und mit den Positiv- und Negativkontrollen verglichen.

3.4.1 Biokompatibilität von FGG

Zunächst wurde untersucht, ob das FGG biokompatibel ist. Dafür wurde der CellTiter-Blue Viabilitätstest durchgeführt. Der CTB-Assay beruht darauf, dass lebende Zellen die farblose Redox-Substanz Resazurin in den Farbstoff Resorufin umwandeln können. Das messbare Fluoreszenz-Signal des Resorufins ist proportional zur Viabilität der Zellen. Die hAD-MSCs wurden für 1, 3 und 7 Tage auf FGG-, Fibrinogen- und BSA-beschichteten

bzw. unbeschichteten Oberflächen kultiviert und im Anschluss die Zellviabilität mithilfe des CTB-Assay ermittelt (Abbildung 42).

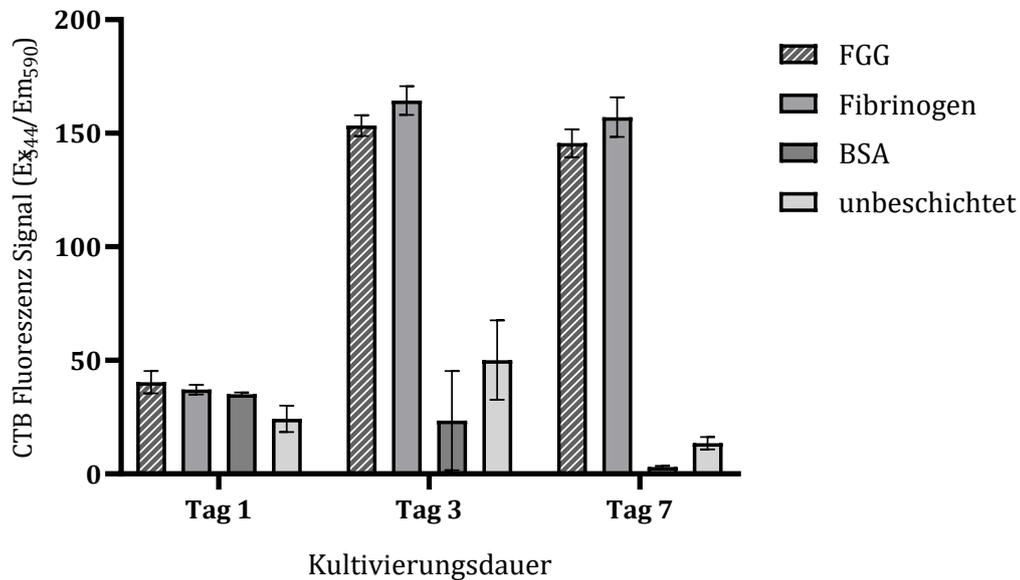


Abbildung 42: Kultivierung von AD-MSCs auf FGG-, Fibrinogen- und BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Oberflächen für 1, 3 und 7 Tage. Es wurden 15.000 Zellen/Well ausplattiert auf 48-Well Platten (Eppendorf). Die Ermittlung der Viabilität der Zellen erfolgte über den CTB-Viabilitätstest.

Ab Tag drei der Kultivierung zeigt sich bereits, dass die Beschichtung mit FGG keinen negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat (Abbildung 42). Die Zellen weisen nach Tag 3 und Tag 7 die gleiche Viabilität auf, wie die Zellen auf der Fibrinogen-Beschichtung (Positiv-Kontrolle). Die Negativ-Kontrollen (BSA, unbeschichtet) unterstützen das Ergebnis, da die Oberflächen ohne Beschichtung und mit BSA-Beschichtung keine Möglichkeit für die Zellen bieten, an der Oberfläche zu adhären und zu proliferieren. Zusätzlich wurde untersucht, ob höhere FGG-Konzentrationen die Zellviabilität der AD-MSCs positiv beeinflussen (Abbildung 43). Durch den CTB-Assay konnte festgestellt werden, dass eine höhere Konzentration des FGGs die Viabilität der Zellen im Konzentrationsbereich 50 µg/mL-200 µg/mL steigert. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das FGG biokompatibel ist und sich positiv auf die Zellviabilität auswirkt.

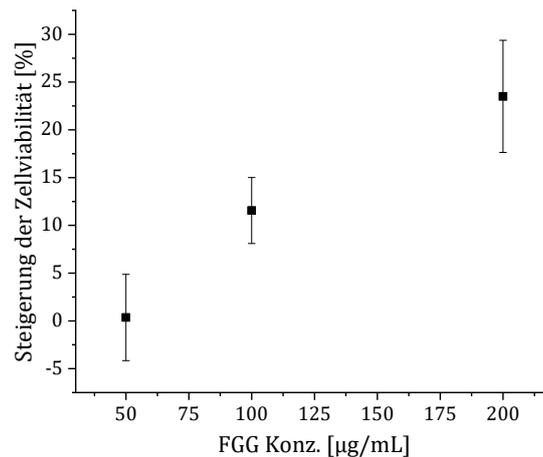


Abbildung 43: Abhängigkeit der Zellviabilität von der Konzentration des aufgereinigten FGG Proteins. Die Steigerung der Zellviabilität ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale der CTB-Assays mit FGG und der Kontrolle (ohne Zugabe von FGG).

3.4.2 Adhäsionsverhalten der AD-MSCs auf FGG beschichteter Oberfläche

Im nachfolgenden Kapitel wurde das Adhäsionsverhalten der hAD-MSCs auf FGG-beschichteter Oberfläche untersucht. Nach Aussäen der hAD-MSCs wurden in einem bestimmten Zeitintervall (0, 5, 10, 30 min) die noch in Suspension befindlichen Zellen gezählt. Dieser Versuch sollte zeigen, wie schnell die hAD-MSCs auf der FGG-Beschichtung im Vergleich zur BSA-Beschichtung adhäreren (Abbildung 44). Nach 10 min sind ca. 75 % der Zellen auf der FGG-Beschichtung adhäriert. Im weiteren Verlauf ist die Zahl der adhärerten Zellen auf ca. 85 % gestiegen (30 min), während auf der BSA-Beschichtung nach 10 min erst 35 % der Zellen adhärert sind. Dieser signifikante Unterschied des Adhäsionsverhaltens der Zellen könnte an den fehlenden Bindestellen (Integrine etc.) auf der BSA-Beschichtung liegen. Im Gegensatz dazu weist FGG einige Bindestellen für Integrine auf, die die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche vermitteln. Das Ergebnis verdeutlicht den positiven Einfluss der FGG-Beschichtung auf das Adhäsionsverhalten der hAD-MSCs.

Neben dem Adhäsionsverhalten wurde im weiteren Verlauf die Proliferation der hAD-MSCs auf der FGG-Beschichtung untersucht. Neben dem schnelleren Adhären der Zellen wurde im nachfolgenden Kapitel mittels mikroskopischer Aufnahmen geprüft, wie sich die Beschichtung auf das Wachstum der Zellen über mehrere Tage auswirkt.

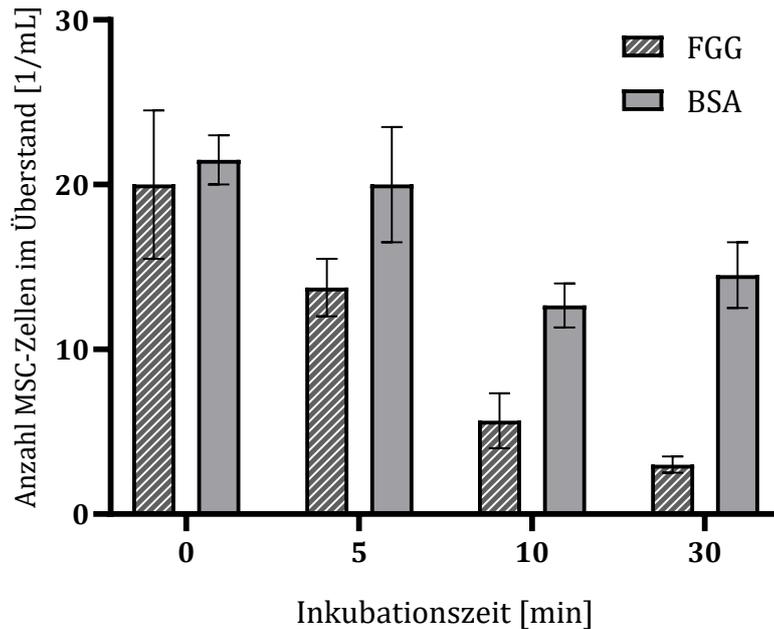


Abbildung 44: Untersuchung der Adhäsion von hAD-MSCs auf FGG- und BSA- beschichteten Oberflächen. Es wurden 300.000 Zellen/Well auf 6-Well Platten (Eppendorf) ausplattiert. Gezählt wurde die Anzahl der nicht-adhären Zellen im Überstand mittels Neubauer-Zählkammer.

3.4.3 Proliferationsverhalten der AD-MSCs auf FGG-beschichteter Oberfläche

Das Proliferationsverhalten der hAD-MSCs auf einer FGG-beschichteten Oberfläche wurde mikroskopisch untersucht, um das Wachstum der Zellen auf dem produzierten FGG mit kommerziell erwerblichem Fibrinogen zu vergleichen. Um das FGG als Biomaterial anwenden zu können, sollte es keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum haben und über mehrere Tage stabil als Oberflächenbeschichtung vorliegen. Dazu wurden die hAD-MSCs auf den verschiedenen Oberflächen (FGG, Fibrinogen, BSA, unbeschichtet) ausgesät, und das Wachstum über 7 Tage beobachtet. Für die Zeitpunkte Tag 1, 3 und 7 wurden von den Zellen mikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 45).

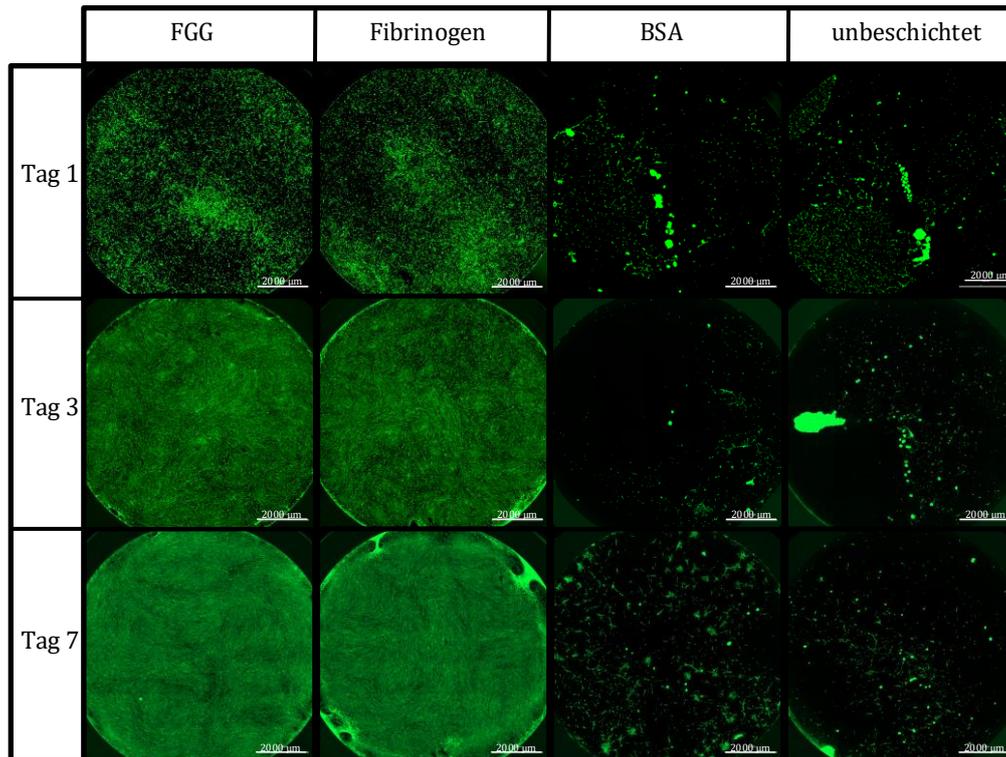


Abbildung 45: Wachstum von hAD-MSCs auf FGG-, Fibrinogen- und BSA- beschichteten bzw. unbeschichteten Oberflächen nach 1, 3 und 7 Tagen Kultivierung. Anschließende Färbung der Zellen mit Calcein-AM. Es wurden 15.000 Zellen/Well ausplattiert (48-Well, Eppendorf). Fluoreszenzaufnahmen mit dem Biotek® Cytation 5™ System (4x Vergrößerung).

Durch die Calcein-AM-Färbung der Zellen konnte diese Beobachtung visualisiert werden, da der Farbstoff gleichmäßig in die lebenden Zellen transportiert wird und die Zellen dadurch grün fluoreszieren. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erkennbar, zeigen die hAD-MSCs auf dem kommerziellen Fibrinogen und dem rekombinanten FGG erwartungsgemäß das gleiche gleichmäßige Wachstumsverhalten. Die Zellen erreichten nach 96 h Kultivierung eine vollständige Konfluenz. Im Gegensatz dazu lösten sich die hAD-MSCs von der BSA-beschichteten und von den unbeschichteten Oberflächen und formierten sich zu Zellaggregaten zusammen. Demzufolge zeigte die quantitative Auswertung, dass die Zellen auf den unbeschichteten und BSA-beschichteten Oberflächen lediglich eine Konfluenz von etwa 10 % erreichten (Abbildung 46).

Diese Beobachtung bestätigt die vorher gezeigten Ergebnisse und zeigt, dass sich auf der BSA-beschichteten und auf der unbeschichteten Oberfläche keine Intergrin-Bindestellen befinden. Die Zellen auf der FGG-beschichteten Oberfläche zeigen hingegen ein typisches Wachstumsverhalten, sodass die maximale Zelldichte nach sieben Tagen erreicht wurde. An Tag 7 zeigt die Aufnahme der Zellen auf der Fibrinogen-beschichteten Oberfläche ein minimales Ablösen der Zellen von der Beschichtung. Durch das Erreichen der maximalen Zelldichte könnte es sein, dass sich das Wachstumsverhalten durch Kontaktinhibition verändert hat.

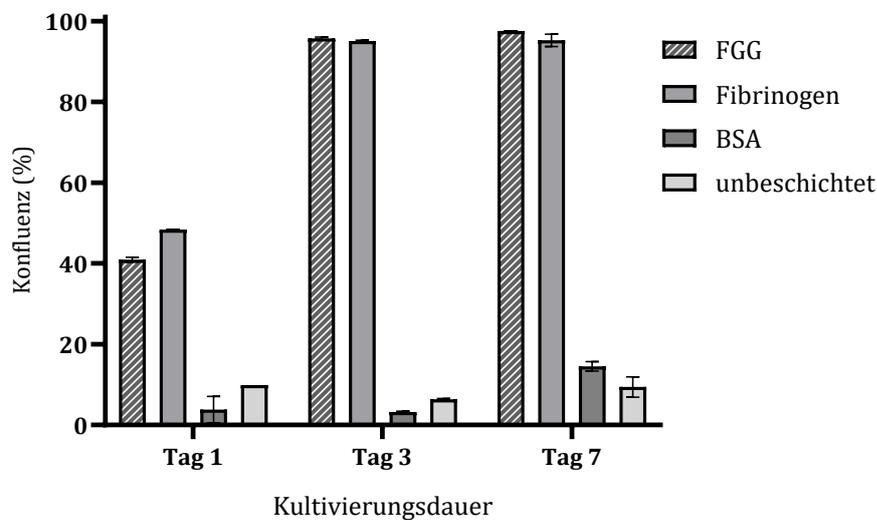


Abbildung 46: Auswertung des Wachstums von hAD-MSCs auf FGG-, Fibrinogen- und BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Wells. Es wurden 15.000 Zellen/Well ausplattiert. Färbung der Zellen mit Calcein-AM. Fluoreszenzaufnahmen mit dem Biotek® Cytation 5™ System (4x Vergrößerung). Auswertung über Fiji.

Zusammenfassend haben die Wachstumsanalysen der hAD-MSCs auf FGG-beschichteten Oberflächen einen positiven Einfluss auf die Proliferation gezeigt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zu der Fibrinogen-Beschichtung festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass FGG möglicherweise als sichere und reproduzierbare Alternative zu kommerziell erwerblichem Fibrinogen für die Oberflächenbeschichtung verwendet werden kann.

3.4.4 Morphologische Betrachtung der hAD-MSCs auf FGG-beschichteter Oberfläche

Abschließend erfolgte die morphologische Untersuchung der hAD-MSCs auf den unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen. Dafür wurden die Zellen nach 24 h Kultivierung fixiert und angefärbt (Abbildung 47). Die Lebendzell-Färbung erfolgte wie zuvor mit

Calcein-AM (grün). Zusätzlich wurde DAPI (blau) verwendet, ein Farbstoff, der an die DNA bindet und den Zellkern färbt. Abgestorbene Zellen wurden mit Propidiumiodid (rot) gefärbt, welches nur bei Beschädigung der Zellmembran in die Zelle gelangt. Zusätzlich zu der bisher verwendeten FGG-Beschichtung wurde eine weitere Beschichtung getestet. Neben dem löslichen FGG nach der Aufreinigung wurde zusätzlich FGG nach der Solubilisierung als Beschichtungsmaterial getestet. Wie bereits im vorherigen Kapitel gezeigt, sind die Zellen auf der FGG-Beschichtung und auf der Fibrinogen- Beschichtung gleichmäßig gewachsen. Darüber hinaus weisen die Zellen eine längliche Form mit verschiedenen Zellfortsätzen auf und wachsen parallel zueinander in einem *Monolayer*. Die genannten Merkmale sind typisch für das Wachstum von hAD-MSCs [114]. Die morphologische Betrachtung zeigt, dass die Beschichtung mit FGG/Fibrinogen eine natürliche Adhäsionsmatrix für die hAD-MSCs darstellt. Im Gegensatz zu der FGG-Beschichtung haben sich die Zellen auf den BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Oberflächen erwartungsgemäß zu Zellklumpen formatiert. Im Inneren dieser Zellklumpen konnten abgestorbene Zellen anhand der roten Färbung identifiziert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die hAD-MSCs nicht auf der BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Oberfläche adhären können. Allerdings ist die Adhäsion an Oberflächenstrukturen für adhären wachsende Zellen, wie die MSCs, überlebenswichtig. Die morphologische Analyse unterstreicht den positiven Einfluss der FGG-Beschichtung auf das Wachstum der AD-MSCs. Auch hier gibt es keine Unterschiede zwischen dem kommerziell erwerblichen Fibrinogen und dem rekombinant hergestellten FGG.

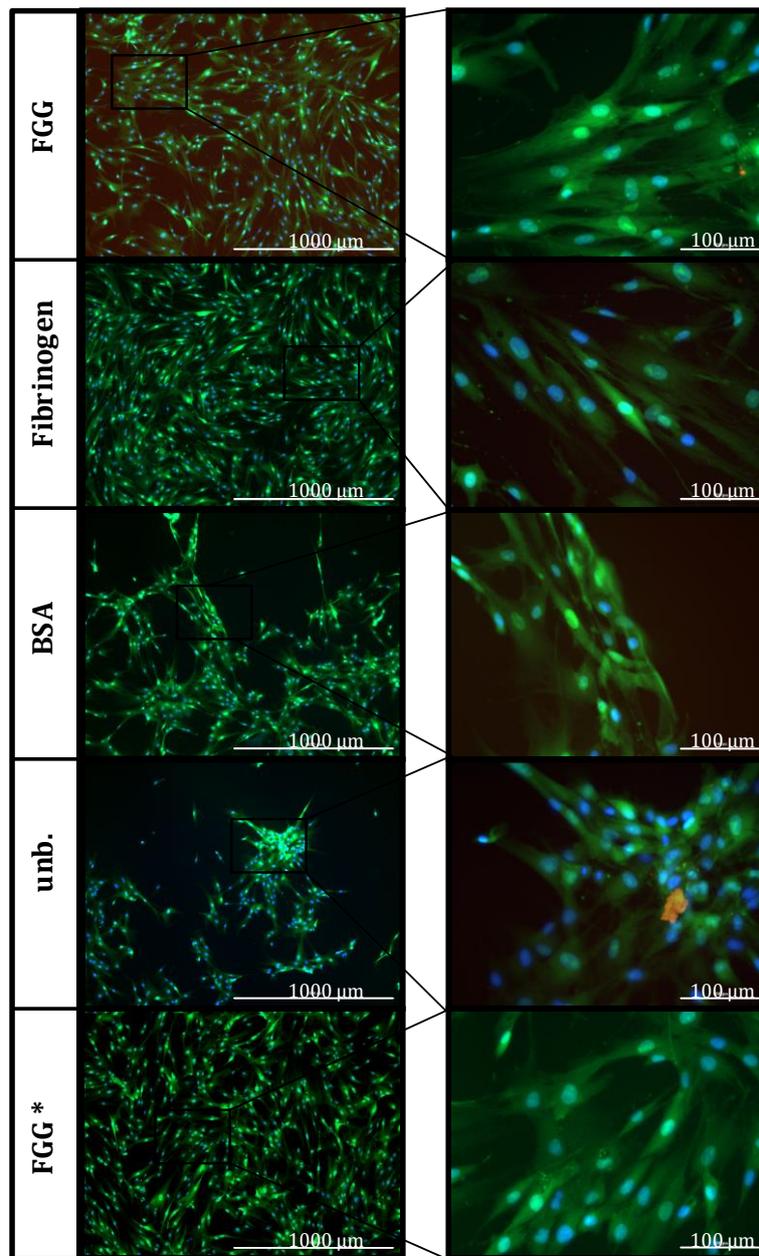


Abbildung 47: Aufnahmen nach 24h Inkubation von AD-MSCs auf FGG-, Fibrinogen- und BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Oberflächen. FGG: FGG gelöst in PBS-Puffer, FGG2: FGG nach Solubilisierung im Harnstoffpuffer. 15.000 Zellen / Well ausplattiert (48-Well Platten, Eppendorf). Färbung der lebenden Zellen (Calcein-AM, grün), des Zellkerns (DAPI, blau) sowie der abgestorbenen Zellen (Propidiumiodid, rot). Fluoreszenzaufnahmen mit dem Biotek® Cytation 5™ System (links: 4x Vergrößerung, rechts: 20x Vergrößerung).

Ergänzend zeigen auch die Zellen auf der zweiten FGG-Beschichtung (FGG nach Solubilisierung, FGG*) die Stammzell-typische Morphologie. Der Puffer, in dem das FGG gelöst ist enthält Harnstoff, der normalerweise schädlich für Zellen ist. Durch das Beschichtungsverfahren werden die Proteine an der Welloberfläche immobilisiert und im Anschluss daran mehrmals gewaschen. Dadurch wird der Harnstoff entfernt und das

FGG entfaltet seine Wirkung, sodass die Zellen gleichermaßen auf dem FGG nach Solubilisierung anhaften. Diese Erkenntnis zeigt, dass das FGG direkt nach der Solubilisierung verwendet werden kann, was die Aufreinigungsschritte und Kosten spart. Dementsprechend wird es interessant, die Oberflächen direkt mit IBs zu beschichten.

3.5 Fazit – Biopolymer FGG

Das FGG konnte in großem Maßstab (10 L) in IBs produziert werden. Die IBs wurden solubilisiert und mittels Zwei-Schritt-Chromatographie konnte eine Reinheit >90 % erreicht werden. Das FGG konnte dialysiert werden und blieb stabil in Lösung. Des Weiteren bildeten sich Dimere und höhere Strukturen bei der Vernetzung mit Faktor XIIIa. Das rekombinante FGG wurde mithilfe der adhärenenten Zelllinie hAD-MSC auf die Eignung als Beschichtungsmaterial getestet.

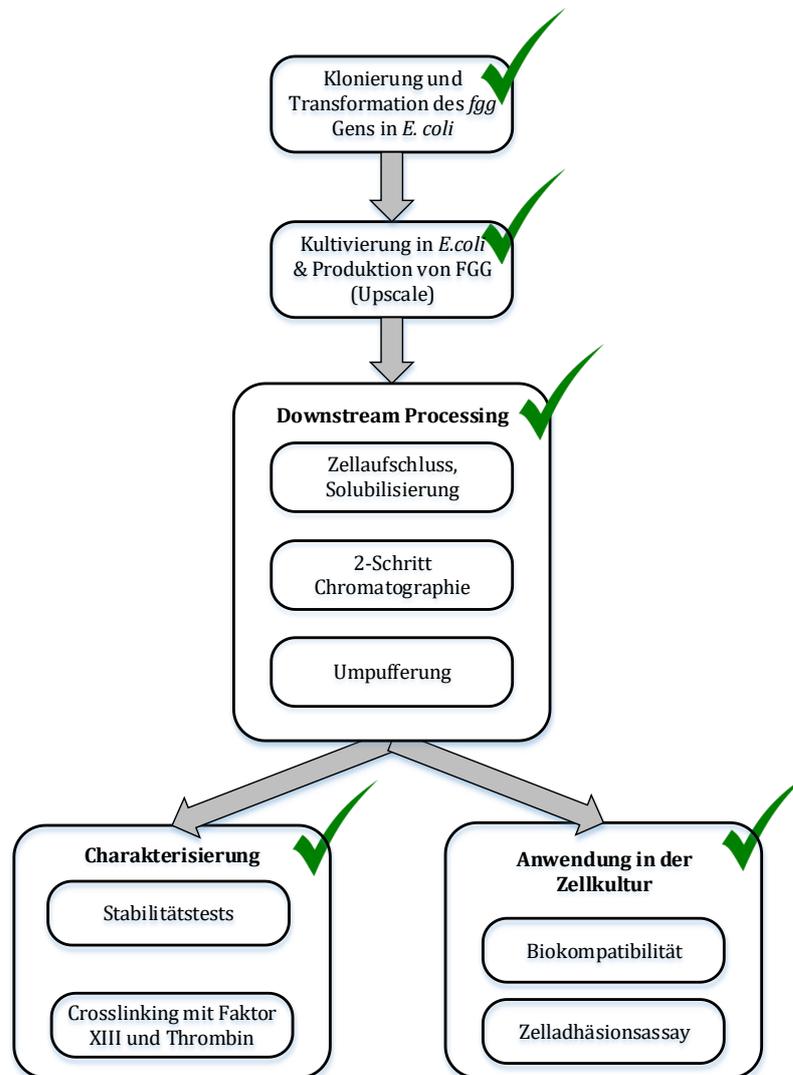


Abbildung 48: Gesamtprozess der FGG-Herstellung und Anwendung in der Zellkultur.

Die Charakterisierung des FGG mit hAD-MSCs hat gezeigt, dass das rekombinant hergestellte FGG biokompatibel ist und als Beschichtungsmaterial die Adhäsion, das Wachstum und die Morphologie der hAD-MSCs positiv beeinflusst. Zwischen der Fibrinogen-Beschichtung und der FGG-Beschichtung konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Daraus lässt sich schließen, dass sich das FGG gleichermaßen gut für die Oberflächenbeschichtung eignet wie das kommerziell erwerbliche Fibrinogen und möglicherweise eine sichere und reproduzierbare Alternative zu Fibrinogen als Biomaterial darstellt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei rekombinante Biopolymere hergestellt, die eine Alternative zu tierisch hergestellten Biopolymeren darstellen. Zum einen wurde eine rekombinante Fibrinogen-Gamma-Kette (FGG) im Expressionssystem *E. coli* produziert und zum anderen ein Gelatine mimetisches Protein (GelMP) in *K. phaffii*. Beide Proteine wurden in vorherigen Arbeiten bereits designt und in kleinem Maßstab produziert. Ziel dieser Arbeit war es, FGG und GelMP im größeren Maßstab zu produzieren und die Ausbeute und Reinheit zu erhöhen. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Proteine biokompatibel sind und in der Zellkultur als Oberflächenbeschichtung eingesetzt werden können.

Biopolymer GelMP

Im ersten Teil der Arbeit wurde das GelMP im Technikumsmaßstab (30 L) in *K. phaffii* (methylotherme Hefe) produziert. In die 30 L Fed-Batch-Kultivierung wurde ein Methanolsensor mit Feedback-Loop integriert, der für eine gleichmäßige GelMP Produktion sorgte und womit eine Biotrockenmasse von 131,3 g/L und ~3 g/L GelMP extrazellulär produziert wurden.

Das beobachtete Proteinbandenmuster, das während der Kultivierung im Überstand nachgewiesen wurde, konnte mittels N-terminaler Sequenzierung analysiert werden. Es stellte sich heraus, dass es sich bei den kleineren Proteinbanden ebenfalls um Fragmente des GelMP handelt, diese aber keine negative Auswirkung in der Anwendung als Biomaterial zeigen. Außerdem zeigte sich in der SDS-PAGE-Analyse, dass das GelMP im Gel nicht mit dem theoretischen Molekulargewicht übereinstimmt (40,2 kDa). Es konnte gezeigt werden, dass dieser zusätzliche Effekt speziell auf die Hydrophilität des GelMP zurückzuführen ist [30] und damit auf eine schlechte Bindung von SDS-Molekülen, da die Wechselwirkung von SDS mit Proteinen hauptsächlich hydrophober Natur ist [115]. Bei den meisten Proteinen verleiht die Bindung von SDS an die Polypeptidkette eine feste Anzahl von Ladungen pro Masseneinheit des Proteins. Als Folge davon ist die Migration und Trennung der Proteine während der Elektrophorese größenabhängig. Im Gegensatz zu den meisten Proteinen sind fibrilläre Proteine wie Seide, Elastin und Kollagen reich an Aminosäuren mit kleinen Seitengruppen, wie Glycin und Alanin. Die geringe durchschnittliche Masse pro Aminosäurerest dieser Proteine impliziert, dass ihre Kettenlänge

und die Anzahl der Reste höher ist als bei kugelförmigen Proteinen mit gleicher Molekularmasse [116], [117]. Folglich wandern Kollagene in der SDS-PAGE bei einem Molekulargewicht, das höher ist als das wahre Molekulargewicht.

Dieser Effekt wurde nachgewiesen, indem die Carbonsäure-Seitenketten des GelMPs verestert wurden und dadurch die Hydrophobizität des GelMP erhöht wurde, sodass es schneller durch das Gel wanderte als das unbehandelte GelMP.

Das extrazellulär produzierte Protein konnte durch die Verwendung der Cross-Flow-Filtration (Sartocon, Hydrosart®) von unerwünschten Medienbestandteilen und Nebenprodukten <30 kDa getrennt und anschließend lyophilisiert werden. Die einfache und kostengünstige Aufarbeitung des GelMP macht es interessant für die Verwendung als Biomaterial.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften des GelMP hinsichtlich der Proteinstabilität und der Strukturcharakterisierung zu untersuchen. Das Konstrukt des GelMP besteht aus einem Abschnitt des humanen Kollagen I sowie endständigen Domänen aus Pro-Gly-Pro-Wiederholungen. Die PGP-Domänen sollten für eine Helixbildung und somit für eine Vernetzung der einzelnen Moleküle sorgen. Rheologische Untersuchungen ergaben, dass das rekombinante GelMP sich ähnlich wie ein Gelatinemimetikum verhält. Bei längerer Inkubationszeit und Temperaturen unter 37°C bildet das Protein ein sehr schwaches Gel aus. Es konnte ein maximaler Wert von 9 Pa nach 20 h erreicht werden. Die Strukturaufklärung mittels CD-Spektroskopie hat gezeigt, dass das GelMP eine ähnliche Sekundärstruktur wie kommerziell erhältliche Gelatine aufweist. Die PGP-Wiederholungen und der nicht-hydroxylierte Kollagenmittelblock führen zu einer zufälligen *random-coil*-Konformation des Proteins.

Zuletzt wurde der Einsatz des GelMPs in der Zellkultur als Alternative zu tierischer Gelatine untersucht. Durch einen CTB-Assay konnte gezeigt werden, dass das GelMP und die zugehörigen Fragmente des GelMPs biokompatibel sind. Das GelMP enthält wie kommerzielle Gelatine Integrin-Bindestellen (RGD-Sequenz), an die adhärente Stammzellen binden. In einem Zelladhäsionsassay konnte gezeigt werden, dass die Zellen gleichermaßen auf einer GelMP- sowie Gelatine-Oberfläche adhärieren und eine Standardwachstumskurve bis zu 100 % Zellkonfluenz nach 60 h zeigen.

Mit den erzielten Resultaten dieser Arbeit wurde eine Basis geschaffen, um das GelMP in vielen Bereichen der Biomedizin anwenden zu können. Hauptsächlich kann das Protein als Oberflächenbeschichtung in der 2D-Zellkultur eingesetzt werden. Für die Weiterentwicklung des Produktes soll das GelMP mit Methacrylsäureanhydrid derivatisiert werden, um ein Netzwerk zu erzeugen und das Produkt in der 3D Zellkultur anwenden zu können. Dabei werden die Lysin- und Hydroxylreste mit Methacrylat- und Methacrylamid-Seitengruppen modifiziert. Neben den biologisch fördernden Eigenschaften ermöglicht die Modifikation mit Methacryloyl-Seitengruppen eine schnelle Polymerisation des GelMP-MA Moleküls in Gegenwart von UV-Licht und einem Photoinitiator (PI) und damit einer kovalenten Vernetzung. Neueste Untersuchungen ergaben, dass mit N,N'-Methylenbisacrylamid (Crosslinker) vernetzte Gelatine als Bioink eingesetzt werden konnte [118]. Diese Funktionalisierungen könnten ebenfalls auf das GelMP übertragen werden, um die Eigenschaften des Proteins entsprechend für die Anwendung als Bioink anzupassen. In diesem Bereich gibt es zahlreiche Möglichkeiten, um das GelMP zu vernetzen und ein starkes Hydrogel auszubilden und um die mechanische Eigenschaft des Hydrogels anzupassen. Zum einen könnten *interpenetrating polymer networks* (IPNs) verwendet werden, wobei das GelMP mit anderen natürlichen Polymeren wie z.B. Fibrin, Hyaluronsäure oder Chitosan vermischt wird [119]–[121]. Natürliche Komponenten sind vorteilhaft, wenn weitere Proteinbindesequenzen eingebracht oder die Biokompatibilität erhalten bleiben soll. Nachteilig ist, dass sie häufig nur schwache Gele ausbilden und somit im Bereich *Bioprinting* schwer einzusetzen sind. In diesem Zusammenhang wären synthetische Kopolymere vorteilhaft, da sie dem Gel mechanische Stabilität verleihen könnten. Mit den Kopolymeren Polyethylenglykol (PEG) und Polyvinylalkohol (PVA) konnten bereits IPNs mit Kollagen hergestellt werden [122], [123]. In diesem Bereich gibt es viele Kombinationsmöglichkeiten, um die Festigkeit des GelMPs zu erhöhen.

Biopolymer FGG

Das Ziel war die Herstellung einer rekombinanten Fibrinogen-Gamma-Kette (FGG), die nach Aufreinigung aufgrund ihrer Reinheit und Biokompatibilität für biomedizinische Anwendungen verwendet werden kann. Fibrinogen besteht aus drei Proteinketten, die in einem komplexen Zusammenspiel mit Chaperonen und mikrosomalen Membranen zu einem Hexamer angeordnet sind. Diese Art von Struktur ist für einfache Mikroorganismen zu komplex. Daher wurde FGG in *E. coli* hergestellt, um einfach und kostengünstig pro-

duzieren zu können. Die Gammakette enthält wichtige Bindestellen für verschiedene Zelltypen, sodass FGG für die Anwendung als Biomaterial genügt. Auf Grundlage von Medved *et al.* [124] konnte bereits in vorherigen Arbeiten das rekombinante FGG designt und in *E. coli* als Expressionssystem als IBs produziert werden. Zusätzlich wurde eine His-Tag-Sequenz eingebracht, um die Aufreinigung des Proteins zu erleichtern. Neben der Expression im bakteriellen System und der Solubilisierung der IBs konnte das FGG in einer vorherigen Arbeit mittels IMAC aufgereinigt werden. In diesem Zusammenhang wurde ein *on-column-Refolding* integriert, mit dem das FGG vom Harnstoff befreit werden sollte. Durch die Entfernung des Harnstoffs fiel das Protein auf der Säule aus, wodurch es zu großen Verlusten kam.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das FGG in größerem Maßstab produziert und die Aufreinigungsstrategie verbessert. Der Fokus wurde dabei auf eine höhere Ausbeute und Reinheit des FGG gelegt. Außerdem wurde das Protein auf Funktionalität getestet und in der Zellkultur als Oberflächenbeschichtung angewandt und mit nativem Fibrinogen verglichen.

Beim *Scale-Up* in eine 10 L-Batch-Kultivierung konnten ähnliche Ausbeuten (110 mg/mL) wie in vorherigen Arbeiten im 2 L-Maßstab mit 10 g/L Glucose als Substrat erreicht werden und die Produktionskapazität erhöht werden. Zusätzlich wurde der Prozess auf eine 10 L-Fedbatch-Kultivierung übertragen, sodass eine 10-fach höhere Biotrockenmasse und dementsprechend eine Produktausbeute von 1,3 g/L erreicht wurde. Durch eine verbesserte Steuerung der Fed-Batch-Regelung könnte die Produktausbeute in zukünftigen Arbeiten weiter erhöht werden.

Um die IBs zu isolieren wurden die Zellen nach der Kultivierung mittels Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Die IBs wurden durch mehrere Waschschrte von Zellresten befreit. Durch eine *freeze-thaw*-Methode konnten die IBs mit 5 M Harnstoff solubilisiert und die Reinheit des FGG auf 56 % gesteigert werden.

Es folgte eine Zwei-Schritt-Chromatographie, bei der zunächst der His-Tag des FGG genutzt wurde um das Protein mit einer IMAC aufzureinigen. In diesem Zusammenhang konnte die Reinheit des FGG durch Veränderung der Umgebungstemperatur, Harnstoffkonzentration, Imidazolkonzentration, Puffersystem und Wahl der Metall-Ionen nicht signifikant erhöht werden (64 %). Teile des Proteins scheinen nicht die nötige Affinität zur Säule aufzuweisen, da das Protein im Durchbruch anteilig nachgewiesen wurde. Ein

Grund könnte sein, dass der HisTag nicht frei zugänglich ist oder ein Anteil des FGGs kein HisTag enthält. Als zweiter Schritt wurde eine Größenausschlusschromatographie verwendet um niedermolekulare Proteine zu entfernen und somit die Reinheit auf > 90 % zu erhöhen. Eine hohe Produktreinheit geht jedoch mit hohem Produktverlust einher.

Es konnte die Biokompatibilität des FGG nachgewiesen werden und die biologische Aktivität des Proteins in der Zellkultur getestet werden. Dafür wurden hAD-MSCs verwendet, die für ein uneingeschränktes Wachstum und interzelluläre Interaktionen an eine Matrix binden müssen. Als Beschichtungsmaterial wurde neben dem FGG, Fibrinogen als Positiv- und BSA als Negativkontrolle verwendet und in gleichen Konzentrationen auf Oberflächen beschichtet. Auf den verschiedenen Beschichtungen wurden die hAD-MSCs ausgesät und die Adhäsion, Konfluenz und Morphologie der Zellen betrachtet. Es stellte sich heraus, dass sich die Wirkung des FGG als Beschichtungsmaterial nicht vom nativen Fibrinogen unterscheidet. Die hAD-MSCs konnten sowohl auf FGG als auf Fibrinogen gleichermaßen wachsen und zeigten auf beiden Beschichtungen eine für MSCs typische spindelartige Form. Eine weitere wichtige Erkenntnis für die Verwendung als Biomaterial ist, dass das FGG bereits nach der Solubilisierung der IBs bioaktiv ist. Andere Forschungsgruppen konnten bereits zeigen, dass Enzyme, Wachstumsfaktoren und auch fluoreszierende Proteine als IBs aktiv sind [125]–[127]. Somit könnte für Beschichtungen in der Zellkultur die direkte Verwendung der IBs getestet werden. Damit könnten die Kosten für die Aufreinigung des FGGs deutlich gesenkt und die Ausbeute erheblich gesteigert werden.

Wie im nativen Fibrinogen, befinden sich im FGG Vernetzungsstellen (Gln398 und Lys406), durch die das FGG mit Thrombin und Faktor XIII polymerisieren soll. Die SDS-PAGE-Analysen ergaben, dass das FGG durch Zugabe dieser Komponenten Dimere und höhere Strukturen ausbildet und somit nachgewiesen wurde, dass die Vernetzungsstellen für Faktor XIII frei zugänglich sind, was mit einer intakten Struktur einhergeht.

Um Kontrolle über die mechanischen Eigenschaften des FGG zu erhalten sind weitere Modifikationen erforderlich. Die Vernetzung könnte durch chemische Modifikation mit einem synthetischen Polymer, z. B. PEG, erreicht werden. PEG ist ein Polymer, das biologisch inert ist und mit dem die mechanischen Eigenschaften von FGG durch Kontrolle der Polymer-Kettenlänge und des Vernetzungsgrades beeinflusst werden können [128], [129]. Erste Untersuchungen zur Herstellung eines PEG-FGG Hybridgels konnten

bereits durchgeführt werden und zeigten vielversprechende Ergebnisse [130]. Das PEG-FGG könnte mit Zusatz eines Photoinitiators und durch UV-Belichtung ein Hydrogel ausbilden und somit im Bereich *Bioprinting*, Stereolithographie und in der Zellkultur eingesetzt werden [131], [132]. Das FGG liefert dabei die biologische Aktivität des Biohybridmaterials, während das synthetische Polymer die gewünschten physikalisch-chemischen Eigenschaften beisteuert.

Bis heute stellt die regenerative Medizin hohe Anforderungen an die Forschung, die derzeit nicht in allen Bereichen erfüllt werden können. Aus diesem Grund wird weiter an natürlichen Materialien geforscht, um geeignete Strukturen zu erhalten, die die komplexe Umgebung des menschlichen Körpers vollständig nachahmen können. Das GelMP und das FGG könnten Teil dieser innovativen Produkte werden und natürliche Materialien tierischen Ursprungs ersetzen. Die fermentationsbasierten Gelatine- und Fibrinogen-Prozesse bieten eine sichere, nachhaltige und kommerziell skalierbare Alternative, während tierische Gelatine mit Schwankungen von Charge zu Charge, potenzieller Übertragung von Krankheitserregern und mit nicht nachhaltigen Beschaffungsmethoden in Verbindung gebracht wird.

A Materialien

A.1 Chemikalien

Tabelle 13: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Land
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland
α -MEM Basalmedium	α -MEM Basalmedium
Accutase	Merck KgaA, Deutschland
Aceton	Kost Alkohole & Produkte aus Alkohol KG, Deutschland
Ammoniak (25%)	AppliChem GmbH, Deutschland
APS (Ammoniumperoxisulfat)	Sigma-Aldrich-Cooperation, USA
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutsch- land
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich-Cooperation, USA
Calcein-AM	Sigma-Aldrich-Cooperation, USA
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutsch- land
Carbenicillin	Sigma-Aldrich Cooperation, USA
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega, Deutschland
Cobaltchlorid-Hexahydrat	Fluka- Chemie (Sigma-Aldrich), USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Fluka-Chemie (Sigma-Aldrich), USA

Chemikalie	Hersteller, Land
Diammoniumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Riedel-de Haën AG, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich-Cooperation, USA
EDTA	AppliChem GmbH, Deutschland
Eisencitrat	Merck KGaA, Deutschland
Essigsäure	AppliChem GmbH, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Fibrinogen (aus bovinem Plasma)	Sigma-Aldrich-Cooperation, USA
Faktor XIII	CoaChrom Diagnostica, Österreich
Fötale Kälber Serum (FKS)	PAA Laboratories
Gentamycin	Merck KgaA, Deutschland
Gibco DMEM Basalmedium	Thermofisher Scientific Inc., USA
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Glycin	Fluka-Chemie (Sigma-Aldrich), USA
Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Chemikalie	Hersteller, Land
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Humanserum (HS)	CC-pro, Deutschland
Imidazol	Merck KGaA, Deutschland
InstandBlue™	Expedeon, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kupferchlorid	Sigma-Aldrich Cooperation, USA
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Manganchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Deutschland
Methacrylsäureanhydrid	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Chemikalie	Hersteller, Land
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriummolybdat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Nickelsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Phosphidium Iodid (PI)	Sigma-Aldrich-Cooperation, USA
Phosphorsäure	Merck KgaA, Deutschland
Protein Plus Prestained Standard	Bio-Rad, Deutschland
Quick Start Bradford-Test Dye Reagenz	BioRad, USA
Rotiphorese, Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1), 40%-ig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Salzsäure	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Salzsäure 37-%ig	AppliChem GmbH, Deutschland
Schwefelsäure	Merck KgaA, Deutschland
SDS / Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tego® Antifoam KS 911	Evonic Industries AG, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Thrombin	CoaChrom Diagnostica, Österreich

Chemikalie	Hersteller, Land
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Triton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Trypsin	Merck KGaA, Deutschland
Zinkacetat-Dihydrat	Fluka- Chemie (Sigma-Aldrich), USA
Zitronensäure-Monohydrat	AppliChem GmbH, Deutschland

A.2 Laborgeräte

Tabelle 14: Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Abgassensor, BlueInOne Ferm	BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland
Äkta pure chromatography system	GE Healthcare Life Science, Schweden
Autoklav Systec V-150	Systec GmbH, Deutschland
Bioreaktor Biostat® Cplus (30 L)	Sartorius Stedium Biotech GmbH, Deutschland
Bioreaktor Biostat® C (10 L)	Sartorius Stedium Biotech GmbH, Deutschland
Cleanbench	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Cross-flow-Anlage, Sartoflow® Smart	Sartorius Stedium Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland

Gerätebezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Cross-flow-Kassette, Sartocoon® Slice Hydrosart® Cassette (30 kDa)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Cytation 5 Imaging Reader	Biotek Instruments Inc., USA
DO-Messsonde OxyFerm FDA	Hamilton Company, GB
Durchflusszytometer BD Accuri™ C6	Becton Dickinson (BD) Biosciences, Franklin Lakes, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, DE
Eismaschine AF 103	Scotsman Ice Systems, USA
Endotoxin-Kartusche, Endosafe®-PTSTM 10 – 0,1 EU/mL	Charles River Laboratories, USA
Endotoxin-Messsystem, Endosafe®-PTS™, Car- tridge Reader	Charles River., Laboratories, USA
Feinwaage	Sartorius AG, Deutschland
Feinwaage	VWR international GmbH, Darmstadt, DE
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX 50	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
FPLC-System ÄktaPure	GE Healthcare, Life Science, Uppsala, SE
French Press M-110 L Microfluidizer® Processor	Microfluidics, USA
Gefriertrocknungsanlage	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage, Alpha 1-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, DE
Glucosemessgerät, YSI 2900	YSI Incorporated, USA

Gerätebezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Heraeus Megafuge 10	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HiLoad 16/600 Superdex 75	GE Healthcare Life Science, Schweden
HisTrap™ HP 5mL	GE Healthcare Life Science, Schweden
IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System	Essen BioScience, Sartorius Brand, Göttingen, DE
Inkubationsschrank Hera cell 240, Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kontrolleinheit Biostat C	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Kryobehälter MVE	MVE Cryogenics
Magnetrührer C-MAG HS 7	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen DE
Magnetrührer mit Heizung MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Methanolsensor	Raven Biotech Inc, Vancouver, CA
Microplate-Reader Multiskan Go	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Neubauer Zählkammer	Assistent®, Sondheim, Deutschland
Peristaltikpumpe Reglo ICC	Ismatec, Wertheim, Deutschland
pH Messsonde, EasyFerm Plus	Hamilton Company, GB
pH Meter HI 221	HANNA Instruments, Vöhringen, Deutschland
Photometer Libra S80	Biochrom GmbH, Deutschland

Gerätebezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Pipettierhilfe accu-jet® <i>pro</i>	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, DE
Proteingelstation Mini PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Reinstwasseranlage arium pro VF	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Rührkesselreaktor (10L) Biostat® C	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Rührkesselreaktor (30L) Biostat® Cplus	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Scanner Perfection V750 Pro	Epson, Suwa, JP
Schüttelkolben (500 mL)	Corning, Inc., New York, USA
Schüttelkolbeninkubator	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Sterilbank HERA safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank Tecnoflow	INTEGRA Biosciences, Hudson, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trokenschrank	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, Deutschland
Ultraschallsonde LABSonic®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Ultraschallsonde, Labsonic® M	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Vakuumfiltrationsanlage	Sartorius AG, Deutschland
Vortexer Analog Vortex Mischer	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland

Gerätebezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Wasserbad WNB	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zählkammer Blaubrand nach Neubauer	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus™ Fresco 21	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus™ Megafuge 10	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge X5 FR	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Zentrifuge Micro Star 17 R	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge miniSpin Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenrotor Fiberlite F15-8x50cy	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Zentrifugenrotor TX-750	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA

A.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Ort, Land
Dispenser Multipipette® E3	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Dispenser-Spitzen, 5 und 10 mL Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Material	Hersteller, Ort, Land
Einwegpipette 50 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, DE
Einwegpipetten Costar® Stripette (2; 5; 10 und 25 mL)	Corning, Inc., New York, USA
Einwegspritzen (1 mL-10 mL)	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Kanülen Sterican	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kimtech Science Kimwipes	Kimberly-Clark Professional, USA
Kryoröhrchen CryoPure Gefäß 1,6 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Mikrotiterplatte 24 well, TC Platte	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Mikrotiterplatte 24 well, untreated	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Mikrotiterplatte 24 well, untreated	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten 48 well, untreated	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten 96 well	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikrotiterplatten 96 well, TC-Platte	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, DE
Nitrilhandschuhe Rotiprotect®-Nitril light	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland

Material	Hersteller, Ort, Land
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Skalpell	B. Braun Melsungen, Deutschland
Spritzen Norm-Ject	Henke SassWolf, Tuttlingen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter Minisart 0,2µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
T-Flaschen, T 25, T75,T175	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 mL)	Corning Inc., USA

A.4 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 16: Puffer, Lösungen und Medien

Lösung	Zusammensetzung
Medien für die Kultivierung von <i>Komatagaella phaffii</i>	
BMG	2,12 % Kaliumphosphat, 1,34 % YNB, 4 % Biotin, 1 % Glycerol
BMM	2,12 % Kaliumphosphat, 1,34 % YNB, 4 % Biotin, 0,5 % Methanol
BMGY	2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 2,12 % Kaliumphosphat, 1,34 % YNB, 4 % Biotin, 1 % Glycerol
BMMY	2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 2,12 % Kaliumphosphat, 1,34 % YNB, 4 % Biotin, 0,5 % Methanol

Lösung	Zusammensetzung	
Hexametaphosphat	Hexametaphosphat	150 g
	Zugabe von 1 L des. H ₂ O	
Trace-Element Solution (PTM ₁)	H ₂ O	970 ml
	CuSO ₄ (H ₂ O) ₅	5,99 g
	10xNaI stock solution (0.4 g NaI per 40 ml Wasser)	58 ml
	MnSO ₄ * H ₂ O	3,0 g
	Na ₂ MoO ₄ (H ₂ O) ₂	0,2 g
	CoCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,5 g
	ZnCl ₂ (H ₂ O) ₅	20,04 g
	FeSO ₄ (H ₂ O)	65,05 g
	100xH ₃ BO ₃ Stocklösung (1.0 g H ₃ BO ₃ per 40 ml Wasser)	7800 ml
	96.2 % H ₂ SO ₄	19,2 ml
	D-Biotin	0,4 g

Lösung	Zusammensetzung	
Fermentationsmedium (pro L)	Glycerol	50 mL
	Dest. Wasser	833 mL
	CaSO ₄	0,9 g
	K ₂ SO ₄	14,67 g
	MgSO ₄ *7H ₂ O	11,67 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	9 g
	Hexametaphosphat	167 mL
	(Zugabe nach Autoklavieren des Bioreaktors)	
	trace elements	4 mL
	(Zugabe nach Autoklavieren des Bioreaktors)	
Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>		
LB-Miller-Medium	Hefeextrakt	5 g/L
	Carbenicillin	50 µg/mL
	NaCl	10 g/L
	Trypton	10 g/L
	pH 7	

Lösung	Zusammensetzung	
LB-Agar	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	10 g/L
	Trypton	10 g/L
	Carbenicillin	50 µg/mL
	Agar	15 g/L
	pH 7	
Batch Medium Gruppe A	Glucose*H ₂ O	11 g/L
	MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2 g/L
	H ₃ BO ₃	3 mg/L
	MnCl ₂ *2H ₂ O	12,3 mg/L
	CuCl ₂	1,2 mg/L
	CoCl ₂ *6H ₂ O	2,5 mg/L
	Zn(CH ₃ COO) ₂ *2H ₂ O	33,8 mg/L
	EDTA	14,1 mg/L
Batch Medium Gruppe B	(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,5 g/L
	KH ₂ PO ₄	13,3 g/L
	Zitronensäure*H ₂ O	1,86 g/L
	Eisencitrat	0,1 g/L
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	2,1 mg/L
	pH 6,8	

Lösung	Zusammensetzung	
Feeding-Lösung	Glucose*H ₂ O	649,45 g/L
	MgSO ₄ *7H ₂ O	14,85 g/L
	H ₃ BO ₃	3,47 mg/L
	MnCl ₂ *2H ₂ O	14,18 mg/L
	CuCl ₂	1,34 mg/L
	CoCl ₂ *6H ₂ O	2,95 mg/L
	Zn(CH ₃ COO) ₂ *2H ₂ O	15,24 mg/L
	EDTA	9,59 mg/L
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	2,95 mg/L
	Eisencitrat	29,52 mg/L
Zyp-Medium	Glucose	11 g/L
	KH ₂ PO ₄	6,8 g/L
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	8,99 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,3 g/L
	MgSO ₄	5 mL/L
	FeCl ₃	0,5 mL/L
	NaMoO ₄	0,5 mL/L
	Tracer-Lösung 1000x	1 mL/L
	Carbenicillin	50 µg/mL
	pH 7,5	

Lösung		Zusammensetzung	
Tracer-Lösung Zyp-Medium	1000x;	ZnCl ₂	65,4 mg/L
		H ₃ BO ₃	20 mg/L
		MnCl ₂ *4H ₂ O	89 mg/L
		FeSO ₄ *7H ₂ O	4 g/L
		CoCl ₂ *6H ₂ O	50 mg/L
		CuSO ₄ *5H ₂ O	100 mg/L
		NiSO ₄ *7H ₂ O	100 mg/L
Carbenicillin-Stocklösung		5 mg/mL	
Natriummolybdat-Lösung 5000x; DNB-Medium		Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	10,5 g/L
Tracelement-Stocklö- sung 2000x; DNB-Medium		CoCl ₂	2,8 g/L
		MnCl ₂ *2H ₂ O	24,6 g/L
		CuCl ₂	2,4 g/L
		H ₃ BO ₃	6 g/L
		Zn(CH ₃ COO) ₂ *2H ₂ O	67,6 g/L
		TitriplexIII (EDTA-Na ₂)	28,2 g/L
Lösungen für die SDS-PAGE			

Lösung	Zusammensetzung	
SDS Trenngel 12%ig	Rotiphorese Gel 40	1,5 mL
	SDS 1%	0,5 mL
	Tris/HCl (1,5M), pH 8,8	1,4 mL
	ddH ₂ O	1,6 mL
	TEMED	10 µL
	APS (25% ig)	10 µL
SDS Sammelgel 6%	Rotiphorese Gel 40	0,75 mL
	SDS 1%	0,3 mL
	Tris/HCl (1,5M), pH 6,8	0,63 mL
	ddH ₂ O	3,77 mL
	TEMED	10 µL
	APS (25% ig)	10 µL
10x TGS-Puffer	Tris	3 g/L
	Glycin	140 g/L
	SDS	5 g/L
	pH 8,3	
Lämmli Puffer	SDS-Probenpuffer	800 µL
	Glycerin (55%-ig)	140 µL
	2-Mercaptoethanol	100 µL

Lösung	Zusammensetzung	
Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung	dd H ₂ O	1750 mL
	H ₃ PO ₄ (85%-ig)	250 mL
	(NH ₄) ₂ SO ₄	250 g
	Coomassie G-250	2,5 g
	Methanol	500 mL
Puffer und Färbelösungen für die Stammzellkultivierung		
Standard Proliferationsmedium (MSCs)	HS	10%
	Gentamycin	0,5%
	α-MEM	
DMEM-Basalmedium	DMEM	13,5 g
	Na ₂ CO ₂	3,7 g
	ad 1L H ₂ O	
MEM +	MEM ohne Phenolrot, flüssig	1%
	nicht-essentielle Aminosäuren	
	P/S	1%
	FKS	10%
	L-Glutamin	2%
Calcein-AM/PI-Färbelösung	αMEM	998 µL
	Calcein-AM	2 µL

Lösung		Zusammensetzung	
DAPI-Färbelösung		DAPI-Puffer	999 μ L
		DAPI-Stocklösung	1 μ L
Kryomedium		α MEM-Medium,	
		Humanserum	10%
		DMSO	10 %,
		Gentamycin	0,5%
Fixierlösung		Paraformaldehyd 1x PBS	4%
Natriumboratpuffer, 10 mM (SBB I)		Borsäure	10 mM
		Mit NaOH auf pH 7,4	
Natriumboratpuffer, 50 mM (SBB II)		Borsäure	50 mM
		Mit NaOH auf pH 8,3	
Phosphat-Saline Puffer (PBS)		Natriumchlorid	0,8 g/l
		Kaliumchlorid	0,2 g/l
		Natriumhydrogenphosphat	1,44 g/l
		Kaliumhydrogenphosphat	0,24 g/l
		Kaliumchlorid	0,0201 g/L
		pH 7,4	

Lösung	Zusammensetzung	
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE)	Tris-Base	40 mM
	Eisessig	20 mM
	Ethylendiamintetraessigsäure	1 mM
	pH 8,0	
Medium für CTB-Assay	α -MEM-Basalmedium	
	CTB-Reagenz	10%
Puffer für den Zellaufschluss von <i>E. coli</i>		
Lysepuffer	MOPS	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
Waschpuffer	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	100 mM
	Harnstoff	1 M
	EDTA	1 mM
	Triton	1 % (v/v)
	pH 8	
Solubilisierungspuffer	Tris- HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	Harnstoff	0-8 M
	pH 8	
Puffer für die IMAC		

Lösung	Zusammensetzung	
Bindepuffer	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	Imidazol	20 mM
	Harnstoff	0 M-8 M
	pH 8	
Elutionspuffer	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	Imidazol	250 mM
	Harnstoff	2 M-5 M
Puffer für die SEC		
Equilibrierungspuffer	Tris-HCl	10 mM
Laufpuffer	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	Harnstoff	2 M
	pH 8	
Lagerungspuffer	NaCH ₃ COOH	200 mM
	Ethanol	20% (v/v)
	pH 8	

A.5 Verwendete Kits

Kit	Hersteller, Land
CellTiter-Blue®	Promega Corporation, USA
CytoTox-ONE™	Promega Corporation, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.

A.6 Software

Software	Hersteller, Ort, Land
Fiji ImageJ	Wayne Rasband (National Institute of Health), USA
GelAnalyzer	Microsoft Corporation, USA
Gen5™	BioTek Instruments Inc., USA
GraphPad Prism	Graphpad Software, Inc
Image J	Wayne Rasband (National Institute of Health) USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Visio	Microsoft Corporation, USA
OriginLab 2019b	OriginLab Corporation, USA
Reaktorüberwachung MFCS	Sartorius Stedim Biotech, DE
Unicorn 6	GE Healthcare Life Sciences, Schweden

A.7 Zelllinien

Tabelle 17: Verwendete Zellen zur Charakterisierung des FGG und GelMP.

Zelltyp	Bezeichnung	Passagennummer
hAD-MSC	AD27J	P5 – P11
hAD-MSC	AD44-GFP	P15 – P18

B Methoden

B.1 Arbeiten mit *Komatagaella phaffii*

B.1.2 Kultivierungsarbeiten-GelMP

B.1.2.1 Stammhaltung

Für die Kultivierungsarbeiten zur Produktion von GelMP wird der Stamm *Komatagaella phaffii* verwendet. Für die Anlegung von Dauerkulturen (Klon 4) werden diese mit 15 % Glycerol bei -80°C gelagert. Die Dauerkulturen haben eine $\text{OD}_{600}=50$ und werden in Schüttelkolben angesetzt.

B.1.2.2 Ansetzen von Vor- Vorkulturen

Die Vorkultur wurde in einem 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen angesetzt. Dafür werden 50 mL YPD-Medium in den Kolben gegeben und mit einer OD_{600} 0,1 angeimpft. Die Vor-Vorkulturen wurden für 16 h bei 150 rpm kultiviert, um eine OD_{600} zwischen 10-14 zu erreichen.

B.1.2.3 GelMP Kultivierungen im Rührkesselreaktor: Fed-Batch-Betrieb

Die Fed-Batch-Kultivierung wurde im 30 L Edelstahlreaktor (Biostat® Cplus, Sartorius Stedim Biotech GmbH) durchgeführt. Dazu wurden 250 mL Vorkultur über Nacht bei 30°C und 150 rpm kultiviert. Die Reaktorsysteme bestehen aus einem Reaktorbehälter und einer Steuereinheit. Die im Deckel und an den Außenwänden integrierten Ports (25 mm) wurden verwendet, um Messsonden in den Prozess zu integrieren. Der Rührer

ist ebenfalls über den Deckel eingebaut und die Temperierung erfolgt über den Reaktormantel. Mit dem Sensor BlueInOne Ferm (BlueSens gas sensor GmbH) kann das Abgas analysiert werden. Die Online Messsonden dienen für die Überwachung des pH-Werts (EasyFerm Plus, Hamilton Company) und des pO-Werts (OxyFerm, FDA, Hamilton Company). Über einen weiteren Port wird der Methanol-Sensor integriert, um die Zugabe von Methanol steuern zu können. Das Fermentationsmedium (10 Liter) mit 5 % Glycerol wurde für 30 Minuten bei 122°C sterilisiert. Danach werden die Hefezellen aus einer Startkultur in Fermentationsmedium aseptisch in den Bioreaktor gegeben.

B.1.2.4 Methanol-Sensor Setup

Der Methanolsensor wird über einen 25 mm Port in den Bioreaktor eingeführt. Anschließend werden Luftschläuche für die Luftversorgung an den Sensor angeschlossen. Ein Einplatinen-Computer wird ebenfalls an den Sensor angeschlossen. Dieser besitzt eine serielle RS232-Schnittstelle, die zusätzlich mit einer peristaltischen Pumpe verbunden ist. Zusätzlich ist eine Kontrollsoftware installiert, die zur Überwachung der Sollwerte genutzt wird. Außerdem wurde eine peristaltische Pumpe (Ismatec) für die Methanolzugabe an den Reaktor angeschlossen.

B.1.2.5 Offline Analytik während der GelMP-Kultivierungen

Für die Offline Analytik wurden 5 mL Kulturvolumen zu den jeweiligen Zeitpunkten entnommen und für die nachfolgenden Analysen verwendet.

Bestimmung der optischen Dichte

Die Analyse der optischen Dichte im Prozess erfolgt über eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 600 nm (Libra S80, Biochrom GmbH). Als Referenz wurde eine 0,9 %ige Salinelösung verwendet. Sobald der Wert $OD_{600}=0,5$ überschritten wird, muss die Probe mit der 0,9 %igen Salinelösung verdünnt werden.

Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurde 1 mL Kultivierungsprobe in ein trockenes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Heraeus™ Biofuge™ pico, Thermo Fisher Scientific). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 48 h bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Pellet gewogen und daraus die Biotrockenmasse bestimmt.

B.2 Downstream Processing-GelMP

B.2.1 Umpufferung mittels Größenausschlusschromatographie

Das im Überstand befindliche GelMP wird direkt aus der Fermentationsbrühe mit dem ÄKTA pure System aufgereinigt. Dazu werden 15 mL des Überstandes auf eine Sephadex G-25 Säule (HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare) geladen. Diese wird zuvor mit PBS-Puffer (pH 7,4) nach Protokoll gemäß GE äquilibriert. Die Fermentationbrühe mit dem GelMP wird mit einer Flussrate von 5 mL/min mit PBS-Puffer 40 min eluiert und mit einem UV- und Leitfähigkeitssensor überwacht. Die detektierten Peaks werden mittels SDS-PAGE analysiert. 8 mL Fraktionen wurden pro Durchlauf gesammelt und anschließend gefriergetrocknet.

B.2.2 Dialyse und Aufkonzentrierung mit Cross-Flow Filtration

Um größere Mengen des Kulturüberstandes zu dialysieren, wird die Cross-Flow Anlage (Sartoflow Smart, Sartorius Stedim Biotech GmbH) verwendet. Für die Abtrennung von kleineren Bestandteilen wird eine Membran-Kassette mit einem *cut off* von 30 kDa in die Apparatur eingebaut. Das System wird zunächst mit zwei Liter destilliertem Wasser gespült. Das Wasser wird abgelassen und der Vorgang wiederholt. Anschließend wird der Behälter mit dem Kulturüberstand befüllt und solange dialysiert, bis das Konduktivitätssignal einen konstanten Wert (unter 1 mS/cm) erreicht. Im Anschluss wird der dialysierte Überstand auf ein zehntel des Volumens aufkonzentriert und geerntet. Das System wird mit 100 mL destilliertem Wasser gespült um Rückstände aus dem System zu lösen. Die Rückstände werden ebenfalls geerntet. Am Ende wird das System mit 3 M Natronlauge und anschließend mit Wasser gespült. Die Membran-Kassette wird aus dem System gebaut und in 3 M Natronlauge gelagert.

B.2.3 Trocknung von GelMP

Nach der Dialyse mittels Größenausschlusschromatographie oder Cross-Flow-Filtration wird das aufgereinigte GelMP gefriergetrocknet. Die Probelösung wird erst eingefroren (-80°C) und im Anschluss bei -20°C und einem Druck von 0,03 mbar bis zur vollständigen Trocknung gefriergetrocknet. -

B.3 Arbeiten in der Zellkultur - GelMP

B.3.1 Zelladhäsions Experimente-GelMP

Das lyophilisierte GelMP wurde im PBS-Puffer (pH 7,4) in einer Konzentration von 2 mg/mL gelöst. 400 μ L dieser GelMP-Lösung wurden in jedes Well gegeben und 12 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit 500 μ L PBS-Puffer gespült, um überschüssiges Protein zu entfernen. Als Kontrolle für das Adhäsionsexperiment wurden eine Reihe von Wells mit Rinderserumalbumin (BSA) und Gelatine (Sigma Aldrich, Gelatine Typ A, USA) mit gleicher Konzentration und nach dem gleichen Verfahren wie bei GelMP beschichtet.

Für Adhäsionsexperimente wurden hAD-MSCs auf eine beschichtete 48-Well-Platte (Eppendorf, Deutschland) mit einer Dichte von 15.000 Zellen/cm² mit 300 μ L Medium pro Well gesetzt. Nach der Aussaat wurden die Zellen für 60 h in alpha-MEM mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS) und 50 μ g/mL Gentamicin in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 21 % O₂ bei 37°C kultiviert. Während der Kultivierung wurden alle 2 h mikroskopische Aufnahmen (vier Felder pro Well) mit einem IncuCyte® Live-Cell Imaging System (Sartorius, Deutschland) gemacht. Die Daten wurden mit der IncuCyte® Confluence Software (IncuCyte® S3 2018 A) analysiert, die die Konfluenz der Zellen analysiert.

B.3.2 Biokompatibilität von GelMP durch quantitativen Assay - GelMP

Die hAD-MSCs wurden in 48 Wellplatten mit einer Dichte von 15.000 Zellen/Well in 300 μ L Kulturmedium (alpha-MEM mit 10 % FBS, 50 μ g/mL Gentamicin, 0,5 μ M IncuCyte® Caspase-3/7 Reagenz) gesetzt. Das Medium wurde zuvor mit GelMP, Gelatine und BSA gemischt, was zu einer Endkonzentration von 5 mg/mL führte. Eine quantitative Analyse der Apoptose von hAD-MSCs über die Zeit wurde während der Kultivierung im behandelten Medium (GelMP, BSA, Gelatine) und mit regulärem Zellkulturmedium als Kontrolle durchgeführt. Nach der Behandlung wurden die Zellen sofort in das IncuCyte® Live-Cell Analysesystem (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland) mit einem 10X-Objektiv in einem Standard-Zellkulturinkubator eingesetzt und alle 2 h sowohl Phasenkontrast- als auch Fluoreszenzbilder aufgenommen.

IncuCyte™ Lebendzellanalyse

Zur weiteren morphologischen Untersuchung sowie Nekrose- und Apoptose-Testung wurden die Zellen über einen Zeitraum von 12-48 h mit dem Lebendzell-Imaging-System IncuCyte™ (Essen BioScience, jetzt Sartorius) beobachtet und optisch analysiert. Das IncuCyte™ nimmt zu vorher festgelegten Zeitpunkten selbstständig Bilder von Kulturfäßen im Phasenkontrast, grünem oder rotem Fluoreszenzspektrum auf und ermöglicht eine Komplexe Bildanalyse mit zugehöriger Software. Für die Analyse der Apoptose und Nekrose wurden Fluoreszenzmarker für Caspase 3/7 Aktivität (IncuCyte™ *Caspase 3/7 green reagent*), Phosphatidylserin-Delokalisierung (IncuCyte™ *Annexin V green reagent*) und Membranintegrität (IncuCyte™ *Cytotox red reagent*) verwendet.

Die Auswertung erfolgte über die zugehörige Bildanalyse-Software, mit der individuelle Masken je nach Kultivierungsbedingung selbstständig erstellt wurden. So war es möglich, die Fluoreszenzsignale der einzelnen Zellen zu quantifizieren. Die Erkennung der Signale wurde für verschiedene Zeitpunkte kontrolliert und die Größenfilter und Fluoreszenzsignal-Grenzwerte dementsprechend angepasst, dass für die Zellen nur einzelne Signale detektiert und zufällig angefärbte Störobjekte ausgefiltert wurden. Für die Auswertung wurden nur Bilder mit ähnlicher Konfluenz der Zellen verwendet, um den Standardfehler zu minimieren. Es wurden für die selektierten Bilder der Wells mit identischen Kultivierungsbedingungen Mittelwerte und Standardabweichung der ermittelten Fluoreszenzsignale berechnet.

B.4 Arbeiten mit *Escherichia coli*

B.4.1 Kultivierungsarbeiten-FGG

Die Anzucht der *E. coli* Tuner Kulturen und Stammkulturen erfolgt in LB-Medium (Tabelle 16) auf einem Schüttler (150 rpm, 37°C). Die Kultur enthält eine Carbenicillin-Resistenz, sodass dem Medium 50 µg/mL Carbenicillin hinzugefügt wird. Die Kultivierungen des *E. coli* Tuner Stammes erfolgte in einem 10 L Edelstahl-Bioreaktor (Sartorius, Göttingen). Die Instrumente zur Messung von pH, pO₂ und Temperatur sind im Kopfraum des Reaktors angebracht. Durch die Zugabe von Ammoniak (25 %) erfolgt die Regelung des pH-Wertes auf 6,5. Der pO₂-Gehalt im Medium wird konstant auf einen Wert von 30 % durch eine Rührerkaskade reguliert.

B.4.1.1 Fermentationsvorbereitung und Durchführung

Die in Kapitel 3.1 beschriebenen Kultivierungsarbeiten erfolgten in einem Bioreaktor Biostat C (Sartorius Stedim Biotech GmbH). Die Vorbereitungen zur Fermentation sind am Vortag durchzuführen. Die Vor-Vorkultur, die in 500 mL Schüttelkolben mit LB-Medium angesetzt wurde, wurde für 12 Stunden bis zum Erreichen einer $OD_{600}=12$ bei 37°C und 150 rpm kultiviert. Außerdem wurden zusätzlich das nadelfreie Zugabeventil (SACOVA-Ventil) und ein Animpfbehälter mit Inokulationsnadel für die Kultivierung im Edelstahl-Bioreaktor autoklaviert (21 min, 121°C). Nach Kalibrierung der pH-Sonde im Bereich zwischen pH 4 und pH 7, wird das eingebaute SACOVA-Ventil mit der Ammoniak-Lösung (25 %) verbunden. Je nach Prozessmaßstab wird das entsprechende Medienvolumen vorgelegt.

B.4.1.2 Offline Analytik während der FGG-Kultivierungen

Für die Offline Analytik wurden pro Kultivierung 5 mL Kulturvolumen genommen und für die nachfolgenden Analysen verwendet.

Bestimmung der optischen Dichte

Die Analyse der optischen Dichte im Prozess erfolgt über eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 600 nm (Libra S80, Biochrom GmbH). Als Referenz wird eine 0,9 %ige Salinelösung verwendet. Sobald der Wert $OD_{600}=0,5$ überschritten wird, muss die Probe mit der 0,9 %igen Salinelösung verdünnt werden.

Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wird 1 mL Kultivierungsprobe in ein trockenes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Heraeus™ Biofuge™ pico, Thermo Fisher Scientific). Der Überstand wird verworfen und das Pellet für 48 h bei 80°C getrocknet. Anschließend wird das getrocknete Pellet gewogen und daraus die Biotrockenmasse bestimmt.

Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Glucosebestimmung während der Kultivierung geschieht vollautomatisch mittels YSI 2900 (YSI Incorporated). Diese Methode basiert auf einer enzymatischen Nachweismethode. Dazu wird der zellfreie Überstand der Kultivierung vermessen, wobei der Glukosekonzentrationsbereich zwischen 0 und 10 g/L liegen sollte.

B.5 Downstream Processing-FGG

B.5.1 Zellernte und Isolierung von Inclusion Bodies

Die Zellernte von *E. coli* erfolgte durch Zentrifugation (10.000xg, 4°C, 1h). Das pelletierte Zellmaterial wurde aliquotiert und eingefroren (-20°C). Für den Zellaufschluss wurden die Zellen in Lysepuffer resuspendiert. Die Zusammensetzung des Lysepuffers ist in Tabelle 16 ersichtlich. Zur Resuspension wird für 1 g Feuchtpellet 20 mL Lysepuffer eingesetzt. Für 10 min wird das Pellet im Puffer homogenisiert und anschließend abzentrifugiert (15.000xg, 30 min). Der Überstand wird verworfen und das Pellet erneut in Lysepuffer resuspendiert. Es folgt der Zellaufschluss mittels Hochdruck-Homogenisator (M-110 L Microfluidizer® Processor). Um eine Wärmeentwicklung zu vermeiden wurde das System kontinuierlich mit Eis gekühlt. Der Aufschluss erfolgte bei 9 psi und die Lösung wird 8-mal durch das System gepresst. Im Anschluss wird die Lösung zentrifugiert (15.000xg, 30 min) um die Zelltrümmer von den IBs zu trennen. Das entstandene Pellet wird erneut in Waschpuffer (siehe Tabelle 16) resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt. Der Überstand wird in jedem Schritt dekantiert, sodass nach dem dritten Waschschrift die IBs eingefroren werden und für weitere Anwendungen bei -20°C aufbewahrt werden.

Zellaufschluss mittels Ultraschall

Für den analytischen Maßstab wurde der Zellaufschluss mittels Ultraschall durchgeführt. Zellproben wurden aufgetaut und bei 13.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C, 5 min). Im Anschluss wurde das Pellet in 500 µL 1x PBS-Lysepuffer resuspendiert. Für den Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde jede Probe dreimal für 30 sec beschallt (100 % Amplitude, Cycle 0,6). Zum Abkühlen der Sonde wurde die Probe zwischen jeder Beschallung für 1 min auf Eis gestellt. Das Lysat wurde anschließend bei 13.300 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Präzipitat in 500 µL 1x PBS-Lysepuffer resuspendiert.

B.5.2 Solubilisierung von Inclusion Bodies

Das Pellet nach Zellaufschluss wird in Solubilisierungspuffer resuspendiert und anschließend bei -20 °C mindestens über Nacht eingefroren. Die Probe wird nach 12 h bei

Raumtemperatur aufgetaut. Im Anschluss werden die Proben für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wird verworfen.

B.5.3 Metallchelate-Affinitätschromatographie (HiTrap Column 5 mL)

Die Aufreinigung mittels FPLC erfolgte voll automatisch mit dem Äkta pure-System (GE Healthcare). An das System sind sowohl ein Leitfähigkeitsdetektor, als auch ein UV-Detektor (280 nm) angeschlossen. Für die Affinitätschromatographie wurde eine HiTrap™ Säule, 5 mL von GE verwendet. Der Ablauf ist in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Prozessablauf der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von FGG mittels HisTrap™-Säule.

Phase	Volumen	Flussrate	Puffer
Equilibrierung	25 mL	5 mL/min	TBS-Puffer, 5 M Harnstoff
Probenaufgabe	10 mL	2,5 mL/min	TBS-Puffer, 5 M Harnstoff
Waschen	25 mL	5 mL/min	TBS-Puffer, 5 M Harnstoff
Elution	25 mL	5 mL/min	TBS-Puffer, 5 M Harnstoff, 250 mM Imidazol
Equilibrieren	25 mL	5 mL/min	TBS-Puffer, 5 M Harnstoff
Weitere Parameter			
Temperatur	20°C		
Metall-Ionen	Nickel-Ionen		
Puffersystem	TBS Puffer, pH 8		
Säule	HiTrap™HP-Säule		
Imidazol	250 mM		
Harnstoff	5 M		

B.5.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde mit einer HiLoad Superdex 75 µg (GE Healthcare) durchgeführt, die ein Säulenvolumen von 120 mL besitzt. Folgende Methode wurde zur weiteren Aufreinigung des FGG Proteins mit SEC verwendet:

	Volumen [mL]	Flussrate [ml/min]	Puffer ^a
Equilibrierung	240	1	Equilibrierungspuffer
Probenaufgabe	5	1	Laufpuffer
Elution	180	0,8	Laufpuffer
Regeneration	120	1	Equilibrierungspuffer

^aZusammensetzung siehe Tabelle 16

Zur Lagerung der Säule wurde mit 2 CV Lagerungspuffer gespült.

B.5.5 Umpufferung und Aufkonzentrierung

Die Elutionsfraktionen, die FGG enthalten, werden mittels Vivaspin Diafiltrationseinheit umpuffert und aufkonzentriert. Dazu wurde eine Fraktion (2 mL) in die Einheit gegeben und mit 12 mL PBS-Puffer aufgefüllt und für 3x 20 min bei 4.000 xg zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationsschritten wird die Diafiltrationseinheit wieder auf 12 mL PBS-Puffer aufgefüllt. Nach der Umpufferung wird die Probe sterilfiltriert (0,2 µm).

B.6 Arbeiten in der Zellkultur - FGG

Zur Charakterisierung von FGG wurden Untersuchungen in der Zellkultur durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten (wenn nicht anders angegeben) unter sterilen Voraussetzungen.

B.6.1 Beschichtung der Zellkulturplatten mit Proteinlösung

Für die Proteinbeschichtung wurden 500 µg/mL FGG in PBS-Puffer (pH 7,4) gelöst und 150 µL auf unbeschichtete 48-Well-Platen (Eppendorf) gegeben. Die Proteinlösungen

wurden für 12 h bei 4°C auf der Oberfläche inkubiert. Zusätzlich wurden Wells mit Fibrinogen und BSA beschichtet und gleichermaßen behandelt. Im Anschluss wurde die Proteinlösung entnommen und die Oberflächen mit PBS-Lösung gewaschen. Für den Adhäsionsassay (siehe Kapitel 3.4.3) wurden unbeschichtete 6-Well-Platten (Eppendorf) verwendet und mit 750 µL Proteinlösung beschichtet.

B.6.2 Kultivierung und Passagieren der hAD-MSCs

Die adhärent wachsenden hAD-MSCs wurden bei 37°C in T75-Kulturflaschen mit α -MEM Standardproliferationsmedium (α -MEM + 10 % HS und 1 % Gentamycin) kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz >80 % passagiert. Das Medium wurde dazu abgesaugt und die Zellen in vorgewärmtem PBS-Puffer gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte mittels Accutase (4 mL, 10-15 min inkubieren bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit 4 mL Medium durch mehrmaliges Abspülen von der Oberfläche entfernt und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Medium getrennt (300 xg, 5 min) und in neues Medium (5 mL) resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 20 mL Zellsuspension in 20 µL Trypanblau-Lösung resuspendiert. 10 µL davon wurden in die Neubauer-Zählkammer aufgetragen und die Zellen in den Quadraten mittels Mikroskop gezählt. Durch Mittelwertbildung und Berücksichtigung der Verdünnung lässt sich die Gesamtzellzahl in den 5 mL Medium ermitteln. Die Zellen wurden für eine weitere Passage in eine neue Kulturflasche überführt und bei 37°C im Brutschrank kultiviert oder für die Beschichtungsexperimente auf den unterschiedlich beschichteten Oberflächen kultiviert.

B.6.3 CTB-Assay (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay)

Der CTB-Assay dient der Beurteilung der Viabilität der Zellen und beruht darauf, dass lebende Zellen die Redox-Substanz Resazurin in den Fluorophor Resorufin umwandeln können. Der CTB-Assay wurde sowohl mit FGG im Medium als auch mit FGG-beschichteten Oberflächen durchgeführt. Für die Untersuchung der Biokompatibilität von FGG wurden die nicht-markierten hAD-MSCs (8.000 Zellen/Well) auf herkömmlichen Zellkulturplatten (96-Well von Sarstedt) ausplattiert und nach ca. 24 Stunden Kultivierung bei 37°C das Medium gewechselt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und das neue Standardproliferationsmedium wurde mit FGG (gelöst in PBS; Verhältnis 1:2, 1:4, 1:8) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden bei 37°C kultiviert.

Das Medium wurde erneut gewechselt und die Zellen für 2 Stunden mit 10 %-tiger CTB-Lösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Fluoreszenzmessung bei 560 nm (Anregung) und 590 nm (Emission).

Für die Untersuchung, ob die FGG-Beschichtung biokompatibel ist, wurden 15.000 hAD-MSCs/Well auf die beschichteten Oberflächen (48 Well von Eppendorf) ausplattiert. Nach 1, 3 und 7 Tagen wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 1 Stunde mit 10 %-tiger CTB-Lösung inkubiert. Es erfolgte die Überführung des Überstandes in 96-Wellplatten und die Fluoreszenzmessung bei 560 nm (Anregung) und 590 nm (Emission).

Zur Auswertung wurde der Blank-Wert der CTB-Lösung von den jeweiligen Messwerten abgezogen und Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Viabilität der Zellen wurde stets in Bezug auf die Dunkel-Kontrolle der jeweiligen Wellplatte berechnet.

B.6.4 FGG-Beschichtungsversuche mit hAD-MSCs

Zur Analyse des Adhäsionsverhaltens wurden nicht-markierte hAD-MSCs auf die beschichteten Oberflächen gegeben. Für die 48 Well Platte wurden 40.000 Zellen/Well, für die 6 Well Platte 300.000 Zellen/Well ausgesät. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde das Medium mit den nicht adhären Zellen abgenommen und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt (analog zu Kapitel 6.2.2.2).

Für die Wachstumsanalyse wurden sowohl die nicht-markierten hAD-MSCs – als auch die GFP-markierte Zellen auf den beschichteten Oberflächen ausplattiert. Dabei wurde die Zahl der ausplattierten Zellen variiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aufnahmen des gesamten Wells mit dem Biotek® Cytation 5™ System gemacht. Dafür wurden die Zellen ggf. mit Calcein-AM gefärbt. (Kapitel 6.2.3.4) Für die anschließende Auswertung in Fiji wurden die in Tabelle 19 aufgelisteten Makros verwendet.

Tabelle 19: Makros zur quantitativen Auswertung des Wachstumsverhalten der AD-MSCs mittels Bildbearbeitungsprogramm Fiji

AD-MSCs	<pre>run("8-bit"); run("Subtract Background...", "rolling=20 light"); run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 normalize"); run("Remove Outliers...", "radius=30 threshold=80 which=Dark"); run("Threshold..."); setThreshold(0, 225); setOption("BlackBackground", true); run("Convert to Mask"); run("Despeckle"); 3x run("Fill Holes"); run("Measure");</pre>
GFP-markierte AD- MSCs	<pre>run("8-bit"); run("Subtract Background...", "rolling=30"); run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 normalize"); setThreshold(10, 255); //run("Threshold..."); run("Convert to Mask"); makeOval(-128, -75, 1944, 1949); run("Measure");</pre>

AD-MSCs gefärbt mit Calcein-AM		<pre>run("8-bit"); run("Subtract Background...", "rolling=50"); setThreshold(2, 255); run("Convert to Mask"); makeOval(-126, -72, 1908, 1955); run("Measure");</pre>
-----------------------------------	--	---

B.7 Proteinanalytik

B.7.1 N-terminale Sequenzierung-GelMP

Für die N-terminale Sequenzierung wird das GelMP auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einer Ponceau Rot-Färbung sichtbar gemacht. Die Probe wurde an das Helmholtz Zentrum in Braunschweig weitergeleitet und analysiert.

B.7.2 Bichinchoninic Acid Protein Assay-GelMP

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird ein Bicinchoninsäure (BCA)-Assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Als Referenz wurde natives Kollagen I aus der menschlichen Plazenta (Santa Cruz Biotech., Dallas, TX, USA) verwendet.

B.7.3 Chemische Modifizierung des GelMP

Die Veresterung der Carbonsäure-Seitenketten des GelMP erfolgte durch die Zugabe von 500 µL Methanol und 0,1 M Salzsäure (pro 100 µg GelMP). Die Lösung wurde bei 4°C für 72 h inkubiert. Das Methanol wurde durch Diafiltration (3 kDa) gegen 1 M Salzsäure ausgetauscht. Die Probe wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

B.7.4 SDS-PAGE

Proteinproben wurden mit SDS-PAGE mit 10 % Tris-HCl-Gelen und einem Mini Protean Tetra Cell System (BioRad, USA) analysiert. Der Kulturüberstand wurde 1:1 mit Laemmli-Puffer (2x) gemischt und 10 μL wurden auf das Gel geladen. Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Precision Plus Protein Standard (BioRad, USA) verwendet. Proteine wurden mit der Coomassie Brilliant Blue G 250 Färbung visualisiert.

B.7.5 Coomassie-Färbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel kurz in Wasser gewaschen und im Anschluss mit Coomassie Brilliant Blue oder InstantBlue™ gefärbt. Dafür wurde das Gel in der Färbelösung unter Schütteln bei Raumtemperatur über Nacht (Coomassie Brilliant Blue) oder für eine Stunde (InstantBlue™) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch Abnahme der Färbelösung und durch Waschen des Gels mit Wasser bis der Hintergrund des Gels farblos war.

B.7.6 Bradford-Test Assay

Zur Quantifizierung des FGG wurde der Bradford-Test verwendet. Das FGG wurde mittels Dreifachbestimmung in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit einem Bradford-Test-Reagenz (BioRad) 1:5 verdünnt (Endvolumen: 250 μL). Zur Quantifizierung wurde BSA als Standard verwendet und eine Standardreihe von 0-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mit dest. Wasser verwendet. Das Bradford-Test-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau-G250, der an die kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine bindet. In Gegenwart einer sauren Lösung kommt es zu einer Überführung des Farbstoffes vom kationischen in den anionischen Zustand sowie zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm. Dies kann photometrisch bestimmt werden und ist proportional zur Proteinkonzentration.

Um die Konzentration zu ermitteln, wird der Messwert der Messung bei 470 nm vom Messwert der Messung bei 595 nm subtrahiert und zwischen den identischen Proben der Mittelwert gebildet. Die Absorption der Standard-Reihe wird gegen die Konzentration aufgetragen und eine lineare Regression gebildet. Mittels der Geradengleichung kann aus der Absorption der zu vermessenden Proben die Konzentration bestimmt werden.

B.7.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Densitometrie

Die densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit der Software GelAnalyzer. Dafür wurden die angefertigten SDS-Gele mit Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend eingescannt. Die Probenspuren werden über die relative Farbdichte der gesamten Probenspur und der zu analysierenden Proteinbande bestimmt. Neben der Proteinkonzentration wird mit dieser Methode die Reinheit der zu analysierenden Proteinproben bestimmt.

B.7.8 Rheologie

Die Gelbildung einer 2,5 mM GelMP-Lösung in PBS (pH=7,4) wurde bei 15 °C mit einem modularen Rheometer MCR 302, Anton Paar, Österreich) mit einer Plattengeometrie (20 mm Durchmesser, 1 mm Spaltweite) untersucht. Die Trimerisierung wurde mit einem Zeitraffer-Oszillationstest unter konstanter Dehnungsamplitude von 0,1 % und bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz für einen Zeitraum von 20 h aufgezeichnet. Eine Lösungsmittelfalle wurde verwendet, um den Probenverlust durch Verdampfung zu verhindern.

B.7.9 CD-Spektrometrie

Zirkuläre Dichroismus-(CD)-Spektren wurden mit einem Spektropolarimeter J-815 (Jasco, USA) aufgenommen. Das aufgereinigte GelMP und die Gelatine A (Sigma Aldrich, USA) wurden im PBS-Puffer in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Das menschliche Kollagen I (Biotechnology Inc., USA) wurde in Essigsäure (1 mg/ml) gelöst und ebenfalls für 10 min bei 90 °C zur thermischen Denaturierung behandelt. Die Testlösungen wurden in eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 mm eingebracht und die Spektren im Bereich von 190-240 nm aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min bei einer Auflösung von 0,5 nm erhalten. Schmelzkurven von 10 bis 60°C wurden durch Erhöhen der Temperatur in Schritten von 10°C abgeleitet. Die Messungen wurden 5 mal durchgeführt und die gemittelten Werte wurden aufgezeichnet.

B.7.10 Differential-Scanning-Fluorometry (DSF)

Die Thermostabilität wurde mittels Nano Differential-Scanning-Fluorometry (DSF) mit dem Tycho NT.6-Gerät (NanoTemper Technologies, München, DE) gemessen. Die Mes-

sung erfolgte im Bereich von 20-95°C mit einer Aufheizrate von 30°C/min. Die Proteinfaltung wurde durch das Fluoreszenzsignal von aromatischen Aminosäuren bei einer Intensität von 330 nm und 350 nm detektiert. Die Schmelztemperatur (T_m) wurde durch das Maximum der ersten Ableitung der Fluoreszenz-Ratio (F350/F330) ermittelt.

C Zusätzliche experimentelle Daten

Gensequenz des Gelatine mimetischen Proteins (GelMP)

```

gaattccccggtccgctggtccacctggtccacctggtccaccaggaccaccaggtccacctggaccaccggg
tcctcccgaccaactagtagtctggttctccaggttctcctggtccagatggtaaaactggacctccaggacctg
ctggacaagatgtagaccaggtctccaggtccaccaggtgctagaggtcaagctggtgttatgggtttcca
ggtcctaaagtgctgctggtgaacctggtaaagctggtgaaagaggtgttctggacctcctggtgctgttg
tctgctgtaagatggtgaggtggtgctcaaggaccctggtcctgctggtccagctggtgagagaggtg
aacaaggtccagctggttctcctggtttcaaggttggcaggtccagctggtccaccaggtgaagctggtaaa
ccaggtgagcaaggtgtccaggtgattgggtgctccaggtccttctggtgctagaggtgaaaggattccc
tggagagagaggtgttcagggtcctcctggtccagctggtccaagaggtgctaatggtgctcctggaaatgatg
gtgctaagggtgatgctggtgctccaggtgctcctggatctcaaggtgctccaggattgcaaggtatgccaggt
gaaagaggtgctgctggtttgcctggtccaaaaggtgatagaggtgacgctggaccaaaagggtgctgatggatc
tccaggtaaagatggtgtagaggttactggaccaatcggtcctcctggacctgctggtgctccaggtgata
agggtgaatctggtccatccggtcctgctggtcctacaggtgctagaggtgctccaggtgacagaggtgaacca
ggacctccaggtccagctggttttctggtccacctggtgctgatggtcaaccaggtgctaaaggtgagccagg
tgacgctggtgctaaaggtgacgctggtccaccaggtcctgctggacctgctggtccacctggtcctattggtg
atgttggtgctccaggtgctaaaggtgctagaggttctgctggacctccaggtgctactggtttccaggtgct
gctggaagagtggctcctccaggaccatctggtaatgctggacctcctggtcctccaggtcctgctggtgaaaga
aggtggtgaaaggtccaagaggtgaaactggtccagctggtgacgtggtgaaagttggacctccaggtccacctg
gtccagctggtgaaaaaggttctccaggtgctgacttaattaaccccggtccgctggtccacctggtccacct
ggtccaccaggaccaccaggtccacctggaccaccgggtcctccggaccata

```

Proteinsequenz des Gelatine mimetischen Protein (GelMP)

1	YVEFP PPGP	PGPPG PPGP	GPPG PPGPPG	PTSTG SPGSP
41	GPDGKTGPPG	PAGQDGRPGP	PGPPGARGQA	GVMGFPGPKG
81	AAGEPGKAGE	RGVPPGGAV	GPAGKDEAG	AQGPPGPAGP
121	AGERGEQGPA	GSPGFQGLPG	PAGPPGEAGK	PGEQGVPGDL
161	GAPGPSGARG	ERGFPERGV	QGPPGPAGPR	GANGAPGNDG
201	AKGDAGAPGA	PGSQGAPLQ	GMPGERGAAG	LPGPKGDRGD
241	AGPKGADGSP	GKDGVRGLTG	PIGPPGAGA	PGDKGESGPS
281	GPAGPTGARG	APGDRGEPGP	PGPAGFAGPP	GADGQPGAKG
321	EPGDAGAKGD	AGPPGPAGPA	GPPGPIGNVG	APGAKGARGS
361	AGPPGATGFP	GAAGRVGPPG	PSGNAGPPGP	PGPAGKEGGK
401	GPRGETGPAG	RPGEVGGPPG	PGPAGEKGS	GADLIN PGPP
441	GPPG PPGPPG	PPGPPG PPGP	PGP	

Gensequenz der Fibrinoge Gamma Kette (FGG)

CTCGAGGATATCATGTATGTTGCAACCCGTGATAATTGCTGCATTCTGGATGAACGTTTTG-
TAGCTATTGTCCGACCACCTGTGGTATTGCAGATTTTCTGAGCACCTATCAGACCAAAGTTGA
TAAAGATCTGCAGAGCCTGGAAGATATTCTGCATCAGGTTGAAAACAAAACCA-
GCGAAGTTAAACAGCTGATTAAGCAATTCAGCTGACCTATAATCCGGATGAAAGCAGCAAAC
CGAATATGATTGATGCAGCAACCCTGAAAAGCCGTAATAATGCTGGAAGAGATCATGAAATAT-
GAAGCCAGCATTCTGACCCATGATAGCAGCATTTCGTTATCTGCAAGAAATCTACAATAGCAAT
AATCAGAAAATTGTGAATCTGAAAGAAAAAGTGGCACAGCTGGAAGCACAGTGTCAAGAAC-
CGTGTAAGATAACCGTTCAGATTCATGATATCACCGGTAAGATTGTCAGGATATTGCAAACA
AAGGTGAAAACAGAGCGGTCTGTATTTTATCAAACCGCTGAAAGCAAATCAGCAGTTT-
CTGGTGTATTGCGAAATTGATGGTAGCGGTAATGGTTGGACCGTTTTTCAGAAAACGTCTGGAT
GGTAGCGTGGACTTCAAAAAAACTGGATTCAGTATAAAGAAGGCTTTGGTCATCT-
GAGCCCGACCGGCACCACCGAATTTTGGCTGGGTAATGAAAAAATTCATCTGATTAGCACCCA
GAGCGCAATTCGGTATGCACTGCGTGTGAACTGGAAGATTGGAATGGTCGTACCAGCAC-
CGCAGATTATGCAATGTTTAAAGTTGGTCCGGAAGCCGATAAATATCGTCTGACCTATGCATA
TTTTGCCGGTGGGATGCCGGTGTGATTTGATGGTTTTGATTTTGGTGAT-
GATCCGAGCGATAAATTTCTTTACCAGCCATAATGGTATGCAGTTTACACCTGGGATAACGAT
AACGATAAATTTGAAGGCAATTGTGCCGAACAGGATGGTAGTGGTTGGTGGATGAATAAAT-
GTCATGCAGGTCATCTGAACGGCGTTTATTATCAGGGTGGCACCTATAGCAAAGCAAGCACCC
CGAATGGTTATGATAATGGTATTATTTGGGCAACCTGAAAAACCCGTTGGTACAGCAT-
GAAAAAAACCACCATGAAAATCATCCCGTTTAAACCGTCTGACCATTGGTGAAGGTCAGCAGCA
TCATCTGGGTGGTGAAAACAAGCCGGTGTGTAATAAAAGGATCCGTCGAC

Proteinsequenz FGG (FASTA):

MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMLEDIMYVATRDNCCILDERFGSYCPTTCGIAD-
FLSTYQTKVDKDLQSLLEDILHQVENKTSEVKQLIKAIQLTYNPDESSKPNMIDAATLKSRLMLEEIMK
YEASILTHDSSIRYLQEIYNSNNQKIVNLKEKVAQLEAQCEPKDVTQIHDITGKDCQDI-
ANKGAKQSGLYFIKPLKANQQFLVYCEIDGSGNGWTVFQKRLDGSVDFKKNWIQYKEGFGHLSPT

GTTEFWLGNEKIHLLISTQSAIPYALRVELEDWNGRTSTADYAMFKVGP EADKYRLTYAYFA-
GGDAGDAFDGDFDGDPSDKFF TSHNGMQFSTWDNDNDKFEGNCAEQDGS GWWMNKCHAGHLN
GVYYQGGTYSKASTPNGYDNGI IWATWKTRWYSMKKTTMKIIPFNRLTIGEGQQHHLGGAK-
QAGDV

Verzeichnisse

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisches Modell zu Herstellung von rekombinanten Hydrogelen. In Anlehnung an Jungst <i>et. al.</i>	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kollagenstruktur. 2 α -Ketten (hier sind zwei α 1-Ketten und eine α 2-Kette repräsentativ für Typ-I-Kollagen dargestellt). Die drei Ketten werden intrazellulär zu einer Tripelhelix geformt (Prokollagen). Das Prokollagen wird durch die Entfernung der N- und C-Propeptide über Peptidasen in Tropokollagen umgewandelt. Durch Selbstorganisation und kovalente Quervernetzungen werden Kollagenmikrofibrillen gebildet (10-300 nm). Kollagenfibrillen, die durch Aggregation der Kollagenmikrofibrillen entstehen, haben einen Durchmesser von 0,5-3 μ m. (adaptiert von [133]). Die Kollagenfibrillen sind unlöslich und können durch saure (Gelatine A) oder alkalische (Gelatine B) Vorbehandlung verarbeitet werden. Die gewonnene Gelatine kann einen reversiblen Sol-Gel-Übergang durchlaufen durch einen Hitze-Kühl-Prozess [134].	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Gleichgewichts zwischen der Blutgerinnung und der Fibrinolyse. Das Gerinnsel wird über eine Kaskade enzymatischer Reaktionen gebildet, das Prothrombin zu dem proteolytischen Enzym Thrombin aktiviert und das lösliche Fibrinogen wird zum unlöslichen Fibrin (Blutgerinnung). Das Fibrin Gerinnsel wird durch Plasmin proteolytisch gespalten und aufgelöst. (In Anlehnung an Weisel <i>et al.</i>).....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fibrinogens. In Anlehnung an Parry <i>et al.</i>	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fibrinogen- $\gamma\gamma$ -Kette. Im N-terminalen Bereich bildet die $\gamma\gamma$ -Kette Disulfidbrücken mit der zweiten $\gamma\gamma$ -Kette (gelb), mit der $\beta\gamma$ -Kette (hellgrün) und der $\alpha\gamma$ -Kette (hellblau). Gezeigt sind die Bindestellen für die Integrine $\alpha_M\beta_3$ (dunkelgrün), $\alpha_{IIb}\beta_3$ (rot) und $\alpha_V\beta_3$ (blau), für den Plasminogen Aktivator tPA (orange), den <i>Crosslinking</i> Faktor XIII (lila) und dem Wachstumsfaktor FGF-2 (grau). Die Bindung von Interleukin-1b an die γ -Kette konnte noch nicht vollständig charakterisiert werden. Basierend auf [57]......	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Charakteristika für die Herstellung von Biotinte. In Anlehnung an Copyright 2013, Wiley-VCH	17

Abbildung 7: Übersicht der bereits optimierten Kultivierungsparameter im 2 L-Maßstab aus einer vorherigen Arbeit [90].	23
Abbildung 8: Übersicht über den Prozess zur Herstellung und Charakterisierung von GelMP. Die Klonierung und Transformation des <i>gelmp</i> Gens wurde bereits in einer vorherigen Arbeit durchgeführt [90]. Diese Arbeit startet mit der Kultivierung zur Produktion von GelMP im größeren Maßstab und endet mit der Anwendung des GelMPs in der Zellkultur.....	24
Abbildung 9: Online und Offline Analytik einer 30 L Fed-batch-Kultivierung von <i>K. phaffii</i> im BiostatC plus Bioreaktor. Der Gelöstsauerstoff wurde während der Kultivierung über 30% gehalten und über die Rührerdrehzahl und den Sauerstoffanteil in der Zuluft kontrolliert. Die Batch Phase endete nach einer Kulturzeit von 55 h was durch einen kurzzeitigen Anstieg des Gelöstsauerstoff sichtbar wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Feed Lösung (Methanol) zugegeben. Die Methanolkonzentration wurde durch einen Methanolsensor mit Feedback Loop über 0,1 % gehalten. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund limitierender Pumpraten nicht erreicht werden....	25
Abbildung 10: (A) SDS-PAGE vom Kulturüberstand der 30 L Fed-Batch-Kultivierung. 1: Glycerol-Batch Phase vor Induktion (48 h Kultivierungsdauer). 2: Induktion mit Methanol t=57 h; 3: t=72 h; 4: t=78 h; 5: t=80 h. M: Größenstandard-Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard.....	26
Abbildung 11: Veresterung von Carboxylaminosäure-Seitenketten aus dem GelMP Protein, 1: unmodifiziertes GelMP; 2: Verestertes GelMP. M: Größenstandard - Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard.....	27
Abbildung 12: Umpufferung des GelMP durch Größenausschlusschromatographie (HiPrep Desalting Säule). (A) Chromatogramm der SEC. Es wurde die Konduktivität (gestrichelte Linie) und die Absorption (durchgezogene Linie) betrachtet. (B) SDS-PAGE der SEC. M: Größenstandard – Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard; 1: Kulturüberstand, der auf die SEC Säule aufgetragen wurde. 2: Peak (1) aus der SEC mit aufgereinigtem GelMP. 3: Peak (2) aus der SEC. Diese Fraktionen weisen keine Proteinbande im SDS-Gel auf.	29
Abbildung 13: Schmelzpunktanalyse von GelMP in verschiedenen Puffersystemen mit verschiedenen pH-Werten. Die Analyse erfolgte mittels nanoDSC.....	31
Abbildung 14: Stabilität GelMP (10 %) in PBS-Puffer; (A) Lagerung der 10 %igen GelMP-Lösung über fünf Tage (1-5) bei 4°C; (B) Lagerung der 10 %igen GelMP-Lösung über fünf Tage (1-5) bei 21°C (RT).	32

Abbildung 15: Löslichkeit des GelMP (500 µg/mL) in verschiedenen Puffersystemen. pH 5 und 5,5: Acetat Puffer; pH 6 und 6,5: MES Puffer; pH 7: MOPS Puffer; pH 7,5: PBS Puffer; pH 8 und 8,5: Tris-HCl Puffer – jeweils 50 mM.....	33
Abbildung 16: Rheologische Messung von GelMP bei 15°C über 20 h. Das GelMP ist in PBS-Puffer in einer 10%-igen Lösung angesetzt.	34
Abbildung 17: (A) CD-Spektrum von humanem Kollagen I, vom denaturierten Kollagen und vom rekombinanten GelMP. (B) CD-Spektrum vom rekombinanten GelMP (10-60°C), von Gelatine A und vom humanen Kollagen I. Es wurde ein UV-Spektrum (190-240 nm) aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/mL.....	35
Abbildung 18: (A) Zeitliche Zellkonfluenz-Untersuchung mit einer hAD-MSC-Zelllinie. Das Medium wurde mit verschiedenen Zusätzen (GelMP, BSA, Gelatine A und ohne Zusatz) behandelt. (B) Die Anzahl der durch Caspase-3/7 gefärbten Zellen wurde über die Zeit aufgenommen und als Fluoreszenzobjekt aufgetragen; n=3 Wells pro Datenpunkt gezeigt; X= Kontrolle, ohne Zusatz.....	37
Abbildung 19: Ablauf des Zelladhäsionsassays mittels IncuCyte-Mikroskop. (1) Die Proteinlösungen (GelMP, BSA, Gelatine A) werden in eine Well-Platte gegeben und 12 h bei 4°C inkubiert. (2) Die Proteinlösung wird abgesaugt und hAD-MSCs werden mit Medium auf die verschiedenen Beschichtungen ausplattiert und über 60 h bei 37°C, 5 % CO ₂ mit einem IncuCyte-Mikroskop überwacht. (3) Jede Stunde werden pro Well 4 Bilder aufgenommen (10x Vergrößerung). Von den aufgenommenen Bildern werden mittels IncuCyte-Software Konfluenz- und Fluoreszenz-Analysen durchgeführt.	38
Abbildung 20: Zellmorphologische Untersuchung auf GelMP, BSA, Gelatine A und unbeschichteter Oberfläche nach 0, 20, 48 und 60 h Kultivierungsdauer. Scale bar 500 µm. Die Videos zum Zellwachstum und Adhäsionsprozess können über die beigefügten QR Codes aufgerufen werden.	39
Abbildung 21: (A) Echtzeit Konfluenz Untersuchung mit einer hAD-MSC Zelllinie. Zellproliferation auf vier verschiedene Oberflächenbeschichtungen (GelMP, Gelatine A, BSA und X=unbeschichtet). Die Zellproliferation wurde 60 h durch das IncuCyte System in einem Inkubator (5 %CO ₂ , und 37°C) beobachtet. (B) Agglomeratbildung der hAD-MSCs auf den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen.....	39
Abbildung 22: Prozess zur Herstellung von GelMP und die mögliche weitere Modifizierung und Anwendung als Bioink.	40
Abbildung 23: Gesamtprozess der FGG-Herstellung und Anwendung in der Zellkultur.	42

Abbildung 24: Optimierte Parameter einer 2L-Batch-Kultivierung aus vorhergehenden Arbeiten [100]. Weitere Details befinden sich im Anhang.....	43
Abbildung 25: Online- und Offline Daten einer 10 L Batch Kultivierung im Edelstahlreaktor. Die Substratanfangskonzentration (Glucose) beträgt 10 g/L. pH-Wert: 6,5. Der Gelöstsauerstoff (DO) nahm mit zunehmender Biomassenkonzentration (gezeigt OD ₆₀₀) ab. Durch die Stoffwechselaktivität veränderte sich die CO ₂ -Konzentration im Abgas. Die Glucose-Konzentration ist über den gesamten Kultivierungsverlauf gesunken. Die Induktion mittels IPTG erfolgte nach 5 Stunden Kultivierungsdauer.	44
Abbildung 26: Online- und Offline Daten einer <i>E. coli</i> Fed-Batch-Kultivierung für die Produktion von FGG. Nach 13,5 h Kultivierungsdauer wurde mit IPTG induziert. Nach weiteren 4 h wurde der Prozess beendet und die Zellen geerntet. Der Gelöstsauerstoff (DO) nahm mit zunehmender Biomasse ab. Durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien veränderte sich die O ₂ - und CO ₂ -Konzentration im Abgas.	46
Abbildung 27: SDS-Gel der 10 L Fed-Batch-Kultivierung. Proteinproduktion nach 4 h Induktion mit IPTG. Bei ca. 55 kDa ist eine eindeutige Proteinbande zu erkennen. Das FGG befindet sich in der unlöslichen Fraktion und liegt als IB vor.	47
Abbildung 28: Ablauf des DSP. Nach dem Zellaufschluss und der Solubilisierung der IBs erfolgt eine Zwei-Schritt-Chromatographie, bei der zunächst die IMAC angewandt wurde und im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt wurde. Abschließend erfolgt die Umpufferung der aufgereinigten Probe zur Entfernung des Harnstoffes und zur Überführung in einen physiologischen Puffer für die weitere Anwendung in der Zellkultur.	49
Abbildung 29: Ablauf von Zellaufschluss und Solubilisierung der IBs nach der Kultivierung mit <i>E. coli</i> . Die Zellen werden aufgeschlossen und die enthaltenen IBs gereinigt und solubilisiert.	50
Abbildung 30: SDS-PAGE der Zellyse, der Waschschritte und der Solubilisierung nach der Kultivierung von FGG mittels <i>E. coli</i> . ZL = Vor Zellyse; ZA = Nach Zellyse; W1-3 = Waschschritte 1-3; S = Nach Solubilisierung; M= Größenstandard (ThermoFisher Prestained Protein Ladder). 10 µL Proben-, 5 µL Größenstandard. Die Banden im Bereich des FGG (ca. 50 kDa) wurden hervorgehoben.	51
Abbildung 31: Prozessparameter, die für die Aufreinigung mittels IMAC mit dem Äkta-Pure-System untersucht wurden [135].	53
Abbildung 32: Chromatographische Aufreinigung von FGG mittels IMAC. (A) Chromatogramm der FGG-IMAC-Aufreinigung mit drei verschiedenen Puffersystemen	

(MOPS-, Natriumphosphat und Tris-HCl-Puffer). Elution erfolgt isokratisch mit 250 mM Imidazol. (B) Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung.....	54
Abbildung 33: Inverse Assoziation von Affinität/Kapazität und Spezifität von Metallionen für His-tags. In Anlehnung an [109].	55
Abbildung 34: (A) Chromatogramm der FGG-Aufreinigung mit vier unterschiedlich immobilisierten Metall-Ionen (Nickel, Cobalt, Kupfer und Zink-Ionen). Die IMAC-Durchläufe wurden mit der HiTrap™ IMAC HP-Säule, 1 mL im TBS-Puffersystem durchgeführt. Probenauftragsvolumen: 1 mL. Flussrate: 1mL/min. Die Elution erfolgte isokratisch mit 250 mM Imidazol. (B) Analyse der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung. A: Auftrag – aufgetragen sind Proben der solubilisierten IBs.....	56
Abbildung 35: Chromatogramme der Affinitätschromatographie von FGG. (A) Chromatographische Aufreinigung von FGG mit verschiedenen Umgebungstemperaturen (10°C, 20°C). (B) Chromatographische Aufreinigung von FGG mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen im Bindepuffer (0 M, 5 M, 8 M). (C) Chromatographische Aufreinigung von FGG mit einem Imidazolgradienten während der Elution. 100 % Imidazol entsprechen 500 mM Imidazol.	57
Abbildung 36: (A) Chromatogramm vom IMAC Lauf mit 5 mL HisTrap™-Säule. Injektionsvolumen 10 mL (3,9 mg/mL), Imidazolkonzentration=250 mM. In Dunkelgrau der Elutionspeak markiert. (B) Zugehöriges SDS-Gel. A= Auftrag, DB = Durchbruch, 1-5: Elutionsfraktionen (dunkelgrau) M= Marker (ThermoFisher Prestained Protein Ladder); 10 µL Proben- und 5 µL Markervolumen.....	59
Abbildung 37: (A) Größenausschlusschromatographie (SEC, HiLoad® Superdex® 75 µg) mit einem Auftragsvolumen von 5 mL. Flussrate: 0,8 mL/min. Probenauftrag: Elutionsfraktion der Affinitätschromatographie (siehe Seite 58). (B) Vergrößerter Ausschnitt des Chromatogramms (A). 1-8 entsprechen den Fraktionsnummern, die mittels SDS PAGE (C) analysiert wurden. Die Reinheit des FGG wurde densitometrisch bestimmt.....	61
Abbildung 38: Proteinausbeute nach der Umpufferung des FGG Proteins (Elutionsfraktion der IMAC) mit Vivaspin® Ultrafiltrations-Einheiten in PBS Puffer (pH 7.4) mit L-Arginin, BSA oder MgCl ₂ /CaCl ₂ . Ausbeuteberechnung über Konzentrationsbestimmungen vor und nach der Umpufferung sowie densitometrische Analyse der SDS-PAGE.....	63

Abbildung 39: Polymerisationstest des rekombinanten FGG mit FXIII. Die Proben wurden nach direkter Zugabe von Thrombin und Faktor XIII (K) und nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C aufgetragen.....	65
Abbildung 40: Analyse der Lagerungsstabilität von FGG in verschiedenen Puffersystemen (Tris-HCl-Puffer mit Harnstoff (5 M) als Zusatz, PBS-Puffer ohne Harnstoff, beides pH 8) bei Raumtemperatur nach 0, 2 und 4 Tagen. (A) Berechnung der Ausbeute über Konzentrationsberechnungen mit Bradford-Test und densitometrischen Analysen der SDS-PAGE (B) SDS-PAGE. 0=Tag 0; 2=Tag 1; 4=Tag 4 M= Größenstandard (Thermofisher Prestained Protein Ladder). 10 µL Proben- und 5 µL Markervolumen.....	66
Abbildung 41: Schematische Darstellung der Beschichtungs- und Biokompatibilitätsuntersuchungen. Neben dem rekombinant produzierten FGG wurde Fibrinogen als Positiv- und BSA als Negativkontrolle verwendet.....	67
Abbildung 42: Kultivierung von AD-MSCs auf FGG-, Fibrinogen- und BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Oberflächen für 1, 3 und 7 Tage. Es wurden 15.000 Zellen/Well ausplattiert auf 48-Well Platten (Eppendorf). Die Ermittlung der Viabilität der Zellen erfolgte über den CTB-Viabilitätstest.....	69
Abbildung 43: Abhängigkeit der Zellviabilität von der Konzentration des aufgereinigten FGG Proteins. Die Steigerung der Zellviabilität ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale der CTB-Assays mit FGG und der Kontrolle (ohne Zugabe von FGG).	70
Abbildung 44: Untersuchung der Adhäsion von hAD-MSCs auf FGG- und BSA-beschichteten Oberflächen. Es wurden 300.000 Zellen/Well auf 6-Well Platten (Eppendorf) ausplattiert. Gezählt wurde die Anzahl der nicht-adhärenierten Zellen im Überstand mittels Neubauer-Zählkammer.....	71
Abbildung 45: Wachstum von hAD-MSCs auf FGG-, Fibrinogen- und BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Oberflächen nach 1, 3 und 7 Tagen Kultivierung. Anschließende Färbung der Zellen mit Calcein-AM. Es wurden 15.000 Zellen/Well ausplattiert (48-Well, Eppendorf). Fluoreszenzaufnahmen mit dem Biotek® Cytation 5™ System (4x Vergrößerung).....	72
Abbildung 46: Auswertung des Wachstums von hAD-MSCs auf FGG-, Fibrinogen- und BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Wells. Es wurden 15.000 Zellen/Well ausplattiert. Färbung der Zellen mit Calcein-AM. Fluoreszenzaufnahmen mit dem Biotek® Cytation 5™ System (4x Vergrößerung). Auswertung über Fiji.	73

Abbildung 47: Aufnahmen nach 24h Inkubation von AD-MSCs auf FGG-, Fibrinogen- und BSA-beschichteten bzw. unbeschichteten Oberflächen. FGG: FGG gelöst in PBS-Puffer, FGG2: FGG nach Solubilisierung im Harnstoffpuffer. 15.000 Zellen / Well ausplattiert (48-Well Platten, Eppendorf). Färbung der lebenden Zellen (Calcein-AM, grün), des Zellkerns (DAPI, blau) sowie der abgestorbenen Zellen (Propidiumiodid, rot). Fluoreszenzaufnahmen mit dem Biotek[®] Cytation 5[™] System (links: 4x Vergrößerung, rechts: 20x Vergrößerung)..... 75

Abbildung 48: Gesamtprozess der FGG-Herstellung und Anwendung in der Zellkultur. 76

Literaturverzeichnis

- [1] K. L. Goh und D. F. Holmes, *Collagenous extracellular matrix biomaterials for tissue engineering: Lessons from the common sea urchin tissue*, Bd. 18, Nr. 5. 2017.
- [2] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, und F. Berthod, „Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications“, *Materials (Basel)*., Bd. 3, Nr. 3, S. 1863–1887, 2010.
- [3] M. H. Lee, P. Ducheyne, L. Lynch, D. Boettiger, und R. J. Composto, „Effect of biomaterial surface properties on fibronectin- $\alpha 5\beta 1$ integrin interaction and cellular attachment“, *Biomaterials*, Bd. 27, Nr. 9, S. 1907–1916, 2006.
- [4] V. Llopis-Hernández, M. Cantini, C. González-García, und M. Salmerón-Sánchez, „Material-based strategies to engineer fibronectin matrices for regenerative medicine“, *Int. Mater. Rev.*, Bd. 60, Nr. 5, S. 245–263, 2015.
- [5] M. D. Shoulders und R. T. Raines, „Collagen Structure and Stability“, *Annu. Rev. Biochem.*, Bd. 78, Nr. 1, S. 929–958, 2009.
- [6] N. Davidenko u. a., „Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry“, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, Bd. 27, Nr. 10, S. 0–1, 2016.
- [7] G. Yang u. a., „Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods“, *Sci. Rep.*, Bd. 8, Nr. 1, S. 1–13, 2018.
- [8] Z. S. Lodish H, Berk A, „Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix“, in *Molecular Cell Biology. 4th edition.*, 2000.
- [9] B. B. Brodsky und A. V Persikov, „MOLECULAR STRUCTURE OF THE COLLAGEN TRIPLE HELIX“, *Adv. Protein Chem.*, Bd. 70, Nr. 04, S. 302–333, 2013.
- [10] L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang, und Y. Cao, „Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications“, *Pediatr. Res.*, Bd. 63, Nr. 5, S. 492–496, 2008.

-
- [11] L. Vitagliano, R. Berisio, L. Mazzarella, und A. Zagari, „Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation“, *Biopolymers*, Bd. 58, Nr. 5, S. 459–464, 2001.
- [12] R. A. Berg und D. J. Prockop, „The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen, evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen“, Bd. 52, Nr. 1, 1973.
- [13] K. Takaluoma *u. a.*, „Tissue-specific changes in the hydroxylysine content and cross-links of collagens and alterations in fibril morphology in lysyl hydroxylase 1 knock-out mice“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 282, Nr. 9, S. 6588–6596, 2007.
- [14] B. Schegg, A. J. Hulsmeier, C. Rutschmann, C. Maag, und T. Hennet, „Core Glycosylation of Collagen Is Initiated by Two (1-O)Galactosyltransferases“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 29, Nr. 4, S. 943–952, 2009.
- [15] M. Yamauchi und M. Sricholpech, „Lysine post-translational modifications of collagen“, *Essays Biochem.*, Bd. 52, Nr. 1, S. 113–133, 2012.
- [16] R. S. G. Silva, S. F. Bandeira, und L. A. A. Pinto, „Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*)“, *LWT - Food Sci. Technol.*, Bd. 57, Nr. 2, S. 580–585, 2014.
- [17] M. H. Zaman, „Understanding the molecular basis for differential binding of integrins to collagen and gelatin“, *Biophys. J.*, Bd. 92, Nr. 2, S. L17–L19, 2007.
- [18] W. A. Starin, „The Antigenic Properties of Gelatin“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 23, Nr. 2, S. 139–158, 2019.
- [19] S. Gorgieva und V. Kokol, „Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives“, *Biomater. Appl. Nanomedicine*, Nr. November, 2011.
- [20] A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, und H. Berghmans, „Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels“, S. 31–38, 2000.
- [21] C. H. Lee, A. Singla, und Y. Lee, „Biomedical applications of collagen“, Bd. 221,

-
- S. 1–22, 2001.
- [22] W. Friess, „Collagen – biomaterial for drug delivery 1“, Bd. 45, S. 113–136, 1998.
- [23] D. Olsen *u. a.*, „Recombinant collagen and gelatin for drug delivery“, Bd. 55, S. 1547–1567, 2003.
- [24] A. H. Grobbs, P. J. Steele, R. A. Somerville, und D. M. Taylor, „Inactivation of the bovine-spongiform-encephalopathy (BSE) agent by the acid and alkaline processes used in the manufacture of bone gelatine“, Bd. 338, S. 329–338, 2004.
- [25] M. Julio, D. Olsen, und J. W. Polarek, „Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin“, S. 245–252, 2005.
- [26] S. Browne, D. I. Zeugolis, und A. Pandit, „Collagen: Finding a solution for the source“, *Tissue Eng. - Part A*, Bd. 19, Nr. 13–14, S. 1491–1494, 2013.
- [27] N. J. Bulleid, D. C. A. John, und K. E. Kadler, „Recombinant expression systems for the production of collagen Synthesis of collagen“, Bd. 28, S. 350–353, 2000.
- [28] O. Pakkanen, A. Pirskanen, und J. Myllyharju, „Selective expression of nonsecreted triple-helical and secreted single-chain recombinant collagen fragments in the yeast *Pichia pastoris*“, *J. Biotechnol.*, Bd. 123, Nr. 2, S. 248–256, 2006.
- [29] C. Yang *u. a.*, „The Application of Recombinant Human Collagen in Tissue Engineering“, Bd. 18, Nr. 2, S. 103–119, 2004.
- [30] M. W. T. Werten, T. J. Van Den Bosch, R. D. Wind, H. Mooibroek, und F. A. De Wolf, „High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*“, *Yeast*, Bd. 15, Nr. 11, S. 1087–1096, 1999.
- [31] M. W. T. Werten *u. a.*, „Precision gels from collagen-inspired triblock copolymers“, *Biomacromolecules*, Bd. 10, Nr. 5, S. 1106–1113, 2009.
- [32] M. W. T. Werten, W. H. Wisselink, T. J. Jansen-van den Bosch, E. C. de Bruin, und F. A. de Wolf, „Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris*“, *Protein Eng. Des. Sel.*, Bd. 14, Nr. 6, S. 447–454, 2001.

-
- [33] M. W. T. Werten, G. Eggink, M. A. Cohen Stuart, und F. A. de Wolf, „Production of protein-based polymers in *Pichia pastoris*“, *Biotechnol. Adv.*, Bd. 37, Nr. 5, S. 642–666, 2019.
- [34] J. W. Weisel, „FIBRINOGEN AND FIBRIN A bstract Fibrinogen is a large , complex , fibrous glycoprotein with three pairs of I . I ntroduction Fibrinogen is a fi brous protein that was fi rst classi fi ed with keratin , ° repeat in wide-angle X-ray“, *Adv. Protein Chem.*, Bd. 70, Nr. 04, S. 247–299, 2005.
- [35] D. V. Buchaim *u. a.*, „Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: A systematic review“, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, Bd. 25, Nr. June 2019, S. 1–15, 2019.
- [36] S. Huang und X. Fu, „Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration“, *J. Control. Release*, Bd. 142, Nr. 2, S. 149–159, 2010.
- [37] S. G. Priya, H. Jungvid, und A. Kumar, „Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration“, *Tissue Eng. - Part B Rev.*, Bd. 14, Nr. 1, S. 105–118, 2008.
- [38] L. D. Black, J. D. Meyers, J. S. Weinbaum, Y. A. Shvelidze, und R. T. Tranquillo, „Cell-Induced Alignment Augments Twitch Force in Fibrin Gel-Based Engineered Myocardium via Gap Junction Modification“, *Tissue Eng. - Part A*, Bd. 15, Nr. 10, S. 3099–3108, 2009.
- [39] C. L. Cummings, D. Gawlitta, R. M. Nerem, und J. P. Stegeman, „Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures“, *Biomaterials*, Bd. 25, Nr. 17, S. 3699–3706, 2004.
- [40] W. G. Chang und L. E. Niklason, „A short discourse on vascular tissue engineering“, *npj Regen. Med.*, Bd. 2, Nr. 1, S. 1–8, 2017.
- [41] T. C. Flanagan *u. a.*, „The in vitro development of autologous fibrin-based tissue-engineered heart valves through optimised dynamic conditioning“, *Biomaterials*, Bd. 28, Nr. 23, S. 3388–3397, 2007.
- [42] E. D. Grassl, T. R. Oegema, und R. T. Tranquillo, „A fibrin-based arterial media equivalent“, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, Bd. 66, Nr. 3, S. 550–561, 2003.

-
- [43] A. Ben-Ari, R. Rivkin, M. Frishman, E. Gaberman, L. Levdansky, und R. Gorodetsky, „Isolation and implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with fibrin micro beads to repair a critical-size bone defect in mice“, *Tissue Eng. - Part A*, Bd. 15, Nr. 9, S. 2537–2546, 2009.
- [44] D. Eyrich u. a., „Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering“, *Biomaterials*, Bd. 28, Nr. 1, S. 55–65, 2007.
- [45] S. Koob, N. Torio-Padron, G. B. Stark, C. Hannig, Z. Stankovic, und G. Finkenzeller, „Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects“, *Tissue Eng. - Part A*, Bd. 17, Nr. 3–4, S. 311–321, 2011.
- [46] F. Lee und M. Kurisawa, „Formation and stability of interpenetrating polymer network hydrogels consisting of fibrin and hyaluronic acid for tissue engineering“, *Acta Biomater.*, Bd. 9, Nr. 2, S. 5143–5152, 2013.
- [47] E. B. Neovius und G. Kratz, „Tissue engineering by cocultivating human elastic chondrocytes and keratinocytes“, *Tissue Eng.*, Bd. 9, Nr. 2, S. 365–369, 2003.
- [48] M. A. Chernousov und D. J. Carey, „ $\alpha v \beta 8$ integrin is a Schwann cell receptor for fibrin“, *Exp. Cell Res.*, Bd. 291, Nr. 2, S. 514–524, 2003.
- [49] C. B. Herbert, C. Nagaswami, G. D. Bittner, J. a. Hubbell, und J. W. Weisel, „Effect of gels of fibrin“, *J. Biomed. Mater. Res.*, Bd. 40, Nr. 4, S. 551–559, 1998.
- [50] P. J. Johnson, S. R. Parker, und S. E. Sakiyama-Elbert, „Fibrin-based tissue engineering scaffolds enhance neural fiber sprouting and delay the accumulation of reactive astrocytes at the lesion in a subacute model of spinal cord injury“, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, Bd. 92, Nr. 1, S. 152–163, 2010.
- [51] E. C. Tsai, P. D. Dalton, M. S. Shoichet, und C. H. Tator, „Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection“, *Biomaterials*, Bd. 27, Nr. 3, S. 519–533, 2006.
- [52] J. J. Stec u. a., „Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease the Framingham Offspring Population“, *Circulation*, Bd.

-
- 102, Nr. 14, S. 1634–1638, 2000.
- [53] M. W. MOSESSON, K. R. SIEBENLIST, und D. A. MEH, „The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 936, Nr. 1, S. 11–30, 2006.
- [54] L. A. Sporn, L. A. Bunce, und C. W. Francis, „Cell proliferation on fibrin: Modulation by fibrinopeptide cleavage“, *Blood*, Bd. 86, Nr. 5, S. 1802–1810, 1995.
- [55] M. Hamaguchi, L. A. Bunce, L. A. Sporn, und C. W. Francis, „Spreading of platelets on fibrin is mediated by the amino terminus of the β chain including peptide β 15-42“, *Blood*, Bd. 81, Nr. 9, S. 2348–2356, 1993.
- [56] Y. Takada, X. Ye, und S. Simon, „The integrins“, *Genome Biol.*, Bd. 8, Nr. 5, 2007.
- [57] D. H. Farrell, „Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain“, *Curr. Opin. Hematol.*, Bd. 11, Nr. 3, S. 151–155, 2004.
- [58] A. Sahni und C. W. Francis, „Plasmic degradation modulates activity of fibrinogen-bound fibroblast growth factor-2“, *J. Thromb. Haemost.*, Bd. 1, Nr. 6, S. 1271–1277, 2003.
- [59] L. Medved, S. Litvinovich, T. Ugarova, Y. Matsuka, und K. Ingham, „Domain Structure and Functional Activity of the Recombinant Human Fibrinogen γ - Module (γ 148 - 411) †“, Bd. 1, Nr. 96, S. 4685–4693, 1997.
- [60] T. Burnouf und A. Padilla, „Current strategies to prevent transmission of prions by human plasma derivatives“, *Transfus. Clin. Biol.*, Bd. 13, Nr. 5, S. 320–328, 2006.
- [61] N. Tojo, I. Miyagi, M. Miura, und H. Ohi, „Recombinant human fibrinogen expressed in the yeast *Pichia pastoris* was assembled and biologically active“, Bd. 59, S. 289–296, 2008.
- [62] J. Calcaterra *u. a.*, „Recombinant human fibrinogen that produces thick fibrin fibers with increased wound adhesion and clot density“, *Biomacromolecules*, Bd. 14, Nr. 1, S. 169–178, 2013.

-
- [63] M. Hirashima *u. a.*, „High-level expression and preparation of recombinant human fibrinogen as biopharmaceuticals“, Bd. 159, Nr. 2, S. 261–270, 2016.
- [64] M. G. Bolyard und S. T. Lord, „High-level expression of a functional human fibrinogen gamma chain in *Escherichia coli*“, *Gene*, Bd. 66, Nr. 2, S. 183–192, 1988.
- [65] S. T. Lord, „Expression of a Cloned Human Fibrinogen cDNA in *Escherichia coli*: Synthesis of an a Alpha Polypeptide“, *Dna*, Bd. 4, Nr. 1, S. 33–38, 1985.
- [66] O. Wang *u. a.*, „A totally recombinant fibrin matrix for mesenchymal stem cell culture and delivery“, Nr. 10091006, S. 1–8, 2018.
- [67] F. Guillemot, V. Mironov, und M. Nakamura, „Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B’09)“, *Biofabrication*, Bd. 2, Nr. 1, 2010.
- [68] L. Koch *u. a.*, „Skin tissue generation by laser cell printing“, *Biotechnol. Bioeng.*, Bd. 109, Nr. 7, S. 1855–1863, 2012.
- [69] D. F. D. Campos *u. a.*, „The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages“, *Tissue Eng. - Part A*, Bd. 21, Nr. 3–4, S. 740–756, 2015.
- [70] K. G. . Lee, H. J., Kim, Y. B., Ahn, S. H., Lee, J.-S., Jang, C. H., Yoon, H. Chun W., „A New Approach for Fabricating Collagen/ECM-Based Biinks Using Preosteoblasts and Human Adipose Stem Cells“, *Adv. Heal. Mater.*, Bd. 9, Nr. 4, S. 1359–1368, 2015.
- [71] D. B. Kolesky, R. L. Truby, A. S. Gladman, T. A. Busbee, K. A. Homan, und J. A. Lewis, „3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs“, *Adv. Mater.*, Bd. 26, Nr. 19, S. 3124–3130, 2014.
- [72] A. C. Daly, S. E. Critchley, E. M. Rencsok, und D. J. Kelly, „A comparison of different biinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage“, *Biofabrication*, Bd. 8, Nr. 4, S. 1–10, 2016.
- [73] B. J. Duan B., Hockaday LA, Kang KH, „3D bioprinting of heterogeneous aortic

-
- valve conduits with alginate/gelatin hydrogels“, *J Biomed Mater Res Part A*, Bd. 101A, Nr. 5, S. 1255–1264, 2013.
- [74] M. Nakamura, S. Iwanaga, C. Henmi, K. Arai, und Y. Nishiyama, „Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication“, *Biofabrication*, Bd. 2, Nr. 1, 2010.
- [75] T. Xu u. a., „Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications“, *Biofabrication*, Bd. 5, Nr. 1, 2013.
- [76] M. Gruene u. a., „Laser printing of three-dimensional multicellular arrays for studies of cell-cell and cell-environment interactions“, *Tissue Eng. - Part C Methods*, Bd. 17, Nr. 10, S. 973–982, 2011.
- [77] J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, und A. Khademhosseini, „Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels“, *Biomaterials*, Bd. 31, Nr. 21, S. 5536–5544, 2010.
- [78] J. Gopinathan und I. Noh, „Recent trends in bioinks for 3D printing“, *Biomater. Res.*, Bd. 22, Nr. 1, S. 1–15, 2018.
- [79] „Advanced BioMatrix - Product Catalog“. [Online]. Verfügbar unter: <https://advancedbiomatrix.com/product-catalog/>. [Zugegriffen: 15-Apr-2020].
- [80] „TissueFab® - GelMA-UV bioink“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/905429?lang=de®ion=DE>.
- [81] „Biomaterials & Bioinks - Allevi Shop“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.allevi3d.com/product-category/bioinks/>. [Zugegriffen: 15-Apr-2020].
- [82] „Bioinksolution - 바이오잉크솔루션“. [Online]. Verfügbar unter: <http://bioinksolution.com/gel4cell.php>. [Zugegriffen: 15-Apr-2020].
- [83] „Bioinks - CELLINK“. [Online]. Verfügbar unter: <https://cellink.com/bioinks/>. [Zugegriffen: 15-Apr-2020].
- [84] „Collplant - Vergenix Flowable Gel“. [Online]. Verfügbar unter:

-
- <http://vergenixfg.com/>. [Zugegriffen: 15-Apr-2020].
- [85] E. M. Ahmed, „Hydrogel: Preparation , characterization , and applications: A review“, *J. Adv. Res.*, Bd. 6, Nr. 2, S. 105–121, 2015.
- [86] O. Shoseyov, Y. Posen, und F. Grynspan, „Human collagen produced in plants more than just another molecule“, *Bioengineered*, Bd. 5, Nr. 1, S. 37–41, 2013.
- [87] P. Fagerholm u. a., „Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold“, *Biomaterials*, Bd. 35, Nr. 8, S. 2420–2427, 2014.
- [88] C. (U.); Nikolay Ouzounov , Alameda, C. Alexander Lorestani , Oakland, C. (US); Monica Bhatia , San Ramon, und)(US, „RECOMBINANT COLLAGEN AND ELASTIN MOLECULES AND USES THEREOF“, 2019.
- [89] Fujifilm, „cellnest™ Recombinant Peptide“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.fujifilm.com/products/biomaterials/rcp/>.
- [90] Caroline Schneider-Barthold, „Rekombinante Produktion eines Kollagenmimetischen Proteins in *Komagataella phaffii* (syn. *Pichia pastoris*)“, 2017.
- [91] Y. Zhang, R. Liu, und X. Wu, „The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*“, *Ann. Microbiol.*, Bd. 57, Nr. 4, S. 553–560, 2007.
- [92] M. W. T. Werten, W. H. Wisselink, T. J. Jansen-, V. Den Bosch, E. C. De Bruin, und F. A. De Wolf, „Secreted production of a custom-designed , highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris*“, Bd. 14, Nr. 6, S. 447–454, 2001.
- [93] A. O. Magnusson, A. Szekrenyi, H. J. Joosten, J. Finnigan, S. Charnock, und W. D. Fessner, „nanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development“, *FEBS J.*, Bd. 286, Nr. 1, S. 184–204, 2019.
- [94] B. E. Lang und K. D. Cole, „Differential scanning calorimetry and fluorimetry measurements of monoclonal antibodies and reference proteins: Effect of scanning rate and dye selection“, *Biotechnol. Prog.*, Bd. 33, Nr. 3, S. 677–686, 2017.

-
- [95] N. Phan-Thien, *Understanding Viscoelasticity* Title. 2002.
- [96] M. L. T. and S. KRIMM, „Effect of temperature on the circular dichroism spectra of β 2-microglobulins“, *Biopolymers*, Bd. 184, Nr. 1, S. 36–39, 1972.
- [97] S. Frank u. a., „Stabilization of short collagen-like triple helices by protein engineering“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 308, Nr. 5, S. 1081–1089, 2001.
- [98] O. D. Krishna und K. L. Kiick, „Protein- and peptide-modified synthetic polymeric biomaterials.“, *Biopolymers*, Bd. 94, Nr. 1, S. 32–48, 2010.
- [99] S. Huang und D. E. Ingber, „The structural and mechanical complexity of cell-growth control“, *Nat. Cell Biol.*, Bd. 1, Nr. 5, S. E131–E138, 1999.
- [100] Sabrina Grünert, „Rekombinante Produktion der fibrinogen gamma chain (FGG)“, 2019.
- [101] G. L. Rosano und E. A. Ceccarelli, „Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges“, *Front. Microbiol.*, Bd. 5, Nr. APR, S. 1–17, 2014.
- [102] A. Khlebnikov und J. D. Keasling, „Effect of lacY expression on homogeneity of induction from the Ptac and Ptrc promoters by natural and synthetic inducers“, *Biotechnol. Prog.*, Bd. 18, Nr. 3, S. 672–674, 2002.
- [103] F. Baneyx, „Recombinant protein expression in Escherichia coli“, *Curr. Opin. Biotechnol.*, Bd. 47, Nr. 3, S. 202–205, 1999.
- [104] S. Gnoth, M. Jenzsch, R. Simutis, und A. Lübbert, „Control of cultivation processes for recombinant protein production: A review“, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, Bd. 31, Nr. 1, S. 21–39, 2008.
- [105] R. Chen u. a., „Comparison of polysialic acid production in Escherichia coli K1 during batch cultivation and fed-batch cultivation applying two different control strategies“, *J. Biotechnol.*, Bd. 154, Nr. 4, S. 222–229, 2011.
- [106] J. W. Lottspeich, Friedrich, Engels, *Bioanalytik*. 2012.
- [107] X. Qi, Y. Sun, und S. Xiong, „A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form“,

-
- Microb. Cell Fact.*, Bd. 14, Nr. 1, S. 1–12, 2015.
- [108] G. Healthcare, „HisTrap HP Kit for purification of His-tagged proteins“, 2004.
- [109] M. Biosciences, „IMAC Resins Selection Guide“. [Online]. Verfügbar unter: <https://marvelgent.com/pages/imac-selection-guideline>.
- [110] GE Healthcare, „GE Reference Guide - Selecting the Most Appropriate SEC Column“, S. 1–12, 2015.
- [111] T. Arakawa *u. a.*, „Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects“, *Biophys. Chem.*, Bd. 127, Nr. 1–2, S. 1–8, 2007.
- [112] Sigma-Aldrich, „Albumin , Bovine - Physical Properties “:; *Prod. Inf. Sheet*, S. 1–5, 2000.
- [113] T. Arakawa und S. N. Timasheff, „Mechanism of Protein Salting In and Salting Out by Divalent Cation Salts: Balance between Hydration and Salt Binding“, *Biochemistry*, Bd. 23, Nr. 25, S. 5912–5923, 1984.
- [114] D. Christoph Greb, „Introduction to Mammalian Cell Culture Morphology and Cell Types & Organization“, 2017.
- [115] J. A. Reynolds und C. Tanford, „Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 66, Nr. 3, S. 1002–1007, 1970.
- [116] M. E. Noelken, B. J. Wisdom, und B. G. Hudson, „Estimation of the size of collagenous polypeptides by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis“, *Anal. Biochem.*, Bd. 110, Nr. 1, S. 131–136, 1981.
- [117] J. W. Freytag, M. E. Noelken, und B. G. Hudson, „Physical Properties of Collagen-Sodium Dodecyl Sulfate Complexes†“, *Biochemistry*, Bd. 18, Nr. 21, S. 4761–4768, 1979.
- [118] N. Celikkin, P. Tarsini, S. Farè, und W. Świążkowski, „3D printing of chemically crosslinked gelatin hydrogels for adipose tissue engineering Authors Nicola Contessi Negrini (1)(2)“, 2019.

-
- [119] W. Wang *u. a.*, „Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats“, Bd. 82, S. 190–204, 2008.
- [120] S. L. Rowe und J. P. Stegemann, „Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios“, *Biomacromolecules*, Bd. 7, Nr. 11, S. 2942–2948, 2006.
- [121] T. N. Snyder, K. Madhavan, M. Intrator, R. C. Dregalla, und D. Park, „A fibrin / hyaluronic acid hydrogel for the delivery of mesenchymal stem cells and potential for articular cartilage repair“, S. 1–11, 2014.
- [122] C. W. Peak, S. Nagar, R. D. Watts, und G. Schmidt, „Robust and degradable hydrogels from poly(ethylene glycol) and semi-interpenetrating collagen“, *Macromolecules*, Bd. 47, Nr. 18, S. 6408–6417, 2014.
- [123] Z. Peng, Z. Li, F. Zhang, und X. Peng, „Preparation and Properties of Polyvinyl Alcohol / Collagen Hydrogel Preparation and Properties of Polyvinyl Alcohol / Collagen Hydrogel“, Bd. 2348, 2012.
- [124] L. Medved, S. Litvinovich, T. Ugarova, Y. Matsuka, und K. Ingham, „Domain Structure and Functional Activity of the Recombinant Human Fibrinogen γ - Module (γ 148 - 411) †“, Bd. 1, Nr. 96, S. 4685–4693, 1997.
- [125] C. Sans *u. a.*, „Inclusion bodies of fuculose-1-phosphate aldolase as stable and reusable biocatalysts“, *Biotechnol. Prog.*, Bd. 28, Nr. 2, S. 421–427, 2012.
- [126] Š. Peternel, J. Grdadolnik, V. Gaberc-Porekar, und R. Komel, „Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins“, *Microb. Cell Fact.*, Bd. 7, S. 1–9, 2008.
- [127] E. García-Fruitós *u. a.*, „Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins“, *Microb. Cell Fact.*, Bd. 4, S. 1–6, 2005.
- [128] S. J. Bryant, T. T. Chowdhury, D. A. Lee, D. L. Bader, und K. S. Anseth, „Crosslinking density influences chondrocyte metabolism in dynamically loaded photocrosslinked poly(ethylene glycol) hydrogels“, *Ann. Biomed. Eng.*, Bd. 32, Nr.

-
- 3, S. 407–417, 2004.
- [129] A. G. Mikos, K. A. Athanasiou, J. S. Temenoff, und R. G. Lebaron, „Effect of poly(ethylene glycol) molecular weight on tensile and swelling properties of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels for cartilage tissue engineering“, *J. Biomed. Mater. Res.*, Bd. 59, Nr. 3, S. 429–437, 2002.
- [130] K. Kruppa, „Synthese und Charakterisierung von biomimetischen Hydrogelen aus rekombinanten Proteinen für die Anwendung als Bioinks in 3D-Bioprinting Selbstständigkeitserklärung“, 2020.
- [131] L. Almany und D. Seliktar, „Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures“, *Biomaterials*, Bd. 26, Nr. 15, S. 2467–2477, 2005.
- [132] M. Gonen-Wadmany, L. Oss-Ronen, und D. Seliktar, „Protein-polymer conjugates for forming photopolymerizable biomimetic hydrogels for tissue engineering“, *Biomaterials*, Bd. 28, Nr. 26, S. 3876–3886, 2007.
- [133] Alberts B; Johnson A; Lewis J, *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, 2002.
- [134] C. E. Campiglio, N. C. Negrini, S. Farè, und L. Draghi, „Cross-linking strategies for electrospun gelatin scaffolds“, *Materials (Basel)*., Bd. 12, Nr. 15, 2019.
- [135] G. Healthcare, „ÄKTA™pure Bedienungsanleitung“. [Online]. Verfügbar unter: <https://docplayer.org/64048517-Aekta-pure-bediennungsanleitung-uebersetzt-aus-dem-englischen.html>.

Unterstützende Arbeiten

Teile der experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in einer studentischen Abschlussarbeit unter Anleitung und in Zusammenarbeit mit der Autorin der Dissertation durchgeführt.

Masterarbeit

Svenja Bothe: Aufreinigung und Charakterisierung der rekombinanten Fibrinogen Gamma Kette (FGG) als Material für biomedizinische Anwendungen. August 2019 – Februar 2020. Teilergebnisse sind in Kapitel 3.2-3.4 verwendet worden.

Bachelorarbeit

Julia Käsehagen: Strategien zur Aufreinigung des FGG Proteins mittels Affinitätschromatographie. Juni 2018 – August 2018. Teilergebnisse sind in Kapitel 3.2.2 verwendet worden.

Bachelorarbeit

Janin Korn: Produktion der Fibrinogen Gamma Kette und Anwendung im Bereich der Biomedizin. September 2018 – Januar 2019. Teilergebnisse sind in Kapitel 3.3.1 verwendet worden.

Bachelorarbeit

Linda Jansen-Olliges: Herstellung und Aufreinigung eines Strukturproteins TcolT in *Pichia pastoris*. Juni 2018 – August 2018.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Pia Gellermann

Geburtstag und -ort: 24.12.1992 in Bückeburg, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

03/2017 – heute Leibniz Universität Hannover (LUH), Promotion im Institut für Technische Chemie

Hannover, Deutschland

10/2014 – 02/2017 LUH, Master of Science in Life Science

Hannover, Deutschland

Schwerpunktfächer: Bioprozesstechnik und Naturstoffchemie

10/2011 – 09/2014 LUH, Bachelor of Science in Life Science

Hannover, Deutschland

08/2003 – 06/2011 Gymnasium Ernestinum Rinteln, Allgemeine Hochschulreife

Rinteln, Deutschland

Publikationsliste

Veröffentlichungen

- 09/2019 **Pia Gellermann (70 %)**, Caroline Schneider-Barthold (10 %) , Svenja Nicolin Bolten (5 %), Ethan Overfelt (5 %), Thomas Scheper (2,5%), Iliyana Pepelanova (7,5 %); Production of a Recombinant Non-Hydroxylated Gelatin Mimetic in *Pichia pastoris* for Biomedical Applications employed in Journal of Functional Biomaterials, doi: 10.3390/jfb10030039
- 2020 **Pia Gellermann (60 %)**, Sabrina Grünert (5 %), Svenja Bothe (10 %), Ina Siller (5 %), Julia Käsehagen (2,5 %), Thomas Scheper (2,5 %), Iliyana Pepelanova (15 %); Production of a Recombinant fibrinogen gamma chain for Biomedical Applications; in preparation
- 04/2020 Ina Siller (80 %), Anton Enders (5 %)), **Pia Gellermann (5 %)**, Steffen Winkler (2,5 %), Antonina Lavrentieva (2,5 %), Thomas Scheper (2,5 %), Janina Bahnemann (2,5 %), "Characterization of a customized 3D-printed cell culture system using clear, translucent acrylate that enables optical online monitoring" employed in Biomedical Materials, doi: 10.1088/1748-605X/ab8e97
- 07/2020 Svenja Bolten (85 %), Anne-Sophie Knoll (5 %), **Pia Gellermann (5 %)**, Iliyana Pepelanova, Ursular Rinas (2,5 %), Thomas Scheper (2,5 %): Purification of fibroblast growth factor 2 using novel animal-component free systems employed in Journal of Chromatography A, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461367
- 2020 Patentanmeldung: **Pia Gellermann (60 %)**, Sabrina Grünert (10 %), Iliyana Pepelanova (27,5 %), Thomas Scheper (2,5 %); "Fibrinogen proteins based on fibrinogen"; submitted

"

Konferenzen und Workshops (chronologisch)

- 05/2017 Lukas Raddatz, Carola Schmitz, **Pia Gellermann**, Antonina Lavrentieva, Iliyana Pepelanova, Sascha Beutel, Thomas Scheper: Hydrogels as Bioinks for 3D bioprinting: Properties and Application (Poster), 2nd International Conference on 3D Printing in Medicine, Mainz, Deutschland
- 08/2017 **Pia Gellermann**, „Biofabrication for NIFE“ – Coaching und Training (Workshop), Progressio Consulting GmbH, Hannover, Deutschland
- 05/2018 **Pia Gellermann**, C. Schneider-Barthold, C-Schmitz, T.Scheper, I.Pepelanove: Recombinant production of a collagen-mimetic protein for 3D-Bioprinting and Tissue Engineering (Vortrag), Sartorius & NIFE Zelltherapie und Tissue Engineering Symposium 2017, Hannover, Deutschland
- 02/2019 **Pia Gellermann**: Production of recombinant fibrinogen gamma chain for 3D-Bioprinting and Tissue Engineering (Vortrag), 15th International PhD Seminar on chromatographic Separation Science (SoCSS 2019), Quedlinburg, Deutschland
- 05/2020 **Pia Gellermann**, Svenja Bothe, Katharina Kruppa, Thomas Scheper, Antonina Lavrentieva, Iliyana Pepelanova: Recombinant proteins from the extracellular matrix as defined and animal-component-free hydrogels for cell culture (Poster), 3D Cell Culture 2020, Freiburg, Deutschland