

---

**Prozeßentwicklung und -optimierung  
zur Herstellung pharmazeutisch interessanter rekombinanter  
Proteine am Beispiel des human-identischen Endostatins**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Ralf Finke  
geboren am 06.09.1967  
in Langenhagen

Hannover, im Juni 2002

---

Referent:  
Korreferent:  
Tag der Promotion:

Prof. Dr. Thomas Scheper  
PD Dr. Bernd Hitzmann  
27. Juni 2002

---

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im Mai 2002

---

(Ralf Finke)

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1998 bis März 2002 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover durchgeführt. Für die Leitung und Betreuung möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken. Bei Herrn PD Dr. Bernd Hitzmann bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Der Firma BioVisioN AG danke ich für den zur Verfügung gestellten Bakterienstamm mit dem diese Arbeit durchgeführt wurde, sowie für die finanzielle Unterstützung bei den Verbrauchsmitteln. Ein besonderer Dank geht an Dr. Rüdiger Heß, der in allen Fragen zur Proteinanalytik stets ein offenes Ohr hatte und viele wertvolle Tips gegeben hat.

Christian, Ingrid und Chulaporn danke ich für das geduldige Korrekturlesen und die vielen konstruktiven Vorschläge zur Gestaltung und Formatierung des Textes.

Martina Weiss danke ich für die Unterstützung bei allen CorelDraw-Problemen, Matthias Arndt für die Kultivierungstips und die vielen anregenden Diskussionen, Ingrid Langwost für die Hilfestellung beim Säulenpacken und der Bedienung der FPLC-Anlage, sowie der organisatorischen Hilfe bei Ausrichtung mehrerer Sommerfeste. Michael Dors und Ivo Havlik gilt mein Dank für die prompte Behebung aller kleinen Problemchen des RISP-Systems. Dirk Kosemund möchte ich für die Einführung in die Bedienung des Phast-Systems danken.

Dem ganzen Arbeitskreis danke ich für die gute Zusammenarbeit, die immer freundschaftliche Atmosphäre und meine schöne „Kellermeister“-Zeit. Ich hoffe sehr wir sehen uns alle auf vielen zukünftigen Sommerfesten wieder!

Meinen Eltern möchte ich für ihre geduldige Unterstützung, den seelischen Rückhalt und die stete Motivation im Alltag danken.

---

## Abstract

Die Mehrzahl von neuentdeckten Proteinen und Peptiden mit therapeutischem Potential kann nicht in ausreichender Menge aus menschlichen oder tierischen Körperflüssigkeiten oder -geweben gewonnen werden. Hier stellt die biotechnologische Herstellung des gewünschten Proteins oder Peptids mittels eines geeigneten rekombinanten Expressionssystems, das sich in kurzer Zeit auf hohe Zelldichten vermehren läßt, eine gute Möglichkeit dar, eine hinreichende Menge des möglichen Therapeutikums für erste Versuche und später auch größere Mengen zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurde ein Produktionsprozeß für rekombinantes, humanidentisches Endostatin in *E. coli* entwickelt. Endostatin ist ein ca. 20 kDa großes zirkulierendes Protein dessen geplante therapeutische Anwendung als Anti-Tumormittel in der Krebstherapie auf seiner hemmenden Wirkung auf die Blutgefäßneubildung (Angiogenese) beruht.

Der verwendete *E. coli*-Stamm war genetisch derart manipuliert, daß das Zielprotein mit einem 6xHis-Tag koexprimiert wurde. Diese Kette aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten am N-Terminus des Proteins erlaubt mittels der Ni-NTA-Metallaffinitäts-Chromatographie eine schnelle Isolierung und Aufreinigung aus der komplexen Mischung von Proteinen die man nach einem Zellaufschluß der Bakterien gewinnt.

Ausgehend von einer kleinen Probe des neuentwickelten *E. coli*-Stammes wurde erst eine sichere Stammhaltung entwickelt, dann in Schüttelkolben mit maximal 100 mL Volumen die wichtigsten Wachstums- und einige Produktionsparameter bestimmt, und schließlich ein Upscaling auf eine 2L-Batch-Kultivierung im Biostat-B-Bioreaktor vorgenommen. Außerdem wurde ein Downstream-Prozeß mit denaturierendem Zellaufschluß, Isolierung des Endostatins durch Ni-NTA-Chromatographie in einer FPLC-Methode, Entsalzung mittels Dialyse oder Gelfiltration, sowie Aufkonzentrierung durch Lyophilisation entwickelt. Zur Produktcharakterisierung wurden die MALDI- und ESI-Massenspektrometrie genutzt.

Im Bioreaktor mit seinen besseren Kontroll- und Regelungsmöglichkeiten wurde die Endostatinproduktion optimiert. Es wurde ein Prozeß-Temperaturprofil gefunden, das in Abstimmung mit den Wachstumsphasen der Mikroorganismen eine Dämpfung des anfänglich starken Wachstums und eine Umstellung auf gute Produktionsbedingungen bewirkt. So gelang es eine Kulturführung für die Batch-Kultivierung im 2L-Biostat-B-Bioreaktor zu entwickeln, die eine spezifische Produktausbeute von maximal 88,4 mg Endostatin pro Gramm Biotrockenmasse erbrachte.

**Stichworte:** Endostatin, Ni-NTA-Metallaffinitäts-Chromatographie, Downstream-Prozeß

---

## Abstract

Human blood and other fluids of the human or animal organism contains thousands of unknown peptides and proteins with functional roles in all kinds of metabolic processes. By screening large peptide banks with modern massspectroscopic methods it is possible to discover and isolate new peptides. If they show a therapeutic effect there is a need of sufficient amounts for tests or clinical use.

Most newfound proteins or peptides are very low concentrated in their tissues of origin or fluids like blood, lympe or hemofiltrate. Therefore it is in majority of cases problematic or impossible to isolate them in sufficient volume.

An alternative biotechnological production provides the new substances fast and in amounts not only high enough for first tests of their efficacy but later – after several upscaling steps- sufficient for commercial use.

In this work a production process for recombinant human-identical Endostatin an inhibitor of angiogenesis was developed. Endostatin has a molecular weight of approx. 20 kDa and is a circulating protein. It showed good efficacy against solid tumors in mice. Therefore it is presumed that Endostatin is a possible anti-cancer drug in human therapy.

The target molecule Endostatin was coexpressed with a N-terminal tag of six consecutive histidine-residues which allowed a fast isolation and purification of the protein by Ni-NTA-metalaffinity-chromatography.

As expressionsystem a genetically modified *E. coli*-strain was used. In shakeflask cultivations the fundamental parameters for growth and the requirements for production of the recombinant protein were determined. A complete downstreamprocess including denaturing lysis, isolation of Endostatin by Ni-NTA-chromatography based on a FPLC-method, desalting by dialysis or gelfiltration and concentration by lyophilization was developed.

After an upscaling step to a 2L-bioreactor the production of Endostatin was optimized. A fast temperature-shift from 37°C to 30°C was able to decrease the bacterial growth and the oxygen consumption. The conditions the bacteria needed for good growth were found to be different from conditions for good protein production. Therefore the temperature-shift was essential for switching between growth and production conditions.

Optimizing the production conditions in a 2L-batch-cultivation in the bioreactor resulted in an specific yield of 88,4 mg Endostatin per gram dry biomass.

**Keywords: Endostatin, Ni-NTA-chromatography, downstreamprocessing**

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>2</b>
2.1	Herstellung rekombinanter Proteine in Bakterien	2
2.2	Von der Proteinstrukturaufklärung zum pharmazeutischen Präparat	2
2.3	Biologische Sicherheit	4
2.4	Angiogenese als Therapieansatz in der Krebsbehandlung	5
2.5	Endostatin	9
2.6	Ni-NTA Chromatographie als Spezialfall der immobilisierten Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC)	11
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
3.1	Mikroorganismus	13
3.1.1	Expressionsinduktion	13
3.2	Typischer Wachstumsverlauf von Batch-Kulturen	13
3.3	Die Nährmedien	15
3.4	Sterilisation	16
3.5	Kulturführung	16
3.5.1	Stammhaltung und Arbeitskulturen	16
3.5.2	Kultivierung in Schüttelkolben	17
3.5.3	Kultivierung im Bioreaktor	18
3.5.3.1	Vorkultur	18
3.5.3.2	Bioreaktor-Kultivierungen	18
3.6	Offline-Proben bei Kultivierungen in Schüttelkolben oder Bioreaktor	22
3.6.1	Bestimmung der optischen Dichte (OD)	22
3.6.2	Bestimmung der Biofeucht- und Biotrockenmasse	22
3.6.3	Zellzahlbestimmung mikroskopisch	23
3.6.4	Bestimmung des Gesamtproteingehalts mit der modifizierten Lowry-Methode	23
3.7	Online-Analytik bei Bioreaktor-Kultivierungen	25
3.7.1	pH-Wert-Messung	25
3.7.2	pO <sub>2</sub> -Wert-Messung (Gelöstsauerstoff)	25
3.7.3	Abgasanalytik (Abgassauerstoff und -kohlendioxid)	26

---

3.8	Produktisolierung und –aufreinigung	27
3.8.1	Zellaufschluß	27
3.8.1.1	Enzymatischer Aufschluß, nativ	27
3.8.1.2	Enzymatischer Aufschluß und Ultraschall, nativ	27
3.8.1.3	Chemischer Aufschluß, denaturierend	28
3.8.1.4	Chemischer Aufschluß und Ultraschall, denaturierend	28
3.8.2	Isolierung und Aufarbeitung mittels Ni-NTA-Chromatographie unter <u>nativen Bedingungen</u> im Mini-Batch-Maßstab	29
3.8.3	Isolierung und Aufarbeitung mittels Ni-NTA-Chromatographie unter <u>denaturierenden Bedingungen</u> im Mini-Batch-Maßstab	29
3.8.4	FPLC	30
3.8.4.1	Gelfiltration zur Probenentsalzung	30
3.8.4.2	Ni-NTA-Chromatographie (FPLC)	31
3.8.5	Dialyse zur Probenentsalzung	32
3.8.6	Volumenreduzierung verdünnter wässriger Proben durch Gefriertrocknung (Lyophilisation)	34
3.9	Produktanalytik	35
3.9.1	Gel-Elektrophorese	35
3.9.2	Kapillarelektrophorese (CE)	36
3.9.3	Massenspektrometrie	37
3.9.3.1	MALDI-TOF Massenspektrometrie	37
3.9.3.2	ESI-Massenspektrometrie	37
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	Schüttelkolbenexperimente	39
4.1.1	Wachstumsverhalten in verschiedenen Nährmedien	40
4.1.2	Wachstum in HDF-Nährmedien mit unterschiedlichen Glucosegehalten	42
4.1.3	Temperaturversuche	43
4.1.4	Versuche zur Effizienz und Toxizität verschiedener Antischaummittel	44
4.1.5	Einfluß der Induktion mit IPTG	47
4.1.5.1	Erntezeitpunkt nach der Induktion	47
4.1.5.2	Zeitpunkt der Induktion	50
4.1.5.3	Einfluß der IPTG-Konzentration auf Wachstum und Produktivität	51
4.1.5.4	Induktion nach Absenkung der Temperatur	53
4.1.6	Endostatin-Isolierung mit der Ni-NTA-Chromatographie im Mini-Batch-Maßstab	56



---

4.2	Kultivierungen im Bioreaktor	59
4.2.1	Ermittlung der Grundparameter für das Wachstum in Bioreaktorkultivierungen	59
4.2.1.1	Verläufe ausgewählter Kultivierungsparameter für Wachstumsexperimente im Bioreaktor	59
4.2.1.2	Sauerstoffversorgung im Bioreaktor	62
4.2.1.3	In Wachstumsexperimenten ermittelte Grundparameter der Kulturführung im Bioreaktor	64
4.2.2	Endostatinproduktion in Bioreaktorkultivierungen	68
4.2.2.1	Wege zur Produktivitätsoptimierung. Kultivierung Nr. 11 als Beispiel für schlechte Produktivität	68
4.2.2.2	Entwicklung einer optimierten Kulturführung	70
4.3	Produktisolierung, -reinigung und -identifizierung	80
4.3.1.	Kapillarelektrophoretische Analytik des Endostatin	88
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
	Anhang	103
	Abkürzungsverzeichnis	107

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Für viele Proteine oder Peptide mit einem pharmazeutisch interessanten Wirkungsspektrum ist die Isolierung aus menschlichem oder tierischem Gewebe bzw. Blut im Regelfall mangels Verfügbarkeit hinreichender Mengen nicht möglich. So waren z. B. für die Isolierung von ca. 100 µg Endostatin zu ersten Forschungszwecken 2.500 Liter humanes Hämofiltrat nötig. Außerdem ist dieser Weg auch aufgrund der nicht völlig auszuschließenden Übertragung von Krankheiten nicht erwünscht. Besonders im Hinblick auf die in der nahen Zukunft zu erwartende, hohe Zahl an Proteinen, für die ein Einsatz als Humantherapeutikum möglich ist, wird die Expression rekombinanter Proteine einen zunehmenden Stellenwert erhalten.

Ein Beispiel für ein mögliches Humantherapeutikum ist Endostatin, ein Protein, das zuerst aus Zellüberständen von Tumorzellen isoliert wurde und über die Hemmung des Blutgefäßwachstums die Rückbildung von Tumoren ermöglichen soll. Aus diesem Grund ist es einer der vielversprechendsten Entwicklungskandidaten für die Krebstherapie. Eine Therapie wäre vor allem für solide Tumoren denkbar, die eine gute Durchblutung benötigen, wie zum Beispiel Lungen- oder Nierenzellkarzinome. Die Wirksamkeit der Substanz wurde in Tierversuchen bewiesen. Die erste Phase der klinischen Tests von Endostatin als Wirkstoff in der Humanmedizin ist bereits abgeschlossen.

In dieser Arbeit soll ein Produktionsprozeß für rekombinantes, humanes Endostatin entwickelt werden. Als Expressionssystem dient ein gentechnisch veränderter *Escherichia coli*-Sicherheitsstamm. Ausgehend von einer minimalen Menge des Bakterienstamms soll zunächst eine sichere Stammhaltung entwickelt werden. Im Labormaßstab (Schüttelkolben bis 500 mL) sollen die optimalen Wachstumsparameter ermittelt und erste Expressionsversuche durchgeführt werden. Für das mit einem 6xHis-Tag koexprimierte Protein soll mithilfe der Ni-NTA-Metallaffinitäts-Chromatographie eine Methode zur Isolierung und Aufreinigung gefunden werden. Die aus den Schüttelkolbenexperimenten gewonnenen Erkenntnisse dienen schließlich als Grundlagen für das Upscaling auf Bioreaktorkultivierungen zunächst im 2L-Maßstab. Im Bioreaktor mit seinen Kontroll- und Regelungsmöglichkeiten sollen die Grundparameter für eine gute Produktivität der Bakterien ermittelt, und durch eine Reihe von Experimenten mit jeweils nur geringer Veränderung der Parameter, optimiert werden. Das aus diesen Fermentationen gewonnene Produkt wird mittels massenspektroskopischer Methoden (MALDI-, und ESI-MS) eindeutig charakterisiert.

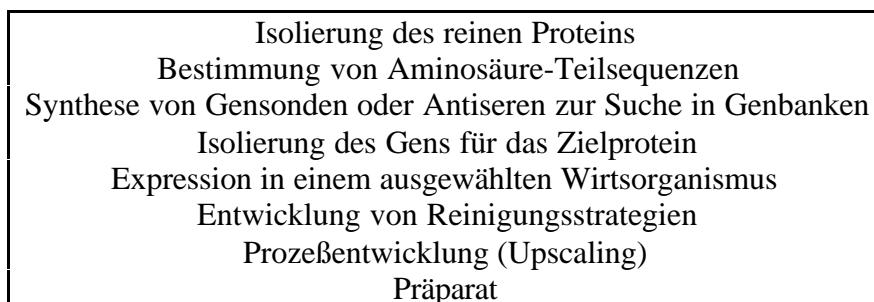
## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Herstellung rekombinanter Proteine in Bakterien

Die Expression von „Fremdgenen“, also von Gensequenzen die nicht zur natürlichen genetischen Ausstattung eines Organismus gehören, sondern von einem anderen Organismus entwicklungsgeschichtlich nicht gleichen Ursprungs stammen, wird heterologe Genexpression genannt [Präve, 1994]. So können auch heterologe Gene bei passender Signalsequenz, die für den Wirtsorganismus spezifisch ist, exprimiert werden, da der genetische Code universell ist. Das bedeutet, daß die gleiche proteinspezifische Information sowohl von einer menschlichen als auch von einer Bakterienzelle genutzt werden kann und zur Synthese eines Proteins mit der gleichen Primärsequenz führt. Diese Tatsache macht sich die Biotechnologie zu Nutze, um z. B. Substanzen mit therapeutischem Potential, die nicht in hinreichender Menge aus organischem Material, menschlichen oder tierischen Körperflüssigkeiten oder -geweben gewonnen werden können, in größeren Mengen herzustellen. Wirtschaftlich bedeutsame Beispiele sind Insulin, das von Bakterien produziert wird, Faktor XIIIa (ein Enzym aus der Blutgerinnungskaskade, das zur Knochen- und Wundheilung therapeutisch eingesetzt wird), das von Hefen produziert wird oder Erythropoietin (EPO, ein Hormon zur Regulation der Erythropoese) aus tierischen Zelllinien.

### 2.2 Von der Proteinstrukturaufklärung zum pharmazeutischen Präparat

Der Weg zur Herstellung eines rekombinanten Proteins im industriellen Maßstab läßt sich vereinfacht in acht Schritte unterteilen [nach Präve, 1994]:



Wenn ein Protein oder Peptid mit einem interessanten Wirkungsspektrum z. B. im humanen Blutplasma gefunden wurde, muß es zunächst isoliert und gereinigt werden. Ausgehend vom gereinigten Protein läßt sich teilweise die Aminosäuresequenz bestimmen. Die Kenntnis der Aminosäuresequenz wiederum ermöglicht die chemische Synthese von Gensonden zur Suche in Genbanken (Sammlung von Wirtsklonen, in denen alle Gene eines Organismus mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit vorhanden sind. Zur Erstellung

wird die komplette DNA z. B. durch limitierte Hydrolyse mit Restriktionsenzymen in Fragmente zerlegt). Auch gegen das gewünschte Protein gerichtete Antiseren sind für die Durchsuchung von Genbanken (Expressionsbanken) geeignet. Schließlich läßt sich aus den so gewonnenen Informationen die Nucleotidsequenz des Gens bestimmen, das für die Expression des gewünschten Zielproteins zuständig ist.

Entsprechend den Eigenschaften des Proteins muß dann der geeignetste Wirtsorganismus ausgewählt werden. Dafür kommen heute hauptsächlich folgende drei Expressionssysteme zur Anwendung: Bakterien, Hefen und Tierzellen. Jedes der drei Systeme hat bestimmte Vor- und Nachteile. Bakterien wie *Escherichia coli* können in preiswerten Nährmedien zu sehr hohen Zelldichten vermehrt werden, bilden aber oft, statt die Proteine auszuschleusen, Einschlusskörper (inclusion bodies), die die Isolierung und Reinigung erschweren. Auch können Bakterien die Proteine nach der Synthese nicht komplex modifizieren (Glykosylierung), was aber für die biologische Aktivität gerade größerer Proteine oft essentiell ist.

Hefezellen können ebenfalls zu hohen Zelldichten kultiviert werden. Sie sind im Gegensatz zu den Bakterien eher dazu fähig die gewünschten Proteine ins Nährmedium auszuschleusen. Problematisch ist auch hier die Modifikation der Proteine (z. B. Glykosylierung), die nicht immer identisch mit den aus Plasma oder Gewebe isolierten Proteinen ist.

In der industriellen Produktion werden für die Kultivierung von Bakterien, Hefen und anderen Mikroorganismen aus wirtschaftlichen Erwägungen meist sehr preiswerte komplexe Nährmedien verwendet. Darin sind billige Inhaltsstoffe enthalten wie Soja- oder Maisbestandteile, Erdnussmehl, hydrolysierte Fleischproteine, Hefeextrakt usw., die als Abfall z. B. in der Lebensmittelindustrie anfallen. Diese stellen den Mikroorganismen in ausreichender Menge benötigte Nährstoffe zur Verfügung, ihre Zusammensetzung ist aber naturgemäß nicht genau definiert und variiert von Charge zu Charge. Dies kann zu Problemen in einer späteren Aufarbeitung und Isolierung des produzierten hochpreisigen Proteins, das meist in relativ geringer Konzentration vorliegt, führen [Demain, 1999].

Tierzellen benötigen zwar sehr teure Nährmedien und wesentlich längere Wachstumszeiten als die anderen beiden Systeme, aber sie haben den Vorteil auch komplizierte, hochglykosylierte Moleküle korrekt und biologisch aktiv synthetisieren zu können.

Das isolierte Gen wird mit den für den Wirtsorganismus spezifischen Kontrollelementen für Transkription und Translation verknüpft und mit Hilfe von Expressionsvektoren in die Wirtszelle eingeschleust. Hier wird das Gen durch die Kontrollelemente angeschaltet und es kommt zur Synthese des Proteins. Als Expressionsvektoren dienen meist Plasmide. Das sind zirkuläre DNA-Moleküle, die in Bakterien als Träger extrachromosomaler DNA vor-

kommen. D. h. sie sind für das Überleben des Bakteriums eigentlich entbehrlich, tragen aber genetische Informationen wie z. B. Resistenzen gegen Antibiotika, die dem Bakterium in bestimmten Umweltsituationen Vorteile verschaffen können.

Je nachdem, ob das Zielprotein aus der Zelle ausgeschleust (sezerniert) oder intrazellulär gebildet wird, kann es entweder direkt aus dem Nährmedium isoliert werden, oder muß nach einem Zellaufschluß aus dem Zellhomogenisat gewonnen werden. Dann muß eine Reinigungsmethode entwickelt werden und, falls es bei der Isolierung notwendig war auf denaturierende Methoden zurückzugreifen, muß das Protein wieder richtig gefaltet werden, um seine biologische Aktivität zurückzuerlangen.

Alle bisher beschriebenen Schritte können experimentell in kleinem und kleinstem Maßstab durchgeführt werden. Wenn die gentechnischen Schritte erfolgreich waren und ein stabiles Expressionssystem für ein wirtschaftlich interessantes Protein etabliert werden konnte, muß im Schritt der Prozeßentwicklung eine Maßstabsvergrößerung auf wirtschaftlich profitable Volumina erfolgen. Das beinhaltet Versuche vom Labor- über den Technikum- oder Pilotmaßstab bis zum Produktionsmaßstab und stellt in der Regel den langwierigsten Teil der Verfahrensentwicklung dar. Außerdem unterliegen sowohl Produkte, wie auch das Herstellungsverfahren strengen und umfangreichen Auflagen staatlicher Instanzen von kommunaler bis internationaler Ebene.

### 2.3 Biologische Sicherheit

Der auch in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm K 12 wird als Sicherheitsstamm bezeichnet. Er gilt als ausgesprochen harmlos und findet weltweit als zuverlässiger Bakterienstamm Verwendung.

*E. coli* K 12-Bakterien unterscheiden sich deutlich von den natürlich vorkommenden *E. coli*-Wildstämmen. Die K12-Stämme werden seit 1922 vielfältig verwendet und sind sehr genau unter den verschiedensten medizinischen und biochemischen Fragestellungen als Modellorganismen untersucht worden. Sie werden international sowohl in der Forschung als auch in den zuständigen Behörden als ungefährlich für Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt angesehen. Dies gilt auch für die häufig verwendeten Wirtsorganismen *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacillus subtilis*.

Um pathogenes Potential entfalten zu können muß sich ein Mikroorganismus zunächst über die natürlichen Eintrittspforten oder z. B. Gewebeverletzungen

- im oder am Wirt anheften,
- in ihn eindringen,

- sich dort vermehren und
- Schäden verursachen.

Fällt nur eine dieser Fähigkeiten weg, verliert der Organismus sein pathogenes Potential. Der *E. coli* K 12-Stamm ist nicht pathogen. Er kann sich nicht auf der Haut, der Nasenschleimhaut oder im Darm ansiedeln, weil er die für die Anheftung notwendigen Eigenschaften (K-Antigene und das „glatte“ Lipopolysaccharid fehlen) verloren hat. Auch Virulenzdeterminanten wie z. B. die Kapselantigene und die für die Pathogenität notwendigen Toxine (enterotoxische, enteroinvasive, enteropathogene Toxine) fehlen.

*E. coli* K 12 reagiert empfindlich auf die im Magen herrschenden sauren Bedingungen und sehr empfindlich gegen Gallensäuren. Im Körpergewebe oder in der Blutbahn sind Abwehrmechanismen des Körpers sehr wirksam gegen diesen Laborstamm.

Auch für die Umwelt geht von *E. coli* K 12-Bakterien keine Gefahr aus, weil sie durch Trockenheit und UV-Einwirkung schnell abgetötet werden und nachweislich weder durch Versporung überleben können, noch in tiefere Bodenschichten abdriften.

#### **2.4 Angiogenese als Therapieansatz in der Krebsbehandlung**

Die Krebsforschung bemüht sich seit langem die intrazellulären Vorgänge welche eine normale Zelle veranlassen, „böartig“ zu werden, aufzuklären. Mit immer besserer Kenntnis der krebsauslösenden oder -fördernden Mechanismen, sowie der Onkogene und Tumorsuppressorgene bieten sich auch neue Ansätze für Krebsprävention oder -therapie. Viele Therapieansätze haben bereits zur Entwicklung mehr oder weniger wirksamer Medikamente geführt, die in der „Chemotherapie“ Anwendung finden.

Eine dieser therapeutischen Strategien besteht in der Ausschaltung der Angiogenese. Unter Angiogenese versteht man die Neubildung und das Wachstum von Blutgefäßen. Sie ist nicht nur für den gesunden Menschen von essentieller Wichtigkeit (z. B. in der embryonalen Entwicklung oder der Geweberegeneration bei der Wundheilung), sondern spielt auch im Zusammenhang mit vielen Krankheitsbildern (Tumorwachstum und Metastasenbildung, cardiovasculäre Erkrankungen, rheumatoide Arthritis, chronische Entzündungen u. a. [Griffioen, 2000]) eine große Rolle. Angiogenese ist ein sehr komplexer Prozeß der durch das Gleichgewicht und Zusammenwirken vieler Faktoren gesteuert wird, von denen viele noch nicht identifiziert sind [Bussolino, 1997; Risau, 1997; Lawrence, 1994]. Angiogenese umfaßt den proteolytischen Abbau von Basalmembranen, den Verlust der Endothelzell-Adhäsion, in das umgebende Gewebe (Stroma) gerichtetes Neuwachstum von Endothel-

zellen, und schließlich die Re-Adhäsion der Zellen, um der neuen Blutkapillare ihre Form zu geben [Hanahan, 1996].

Wichtige Pro-Angiogenesefaktoren sind z. B. basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF). Angiogenese-Inhibitoren sind z. B. platelet-factor4, Angiostatin, Endostatin und Vasostatin [Arbiser, J. L., 1996; Griffioen, 2000].

Für eine therapeutische Steuerung der Angiogenese gäbe es in beiden Richtungen Bedarf: Die Hemmung der Blutgefäßneubildung wäre bei Krankheitsbildern die mit einem exzessiven Blutgefäßwachstum einhergehen wie z. B. Krebs oder diabetischer Retinopathie (krankhafte Wucherung der Netzhautblutgefäße in den Glaskörper des Auges hinein) zur Behandlung von großem Nutzen. Die Förderung der Angiogenese dagegen wäre vor allem bei Herzkrankheiten hilfreich [Griffioen, 2000].

Bereits Anfang der 1970er Jahre entwickelten Folkman und Denekamp die Idee, daß Tumoren stark vaskulös (mit Blutgefäßen versehen) seien und daher verwundbar in ihrer Nährstoffversorgung durch das Blut sein müßten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß der Prozeß der Angiogenese der Angriffspunkt für eine Therapie sei [Denekamp, 1984]. In den 1990er Jahren wurden die ersten Substanzen mit spezifischen angiostatischen Effekten entdeckt [Ingber, 1990; O'Reilly, 1994]. Daraufhin stieg das Interesse am Forschungsgebiet der Angiogenese stark an. Neuere Angiogenese-Inhibitoren haben in verschiedenen vorklinischen Experimenten gezeigt, daß sie in der Lage sind, das Wachstum bestimmter Tumoren zu verlangsamen oder sogar zu stoppen. Im Tierversuch ließ sich ebenfalls zeigen, daß im Fall der Inhibitoren Angiostatin und Endostatin auch bei Anwendung über längere Zeiträume keine Resistenz gegen das Medikament entwickelt wird. Es ist allerdings noch nicht sicher ob sich die Ergebnisse auch auf den Menschen übertragen lassen. Auch ist noch nicht geklärt, welche Nebeneffekte bezüglich normaler physiologischer Prozesse wie Wundheilung oder Embryoentwicklung bei längerer Anwendung zu erwarten sind.

Das Blutgefäßsystem des menschlichen Körpers macht insgesamt eine Fläche von ca. 900 m<sup>2</sup> aus und kann daher als größtes Organ des Menschen bezeichnet werden. Die Blutgefäße bestehen hauptsächlich aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Basalmembran und extrazellulärer Matrix (ECM). Abhängig von der Lage der Gefäße im Körper und ihrer Mikroumgebung sind Basalmembran und ECM in Phänotyp, Zusammensetzung und Funktion unterschiedlich [Rajotte, 1998]. Die Endothelzellen kleiden schichtartig die Innenwände jedes Blutgefäßes aus und sind aktiv an verschiedenen regulatori-

schen Prozessen im Körper beteiligt. Sie sind selektiv durchlässig für Peptide, Proteine und bestimmte im Blut gelöste Stoffe. Sie regeln außerdem je nach ihrem Integritätszustand die Blutkoagulation über die Produktion verschiedener Faktoren (bei intaktem Zustand z. B. Thrombomodulin, t-PA; bei Beschädigung z. B. von Willebrand Faktor (vWF), Plasminogen Activator Inhibitor-1). Ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Endothelzellen ist ihre Fähigkeit Zellen des Immunsystems an Stellen des Körpers zu dirigieren wo diese benötigt werden [Carlos, 1994].

Der Mechanismus der Angiogenese auf molekularer Ebene ist noch nicht komplett aufgeklärt, man geht aber von einem Kaskadenmodell aus [Griffioen, 2000]. Beim gesunden erwachsenen Menschen entstehen im Verlauf von Wundheilungsprozessen oder während des Menstruationszyklus der Frau neue Blutgefäße stets nur aus bereits vorhandenen Gefäßen [Risau, 1997]. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen, vor allem beim Tumorstadium, kommt es zu sehr starker Angiogenese: Tumor-Endothelzellen proliferieren 20- bis 2000 mal schneller als Endothelzellen in normalem, adultem Gewebe [Drenkamp, 1984]. Sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen ist der erste Schritt der Angiogenesekaskade immer die Aktivierung der Endothelzellen. Es wird angenommen, daß dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) bei dieser Initiation die Hauptrolle zufällt. VEGF hat einen vergrößernden Effekt auf die Permeabilität der Endothelzellen und erlaubt dadurch verschiedenen Plasmaproteinen ins Gewebe einzudringen und dort ein Fibrin-reiches Netzwerk zu bilden. Außerdem induziert VEGF die Expression von Proteasen die für das Eindringen in Gewebe und die Remodellierung des Gewebes wichtig sind.

Hypoxische (mangelhaft mit Sauerstoff versorgte) Tumorzellen produzieren VEGF in hohem Ausmaß [Brown, 1997]. Dies läßt sich so deuten, daß ein Tumor durch Ausschüttung von VEGF ins umgebende Gewebe Endothelzellen aktiviert und diese dadurch veranlaßt die Angiogenesekaskade mit dem Ziel zu starten, Blutgefäße in Richtung des Tumors wachsen zu lassen.

Die aktivierten Endothelzellen werden bei der Therapie mit Angiogenese-Inhibitoren als erfolgversprechendstes Ziel angesehen. Eine Zerstörung bzw. Blockierung dieser Zellen schneidet den Tumor von seiner Nährstoffzufuhr ab und hungert ihn dadurch aus.

Aktivierte Endothelzellen haben einige Eigenschaften, die sie als Ansatzpunkte für eine therapeutische Strategie interessant machen: Sie stellen ein eigenständiges, homogenes Gewebe in unmittelbarer Nähe des Tumors dar, das eine besondere Aktivitätsstufe auf-



weist, wie sie im normalen Gewebe nicht vorliegt. Sie sind außerdem für Medikamente leicht zugänglich. Zudem bilden Endothelzellen auch eine genetisch einheitliche Zellgruppe, bei der mutagene Veränderungen durch die Behandlung mit Angiogenese-Inhibitoren weitgehend ausgeschlossen sind.

Es werden zur Zeit viele Angiogenese-Hemmer erforscht. Eine Übersicht bietet das NCI (National Cancer Institut, USA) auf seinen Internet-Seiten (<http://www.nci.nih.gov/>).

Einer dieser untersuchten Stoffe ist Endostatin, das seit seiner Entdeckung 1997 [O'Reilly, 1997] bzw. vor allem seit den Erfolgen im Tierversuch bei der Behandlung verschiedener Tumoren mit Endostatin [O'Reilly, 1997; Boehm, 1997] auch großes öffentliches Interesse gefunden hat. Mittlerweile ist die erste Phase der klinischen Tests von Endostatin als Wirkstoff in der Humanmedizin an drei Kliniken in den USA abgeschlossen worden. Ziel dieses ersten Prüfungsabschnitts ist die Ermittlung der Toxizität bzw. der Verträglichkeit der neuen Substanz beim Menschen und eines therapeutisch sinnvollen Dosierungsschemas. Die Erfassung der Wirksamkeit spielt in dieser Phase nur eine untergeordnete Rolle. Erscheint die Substanz für den Menschen verträglich und ist die Toxizität im geforderten Dosisbereich vertretbar, wird die Prüfung in einem zweiten Abschnitt weitergeführt. Dabei gilt es herauszufinden, bei welchen Krankheitsbildern die Substanz wirksam und welche Form der Anwendung besonders günstig ist. Auch wird untersucht, ob das gewählte Dosierungsschema für längere Anwendungen geeignet ist oder ob es verändert werden muß. Die Phase-II-Prüfung erfolgt bei Patienten mit verschiedensten fortgeschrittenen Tumorerkrankungen.

## 2.5 Endostatin

Endostatin (XVIII) ist ein C-terminales Spaltprodukt von Collagen XVIII mit einer Molekülgröße von ca. 20 kDa. Es ist ein Inhibitor der Endothel-Proliferation [Boehm et al., 1997] und zirkuliert im menschlichen Blutkreislauf [Ständker, 1997].

Ein weiteres - als Endostatin XV bezeichnetes - Protein ist bekannt, das als Spaltprodukt von Collagen XV identifiziert wurde, sich aber in der Struktur, Bindungseigenschaften, Verteilung im Gewebe und der Anti-Angiogenese-Aktivität vom Endostatin XVIII unterscheidet [John H, 1999; Sasaki, 2000].

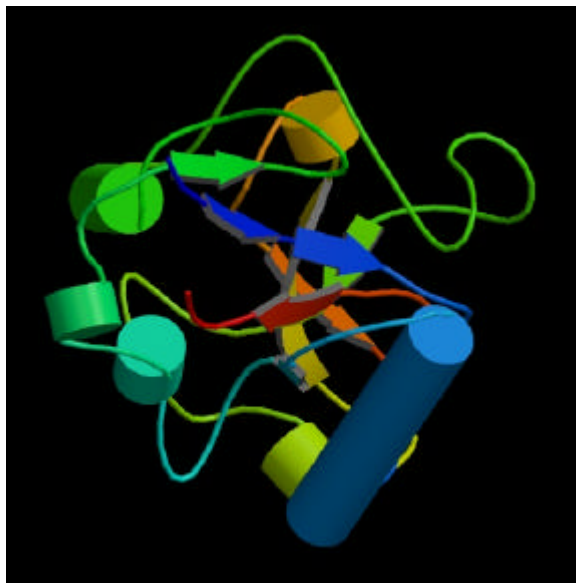


Abb. 1: Kristallstruktur des Endostatin XVIII aus der Röntgenstrukturanalyse in vereinfachter, zylindrischer Darstellung [Hohenester, 1998]

Das Kollagen ist das wichtigste Protein des Bindegewebes. Es macht schätzungsweise ein Drittel der gesamten Proteinmasse des Menschen aus. Die Raumstruktur bildet eine Tripel-Helix, eine sehr starre Helix aus drei verdrehten Aminosäureketten, die durch Wasserstoffbindungen zusammengehalten werden. Man kennt bisher mindestens 19 verschiedene Kollagentypen, die für das jeweilige Körpergewebe typisch sind [Myers, 1997; Karlson, *Biochemie-Lehrbuch*].

Das Kollagen XVIII (auch  $\alpha 1$ -(XVIII)-Kollagen) ist ein ungewöhnlicher Vertreter der Kollagen-Familie. Im Molekül wechseln sich in 10 Bereichen Tripel-Helix-Struktur und nicht-Tripel-Helix-Struktur ab, was als Regionen besonderer struktureller Flexibilität gedeutet wird und das Kollagen XVIII der Gruppe der Multiplexine (multiple triple helix domains and interruptions) zuordnet [Oh, 1994]. Es findet sich hauptsächlich im perivaskulären Basalmembrangewebe [Rehn, 1995]. Das  $\alpha 1$ -(XVIII)-Kollagenmolekül beinhaltet einen

---

nicht-kollagenen C-terminalen Bereich von ca. 300 Aminosäureresten, der als NC1-Domäne bezeichnet wird. Der Aufbau des Endostatin XVIII-Moleküls entspricht den letzten 184 Aminosäureresten der NC1-Domäne (Sequenz s. Anhang). Endostatin enthält zwei Disulfidbrücken, die die Cysteinreste Cys164 und Cys304, sowie Cys266 und Cys296 miteinander verbinden. Die Kristallstruktur des Endostatin XVIII aus der Röntgenstrukturanalyse in vereinfachter, zylindrischer Darstellung ist in Abbildung 1 zu sehen, für eine detaillierte Strukturbeschreibung sei auf [Hohenester, 1998] verwiesen.

In Tierversuchen mit Mäusen konnten bereits 1997 nach Behandlung mit Endostatin Tumoren in einem „schlafenden“ Zustand gehalten werden, solange das Medikament appliziert wurde.

In einigen Fällen wurde sogar ein massiver Rückgang der Tumormasse festgestellt [O'Reilly, 1997]. Folkman und Mitarbeiter wählten eine zyklische Versuchsdurchführung und verwendeten drei unterschiedliche Tumorarten. Die Behandlung wurde immer dann ausgesetzt, wenn eine Regression des Tumors erreicht war. Daraufhin setzte das Tumorstadium wieder ein und wenn die Ausgangsgröße erreicht war wurde die Behandlung wieder aufgenommen was wieder eine Schrumpfung zur Folge hatte.

Im Fall des Lewis-Lungenkarzinoms waren sechs der beschriebenen Zyklen (185 Tage) notwendig um das Tumorstadium endgültig zu unterdrücken. Beim T241-Fibrosarkom (eine Bindegewebsgeschwulst) wurde ein vergleichbares Ergebnis bereits nach vier Zyklen erreicht. Beim B16F10-Melanom reichten zwei Behandlungszyklen bis zur dauerhaften Regression des Tumors.

## 2.6 Ni-NTA Chromatographie als Spezialfall der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die in dieser Arbeit zur Proteinisolierung verwendete Ni-NTA Chromatographie gehört in die Kategorie der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Die Metallchelate-Affinitätschromatographie und der Begriff IMAC wurde 1975 von Porath eingeführt [Porath, 1975, 1992]. Diese Art der Affinitätschromatographie beruht nicht auf biospezifischen Erkennungsmechanismen. Es wird eine Metall-chelatisierende Gruppe, nämlich Nitriloessigsäure (NTA, ein vierzähliger Chelatligand), an einer Matrix immobilisiert. An die NTA-Gruppe werden  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen derart gebunden, daß vier der sechs Bindungsplätze des Ni-Ions besetzt sind. Einige oberflächengebundene Aminosäuren in Proteinen, vor allem Histidinreste, binden spezifisch an die freien Koordinationsplätze (s. Abb. 2).

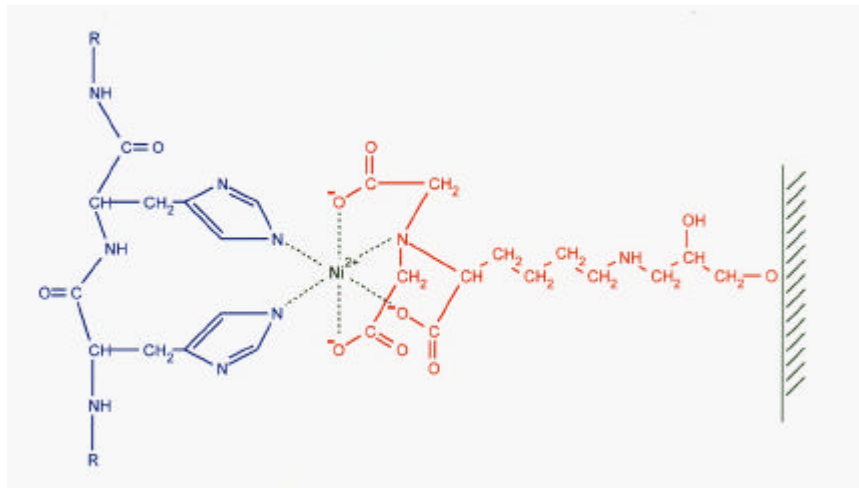


Abb. 2 : Bindung von Histidinresten an eine Ni-NTA-Matrix (Qiagen)

Weitere in der IMAC häufig eingesetzte Metall-Ionen sind  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$ . Die vom jeweiligen Metall abhängige Geometrie der Koordinationssphäre ist dabei für die Selektivität der Bindung entscheidend [Lottspeich, Zorbas, 1998].

Am weitesten verbreitet für diese Art der Proteinisolierung ist eine Sequenz aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten (6xHis-Tag) die endständig (C- oder N-terminal) an die Proteinstruktur gehängt werden. Für die Expression rekombinanter Proteine mit diesem His-Tag, der auch His-Linker genannt wird, stehen Vektorsysteme zur Verfügung, die eine Expression durch starke Promotoren ermöglichen.

---

Je nachdem wie das Zielprotein exprimiert wird (extra- oder intrazellulär, löslich oder als Inclusion Body) ist ein nativer oder denaturierender Zellaufschluß notwendig bevor die Isolierung mittels Ni-NTA Chromatographie möglich ist.

Die Elution des gebundenen Zielproteins erfolgt mit Imidazol – das auch die funktionelle Gruppe des Histidin darstellt – als eluierendes Agens. Es verdrängt das über Histidin gebundene Protein kompetitiv aus dem Chelatkomplex. Dies geschieht in Form einer Gradientenelution mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen. Alternativ können auch Puffer mit niedrigem pH-Wert verwendet werden (ebenfalls als Gradientenelution). Bei pH-Werten niedriger als 5 ist der Imidazolring des Histidins protoniert und kann keinen Komplex mehr mit den Nickel-Ionen bilden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Mikroorganismus

Alle Kultivierungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einem gentechnisch veränderten Stamm des Bakteriums *Escherichia coli* M15, eines Derivats des K-12-Sicherheitsstammes, durchgeführt. Dieser Stamm wurde freundlicherweise von der Firma BioVision AG, Hannover zur Verfügung gestellt.

##### 3.1.1 Expressionsinduktion

Der Stamm trägt sowohl ein pREP4-Repressor-Plasmid, als auch ein pQE-Expressions-Plasmid auf dem als Fusionsprotein humanes Endostatin mit einem 6xHis-Tag codiert ist. Auf dem pREP4-Plasmid ist eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin codiert, auf dem pQE-Plasmid zusätzlich noch eine Ampicillin-Resistenz.

Das pREP4-Plasmid reguliert die Zielproteinexpression dadurch, daß es die Expression eines *lac*-Repressor-Proteins veranlaßt. Dazu bedarf es der Wechselwirkung mit dem pQE-Expressions-Plasmid. Auf diesem befindet sich eine Promotor-Operator-Kombination aus dem Phagen-T5-Promotor und zwei *lac*-Operatoren. Solange ausreichend *lac*-Repressor-Protein vorhanden ist, verhindern die *lac*-Operatoren den Start der Proteinexpression. Erst wenn dem Nährmedium Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) zugefügt wird, das an das *lac*-Repressor-Protein bindet und es dadurch inaktiviert, wird die Expression des Endostatins gestartet (induziert).

#### 3.2 Typischer Wachstumsverlauf von Batch-Kulturen

Die meisten Mikroorganismen folgen unter den Bedingungen einer Batch-Kultivierung in ihrem Wachstumsverhalten verschiedenen Wachstumsphasen, wie sie in Abbildung 3 dargestellt sind. Abhängig von den Kultivierungsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Nährstoffkonzentration u. a.) unterscheiden sich die Wachstumskurven verschiedener Mikroorganismen hauptsächlich in der Dauer der einzelnen Phasen.

Die Auftragung der Zellzahl  $N$  im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit liefert die sogenannte Wachstumskurve.

Diese Kurve zeigt im allgemeinen folgenden typischen Verlauf:

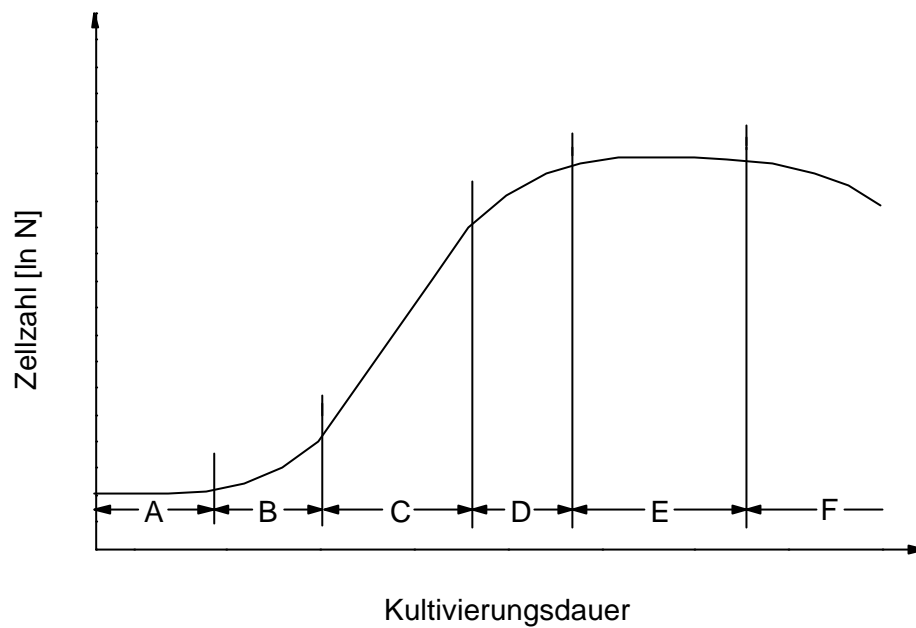


Abb. 3: „Wachstumskurve“, Änderung der Zellzahl mit der Zeit in einer Batch-Kultur (nach [Dellweg, 1987])

Man unterscheidet mehrere Phasen der Entwicklung der Mikroorganismen:

A = Inkubations- oder Adaptionphase

B = Akzelerationsphase

C = exponentielle Phase

D = kurze Übergangsphase (Verzögerungsphase)

E = stationäre Phase

F = Absterbephase oder letale Phase

In der Inkubationsphase (A) findet meist keine Zellvermehrung statt, aber die Größe und Masse der Einzelzellen nimmt zu, nachdem eine Adaption der Zellen an die neue Umgebung erfolgt ist. Die Akzelerationsphase (B) kennzeichnet den Beginn der Vermehrung der Zellen, sie mündet direkt in die exponentielle Phase (C) ein. In dieser Phase ist die Wachstumsrate maximal. Bedingt durch den Mangel an Nährstoffen, die Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte oder limitierten Stofftransport wird das Wachstum schließlich in der Verzögerungsphase (D) allmählich verlangsamt. Die Wachstumskurve geht dann in die stationäre Phase (E) über, in der die Zellen die noch vorhandenen Reservestoffe aufbrauchen. In diesem Stadium ist die Absterbegeschwindigkeit gleichgroß wie die Wachstumsgeschwindigkeit. Überwiegt schließlich die Autolyse der Zellen, beginnt die Absterbephase (F). In dieser Phase steigt die Totzellzahl stark an [Dellweg, 1987].

### 3.3 Die Nährmedien

Es wurden drei verschiedene komplexe Medien (LB-, 2YT- und Super-LB-Medium), sowie ein synthetisches Minimalmedium (HDF-Medium) verwendet. Bei 2YT- und Super-LB-Medium handelte es sich um modifizierte LB-Medien mit höheren Trypton- und Hefeextraktkonzentrationen (s. Tab. 1).

Tab. 1: Zusammensetzung der LB-Medien

Bestandteil	LB-Medium	2YT-Medium	Super-LB-Medium
Trypton	10 g/L	16 g/L	25 g/L
Hefe-Extrakt	5 g/L	10 g/L	15 g/L
NaCl	5 g/L	5 g/L	5 g/L

Einige Schüttelkolbenkultivierungen wurden in einem synthetischen Minimalmedium (HDF-Medium nach [Riesenberg, 1990]), dessen Zusammensetzung in Tabelle 2 beschrieben ist, durchgeführt.

Tab. 2: Zusammensetzung des HDF-Mediums

Substanz	Konzentration [g/L]	Substanz	Konzentration [g/L]
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,7	$\text{H}_3\text{BO}_3$	$0,6 \cdot 10^{-3}$
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,8	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,0	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
Glucose	9,0	EDTA	$1,7 \cdot 10^{-3}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0	$\text{Fe(III)citrat} \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$	Citronensäure $\cdot \text{H}_2\text{O}$	0,35
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	Antischaummittel SP1	225 $\mu\text{L/L}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$0,3 \cdot 10^{-3}$		

Der Phosphatpuffer, Ammoniumsulfat, Antischaummittel und die Spurenelemente wurden zusammengegeben, mit 5 N Natronlauge auf pH 6,4 eingestellt und anschließend autoklaviert. Die Magnesiumsulfat- und Glucoselösungen wurden separat autoklaviert, wobei eine 100fach konzentrierte Magnesiumsulfatlösung und eine 10fach konzentrierte Glucoselösung verwendet wurden.



### 3.4 Sterilisation

Zur Sterilisation aller Geräte (Schüttelkolben, Meßzylinder, Pipettenspitzen, Pinzetten etc.) die bei den verschiedenen Versuchen in direkten Kontakt mit den Mikroorganismen kamen, sowie der Nährmedien und des kompletten Bioreaktors, wurde ein Autoklav der Firma Fedegari mit 170 Liter Fassungsvermögen benutzt. Es wurde mindestens 20 Minuten bei 121°C und 1 bar autoklaviert. Alle mit Mikroorganismen kontaminierten Geräte und Abfälle wurden in einem zweiten Autoklaven desselben Typs mit denselben Einstellungen behandelt, so daß sichergestellt war, daß nur vollständig abgetötete Abfälle in die Kanalisation und den Müll gelangten.

### 3.5 Kulturführung

#### 3.5.1 Stammhaltung und Arbeitskulturen

Ansprüche an die Stammhaltung sind:

- Ein genügend großer Teil der Mikroorganismen soll vermehrungsfähig bleiben.
- Schutz vor Verunreinigungen (besonders durch Fremdorganismen).
- Die Eigenschaften des jeweiligen Stammes sollen erhalten bleiben (Schutz vor Mutationen bzw. vor Verlust von Plasmiden).
- Es soll bei Bedarf Impfmateriale für frische Kulturen zur Verfügung stehen.

Möglichkeiten zur Erfüllung dieser Ansprüche sind durch die Anlage von „Stammkulturen“ gegeben. In Stammkulturen wird die Vermehrung der Mikroorganismen möglichst stark verlangsamt, so daß die Zahl der Generationen (und damit auch die Zahl der möglichen Mutationen) klein bleibt.

Die Stammhaltung des *Escherichia coli*-Stammes erfolgte als Gefrierkultur in Glycerin (50% v/v) bei -78°C. Die Bakterien wurden in Schüttelkolben mit LB-Medium bei 37°C kultiviert. Gegen Ende der exponentiellen Phase wurden Portionen von je 750 µL der Schüttelkultur in sterile Kryogefäße, mit vorgelegten 1000 µL sterilisiertem Glycerin (75 % v/v), gegeben. Nach dem Durchmischen wurde langsam abgekühlt (1 Stunde bei 4°C, dann 3 Stunden bei -18°C) und schließlich in gefrorenem Zustand bei -78°C gelagert. Das Glycerin dient als Schutzstoff, um die Bakterienzellen vor Schädigungen beim Gefriervorgang zu schützen. Die Hauptgefahren für die Zellen liegen in der Bildung von intrazellulären Eiskristallen, sowie zu hoher Zunahme der intrazellulären Elektrolytkonzentration. Glycerin dringt relativ leicht ins Zellinnere ein und stabilisiert dort die Hydrathülle

der Proteine. Dadurch wird eine Denaturierung durch Entwässerung und zunehmende Elektrolytkonzentration verhindert.

Für die Herstellung von Arbeitskulturen auf Agarplatten wurde jeweils ein Kryogefäß mit der Stammkultur aufgetaut (schrittweise, analog zum Einfrieren) und nach dem Animpfen verworfen.

Die Agarplatten wurden aus LB-Medium gegossen, dem 15 g/L Agar zugegeben war.

Die Arbeitskulturen konnten bei luftdichter Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen verwendet werden, ohne daß ein Verlust an Vitalität feststellbar war.

### 3.5.2 Kultivierung in Schüttelkolben

Die Versuche wurden in verschiedenen Arten von Schüttelkolben durchgeführt. Die Kolben hatten alle Erlenmeyerform, unterschieden sich aber im Volumen und der Zahl der Schikanen. Bei den Schikanen handelt es sich um tiefe Einkerbungen im unteren Teil der Kolben, die vertikal bis auf die halbe Höhe des Kolbens geführt werden. Sie dienen zur besseren Umwälzung der Flüssigkeit während des Schüttelvorgangs. Durch die erzeugten Turbulenzen wird der Luft- und damit auch der Sauerstoffeintrag in die geschüttelte Flüssigkeit erhöht, so daß für aerobe Mikroorganismen bessere Wachstumsbedingungen erzeugt werden. Es standen folgende Kolben zur Verfügung:

100 mL	4 Schikanen	Maximal 30 mL Füllhöhe
300 mL	2 Schikanen	Maximal 70 mL Füllhöhe
300 mL	4 Schikanen	Maximal 70 mL Füllhöhe
500 mL	2 Schikanen	Maximal 100 mL Füllhöhe
500 mL	4 Schikanen	Maximal 100 mL Füllhöhe

Bei den vergleichenden Versuchsreihen wurden 4 bis 8 Kolben gleicher Sorte verwendet.

Es wurde in Laborschüttlern des Typs Certomat II mit Temperierhauben Certomat HK (beides Fa. B. Braun Biotech international) gearbeitet.

Bei allen Kultivierungen wurden dem Nährmedium zwei Antibiotika zugefügt. Ampicillin wurde als Natriumsalz verwendet und in Wasser gelöst. Es wurde so eingewogen und in entsprechendem Wasservolumen gelöst, daß eine Endkonzentration im Schüttelkolben von 100 µg/mL Medium erreicht wurde. Kanamycin lag als flüssige Stammlösung von 50 mg/mL vor und wurde so weit mit Wasser verdünnt, daß eine Endkonzentration von

25 µg/mL Medium erreicht wurde. Beide Antibiotika wurden vermischt und erst nach dem Autoklavieren des Mediums unter sterilen Bedingungen über einen Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm direkt in das Nährmedium gegeben.

### **3.5.3 Kultivierung im Bioreaktor**

#### **3.5.3.1 Vorkultur**

Die Anzucht der Vorkultur für die Biostat-Kultivierungen erfolgte jeweils in einem 100 mL-Schüttelkolben mit vier Schikanen. 30 mL steriles, mit Antibiotika versetztes Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie von einer Arbeitskulturer (Agarplatte) angeimpft. Nach einer Kultivierungszeit von 8 bis 10 Stunden bei 37°C im Schüttelschrank (130 RPM) wurde die Kultur auf 30 mL frisches Medium überimpft und nach einer Anwachzeit von ca. 4 Stunden (Mitte der exponentiellen Phase) zum Animpfen des Reaktors verwendet. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in einer Zählkammer bestimmt. Anhand des Zählergebnisses wurde das benötigte Volumen für einen Animpftiter von  $5 \times 10^6$  Zellen/ mL bestimmt. Der Animpftiter war für alle Reaktorkultivierungen gleich.

#### **3.5.3.2 Bioreaktor-Kultivierungen**

Alle Bioreaktor-Kultivierungen wurden in einem 2L-Biostat B Reaktor (Fa. Braun, Melsungen) durchgeführt. Das handelsübliche Glasgefäß war dabei durch ein Edelstahlgefäß, dessen Dimensionen denen des Glaselementes entsprechen, ersetzt. Die seitlich eingebauten Stützen erlauben auch den Einsatz verschiedener optischer Sensoren. Es handelt sich um eine Anfertigung der institutseigenen Feinmechanikwerkstatt.

Der Reaktor hat ein Arbeitsvolumen von 2 L. Als Deckel wurde der Originaldeckel des Glasgefäßes verwendet. Der doppelwandige Edelstahlreaktor wurde mit Wasser temperiert. Es wurden bei allen Kultivierungen drei in regelmäßigen Abständen auf der Rührerachse angebrachte 6-Scheibenrührer verwendet.

Der Biostat B war mit einer digitalen Meß- und Regeleinheit (DCU) versehen, die über ihren Hostanschluß mit einer Workstation (Vax-Station) verbunden war. Die Datenaufnahme, Prozeßsteuerung und -regelung erfolgte über das sogenannte RISP-System (Real Time Integrating Software Platform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover). Die alle 10 Sekunden aufgenommenen Meßwerte wurden über einen Zeitraum von 1

Minute gemittelt und gespeichert. Der Verlauf der einzelnen Parameter wird während der Kultivierung graphisch dargestellt.

Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau des Reaktors und seiner Peripherie. Der Reaktor war mit einem Temperaturfühler (Pt-100), einer pH- sowie einer Sauerstoffelektrode (beide Fa. Mettler-Toledo) zur Prozeßüberwachung ausgestattet. Über ein Mass-Flow-Meter (Mass-Flow-Controller 5851, 0-30 L/min, Fa. Brooks) und den angeschlossenen Controller (Modell 5876, Fa. Brose) wurde die Druckluftbegasung (0,5-3 vvm) eingestellt. Die Druckluft wurde über einen Sterilfilter durch einen Begasungsring (unterhalb des Rührers) in das Medium eingeleitet. Für die Kultivierungen mit einer Begasungsrate von mehr als 2,5 vvm wurde eine mit 800 mL sterilem Wasser gefüllte Waschflasche und eine leere Sicherheitsflasche, die einen eventuellen Überlauf aufnehmen konnte, vor den Begasungsring geschaltet. Der Zuluftstrom wurde durch das Wasser in der ersten Waschflasche befeuchtet, so daß es zu weniger Feuchtigkeitsaustrag aus dem Reaktor kam. Die Waschflasche wurde nicht über einen Sterilfilter, sondern über eine fest mit Watte gestopfte Glas-hülse angeströmt.

Das Abgas verließ den Reaktor durch einen mit Kühlwasser betriebenen Abluftkühler, dem noch eine eisegekühlte Sicherheitsflasche nachgeschaltet war. So konnte gewährleistet werden, daß aus dem Reaktor mitgerissene Feuchtigkeit auskondensierte, bevor sie in die Abgasanalytik gelangen konnte.

Der Abgasstrom führte über einen Verteiler (Mux-Control 100, Fa. Braun, Melsungen) in das Abgasanalyzesystem EGAS 2 (Fa. Hartmann&Braun), das mit einem kombinierten CO<sub>2</sub>-/O<sub>2</sub>-Analysator (URAS 14 + O<sub>2</sub>) ausgerüstet war. Diese Abgasdaten wurden ebenfalls vom RISP-System aufgenommen.

Der pH-Wert wurde während der Kultivierung durch automatische Zudosierung von steriler 4 %-iger HCl- bzw. 10 %-iger NaOH-Lösung konstant gehalten.

Der Reaktor wurde vor jeder Kultivierung mit 2,0 L Nährmedium befüllt, dann wurde er mitsamt den eingebauten Elektroden sowie allen angeschlossenen Gefäßen für 25 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Sauerstoffelektrode wurde nach dem Polarisieren (Polarisierungsdauer sechs Stunden) kalibriert, wobei der 0 %-Wert durch Begasung mit Stickstoff und der 100 %-Wert durch Begasung mit Druckluft bei den jeweiligen geplanten Kultivierungsbedingungen festgelegt wurden.

---

Wenn der Reaktor nach dem Autoklavieren auf die Kultivierungstemperatur abgekühlt war, wurden die Antibiotika Ampicillin (100 mg/L) und Kanamycin (25 mg/L) durch einen Sterilfilter über den Animpfstutzen des Reaktors ins Medium gegeben.

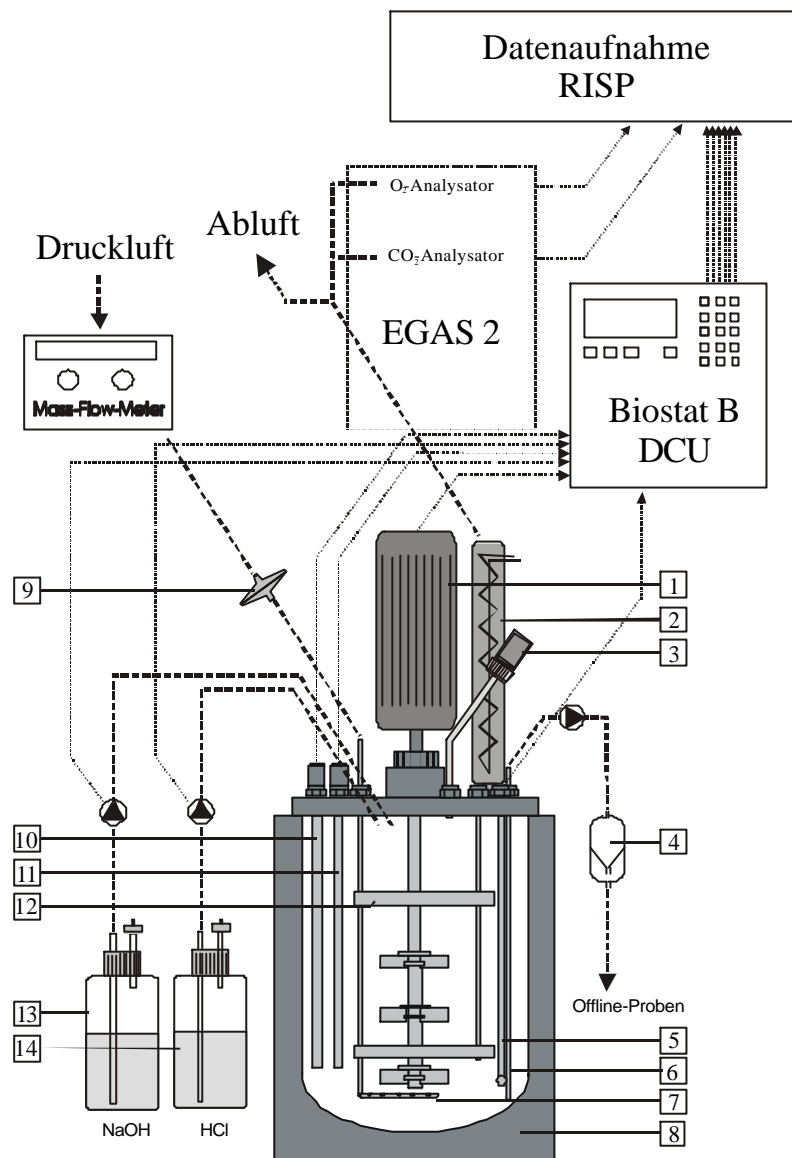


Abb. 4: Schematischer Aufbau des verwendeten Bioreaktors und seiner Peripherie

- |  |   |
|--|---|
| 1 = Rührermotor                        | 8 = Reaktorkühlmantel                       |
| 2 = Abluftkühler                       | 9 = Sterilfilter, Zuluft                    |
| 3 = Animpfstutzen mit Septum           | 10 = pH-Elektrode                           |
| 4 = Bakterienfalle für die Probennahme | 11 = Sauerstoffelektrode (pO <sub>2</sub> ) |
| 5 = Temperaturfühler                   | 12 = Begasungskorb                          |
| 6 = Probenahmerohr                     | 13 = Vorratsflasche Lauge (10 % NaOH)       |
| 7 = Begasungsring                      | 14 = Vorratsflasche Säure (4 % HCl)         |

--- = Stoffströme

... = Datenströme

### **3.6 Offline-Proben bei Kultivierungen in Schüttelkolben oder Bioreaktor**

#### **3.6.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD)**

Die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) der Kulturlösung ist ein Maß für die Zelldichte. Sie wurde als Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvicon 922, Fa. Kontron) gemessen. Die Kulturprobe wurde vor der Messung mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung (aq.) so verdünnt, daß die gemessene Absorption den Wert von 0,8 nicht überstieg. In einer 1,5 mL Einwegküvette mit 1 cm Schichtdicke wurde dann bei 25°C gegen 0,9 %-ige NaCl-Lösung (aq.) die Extinktion gemessen. Die NaCl-Lösung wurde auch als Referenz verwendet (Nullabgleich), da entsprechend verdünntes, zellfreies Kulturmedium bei der eingestellten Wellenlänge eine zu vernachlässigende Absorption besitzt.

#### **3.6.2 Bestimmung der Biofeucht- und Biotrockenmasse**

Für die Abtrennung der Biomasse vom Medium wurde ein Probenvolumen von insgesamt 4 mL in einer Zentrifuge (Firma Eppendorf, Centrifuge 5415 D) bei 16.100 g, drei Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Dazu wurden vorher getrocknete und gewogene Reaktionsgefäße (Firma Eppendorf) von 2 mL Volumen verwendet, die zweimal gefüllt und zentrifugiert wurden. Da besonders bei Probenahmen in frühen Kultivierungsphasen nur wenig Biomasse vorhanden ist, sollte durch das höhere Probenvolumen der Wägefehler gemindert werden.

Der Überstand wurde jeweils verworfen, nach der zweiten Zentrifugation wurde das feuchte Zellpellet gewogen und über die Gewichts Differenz die Biofeuchtmasse bestimmt. Die Reaktionsgefäße wurden dann bis zur Gewichtskonstanz bei 75°C getrocknet, anschließend wiederum gewogen und die Biotrockenmasse über die Gewichts Differenz bestimmt.

### 3.6.3 Zellzahlbestimmung mikroskopisch

Die Zellzahl pro mL Zellsuspension wird durch Zählen der Zellen unter einem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe einer Helber-Kammer ermittelt. Die Proben werden mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung (aq.) so verdünnt, daß sich in einem Großquadrat maximal 50 Zellen befinden.

### 3.6.4 Bestimmung des Gesamtproteingehalts mit der modifizierten Lowry-Methode

Es wurde ein Testkit der Firma Pierce (Modified Lowry Protein Assay) verwendet. Das Testkit enthält das modifizierte Lowry Protein Assay Reagenz (Kupfersulfat, Kaliumiodid und Natriumtartrat in einem alkalischen Natriumcarbonat-Puffer), das 2N Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz und eine in Ampullen aliquotierte Albuminstandardlösung, die Rinder-Serum-Albumin (BSA) in einer Konzentration von 2 mg/mL enthält und als Stammlösung für eine Verdünnungsreihe zur Kalibration des Tests benötigt wird.

Bei der Lowry-Methode wird zunächst unter alkalischen Bedingungen das Protein mit zweiwertigem Kupfer in Gegenwart von Natriumtartrat umgesetzt. Dabei entsteht ein vierzähliger Kupferkomplex mit einwertigem Kupfer. Nach der Zugabe des 1:1 mit Wasser verdünnten Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, welches u. a. Phosphomolybdän-/ Phosphowolframsäure-Anteile enthält, entsteht ein wasserlöslicher blauer Komplex, dessen Absorption bei 750 nm im Photometer (Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments) bestimmt wird. Aus der Albuminstandardlösung wurden vor den jeweiligen Proteinbestimmungen mit demselben Puffer in dem auch die Proben gelöst waren, Verdünnungen im Bereich von 1 bis 1500 µg/mL BSA hergestellt. Aus diesen Verdünnungen wurde eine Kalibrationskurve, wie sie als Beispiel in Abbildung 5 gezeigt ist, erstellt. Es besteht nur im Bereich von ca. 5 bis 250 µg Protein/mL Linearität. Hier wurden sehr gute lineare Regressionskoeffizienten erreicht. Daher wurden Proben mit höheren Proteingehalten entsprechend verdünnt bis ihre Absorption im genannten Bereich gemessen werden konnte.



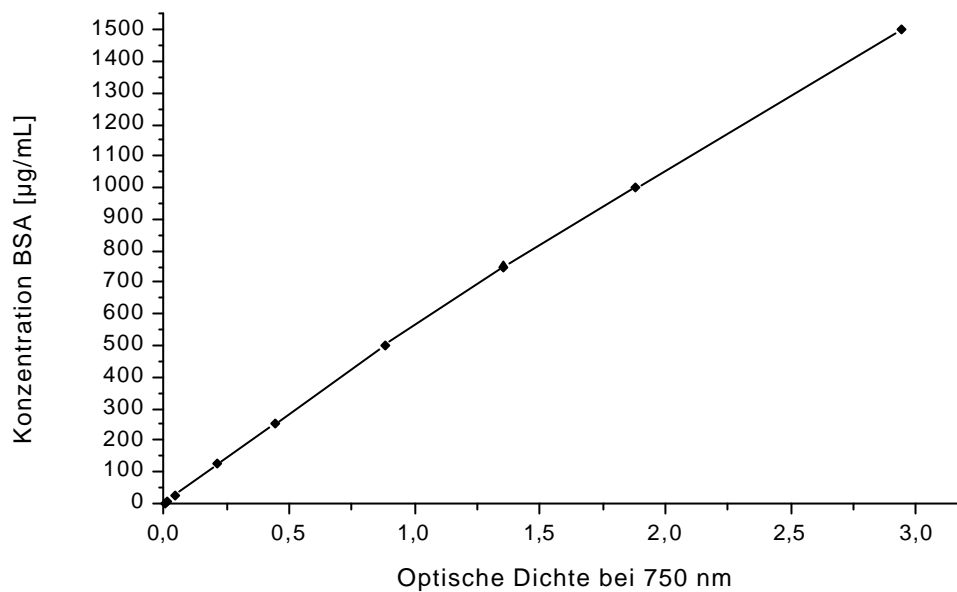


Abb. 5: Kalibrationskurve für Lowry-Test. BSA in Konzentrationen von 1 – 1500 µg/mL (bei 750nm)

Für die Messung wurden je 200 µL des Standards oder der Proteinprobe, sowie 200 µL des verwendeten Verdünnungspuffers (meist Lysispuffer A- nativ, oder Lysispuffer B- denaturierend, s. Anhang) als Blank, in vorher beschrifteten Reaktionsgefäßen, vorgelegt. In Intervallen von 15 Sekunden wurde dann je 1 mL des modifizierten Lowry-Reagenz dazupipettiert und sofort auf einem Vortex-Mixer gründlich durchmischt. Danach folgte eine Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurde wiederum in 15 Sekunden-Intervallen jeweils 100 µL des verdünnten Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz dazugegeben, kräftig geschüttelt und umgefüllt in Halbmikroküvetten. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben am Photometer bei 750 nm vermessen.

### **3.7 Online-Analytik bei Bioreaktor-Kultivierungen**

#### **3.7.1 pH-Wert-Messung**

Zur Messung des pH-Wertes wurde eine sterilisierbare Einstabmeßkette (Fa. Mettler-Toledo) verwendet, die mit der Steuereinheit eines Biostat B-Fermenters (Fa. Braun) verbunden war. Die Einstabmeßkette besteht aus einer Glas- und einer Vergleichselektrode, die zusammen eine galvanische Kette bilden. Die eigentliche Meßgröße ist die Spannung (Summe der Grenzflächenpotentiale in der Lösung), die mit einem hochohmigen Voltmeter gemessen wird. Der Zusammenhang zwischen der Spannung und dem pH-Wert ist über die Nernst'sche Gleichung gegeben. Die Kalibration der pH-Elektrode erfolgte vor dem Autoklavieren mit zwei Pufferlösungen (pH 4,0 und pH 7,0). Zwischen den Messungen wurde die Elektrode in 3M Kaliumchloridlösung gelagert. Die Reinigung erfolgte in Pepsin-Lösung.

#### **3.7.2 pO<sub>2</sub>-Wert-Messung (Gelöstsauerstoff)**

Der Gelöstsauerstoff wurde mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode (Fa. Mettler-Toledo) als Sauerstoffpartialdruck nach dem polarographischen Prinzip (Clark-Prinzip) gemessen. Dabei diffundiert der Sauerstoff aus der Lösung durch eine gasdurchlässige Teflonmembran, die die Meßlösung von der Ag-Anode und Pt-Kathode trennt, und wird an der Kathode reduziert. An der Anode wird Silber oxidiert.

Die Elektrode wird nach dem Autoklavieren im Fermenter-System kalibriert (Zwei-Punkt-Kalibration). Dabei wird zunächst durch Begasung mit Stickstoff der 0%-Wert für pO<sub>2</sub> festgelegt. Der 100%-Wert wird durch Begasung mit Druckluft unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen (Rührerdrehzahl und Begasungsrate) eingestellt. Die während der Fermentation gemessenen Werte geben die relative Sauerstoffsättigung (%-rel. Sättigung) an.

### 3.7.3 Abgasanalytik (Abgassauerstoff und -kohlendioxid)

Die Abgasanalyse wurde mit dem EGAS 1 der Firma Hartmann & Braun (Frankfurt a.M.) durchgeführt. Das Gesamtsystem zur Meßgasaufbereitung besteht aus dem Meßgaskühler mit Kondensatauffanggefäß zum Trocknen des Meßgases, der Meßgasfördereinheit mit Überwachung von Fluß und Feuchtigkeit und den Analysegeräten zur Messung von Kohlendioxid und Sauerstoff.

Der Sauerstoffgehalt wird elektrochemisch über eine Elektrolysezelle bestimmt. Der Sauerstoffsensor nach dem Stromsondenprinzip besteht im wesentlichen aus einer elektrochemischen Zelle mit röhrenförmigem Festelektrolyten aus sauerstoffionenleitender Zirkondioxidkeramik, auf dessen Innen- und Außenfläche poröse elektronenleitende Schichten als Elektroden (Hauptbestandteil Platin) aufgebracht sind. Der mit Yttriumoxid oder anderen Seltenerde-Oxiden dotierte Zirkondioxid-Festelektrolyt enthält in seinem Kristallgitter Sauerstoff-Leerstellen, die eine mit der Temperatur exponentiell zunehmende Sauerstoffionenleitfähigkeit ermöglichen. Oberhalb der Mindesttemperatur der Sonde (ca. 650°C) ist die Messung temperaturunabhängig. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 0,4-1,0 V wird in der rohrförmigen Zirkondioxid-Festelektrolytzelle ein Gleichstromsignal erzeugt, das der Sauerstoffionenkonzentration des zu messenden Gases direkt proportional ist.

Ein auf Kohlendioxid sensibilisiertes, einstrahliges IR-Photometer nutzt die IR-Aktivität des Kohlendioxids für dessen quantitative Bestimmung durch Messung der IR-Absorption bei charakteristischen Wellenlängen. Die Bestimmung erfolgt nichtdispersiv bei spezifischen Wellenlängen (NDIR-Bestimmung). Strahlungsquelle ist ein unterkühlter Glühfaden (700°C). Die vom Strahler ausgehende IR-Strahlung wird durch eine von einem Synchronmotor angetriebene Blende in intensitätsgleiche Anteile zerlegt, die abwechselnd die Analysenhälfte und die Vergleichshälfte (gefüllt mit kohlendioxidfreiem Gas) der zweigeteilten Küvetten durchstrahlen. Beide Strahlungsanteile treten in eine Doppelschicht-Absorptionskammer ein, die mit Kohlendioxid gefüllt ist. Die beiden Schichten stehen mit einem Membrankondensator in Verbindung. Kohlendioxid in der Analysenhälfte absorbiert die spezifische Strahlung, was zu einer proportionalen Auswölbung der Membran führt und damit eine entsprechende Kapazitätsänderung des Membrankondensators verursacht.

Die Kalibrierung der Analysegeräte erfolgt automatisch (mit Kalibrationsküvette und Umgebungsluft, die mit Hilfe einer Absorptionsmittelpatrone von Wasser (mittels Blaugel)

und Kohlendioxid (mittels Natriumhydroxid auf Träger) befreit ist) oder manuell mit Eichgas der Zusammensetzung 1,94 % CO<sub>2</sub>, 18,6 % O<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>.

### **3.8 Produktisolierung und -aufreinigung**

#### **3.8.1 Zellaufschluß**

Da das Zielprotein Endostatin von den Bakterien nicht ausgeschleust, sondern intrazellulär gebildet wird, besteht der erste Schritt der Produktisolierung im Aufschluß der Zellen. Dafür bestehen verschiedene Möglichkeiten:

Anwendung mechanischer Methoden in Festsubstanz (Vermahlen tiefgefrorener Proben, Rührwerkskugelmühle) oder in Lösung (Hochdruckhomogenisatoren, Ultraschall, Scherkräfte beim Rühren), sowie nichtmechanische Methoden (Trocknung, Lyse durch osmotischen Druck, chemische Lyse durch Detergentien, enzymatische Lyse).

In dieser Arbeit wurden die Zellaufschlüsse chemisch bzw. enzymatisch durchgeführt, wobei sowohl unter nativen Bedingungen (Lysispuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, Lysozym) als auch unter denaturierenden Bedingungen (Lysispuffer B: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8 M Harnstoff, pH 8,0) gearbeitet wurde. Beide chemischen Methoden wurden auch mit dem Aufschluß durch Ultraschall (Labsonic U mit Mikrospitze, Ø 4 mm, Fa. B. Braun) kombiniert.

##### **3.8.1.1 Enzymatischer Aufschluß, nativ**

Das durch Zentrifugation aus der Bakteriensuspension gewonnene Zellpellet wurde bei der enzymatischen Lyse unter nativen Bedingungen in Lysispuffer (5 mL/ g Biofeuchtmasse) resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (1 mg/mL) wurde kurz geschüttelt und dann 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde bei 4°C 25 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert (Sigma 3K20, Fa. B. Braun), der Überstand vorsichtig abpipettiert, aliquotiert und eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

##### **3.8.1.2 Enzymatischer Aufschluß und Ultraschall, nativ**

Wie unter 3.8.1.1, aber nach der 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde zusätzlich mit einer Ultraschallsonde mit Mikrospitze (Labsonic U, Fa. B. Braun) beschallt. Bei voller Leistung wurde in einer mit einer Eis/ Kochsalz-Mischung gekühlten Rosettzelle (siehe

Abbildung 7) zweimal 5 Minuten lang mit 0,5 sekundigen Intervallen beschallt. Das Lysat wurde bei 4°C 25 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert (Sigma 3K20, Fa. B. Braun), der Überstand vorsichtig abpipettiert, aliquotiert und eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

### 3.8.1.3 Chemischer Aufschluß, denaturierend

Das durch Zentrifugation aus der Bakteriensuspension gewonnene Zellpellet wurde bei der chemischen Lyse unter denaturierenden Bedingungen in Lysispuffer B (5 mL/ g Biofeuchtmasse) resuspendiert. Dann wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Eppendorf-Schüttler geschüttelt. Das Lysat wurde bei 4°C 25 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert (Sigma 3K20, Fa. B. Braun), der Überstand vorsichtig abpipettiert, aliquotiert und eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

### 3.8.1.4 Chemischer Aufschluß und Ultraschall, denaturierend

Das durch Zentrifugation aus der Bakteriensuspension gewonnene Zellpellet wurde bei der chemischen Lyse unter denaturierenden Bedingungen in Lysispuffer B (5 mL/ g Biofeuchtmasse) resuspendiert. Mit einer Ultraschallsonde mit Mikrospitze (Labsonic U, Fa. B. Braun) wurde dann in einer mit einer Eis/ Kochsalz-Mischung gekühlten Rosettzelle (siehe Abbildung 7) bei voller Leistung 9 Minuten lang mit 0,7 sekundigen Intervallen beschallt. Das Lysat wurde bei 4°C 25 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert (Sigma 3K20, Fa. B. Braun), der Überstand vorsichtig abpipettiert, aliquotiert und eingefroren, das Pellet wurde verworfen.



Abb. 7: Dreiarmlige Rosett-Zelle für Ultraschall-Zellaufschluß

### **3.8.2 Isolierung und Aufarbeitung mittels Ni-NTA-Chromatographie unter nativen Bedingungen im Mini-Batch-Maßstab**

1 mL des nach 3.8.1.1 oder 3.8.1.2 unter nativen Bedingungen gewonnenen klaren Lysats wurden mit 250 µL der 50%-igen Ni-NTA-Harz-Suspension (Ni-NTA-Superflow) vermischt und bei Raumtemperatur 60 Minuten geschüttelt. Alle im Lysat enthaltenen Proteine mit einem 6xHis-Tag sollten bei diesem Schritt an das Ni-NTA gebunden werden. Anschließend wurde drei Minuten lang bei 16.100 g zentrifugiert. Das Ni-NTA-Harz lag als festes Pellet vor, der Überstand, welcher alle nicht gebundenen Anteile des Lysats enthielt, wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in vorher beschriftete Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und eingefroren (beschriftet als „Überstand“). Das Pellet wurde dann zweimal mit je 1,25 mL Waschpuffer B (20 mM Imidazol) versetzt und 10 Minuten geschüttelt. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände aliquotiert und eingefroren (beschriftet als „Wasch 1, Wasch 2“). Danach folgte der erste Elutionsschritt: Das Pellet wurde dreimal hintereinander in je 1,25 mL Elutionspuffer C (250 mM Imidazol) resuspendiert, 10 Minuten geschüttelt und die Überstände aliquotiert und eingefroren (beschriftet als „Eluat 1, 2, 3“).

### **3.8.3 Isolierung und Aufarbeitung mittels Ni-NTA-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen im Mini-Batch-Maßstab**

Alle Schritte der Mini-Batch Aufreinigung fanden bei Raumtemperatur statt. Je 1 mL des durch Zellaufschluß (s. 3.8.1.3 und 3.8.1.4) hergestellten klaren Zellysats wurden mit 250 µL der 50%-igen Ni-NTA-Harz-Suspension (Ni-NTA-Superflow) versetzt und 60 Minuten geschüttelt. Alle im Lysat enthaltenen Proteine mit einem 6xHis-Tag sollten bei diesem Schritt an das Ni-NTA gebunden werden. Anschließend wurde drei Minuten lang bei 16.100 g zentrifugiert. Das Ni-NTA-Harz lag als festes Pellet vor, der Überstand, welcher alle nicht gebundenen Anteile des Lysats enthielt, wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in vorher beschriftete Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und eingefroren (beschriftet als „Überstand“). Das Pellet wurde dann zweimal mit je 1,25 mL Waschpuffer C (pH 6,3) versetzt und 10 Minuten geschüttelt. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände aliquotiert und eingefroren (beschriftet als „Wasch 1, Wasch 2“). Danach folgte der erste Elutionsschritt: Das Pellet wurde dreimal hintereinander in je 1,25 mL Elutionspuffer D (pH 5,9) resuspendiert, 10 Minuten geschüttelt und die Überstände aliquotiert und einge-

froren (beschriftet als „Eluat D1, D2, D3“). Danach wurde die Prozedur mit Elutionspuffer E (pH 4,5) wiederholt und die Überstände ebenfalls eingefroren (beschriftet als „Eluat E1, E2, E3“).

### **3.8.4 FPLC**

Sowohl für die Probenentsalzung als auch die Ni-NTA-Chromatographie wurde eine Niederdruckanlage (FPLC) der Firma BioRad verwendet. Die Anlage besteht aus einer Peristaltikpumpe, einem manuell verstellbaren Probenaufgäbeventil, einer Mischkammer, einem Probensammler und einer elektronischen Steuereinheit. Das System bietet die Möglichkeit die Schlauchgröße für alle angeströmten Teile der Anlage zu wechseln, so daß eine Vielzahl verschiedener Chromatographiesäulen damit verwendet werden kann. Über einen UV- und einen Leitfähigkeitsdetektor kann der Chromatographielauf kontrolliert werden. Die Datenaufnahme erfolgt über einen angeschlossenen PC.

#### **3.8.4.1 Gelfiltration zur Probenentsalzung**

Zur Probenentsalzung wurde eine mit Sephadex G25-Fine gepackte Säule verwendet. Das Trägermaterial wurde zum Quellen über Nacht mit Wasser versetzt. Da Sephadex nur geringe mechanische Festigkeit aufweist wurde anfangs sehr vorsichtig mit einem Spatel umgerührt und auf weiteres Rühren verzichtet. Das gequollene Gel wurde luftblasenfrei in eine Glassäule (Firma Millipore, Vantage) gepackt. Die Säule ist beidseitig mit frei verstellbaren Stempeln versehen, die jeweils in einer für das Flußmittel durchlässigen Fritte enden, das Gel aber zurückhalten. Die Säule wurde zu einer Höhe von 23 cm gepackt, so daß ein Säulenvolumen von ca. 40,6 mL zur Verfügung stand. Die zu entsalzenden Proben, die bei der Ni-NTA-Chromatographie anfielen, hatten üblicherweise ein Volumen von 4-12 mL und lagen mit extrem hohen Salzgehalten (8 M Harnstoff, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-HCl) und mit leicht saurem pH-Wert vor.

Es wurden verschiedene Laufpuffer für die Entsalzung getestet (s. Ergebnisteil). Zur Reinigung wurde die Säule mit 0,1 M NaOH gespült.

Die aufgefangenen Fraktionen wurden eingefroren und zur Aufkonzentrierung lyophilisiert (s. 3.8.6). Anschließend wurden sie in einer minimalen Menge 0,1% TFA wieder aufgenommen und zu weiteren Analysen (SDS-PAGE, CE, MALDI) verwendet.

### 3.8.4.2 Ni-NTA-Chromatographie (FPLC)

Als Trägermaterial wurde Ni-NTA-Superflow der Firma Qiagen verwendet, das als fertig aufgequollenes und verwendungsfertiges Gel zu erwerben ist. Das Gel wurde in eine Säule mit Adapter (Durchmesser 1,65 cm) zu einer Höhe von 13 cm gepackt, so daß ein Säulenvolumen von ca. 27,8 mL zur Verfügung stand.

Laut Firmenangaben hat Ni-NTA-Superflow eine hohe Protein-Beladungskapazität von 5-10 mg Protein/ mL Gel. Für die Isolierung des mit 6xHis-Tag versehenen Proteins wurden mit einer lang ausgezogenen Pasteurpipette jeweils 1-3 mL des klaren Zellysats (s. 3.8.1 Zellaufschluß) vorsichtig auf die Geloberfläche aufgetragen.

Mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 mL/ Min wurde die Säule mit den bereits in der Batch-Chromatographie beschriebenen Puffern folgendermaßen gespült:

Ca. 3,25 Säulenvolumen (entsprechend 45 Minuten) wurde mit dem Lysispuffer (Puffer B, pH 8,0) gespült bis die Nulllinie wieder erreicht war. Dann wurde mit ca. 1,6 Säulenvolumen (entsprechend 25 Minuten) Puffer C (pH 6,3) gewaschen, und anschließend mit 1,6 Säulenvolumen Puffer D (pH 5,9) und mit 1,6 Säulenvolumen Puffer E (pH 4,5) eluiert. Die entstandenen Fraktionen wurden als „Überstand-“, „Wasch-“, „Eluat D-“ und „Eluat E-“ Fraktionen aufgefangen (s. Abb. 8) und weiterverarbeitet. Die „Überstand-“Fraktion enthielt somit alle Bestandteile des Lysats, die nicht an das Ni-NTA gebunden hatten, die Waschfraktion alles unspezifisch gebundene Material, die Eluat-D-Fraktion alle Proteine mit korrektem 6xHis-Tag, die Eluat-E-Fraktion alle Proteine mit Varianten des His-Tags, Dimere o. ä.



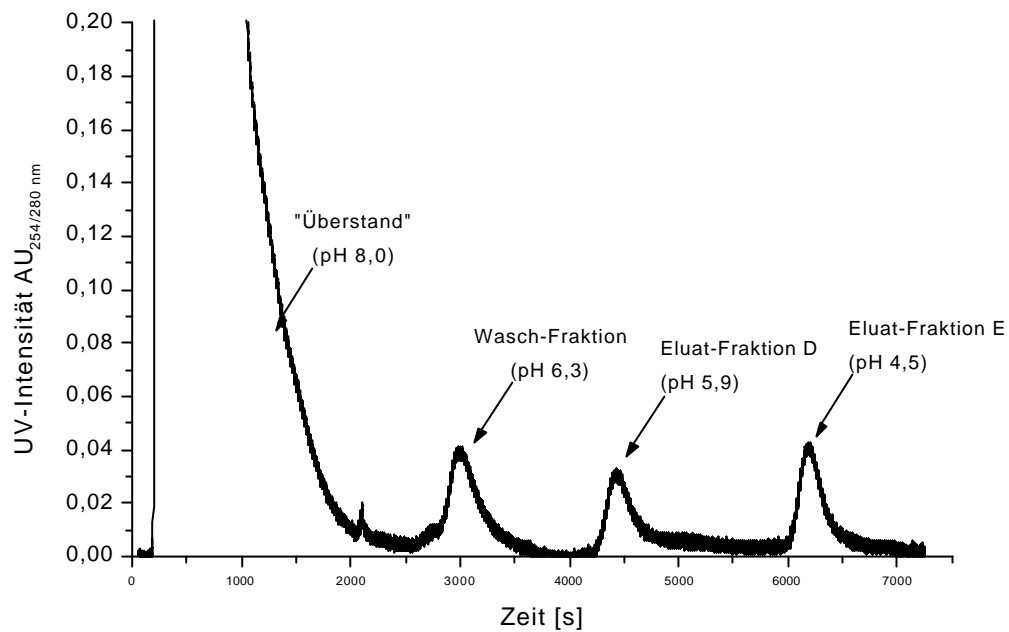


Abb. 8: Typisches FPLC-Chromatogramm für Ni-NTA-Superflow unter denaturierenden Bedingungen

### 3.8.5 Dialyse zur Probenentsalzung

Die nach der Aufarbeitung mittels Ni-NTA-Chromatographie erhaltenen Proben waren durchweg in Puffern mit sehr hohen Salzanteilen (vor allem 8 M Harnstoff, entspricht 480,5 g/L) gelöst. Für weitere Analysen war deshalb eine möglichst vollständige Entsalzung der Proben unumgänglich, da der hohe Salzgehalt die meisten Analysemethoden stört. Für einen Teil der Proben wurde daher die Dialyse zur Entsalzung angewendet. Da die Methode jedoch wegen der Vorbereitung der Dialyseschläuche zeitaufwendig war und auch einige Probleme auftauchten, wurde später statt der Dialyse die Gelfiltration zur Entsalzung vorgezogen.

Es wurden Dialyseschläuche „Medicell“ mit einer Trenngrenze von 12-14 kDa und einem Durchmesser von 14,3 mm verwendet.

Es wurden ca. 10 bis 20 cm lange Stücke von dem Dialyseschlauch geschnitten, der in trockener Form als Rollenware vorlag. Zur Rehydratisierung und Entfernung von Schwermetallionen bzw. Zerstörung von eventuell anhaftenden Proteasen wurden die Schlauchstücke zweimal je 45 Minuten in 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, der 10 mM EDTA zugesetzt wurden, gekocht. Ebenso wurden die im späteren Versuchsverlauf verwendeten Gerätschaften (Pinzetten, Verschluss-Clips, kleine Gläser zur Aufbewahrung) behandelt.

---

Die zu entsalzenden Proben wurden aufgetaut und mit einer Pipette in die einseitig mit einem Clip verschlossenen Schläuche gefüllt. Anschließend wurde der Schlauch mit einem zweiten Clip so verschlossen, daß ein Reservoir von ca. 1/3 des Probenvolumens erhalten blieb, da im Verlauf der Dialyse das Flüssigkeitsvolumen im Schlauch ansteigt und somit die Gefahr besteht, daß der Schlauch platzen kann. Unter starkem Rühren wurde dann unter mehrmaligem Wechsel des kalten, destillierten Wassers dialysiert. Für die sehr kleinen Volumina der aus den Mini-Batch-Versuchen (maximal 500  $\mu$ L) erhaltenen Proben reichte eine Dialysezeit von 60 Minuten aus. Für die größeren Probenvolumen (10 – 20 mL) aus der Ni-NTA-Chromatographie wurden längere Schlauchstücke verwendet und die Dialysezeit verlängert auf mindestens 2 Stunden mit halbstündigem Wasserwechsel.

### **3.8.6 Volumenreduzierung verdünnter wässriger Proben durch Gefriertrocknung (Lyophilisation)**

Im Verlauf der Aufarbeitung der Kultivierungsproben zur Isolierung bzw. Reinigung des Zielproteins werden die Proben zwangsläufig stark verdünnt. Nach der Entsalzung über Dialyse oder Gelfiltration war daher eine Aufkonzentrierung nötig. Dazu wurden die verdünnten, wässrigen Proben im  $-80^{\circ}\text{C}$ -Schrank (Firma Colora, UF80-450S) tiefgefroren und anschließend in einer Lyophilisationsapparatur (Firma Biometra, GeneVac SF50) durch Sublimation im Hochvakuum gefriergetrocknet. Bei kleinen Probenmengen wurden dafür Eppendorf-Reaktionsgefäße mit durchbohrten Deckeln benutzt, bei größeren Probenmengen wurden Kunststoff-Zentrifugengefäße mit durchbohrten Deckeln verwendet.

Die Lyophilisationsapparatur besteht aus einem Zentrifugen-Teil und einer leistungsstarken Vakuumpumpe. Der Rotor der Zentrifuge ist mit einer abnehmbaren durchsichtigen Haube aus dickwandigem Kunststoff luftdicht verschlossen. Die Vakuumpumpe ist über einen verstärkten Schlauch, der sich mit einem einfachen Hahn öffnen und schließen läßt, mit der Zentrifugeneinheit verbunden. Ein Manometer zeigt den in der Apparatur herrschenden Druck und damit die Qualität des Vakuums an. Proben in Eppendorf-Reaktionsgefäßen von 2 mL Volumen wurden ca. 5 Stunden bis zur Trockne lyophilisiert, größere Volumina über Nacht.

### 3.9 Produktanalytik

#### 3.9.1 Gel-Elektrophorese

Die SDS-PAGE-Gelelektrophorese (PAGE = **P**oly**a**crylamid-**G**elelektrophorese) ist eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Durch die Vorbehandlung der Proteinmischung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert. SDS bindet an die hydrophoben Regionen des Proteins. Dies ist mit einer strukturellen Änderung der Proteinmoleküle (die Faltung geht teilweise oder ganz verloren), sowie der Einbringung einer starken negativen Ladung verbunden. Diese überdeckt alle normalerweise vorhandenen Ladungen, so daß nur noch die unterschiedlichen Molekulargewichte die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel beeinflussen. Größere Moleküle wandern weniger weit im Acrylamidgel als kleinere. Gibt man Mischungen von Proteinen mit genau bekannten Molekulargewichten gleichzeitig mit den aufzutrennenden unbekannt Proteinen auf das Gel kann man anhand der Lage der Banden des „Standards“ den anderen Proteinbanden Molekülmassen zuordnen.

Alle SDS-Gele wurden mit dem Phast System™ der Firma Pharmacia bearbeitet. Die Phast-Gel-Apparatur besteht aus einer Trennkammer und einer Entwicklungskammer. Die Programmierung der Lauf-Parameter (Temperatur, Spannungsverlauf, zeitliche Abfolgen und Dauer verschiedener Programmschritte usw.) für beide Kammern erfolgt über eine zentrale Tastatur und ein einfaches Display. In der Trennkammer können gleichzeitig zwei vorgefertigte Gele eingelegt werden. Die Trennkammer besitzt ein Kühlsystem, das eine konstante Temperatur während des Trennlaufs gewährleistet. Das Kühlbett wird mit jeweils 70 µL n-Dodecan beschichtet bevor das Gel blasenfrei aufgelegt wird. Auf das genau positionierte Gel wird eine spezielle Abdeckplatte gelegt, die Aufnahmefächer für zwei vorgefertigte Pufferstreifen pro Gel hat. Über Platinelektroden die auf den Pufferstreifen aufliegen wird der Stromkreislauf geschlossen.

Wenn der Trennlauf beendet ist, werden die Pufferstreifen entfernt, die Gele in die Entwicklungskammer gegeben und das Entwicklungsprogramm gestartet. Im Deckel der Entwicklungskammer befindet sich ein rotierendes Halterungssystem, das zwei Gele sicher aufnehmen kann. Die lichtdicht abgeschlossene Entwicklungskammer wird dem Programm entsprechend nacheinander mit verschiedenen Lösungen geflutet (Wasch-, Fixier-, Silbernitrat-, Entwicklungs-, Reduzier- und Stopplösung). Anschließend können die fertig entwickelten SDS-PAGE-Gele entnommen und dokumentiert werden.

Es wurden vorgefertigte homogene Polyacrylamidgele (20%) der Firma Pharmacia verwendet, die mit Silbernitrat gefärbt wurden. Als Standard wurde mindestens eine, meist

zwei Bahnen des Gels mit dem Low-Weight-Standard der Firma Sigma belegt. Dabei handelt es sich um eine genau definierte Mischung von 8 Proteinen mit Molekülmassen zwischen 6,5 und 66 kDa: Aprotinin (6,5 kDa),  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa), Trypsin Inhibitor (20 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Carbo Anhydrase (29 kDa), Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (36 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Albumin (66 kDa).

### 3.9.2 Kapillarelektrophorese (CE)

Bei der Kapillarelektrophorese wird eine (z. B. proteinhaltige) Probe in einer Quarzglas- kapillare, die gleichmäßig mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist, bei Anlegen einer Hochspannung in ihre verschiedenen Bestandteile getrennt. Das Trennprinzip beruht auf der Kombination der elektrophoretischen Wanderung geladener Teilchen und des elektroosmotischen Flusses der Elektrolytlösung. Negativ geladene Teilchen wandern aufgrund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit zur Anode. Der elektroosmotische Fluß ist auf den Fluß des Gesamtelektrolyten zurückzuführen, der durch die geladene Kapillarinne wand und die angelegte Spannung verursacht wird. Bei Elektrolytlösungen, deren pH-Wert oberhalb von 1,5 liegt, werden die Silanolgruppen der Kapillarinne wand negativ geladen. Dies wird durch Gegenionen aus der Elektrolytlösung wieder ausgeglichen, es verbleibt aber in der Elektrolytlösung ein kleiner Überschuß an positiven Ladungen, die zur Kathode wandern. Aufgrund dessen bewegt sich der elektroosmotische Fluß in Richtung Kathode. Der elektroosmotische Fluß ist meist stärker als die elektrophoretische Beweglichkeit negativer Teilchen in die entgegengesetzte Richtung. Daher wandern alle Analyte zur Kathode, wobei die positiv geladenen Moleküle diese eher erreichen als die neutralen und negativ geladenen. Ist ein UV-Detektor vor der Kathode installiert, so können die Analyten, die das Detektorfenster auf ihrem Weg zur Kathode passieren, in der Reihenfolge ihrer Auftrennung gemäß der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeiten detektiert werden. Als Elektrophoresesystem wurde das P/ACE™ MDQ (Fa. Beckmann) verwendet. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit der P/ACE System MDQ Software (Fa. Beckmann). Die Detektionswellenlänge betrug 214 nm. Zur Trennung wurde eine 57 cm lange unbeschichtete „fused silica“ Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50  $\mu$ m (Typ TSP 075350, Optronis) verwendet. Die Aufnahmefrequenz der Elektropherogramme betrug 4 Hz.

### 3.9.3 Massenspektrometrie

#### 3.9.3.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onisation – **T**ime of **F**light) werden die Analyten zusammen mit einem Überschuss an Matrixsubstanz (meist Säuren wie  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure, die ihr Absorptionsmaximum bei der verwendeten Laserwellenlänge von 337 nm haben) auf einem Probenträger kristallisiert. Nach Laserbeschuss übertragen die erzeugten Matrixionen ihre Ladung auf die Analytmoleküle. Die so entstandenen Analytionen werden im Hochspannungsfeld beschleunigt und treten in die evakuierte Flugröhre ein. Nach der Detektion wird über die Flugzeitdauer der Masse/ Ladungsquotient ( $m/z$ ) der Ionen berechnet. Daraus lässt sich das exakte Molekulargewicht des Analyten bestimmen.

Für die MALDI-Messungen wurde ein Voyager-DE STR der Fa. Applied Biosystems verwendet. Es wurde im Linear-Modus gemessen.

Als Matrixsubstanz wurde eine gesättigte Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CHC) und Fucose (1:1) verwendet. Jeweils 0,5  $\mu$ L Matrix und 0,5  $\mu$ L Probe wurden auf den Probenträger pipettiert, vermischt und getrocknet.

#### 3.9.3.2 ESI-Massenspektrometrie

Bei der ESI-Massenspektrometrie findet die Ionisierung des Analyten aus flüssiger Phase heraus statt. Der Analyt wird dazu mit einer säurehaltigen Lösung aufgenommen (z. B. 0,1% Ameisensäure oder 0,1% TFA (v/v)). Aus einer Kapillare (z. B. einer HPLC-Säule) heraus werden Tröpfchen der Analytlösung als Aerosol in die Ionisationskammer gesprüht (Vernebelung). Die Tröpfchen sind aufgrund einer zwischen Kapillare und dem Eingang zum Analysator des Massenspektrometers angelegten Hochspannung positiv oder negativ geladen, je nachdem ob die Kapillare den negativen oder positiven Pol des Feldes bildet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels und Desolvatisierung verbleiben einfach oder mehrfach positiv oder negativ geladene Quasi-Molekülonen, die in den Analysator des Massenspektrometers gelangen.

Auch bei dieser Methode werden die Signale der Analyten mit ihrem Masse/ Ladungsquotient ( $m/z$ ) dargestellt. Bei der ESI-Massenspektrometrie treten neben den einfach geladenen Molekülonen auch mehrfach bzw. vielfach geladene Spezies auf. Dadurch ist es möglich auch größere Peptide und Proteine zu detektieren. Bei hochmolekularen Substanzen

werden Ladungen von  $n = 20$  und höher beobachtet. Dies führt zu komplizierten Spektren im Bereich des Molekülions (M), dem Molmasse-Cluster.

Die Berechnung der relativen Molekülmasse aus dem Cluster bezeichnet man als Dekonvolution. Sie wird meist durch EDV für möglichst viele benachbarte Signale eines Molmasse-Clusters durchgeführt und ergibt einen Mittelwert für die Molekülmasse mit einer Präzision bei 0,01 %.

Kennt man den Ladungszustand  $n_1$  des zu einem Signal gehörenden Quasi-Molekülions, so berechnet sich die relative Masse des Molekülions (M) zu:

$$M = n_1 [(m/z) - 1]$$

mit: M = Masse des Molekülions

$n_1$  = Ladungszahl des Ions 1

(m/z) = Signal des Quasi-Molekülions

Es wurde mit dem ESI Q-Star der Fa. Applied Biosystems gearbeitet. 5  $\mu$ L Probe direkt aus der HPLC-Fraktion wurden lyophilisiert und mit 10  $\mu$ L Puffer (50 % Methanol, 1 % Ameisensäure) wieder aufgenommen. Als Detektor diente ein Time-of-Flight-Massenspektrometer. Es wurde im Positiv-Modus gemessen.

---

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Schüttelkolbenexperimente

Für die Anzucht des verwendeten Bakterienstammes im Labormaßstab existieren einfache Arbeitsprotokolle [Qiagen, 2000], aus denen die folgenden Grundparameter für die ersten Versuche übernommen wurden: Temperatur 37°C, Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/mL, Kanamycin in einer Konzentration von 25 µg/mL, Schüttelgeschwindigkeit maximal 300 RPM, Induktion mit IPTG nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7. Außerdem schlagen die Arbeitsprotokolle drei verschiedene LB-Medien vor, von denen man das geeignetste durch Wachstumsversuche ermitteln soll.

In Schüttelkolbenversuchen wurden zunächst mehrere Nährmedien auf ihre Eignung getestet. Es wurde das Wachstumsverhalten der Bakterien bei verschiedenen Temperaturen und Schüttelgeschwindigkeiten, sowie der Einfluß von Antischaummitteln (ASM) untersucht. Außerdem wurde versucht die optimale IPTG-Konzentration und den Zeitpunkt für die Induktion der Proteinexpression und die notwendige Einwirkdauer des IPTG zu ermitteln. Die Ergebnisse aus den Schüttelkolbenversuchen sollten als Grundlagen für das Upscaling auf den 2-L-Maßstab in den Bioreaktorkultivierungen dienen. Da sich nach den ersten Bioreaktorkultivierungen zeigte, daß die Verwendung eines Temperaturprofils bei der Induktion eventuell eine höhere Produktivität bewirken könnte, wurden später noch Schüttelkolbenversuche zu diesem Thema durchgeführt, die aber der Übersicht halber auch in diesem Kapitel aufgeführt werden.



#### 4.1.1 Wachstumsverhalten in verschiedenen Nährmedien

In vier Schüttelkolben von 100 mL Volumen wurden jeweils 30 mL LB-, 2YT-, Super-LB- und HDF-Medium vorgelegt. Die Kolben wurden mit je 200  $\mu$ L aus derselben Vorkultur angeimpft und bei 37°C mit 130 RPM geschüttelt (Schüttelschrank Firma B. Braun Biotech, Certomat S II mit Haube Certomat HK). Da noch keine Erfahrungswerte über die Dauer der Kultivierung vorlagen, wurde das Wachstumsverhalten sehr lange (ca. 26 Stunden) durch Biotrockenmassebestimmung (BTM) verfolgt. Abbildung 9 zeigt eine deutliche Abfolge: In Super-LB-Medium ist mit 3,5 g/L das beste Wachstum festzustellen, in 2YT- (2,1 g/L) und LB-Medium (1,2 g/L) ist das Wachstum mäßig, in HDF-Medium (0,2 g/L) ist unter den gewählten Bedingungen fast überhaupt kein Wachstum der Bakterien erfolgt. Erstaunlicherweise kam es in allen vier Kulturen zwischen der vorletzten und der letzten Probenahme noch einmal zu einem Anstieg der Biotrockenmasse. Die Nährmedien enthielten zwar alle jeweils zwei Antibiotika (Ampicillin und Kanamycin), es ist aber trotzdem nicht auszuschließen, daß es nach der langen Kultivierungszeit zu einer Kontamination gekommen ist.

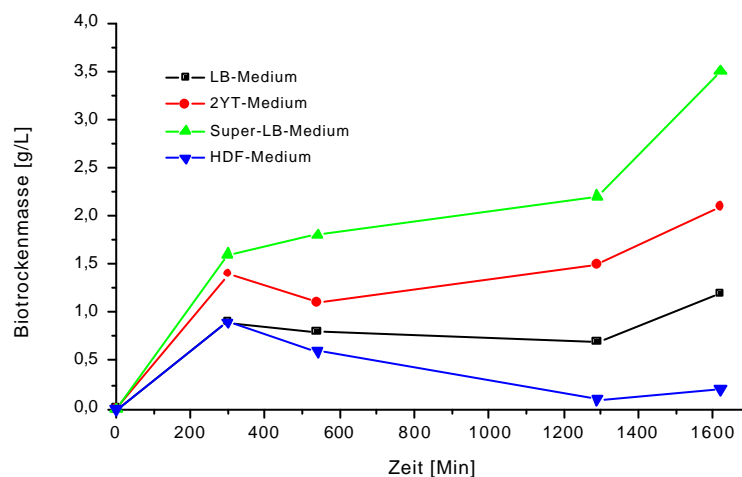


Abb. 9: Langzeitversuch, Wachstumsverhalten in 4 verschiedenen Nährmedien (Schüttelkolben)

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, findet die exponentielle Wachstumsphase innerhalb der ersten fünf Stunden der Fermentation statt. Wegen der zu geringen Zahl der Probenahmen im Langzeitversuch sind die Phasen des Zellwachstums aber nicht genau zuzuordnen. Der Versuch wurde deshalb später mit einer wesentlich verkürzten Laufzeit und viel mehr Probenahmen an den drei verschiedenen LB-Medien wiederholt. Zum Vergleich des Wachstumsverhalten der Bakterien in LB-, 2YT-, Super-LB-Medium wurden drei Schüttelkolben von 500 mL Volumen (4 Schikanen) mit jeweils 100 mL der drei Nährmedien befüllt und mit je-

weils 250  $\mu\text{L}$  aus derselben Vorkultur angeimpft. Es wurde bei 37°C mit 130 RPM geschüttelt.

Die Werte der optischen Dichte und der Biotrockenmasse ergaben wiederum deutliche Wachstumsunterschiede für die jeweiligen Medien, wie in Abbildung 10a und 10b zu sehen ist.

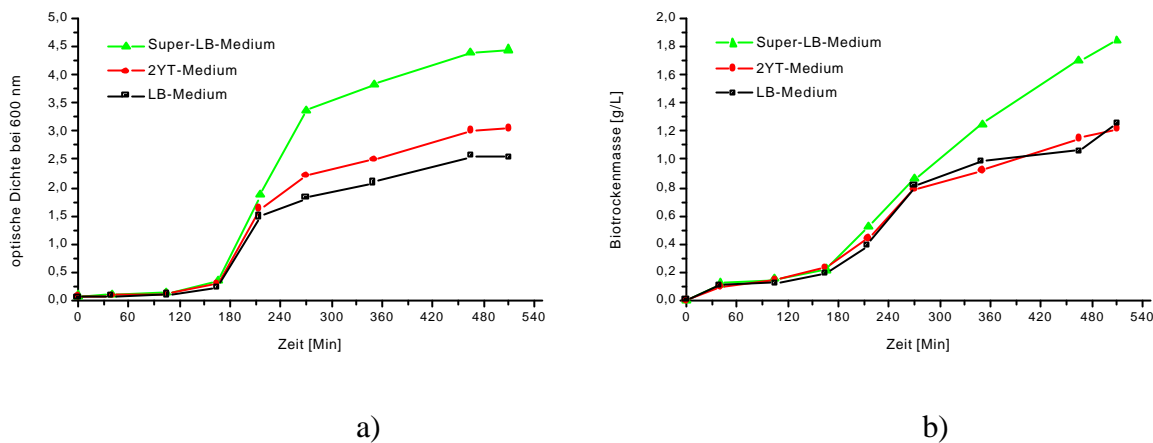


Abb. 10: Vergleich des Wachstumsverhaltens in LB-, 2YT-, Super-LB-Nährmedium (a: anhand der optischen Dichte; b: anhand der Biotrockenmasse)

Wie schon im Langzeitversuch mit vier verschiedenen Medien (s. Abb. 9) zeigt sich hier deutlich, daß Super-LB-Medium den Zellen ein besseres Wachstum ermöglicht als 2YT- und LB-Medium. In allen weiteren Schüttelkolbenversuchen – ausgenommen die weiteren Versuche zum Wachstumsverhalten in modifizierten HDF-Medien - wurde deshalb mit Super-LB-Medium als Nährmedium gearbeitet.

Da es sich bei LB-, 2YT- und Super-LB-Medium um komplexe Medien handelt, die Trypton und Hefeextrakt mit nicht genau bestimmbarer bzw. von Charge zu Charge unterschiedlicher Zusammensetzung enthalten, könnten bei Verwendung dieser Medien in den späteren Aufarbeitungsschritten Probleme entstehen. HDF-Medium dagegen ist ein definiertes Minimalmedium, das für Hochzelldichtekultivierungen von Bakterien entwickelt wurde [Riesenberg, 1990]. Minimalmedien sind hinsichtlich einer leichteren Aufarbeitung den komplexen Medien vorzuziehen (s. Theoretische Grundlagen, 2.2). In den Vorversuchen zeigte sich nur sehr schlechtes Wachstum der Bakterien in HDF-Medium (s. Abb. 9), deshalb wurde versucht durch Änderung des Glucosegehalts ein besseres Wachstumsverhalten zu erreichen.

#### 4.1.2 Wachstum in HDF-Nährmedien mit unterschiedlichen Glucosegehalten

Es wurden drei HDF-Medien mit folgenden Glucosegehalten getestet: 3 g/L, 5 g/L und 12 g/L.

Drei Schüttelkolben von 100 mL Volumen (4 Schikanen) wurden jeweils mit 30 mL der verschiedenen HDF-Medien befüllt. Die Kolben wurden mit jeweils 500  $\mu$ L aus derselben Vorkultur angeimpft und bei 37°C mit 130 RPM geschüttelt (Schüttelschrank Firma B. Braun Biotech, Certomat S II mit Haube Certomat HK). Da sich in den Vorversuchen gezeigt hatte, daß nach ca. 5 bis 7 Stunden (abhängig vom Animpftiter) die stationäre Phase erreicht wird, wurde das Wachstumsverhalten jetzt über ca. 8 Stunden durch Messung der optischen Dichte und Bestimmung der Biotrockenmasse verfolgt.

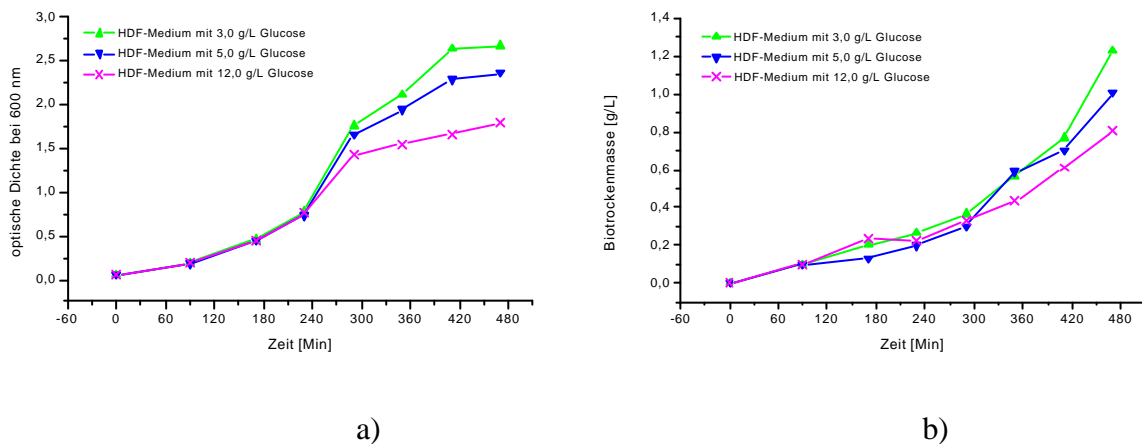


Abb. 11: Wachstumsverhalten in fünf HDF-Nährmedien mit unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen (a: anhand der optischen Dichte; b: anhand der Biotrockenmasse)

In allen drei HDF-Medien zeigten die Wachstumskurven den typischen Verlauf einer Batch-Kultivierung (s. 3.2). In Abbildung 11 ist zu erkennen, daß nach einer langen Adaption- und Akzelerationsphase von ca. 230 Minuten (ca. 4 Stunden) die exponentielle Phase beginnt, die bei allen drei Kulturen ca. 1 Stunde dauert. Danach (etwa ab der 300. Minute) geht die Kultur im Medium mit 12 g/L Glucose fast übergangslos in die stationäre Phase über und erreicht am Ende der Kultivierung nach ca. 8 Stunden eine optische Dichte von ca. 1,8 und eine Biotrockenmasse von ca. 0,8 g/L. Die Kulturen in den Medien mit 3 g/L und 5 g/L Glucose dagegen wachsen, obwohl deutlich weniger Nährstoffe vorliegen, auch nach der exponentiellen Phase noch deutlich weiter und gehen erst zwei Stunden später in eine stationäre Phase über. Durch das bessere Wachstum erreichen sie auch höhere OD-Werte und Biotrockenmassen: Die Kultur im 5 g/L Glucose-Medium hat nach 8 Stunden Kultivierungszeit eine optische Dichte von 2,36 und eine BTM von 1 g/L. Das beste Wachstum in diesem vergleichenden Experi-

ment zeigte die Bakterienkultur im Medium mit 3 g/L Glucose. Der OD-Wert lag bei 2,67 die BTM nach 8 Stunden erreichte 1,2 g/L.

Das Wachstumsverhalten in HDF-Medium war also widersprüchlich: Die zugegebene Glucose stellte die einzige C-Quelle des Mediums dar, so daß zu erwarten gewesen wäre, daß mit steigendem Glucosegehalt auch die erzeugte Biomasse zunimmt. Ein Grund hierfür konnte nicht gefunden werden.

Aus dem gezeigten Versuch und weiteren Schüttelkolbenexperimenten in HDF-Medium mit 3 g/L Glucose bzw. 5 g/L Glucose, auf die hier aber nicht mehr weiter eingegangen werden soll, war erkennbar, daß selbst die besten mit HDF-Medien erreichten Biomassen noch deutlich unter den mit LB-Medien erreichten lagen. Eine weitere Medienoptimierung hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt, deshalb wurde nur noch mit den verschiedenen LB-Medien weitergearbeitet, die zudem den Vorteil aufweisen, daß sie aus nur wenigen verschiedenen Komponenten bestehen und daher mit weniger Aufwand herzustellen sind als das HDF-Medium.

#### 4.1.3 Temperaturversuche

Als mesophiler Mikroorganismus sind die sogenannten Kardinal-Temperaturen für *E. coli*: Minimum 8°C (unterhalb dieser Temperatur kein Wachstum möglich), Optimum 39°C (in nährstoffreichem Medium) und Maximum 48°C (oberhalb dieser Temperatur kein Wachstum möglich) [Brock, 1996]. Da für den verwendeten *Escherichia coli*-Stamm eine Kultivierungstemperatur von 37°C empfohlen war [Qiagen, 2000] wurden keine Versuche mit Temperaturen oberhalb 37°C durchgeführt. Es sollte geklärt werden welche Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen ein Absinken der Temperatur hat bzw. ob sich die Bakterien auch bei tieferen Temperaturen (gleichbedeutend mit einer wirtschaftlich interessanten Energieeinsparung) zu ausreichenden Zelldichten kultivieren lassen. Dazu wurden insgesamt sechs Schüttelkolben von 500 mL Volumen (4 Schikanen) mit jeweils 100 mL Super-LB-Nährmedium befüllt und mit jeweils 1,0 mL aus derselben Vorkultur angeimpft. An drei baugleichen Schüttlern (Schüttelschrank Firma B. Braun Biotech, Certomat S II mit Haube Certomat HK) wurden Temperaturen von 37, 32 und 28°C eingestellt und je zwei Kolben pro Schüttler mit 130 RPM geschüttelt.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, zeigte sich 37°C erwartungsgemäß als die Temperatur bei der die Mikroorganismen am besten wachsen. Aber auch bei 32°C wurden noch relativ hohe Zelldichten erreicht. Die bei 28°C kultivierten Bakterien zeigten dagegen ein stark g-

bremstes Wachstum. Eine exponentielle Phase war nicht erkennbar und mit einer OD von nur ca. 2,5 wird nicht einmal die Hälfte des Wertes der 37°C-Kultivierung erreicht. Ein kurzfristiges Absinken der Temperatur während einer Kultivierung hat also kein Absterben oder eine ernsthafte Schädigung der Zellen zur Folge. Allerdings verzögert es das Wachstum teilweise erheblich.

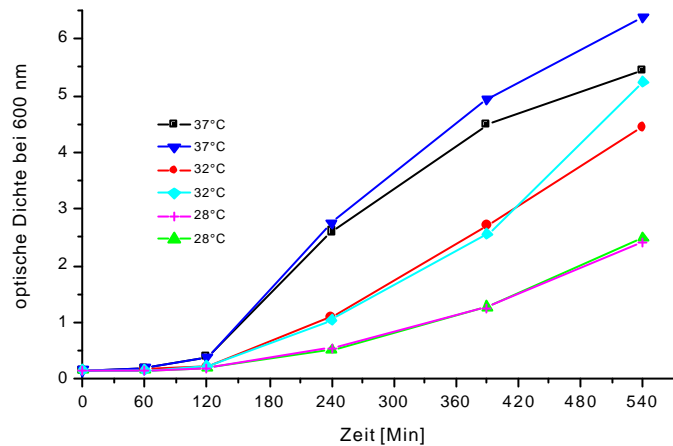


Abb. 12: Vergleich des Wachstumsverhaltens bei 28, 32, 37°C in Super-LB-Nährmedium

#### 4.1.4 Versuche zur Effizienz und Toxizität verschiedener Antischaummittel

Bei hohen Schüttelgeschwindigkeiten kommt es vor allem in den komplexen Nährmedien zu starker Schaumentwicklung, die entweder von Mediumsbestandteilen oder von Proteinen, die bei der Lyse der Mikroorganismen ins Medium abgegeben werden, verursacht wird. In Vorversuchen wurde beobachtet, daß eine Schaumbildung immer mit schlechtem Wachstum der Bakterien und daher geringer Biomassebildung einherging. Daher wurden Schüttelgeschwindigkeiten von 100 bis maximal 130 RPM gewählt bei denen das Problem nicht mehr auftrat. Andere Möglichkeiten die Schaumbildung zu vermeiden bzw. zu verhindern oder auf ein nicht-schädliches Maß zu verringern wäre der Einsatz von Antischaummitteln oder die Anwendung mechanischer Vorrichtungen zur Zerstörung entstandenen Schaums. Da mechanische Hilfen weder im Schüttelkolben- noch im 2L-Bioreaktormaßstab sinnvoll erschienen, wurde im Schüttelkolbenmaßstab die Wirkung verschiedener Antischaummittel auf die Mikroorganismen getestet.

Da nicht abzuschätzen war ob sich das Antischaummittel in der späteren Produktaufreinigung störend auswirken würde, sollte die geringstmögliche Menge zum Einsatz kommen, die aber noch eine effiziente Unterdrückung der Schaumbildung gewährleistet.

Es wurden die Antischaummittel ASM 289 (Fa. Sigma) und Desmophen 3900 (Fa. Bayer) getestet. In insgesamt sieben Schüttelkolben von 300 mL Volumen (4 Schikanen) wurden jeweils 80 mL Super-LB-Nährmedium vorgelegt. Sechs Kolben wurden mit sterilem Antischaummittel in verschiedenen Konzentrationen versetzt: Desmophen 3900 wurde in den Konzentrationen 50, 60, 80, 100  $\mu\text{L/L}$  eingesetzt, ASM 289 in den Konzentrationen 50  $\mu\text{L/L}$  und 100  $\mu\text{L/L}$ . Ein Kolben ohne Antischaummittel diente als Referenz.

Die Kolben wurden mit jeweils 1,0 mL aus derselben Vorkultur angeimpft. Die Anfangsschüttelgeschwindigkeit war 150 RPM, nach ca. zwei Stunden wurde die Geschwindigkeit dann auf 170 RPM gesteigert um absichtlich Schaum zu erzeugen und die Wirksamkeit bezüglich der Schaumunterdrückung feststellen zu können. Die Referenzkultivierung hatte bereits in der Anfangsphase bei 150 RPM Schaum gebildet, der sich nach der Erhöhung auf 170 RPM noch verdichtete. In beiden Kolben mit ASM-289-haltigem Medium war keinerlei Schaumbildung festzustellen, in den vier Kolben mit Desmophen 3900 war nur bei der niedrigsten Desmophen-Konzentration (50  $\mu\text{L/L}$ ) am Ende der Kultivierung eine geringe Schaumbildung aufgetreten.

Wie in Abbildung 13 gezeigt wird, erreicht die Referenzkultivierung ohne Antischaummittel nach 6,5 Stunden eine mittelmäßige optische Dichte von ca. 3,0. Eine bis auf die Schüttelgeschwindigkeit vergleichbare Kultivierung (z. B. in Abb. 12 die 37°C-Kultivierung) sollte höhere OD-Werte von 4 bis 5 erreichen. Auffällig ist auch, daß der Wachstumsverlauf bei allen Kultivierung etwas in die Länge gezogen ist. Vor allem während der exponentiellen Phase kommt es nur zu einem mäßigen Anstieg der optischen Dichte und der Biomasse.

Die beiden verschiedenen Antischaummittel zeigten deutlich unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Zellen: Desmophen 3900 hatte in allen vier getesteten Konzentrationen leicht positive Auswirkungen auf das Zellwachstum. Die Verläufe der Kurven entsprechen zwar dem Verlauf der Referenzkultur ohne Antischaummittel und zeigen ebenfalls nur eine mäßig steile Steigung in der exponentiellen Phase, insgesamt werden aber unter den gewählten Bedingungen mit Desmophen 3900 höhere optische Dichten erreicht als ohne Antischaummittel.

Das zweite Antischaummittel (ASM 289) dagegen hatte in beiden Konzentrationen (50  $\mu\text{L/L}$  und 100  $\mu\text{L/L}$ ) negative Auswirkungen. Die optische Dichte der Kultivierung mit 50  $\mu\text{L/L}$  ASM 289 erreichte mit ca. 2,3 einen deutlich schlechteren Wert als die Referenzkultivierung, die Kultivierung mit 100  $\mu\text{L/L}$  ASM 289 wuchs sogar nur bis zu einer optischen Dichte von 1,3.

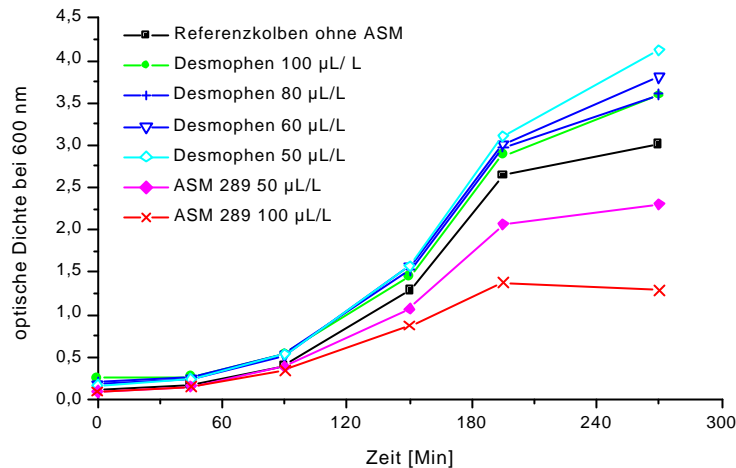


Abb. 13: Wachstumskurve anhand der optischen Dichte für Schüttelkolben mit Antischaummitteln in verschiedenen Konzentrationen

Es wurde deshalb geschlossen, daß ASM 289 eine zu stark toxische Wirkung auf die Bakterien, hatte um es als Antischaummittel für die weiteren Kultivierungen einsetzen zu können.

Von den getesteten vier Desmophenkonzentrationen war 60 µL/L die optimale Konzentration. Mit 50 µL/L wurde zwar eine etwas höhere optische Dichte erreicht, aber es zeigte sich trotzdem leichte Schaumbildung. Im Gegensatz dazu unterdrückte die Zugabe von 60 µL/L Desmophen 3900 die Schaumbildung unter den getesteten Bedingungen vollständig.

Da es bei den Experimenten in Schüttelkolben unter den normalerweise gewählten Bedingungen (Schüttelgeschwindigkeit maximal 130 RPM) nicht zur Schaumbildung kam, fand das Antischaummittel in den weiteren Vorversuchen keine Anwendung mehr. Die ermittelten Zusammenhänge wurden aber beim späteren Upscaling in den Bioreaktormaßstab berücksichtigt. In den Bioreaktorkultivierungen wurde stets mit Desmophen 3900 zur Schaumunterdrückung gearbeitet. Aufgrund des größeren Arbeitsvolumens und der nicht mit dem Schütteln vergleichbaren, viel stärkeren Durchmischung mittels Scheibenrührer, mußten dort aber höhere ASM-Konzentrationen eingesetzt werden.

#### **4.1.5 Einfluß der Induktion mit IPTG**

Um die Endostatinproduktion zu starten ist eine Induktion der Proteinexpression mit Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) notwendig. Als Zeitpunkt für diese Induktion schlägt das Arbeitsprotokoll [Qiagen, 2000] das Erreichen einer optischen Dichte von 0,5-0,7 vor. Dies entspricht unter den normalerweise gewählten Kultivierungsbedingungen ungefähr dem Anfang der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterienkultur. In dieser Phase kann man davon ausgehen, einen sehr hohen Anteil gesunder, vitaler und produktiver Zellen vorliegen zu haben. Allerdings ist die Zelldichte zu diesem Zeitpunkt noch relativ niedrig.

Es galten also folgende Fragestellungen zu klären:

- 1) Wann ist der optimale Zeitpunkt zur Induktion?
- 2) Welche IPTG-Konzentration ist am günstigsten?
- 3) Wann ist der optimale Erntezeitpunkt?

Als geeignetste Methode zur relativ schnellen, kostengünstigen und verlässlichen Beurteilung der in großen Mengen angefallenen Proben aus den verschiedensten Kultivierungsversuchen hat sich die SDS-PAGE-Gelelektrophorese herausgestellt. Es ging in den Schüttelkolbenversuchen noch nicht um eine Produktion von Endostatin in größerem Maßstab, sondern eher darum, Tendenzen in der Änderung der Produktivität durch Modifikation verschiedener Kultivierungsparameter zu erkennen. Die meisten Ergebnisse in diesem Kapitel beruhen daher auf qualitativer Beurteilung der aus unbehandelten oder aufkonzentrierten Zellysaten erhaltenen Banden auf SDS-PAGE-Gelen. Dies wird anhand einiger gezeigter Beispiele verdeutlicht.

##### **4.1.5.1 Erntezeitpunkt nach der Induktion**

Nach der Zugabe von IPTG müssen im Metabolismus der Bakterienzellen einige Umstellungen geschehen, damit es statt zum normalen Wachstum und Reproduktion zur Produktion des „zellfremden“ Proteins kommt. Die für diese Umstellung benötigte Zeitspanne und die Geschwindigkeit der anschließenden Proteinproduktion sind nicht bekannt. Unter der vereinfachenden Annahme, daß die einmal begonnene Proteinproduktion kontinuierlich weiterläuft und das Produkt intrazellulär angereichert wird, müßte sich eine zeitliche Abhängigkeit für den Anstieg der Endostatin-Konzentration nach der Induktion bestimmen lassen. Da aber sicherlich auch mit unerwünschten Effekten zu rechnen ist (z. B. ein Abbau des Proteins durch Enzyme, Störung des Zellmetabolismus durch das fremde Protein und dadurch Vergiftung und Absterben, vermehrte Fehler beim Ablesen der DNA-Sequenzen, die zu Fehlern im Pro-



dukt führen usw.), die nach einer bestimmten Zeit zur Abnahme der Menge oder der Qualität des zu erntenden Endostatins führen, sollte es einen optimalen Erntezeitpunkt geben.

Um diesen zu finden wurden Versuche durchgeführt bei denen jeweils in einstündigen Abständen nach der Induktion Offline-Proben genommen wurden, die dann im Mini-Batch-Maßstab sowohl unter denaturierenden, als auch unter nativen Bedingungen aufgearbeitet wurden (s. 3.8.2 und 3.8.3). Dabei wurde deutlich, daß sich unter nativen Bedingungen in keiner Probe Endostatin nachweisen ließ. Auch in späteren Versuchen wurde unter nativen Bedingungen nie Endostatin gefunden, in denselben Proben, die denaturierend bearbeitet wurden, ließ sich aber Endostatin nachweisen.

Die Gründe dafür könnten sein:

- Der native Zellaufschluß könnte versagt haben.
- Das Protein ist eventuell unter nativen Bedingungen nicht löslich bzw. liegt in Einschlußkörpern (Inclusion Bodies) vor.

Die Wirksamkeit des Zellaufschlusses wurde mikroskopisch überprüft. Nach dem Aufschluß mit Ultraschall unter nativen Bedingungen wurde eine Probe unter dem Mikroskop betrachtet und mit Trypanblau (0,4%ige Lösung) angefärbt. Es waren keine intakten Zellen mit normaler Zellmorphologie zu finden. Alle noch vorhandenen Zellen und Zelltrümmer ließen sich anfärben. Da Trypanblau intakte Zellmembranen nicht passieren kann und nur tote und beschädigte Zellen tiefblau färbt, war damit bewiesen, daß die Zellmembranen durch das Aufschlußverfahren zuverlässig zerstört werden. Außerdem wurde eine Probe sofort nach dem Ultraschallaufschluß auf Agarplatten ausplattiert, es kam aber zu keinerlei Koloniewachstum.

Ob die Bakterien Einschlußkörper gebildet hatten, die sich unter nativen Bedingungen nicht lösen ließen, konnte nicht überprüft werden, da diese Strukturen für das zur Verfügung stehende Mikroskop auch bei höchster Vergrößerung zu klein sind um Einzelheiten erkennen zu können. Zur sicheren Erkennung wären Elektronenmikroskopaufnahmen von Dünnschnitten notwendig gewesen. Es wurde später nur unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. In insgesamt fünf Schüttelkolben von 300 mL Volumen (4 Schikanen) wurden jeweils 80 mL Super-LB-Nährmedium vorgelegt. Die Kolben wurden mit jeweils 500 µL aus derselben Vorkultur angeimpft und bei 37°C mit 130 RPM geschüttelt. Nachdem eine optische Dichte von ca. 0,4 erreicht war, wurde jeder Kolben über einen Sterilfilter mit 1 mM IPTG versetzt. In Abständen von 60 Minuten wurden die Kultivierungen abgebrochen und der komplette Kolbeninhalt geerntet. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet von je 40 mL Zellsuspension unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Das nicht weiter behandelte Lysat wurde mittels

SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt und qualitativ nach der Erkennbarkeit der markanten Endostatin-Bande im Bereich von 20 kDa (s. z. B. Abb. 15) beurteilt.

Die Proben aus diesem Versuch zum zeitlichen Verlauf der Expression zeigten alle in den ersten drei Stunden nach der Induktion überhaupt keine Endostatinproduktion. In einigen Fällen war bereits nach der vierten Stunde Endostatin nachweisbar, aber erst ab der fünften Stunde nach der Induktion mit IPTG lag es in ausreichender Menge vor, um eine deutliche Bande auf dem SDS-PAGE-Gel zu ergeben (s. Tabelle 3.).

Tabelle 3: Zeitlicher Verlauf der Endostatinproduktion im Schüttelkolben

OD <sub>600</sub> zur Zeit der Induktion mit IPTG (1 mM)	Erkennbarkeit der Endostatin-Bande auf den SDS-PAGE-Gelen					
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
0,39	nein	nein	nein	nein	schwach	deutlich
0,41	nein	nein	nein	nein	deutlich	deutlich
0,42	nein	nein	nein	schwach	deutlich	deutlich
0,46	nein	nein	nein	schwach	deutlich	deutlich
0,55	nein	nein	nein	schwach	deutlich	deutlich

Als Ergebnis dieses Experiments wurde in späteren Versuchen frühestens vier bis fünf Stunden nach der Induktion geerntet.

#### 4.1.5.2 Zeitpunkt der Induktion

Der Zeitpunkt der Induktion mit IPTG wurde stets nach den gemessenen OD-Werten ausgerichtet, da diese am schnellsten eine Aussage zur Zelldichte und zum Zustand der Bakterienkultur erlauben. Es wurden Induktionszeitpunkte zwischen OD 0,4 und 2,9 getestet und anhand von SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach denaturierender Lyse der Zellen qualitativ beurteilt. Dabei zeigte sich, daß in Kultivierungen bei denen bei OD-Werten  $> 1,0$  induziert wurde, nur sehr wenig bzw. kein Endostatin nachweisbar war (siehe Tabelle 4). Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Versuche nicht im einzelnen beschrieben, sondern nur die Ergebnisse tabellarisch dargestellt. In Kapitel 4.1.6, Abb. 18 und 19 wird (unter dem Gesichtspunkt der Proteinisolierung) eine Probe aus dieser Versuchsreihe (Induktions-OD 0,56) genauer vorgestellt.

Alle Versuche wurden unter vergleichbaren Bedingungen (Super-LB-Medium, 4-Schikanenkolben, 100 mL Füllhöhe, 37°C, 120 RPM) durchgeführt. Die Ernte des jeweils kompletten Kolbeninhalts erfolgte fünf Stunden nach der Induktion. Die für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese verwendeten Lysate stammten jeweils von den Pellets von 40 mL geernteter Zellsuspension und wurden nicht weiter aufkonzentriert.

Tabelle 4: Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung des optimalen Induktionszeitpunkt (anhand der OD-Werte)

OD <sub>600</sub> zur Zeit der Induktion mit IPTG (1 mM)	Endostatin-Bande auf dem SDS-PAGE-Gel
0,41	schwach
0,49	schwach
0,56	deutlich erkennbar
0,62	deutlich erkennbar
0,78	deutlich erkennbar
0,88	erkennbar
1,31	sehr schwach, nicht sicher zuzuordnen
1,44	nein
1,72	nein
2,89	nein

Da es gerade am Beginn der exponentiellen Phase zu schnellen Veränderungen der Zelldichte und damit auch der optischen Dichte kommt, die von verschiedenen Parametern abhängen, ist es nicht möglich einen exakten OD-Wert für die Induktion im voraus festzulegen. Als praktikabel für die Induktion hat sich bewährt den OD-Bereich von 0,5 bis maximal 0,9 zu wählen. Dies zeigte sich später auch in den Bioreaktorkultivierungen (s. 4.2.2.2).

#### 4.1.5.3 Einfluß der IPTG-Konzentration auf Wachstum und Produktivität

In insgesamt fünf Schüttelkolben von 300 mL Volumen (4 Schikanen) wurden jeweils 80 mL Super-LB-Nährmedium vorgelegt. Die Kolben wurden mit jeweils 800  $\mu$ L aus derselben Vorkultur angeimpft und bei 37°C mit 130 RPM geschüttelt. Nach ca. 1,5 Stunden hatte die optische Dichte einen Wert von 0,61 erreicht und es wurden vier der fünf Kolben mit IPTG in den Konzentrationen 1 mM, 2 mM, 4 mM und 10 mM induziert. Der fünfte Kolben wurde nicht induziert und diente als Referenz.

Während der Kultivierung wurde die optische Dichte an Offline-Proben gemessen (s. Abb. 14). Wie zu erkennen ist, liegen die OD-Werte in allen Kolben zwar in sehr ähnlichen Bereichen, es bildet sich aber nach dem Induktionszeitpunkt doch eine deutliche Abfolge heraus. Je höher die IPTG-Konzentration bei der Induktion ist, desto geringer ist auch der Wert der optischen Dichte und damit die Zelldichte. Dies läßt auf einen wachstumshemmenden Einfluß des IPTG schließen.

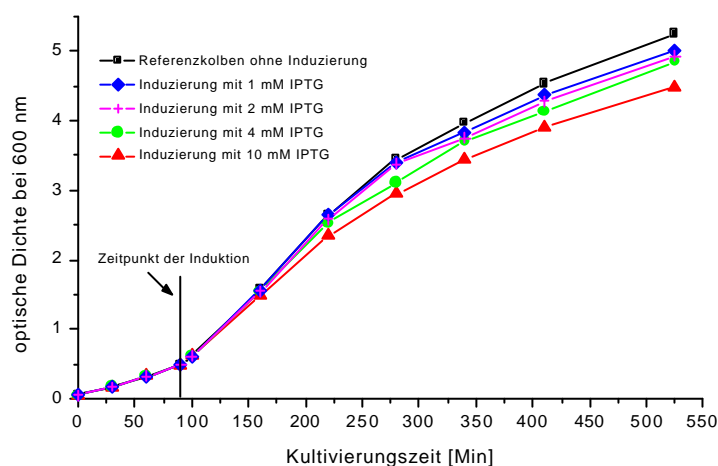


Abb. 14: Schüttelkolbenversuch mit vier verschiedenen IPTG-Konzentrationen

Ca. sieben Stunden nach der Induktion wurden sämtliche Kolben geerntet. Die Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert und gleich große Aliquots der Zellpellets sowohl unter nativen, als auch unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen (s. 3.8.1.2 und 3.8.1.3). Anschließend wurde im Mini-Batch-Maßstab mit Ni-NTA aufgereinigt (s. 3.8.2 und 3.8.3) und von den verschiedenen Eluaten vergleichende SDS-PAGE-Gele angefertigt.

Leider stellte sich dabei heraus, daß in keinem der Eluate der Ni-NTA-Chromatographie Endostatin nachgewiesen werden konnte, obwohl die Gele der rohen (denaturierend hergestellten) Lysate durchaus Endostatin-Banden zeigten (s. Abb. 15 und auch 4.1.6). Bei der nativen

Aufarbeitung war das wahrscheinlich auf dieselben Probleme zurückzuführen, wie bereits unter 4.1.5.1 erläutert.

Der qualitative Vergleich der SDS-PAGE-Gele der nichtaufgereinigten unter denaturierenden Bedingungen erzeugten Lysate zeigt deutlich, daß in allen Fällen eine Bande im gesuchten Bereich von ca. 20 kDa auftaucht (s. Abb. 15). Die Lysate aus den vier Ernten, die alle von vergleichbaren Probenvolumina (je 35 mL Zellsuspension) stammten, wurden in hundertfacher Verdünnung aufgetragen, da sich unverdünnt sehr starke, nicht scharf abgegrenzte Banden zeigten. Die Erwartung bei diesem Experiment war, daß sich – abhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration – eine irgendwie geartete Abfolge der produzierten Endostatinmengen zeigen würde. Dies hätte sich in verschieden intensiv gefärbten Banden auf dem Gel auswirken sollen. Es war aber keine eindeutige Abfolge in der Bandenstärke bei 20 kDa auszumachen. Vielmehr scheint es, daß unabhängig von der zur Induktion verwendeten IPTG-Konzentration ungefähr dieselben Produktmengen entstanden, die jedoch mit der Mini-Batch-Chromatographie nicht isoliert werden konnten.

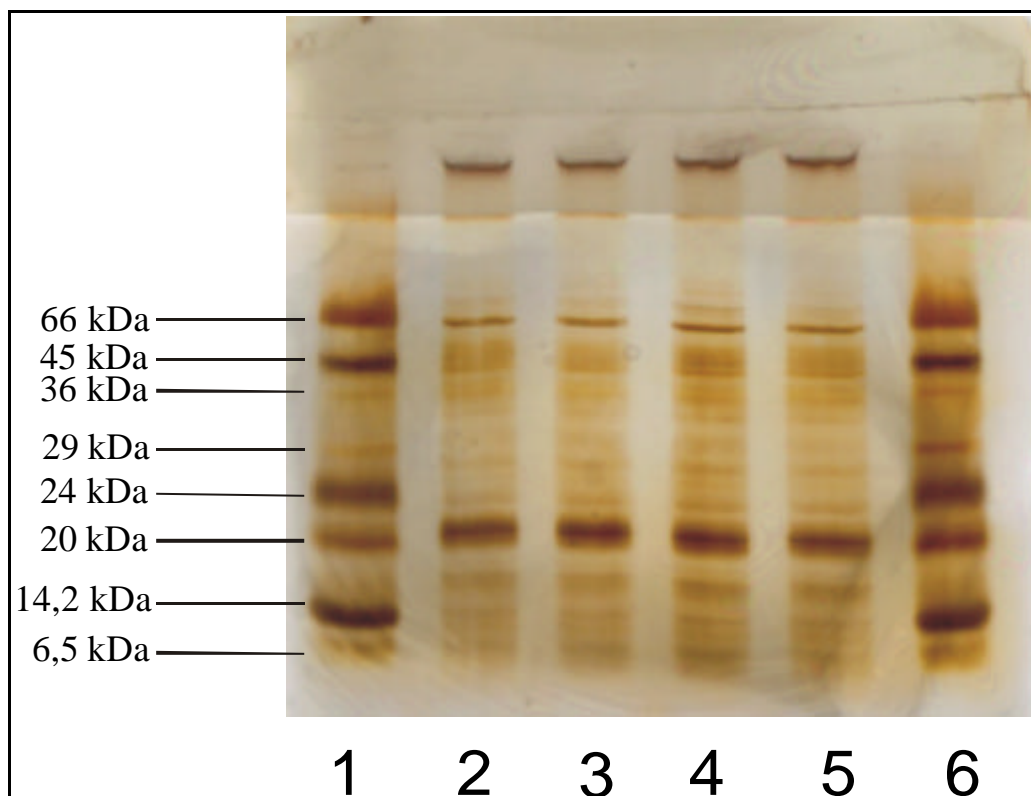


Abb. 15: SDS-PAGE-Gel zum Schüttelkolbenversuch mit vier verschiedenen IPTG-Konzentrationen, Silberfärbung. Belegung: **1** Low Molecular Weight Standard (Sigma, 6fach verdünnt), **2** Lysat Kolben 1 (100fach verdünnt, 1 mM IPTG), **3** Lysat Kolben 2 (100fach verdünnt, 2 mM IPTG), **4** Lysat Kolben 3 (100fach verdünnt, 4 mM IPTG), **5** Lysat Kolben 4 (100fach verdünnt, 10 mM IPTG), **6** Low Molecular Weight Standard (Sigma, 10fach verdünnt)

Eine Möglichkeit zur Quantifizierung der Endostatin-Konzentration stand zum Zeitpunkt dieses Versuches noch nicht zur Verfügung, sondern wurde erst während der Bioreaktorkultivierungen entwickelt (s. 4.2.2.2).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die zur Induktion eingesetzte IPTG-Konzentration im Bereich von 1 bis 10 mM unter den beschriebenen Versuchsbedingungen keinen erkennbaren Einfluß auf die produzierte Endostatin-Menge hatte. Es stellte sich aber eine leicht wachstumshemmende Wirkung hoher IPTG-Konzentrationen heraus. Es wurde daher in allen weiteren Versuchen –auch im Bioreaktor– nur noch mit geringen Induktionskonzentrationen von maximal 2 mM gearbeitet.

#### **4.1.5.4 Induktion nach Absenkung der Temperatur**

Wie schon in den ersten Temperaturversuchen (s. Abb. 12) gezeigt wurde, verzögert sich das Wachstum der Bakterien zwar ein wenig bei tieferen Temperaturen, aber auch noch bei 28°C bleiben die Zellen durchaus vital. Es sollte in einem Versuch geklärt werden, ob ein Dämpfen des Wachstums durch eine kontrollierte Temperaturabsenkung kurz vor der Induktion eventuell die Produktivität der Zellen erhöht. Dieses Vorgehen wird in der Literatur häufiger erwähnt [z. B.: Vasina, 1997, Yang, 1997]. Es wird meist angewendet um ein Aggregieren des Zielproteins und damit auch die Bildung sogenannter Einschlusskörper zu verhindern.

Es wurden drei Schüttelkolben von 500 mL Volumen (4 Schikanen) mit jeweils 100 mL Super-LB-Nährmedium befüllt und mit jeweils 250 µL aus derselben Vorkultur angeimpft. Bei 37°C wurde mit 100 RPM geschüttelt bis eine optische Dichte von ca. 0,5 erreicht war. Dann wurden zwei der drei Kolben in einen anderen Schüttler gestellt der auf 28°C eingestellt war. Die Schüttelgeschwindigkeit blieb identisch bei 100 RPM. Der dritte Kolben verblieb im 37°C-Schüttler und diente als Referenz für ungestörtes Wachstum. Der Kolben Nr. 3 (28°C) wurde über einen Sterilfilter mit 1 mM IPTG versetzt, Kolben Nr. 2 wurde nicht induziert, sondern diente als Referenz für das Wachstum bei 28°C ohne Induzierung. Aus allen drei Kolben wurden stündlich Proben gezogen und die optische Dichte bestimmt. Fünf Stunden nach der Induktion wurde Kolben 3 und zum Vergleich der nicht induzierte Kolben 2 geerntet. Die gesamte geerntete Zellsuspension (ca. 95 mL) wurde jeweils abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet einer chemischen Lyse unter denaturierenden Bedingungen unterworfen. Die geklärten Lysate wurden dann auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen.

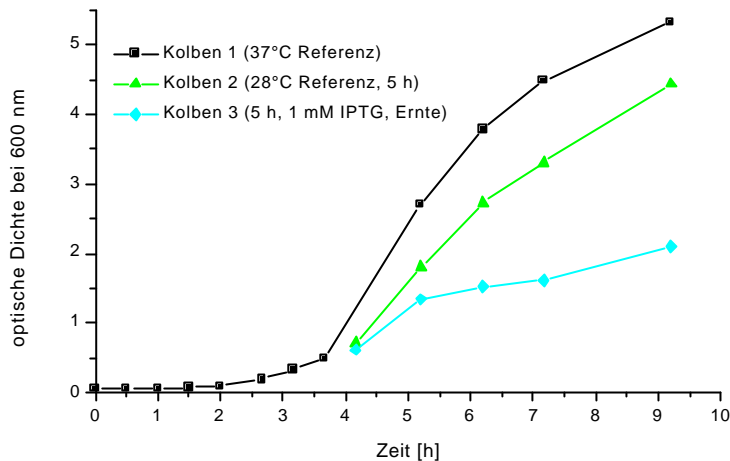


Abb. 16: Schüttelkolbenversuch zur Induktion nach Absenken der Temperatur

In Abbildung 16 ist zu erkennen, daß beide Kulturen bei 28°C langsamer wuchsen und geringere optische Dichten erreichten als die Referenzkultur bei 37°C. Außerdem ist deutlich zu sehen, daß durch die Induktion das Zellwachstum gehemmt wird (wie auch schon in Kapitel 4.1.5.3 gezeigt wurde). Die nichtinduzierte Kultur in Vergleichskolben 2 erreichte trotz der ungünstigen Temperatur eine doppelt so hohe optische Dichte wie die induzierte Kultur in Kolben 3.

Abbildung 17 zeigt ein SDS-PAGE-Gel der lysierten Proben aus Kolben 2 und 3 (Erntezeitpunkt 5 Stunden nach Induktion). Das Gel ist entgegen der unter 3.9.1 beschriebenen Färbemethode mit Coomassie Blau gefärbt, da die Silberfärbung aufgrund einer fehlerhaften Chemikalie versagt hatte. Auf der linken Bahn ist ein Größenstandard aufgetragen, auf der zweiten Bahn die Probe aus Kolben 2 (nichtinduzierte Referenz), auf der dritten Bahn die Probe aus Kolben 3 (Ernte fünf Stunden nach Induktion) und auf der rechten Bahn ein von der Firma BioVisioN zur Verfügung gestellter Endostatin-Standard. In der nichtinduzierten Probe (2) ist erwartungsgemäß im Größenbereich des Endostatins keine Bande zu erkennen, allerdings ist im Bereich von etwa 47 kDa eine sehr starke Bande zu sehen. Diese schwächt sich in der induzierten Probe (3) deutlich ab.

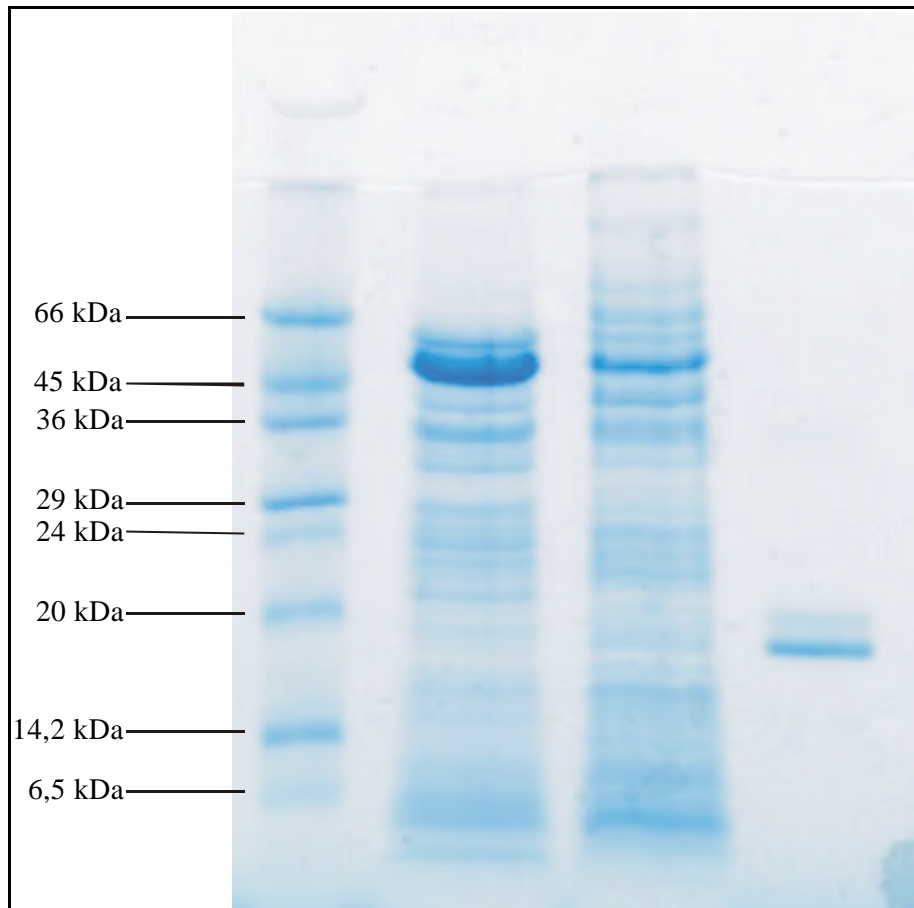


Abb. 17: SDS-PAGE-Gel, Coomassiefärbung. Belegung von links: Low Molecular Weight Standard (Sigma), Lysat Kolben 2 (nicht induziert), Lysat Kolben 3 (induziert mit 1 mM IPTG), Endostatin Standard (BioVisionN)

Außerdem ist eine schwache Bande im Endostatin-Bereich zu erkennen, d. h. es wurde zwar Endostatin produziert, aber nur in geringer Menge. Im Vergleich mit anderen Versuchsergebnissen, die mit einer Induktion ohne Temperaturabsenkung erzielt wurden, läßt sich aus diesem Experiment am ehesten der Schluß ziehen, daß die Versuchsbedingungen zu einer Verschlechterung der Produktivität geführt haben. Trotzdem wurden weitere Experimente zu diesem Thema durchgeführt, die allerdings nicht mehr im Schüttelkolbenmaßstab stattfanden, sondern im Bioreaktor (s. 4.2.2.2).



#### 4.1.6 Endostatin-Isolierung mit der Ni-NTA-Chromatographie im Mini-Batch-Maßstab

Die angewandte Mini-Batch-Methode (s. 3.8.2 bzw. 3.8.3) ist eine Modifikation des bei [Qiagen, 2000] vorgeschlagenen Arbeitsprotokolls zur Batch-Reinigung unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen. Im Gegensatz zum Qiagen-Arbeitsprotokoll wurde nicht mit einer Mini-Chromatographie-Säule gearbeitet, sondern das Ni-NTA-Harz wurde für die verschiedenen Chromatographieschritte (mehrmals waschen und mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte eluieren) jeweils im Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert und mit dem nächsten Wasch- oder Elutionspuffer wieder resuspendiert.

Diese modifizierte Methode wurde sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Wie bereits beschrieben, lassen sich die Probleme beim Arbeiten unter nativen Bedingungen bereits auf den Zellaufschluß zurückführen. Die negativen Ergebnisse in den wenigen Fällen, in denen die Mini-Batch-Chromatographie unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde, sind also wenig aussagekräftig, da wahrscheinlich schon am Beginn der jeweiligen Versuche kein lösliches Endostatin vorgelegen hatte.

Beim Arbeiten unter denaturierenden Bedingungen dagegen konnte nach der Mini-Batch-Chromatographie erfolgreich Endostatin in den Eluaten nachgewiesen werden. Allerdings versagte die Methode bei gering konzentrierten Lysaten. Bei schlechter Produktivität der Bakterien ließ sich zwar meist das wenige produzierte Endostatin noch im rohen Lysat als schwache Bande im 20 kDa-Bereich auf dem SDS-PAGE-Gel nachweisen, aber für die Isolierung mittels Mini-Batch-Chromatographie waren die Mengen zu gering, d. h. die Eluatfraktionen enthielten nicht genug Endostatin um erkennbare Banden zu ergeben.

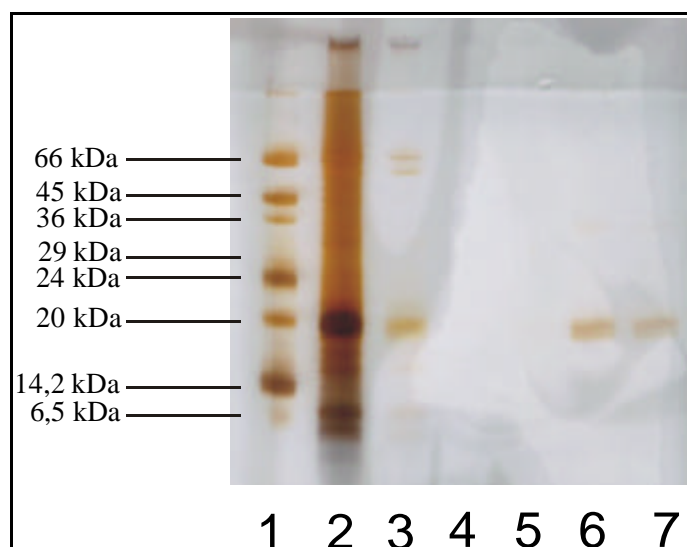


Abb. 18: SDS-PAGE-Gel der denaturierenden Mini-Batch-Chromatographie eines Schüttelkolbenversuchs, Silberfärbung. Belegung: **1** Low Molecular Weight Standard, **2** Überstand (unverdünnt), **3** Erste Waschfraktion Puffer C, **4** Erste Eluatfraktion Puffer D, **5** Zweite Eluatfraktion Puffer D, **6** Erste Eluatfraktion Puffer E, **7** Zweite Eluatfraktion Puffer E

In Abbildung 18 ist ein SDS-PAGE-Gel mit den wichtigsten Wasch- und Eluatfraktionen der denaturierenden Aufarbeitung mittels Mini-Batch-Chromatographie gezeigt. Das Material stammte von einem Schüttelkolbenversuch in dem der optimale Zeitpunkt für die Induktion mit IPTG bestimmt werden sollte (s. 4.1.5.2). Das als Beispiel gezeigte Gel gehört zu einer Kultur, die bei einer OD von 0,56 mit 1 mM IPTG induziert wurde. Die Ernte von ca. 80 mL Zellsuspension fand 5 Stunden nach der Induktion statt. Nach dem chemisch, denaturierenden Zellaufschluß (s. 3.8.1.3) wurden die in 3.8.3 beschriebenen Schritte der Mini-Batch-Chromatographie durchgeführt. Auf dem Gel ist auf der zweiten Bahn der Überstand der ersten Zentrifugation aufgetragen. Eigentlich sollten hier nur noch Proteine zu finden sein, die nicht ans Ni-NTA gebunden haben. In Bahn 2 von Abbildung 18 ist aber neben einigen anderen starken Banden, die stärkste Bande im Endostatin-Bereich von ca. 20 kDa zu finden. Das bedeutet, daß ein großer Teil des im Lysat vorhandenen Endostatins nicht an das Chromatographie-Harz gebunden hat. Dies konnte öfter auch bei anderen Proben beobachtet werden. Auch in der ersten Waschfraktion (Abbildung 18, Bahn 3) konnte noch weiteres, nicht gebundenes Endostatin gefunden werden. Die Elution mit Puffer D (pH 5,9 – Abbildung 18, Bahn 4 und 5) führte zu keiner Bande auf dem Gel, aber mit Puffer E (pH 4,5) eluierte das Protein und es sind in beiden aufgetragenen Eluat-E-Fractionen (Abbildung 18, Bahn 6 und 7) die typischen Endostatin-Doppelbanden zu erkennen. Laut Theorie sollen mit Puffer D die gebundenen Proteine mit korrektem 6xHis-Tag eluieren, mit Puffer E – unter saureren Bedingungen – die Proteine mit Fehlern im His-Tag. Spätere MALDI- und ESI-Messungen an Eluat-E-Fractionen zeigten aber, daß es sich dabei doch um die korrekten Endostatinmoleküle mit 6xHis-Tag handelte.

Trotzdem wurde versucht durch Variation der Elutionspuffer-pH-Werte das Elutionsverhalten zu verbessern. Dazu wurden zusätzlich zwei weitere Elutionspuffer gleicher Zusammensetzung verwendet, die pH-Werte von 5,0 (Puffer F) und 4,1 (Puffer G) hatten. Auf Puffer D (pH 5,9) wurde verzichtet.

In Abbildung 19 ist auf zwei SDS-PAGE-Gelen das komplette Elutionsmuster mit dieser variierten Methode dargestellt. Es wurde dieselbe Probe verwendet wie für Abbildung 18, nur wurde das Lysat durch Lyophilisation ca. 1,5fach aufkonzentriert.

Belegung des Gels: Bahn 1 = Größenstandard, Bahn 2 = Lysat, Bahn 3 = Überstand, Bahn 4 = erste Waschfraktion, Bahn 5 = zweite Waschfraktion, Bahn 6 = erste Elution mit Puffer F, Bahn 7 = zweite Elution mit Puffer F, Bahn 8 = erste Elution mit Puffer E, Bahn 9 = zweite Elution mit Puffer E, Bahn 10 = erste Elution mit Puffer G. Die pH-Wert-Abfolge war also: 8,0 – 6,3 – 5,0 – 4,5 – 4,1. Wie man in Abbildung 19 erkennt, sind im Überstand und im er-

sten Waschschrift wiederum große Anteile an Protein im richtigen Größenbereich des Zielproteins zu finden die nicht ans Ni-NTA gebunden haben. Außerdem eluiert das Endostatin – deutlich erkennbar an einer charakteristischen Doppelbande bei ca. 20 kDa- beginnend mit Puffer F (Bahn F) bis zu Puffer G (Bahn 10), also über einen weiten pH-Bereich zwischen pH 5,0 und 4,1.

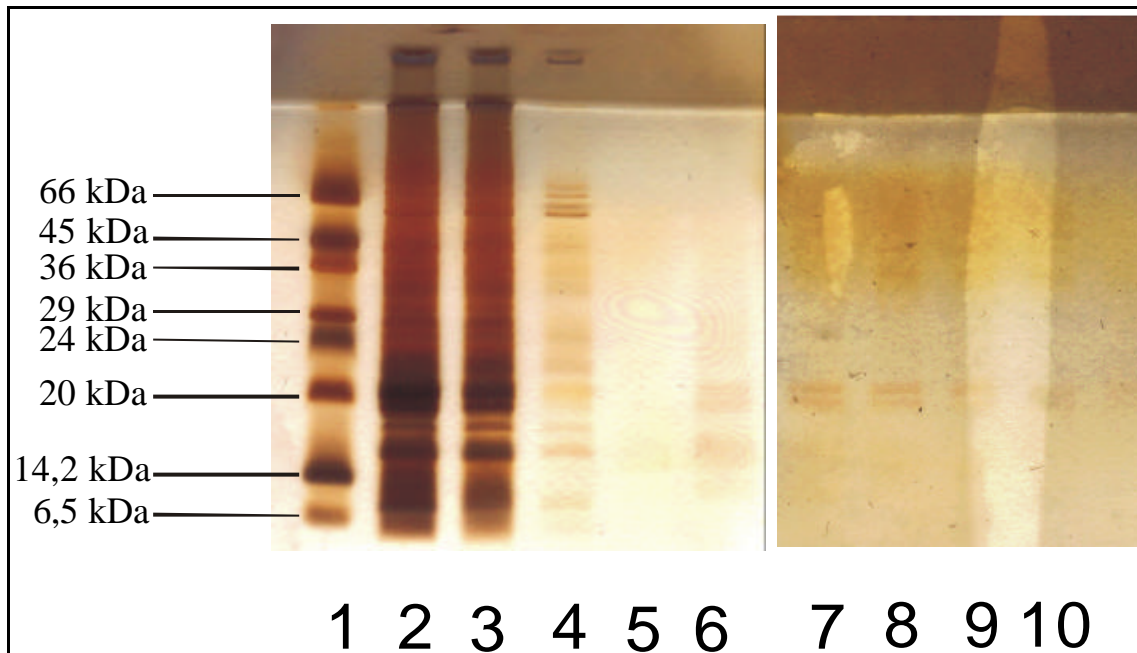


Abb. 19: Mit Silber gefärbtes SDS-PAGE-Gel der denaturierenden Mini-Batch-Chromatographie mit Variation der Elutionspuffer-pH-Werte

Da die Mini-Batch-Chromatographie nur mit ausreichend konzentrierten Proben gute Ergebnisse erbracht hat und anscheinend bei der Beladung des Chromatographie-Harzes erhebliche Proteinverluste in Kauf genommen werden müssen, wurde für die späteren Versuche eine größere Säule (ca. 28 mL) mit Ni-NTA-Superflow gepackt und mit einer FPLC-Anlage (Fa. Biorad) gearbeitet. Durch die zeitaufwendigen Equilibrierschritte und die stärkere Verdünnung bei der Elution, die eine anschließende Volumenreduktion durch Lyophilisation unumgänglich macht, unterscheiden sich beide Methoden nicht sehr im Zeit- und Arbeitsaufwand. Die Chromatographie an der FPLC-Anlage bietet aber den großen Vorteil, daß das Eluat einen UV-Detektor durchläuft und so eine viel bessere Kontrolle der Elution möglich ist. Außerdem wird durch das größere Ni-NTA-Volumen auch eine quantitative Aufarbeitung größerer Probenmengen möglich.

## **4.2 Kultivierungen im Bioreaktor**

### **4.2.1 Ermittlung der Grundparameter für das Wachstum in Bioreaktorkultivierungen**

Bei der Kultivierung im Bioreaktor ist die Regelung und Kontrolle vieler Parameter wesentlich einfacher und besser zu bewerkstelligen als in Schüttelkolben. So ist z. B. die Messung von Abgaswerten für Sauerstoff und Kohlendioxid im Abluftstrom möglich, die Steuereinheit ermöglicht eine Regelung des pH-Werts auf vorgegebene Werte und die konstante Versorgung mit Sauerstoff ist über Mass-Flow-Meter und genau einstellbare Rührgeschwindigkeiten regelbar. Man gewinnt gegenüber den Versuchen in Schüttelkolben eine viel größere Menge an Informationen über den Prozeß.

Die wichtigsten Größen anhand derer die Bioreaktorkultivierungen beurteilt wurden sind einerseits die online aufgenommenen Daten zu pH-Wert, Temperatur, Gelöstsauerstoff-, Abgassauerstoff- und Abgaskohlendioxidgehalt und andererseits die aus Offline-Proben gewonnenen Werte der optischen Dichte, der Biotrockenmasse, sowie der Produktanalytik.

Zunächst sollte geklärt werden, wie sich die Wachstumsverläufe der Bakterien im Bioreaktor von denen im Schüttelkolben unterscheiden, und ob die im Schüttelkolben ermittelten Grundparameter übernommen werden können.

Dazu wurden ähnlich wie in den Schüttelkolbenkultivierungen vergleichende Kultivierungen mit den drei LB-Nährmedien (LB-, 2YT-, Super-LB-Medium) durchgeführt und eine Abfolge der Medien bezüglich der optimalen Wachstumsbedingungen erstellt. Es wurden Temperaturversuche mit Temperaturen die über den kompletten Zeitraum der Kultivierung konstant gehalten wurden durchgeführt, um die optimale Wachstumstemperatur zu bestimmen. Dasselbe wurde mit verschiedenen pH-Werten versucht, und ebenso wurde die optimale Rührergeschwindigkeit ermittelt.

Eine einzelne, detaillierte Darstellung aller dieser Fermentationen würde sicherlich den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher werden die wichtigsten Kulturführungsparameter in Tabellen zusammengefaßt und nur wenige Versuche im Detail dargestellt.

#### **4.2.1.1 Verläufe ausgewählter Kultivierungsparameter für Wachstumsexperimente im Bioreaktor**

In den Wachstumsexperimenten wurde noch auf die Induktion mit IPTG verzichtet. Aus Offline-Proben wurden die optische Dichte und die Biotrockenmasse bestimmt. Der Vergleich dieser Offline-Daten mit den online aufgenommenen Daten (pH-Wert, Temperatur, Ge-

lösstauerstoff-, Abgassauerstoff- und Abgaskohlendioxidgehalt) ist beispielhaft an Kultivierung Nr. 1 für eine Kultivierung ohne Induktion in den Abbildungen 20-22 dargestellt (siehe auch Tab. 5). Diese Kultivierung wurde mit LB-Medium bei einem pH-Wert von 7,0 und konstanter Temperatur von 37°C durchgeführt. Die Temperatur ließ sich mit dem Thermostat der Biostat-Steuereinheit innerhalb von  $\pm 0,2^\circ\text{C}$  konstant halten. Es wurde mit 1 vvm (2 L/min) Druckluft begast, die Rührergeschwindigkeit lag konstant bei 500 RPM ( $\pm 2$  RPM). Die Online-Daten wurden insgesamt 24 Stunden lang aufgenommen, die letzte Offline-Probe wurde nach 7 Stunden genommen.

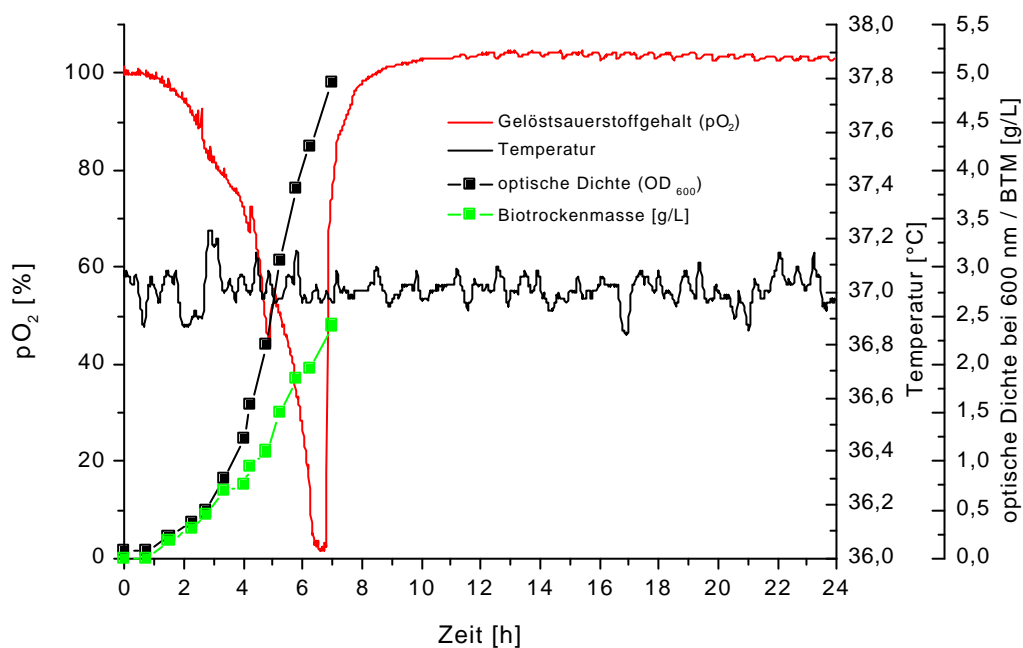


Abb. 20: Bioreaktorkultivierung Nr. 1, pO<sub>2</sub> und Temperatur vs. optische Dichte und BTM (Online-Daten vs. Offline-Daten)

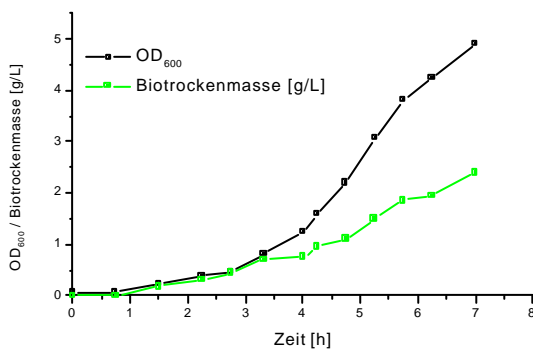


Abb. 21: Bioreaktorkultivierung Nr. 1, optische Dichte und BTM

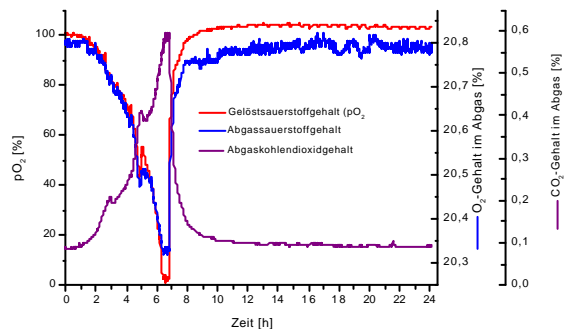


Abb. 22: Bioreaktorkultivierung Nr. 1, Abgas-O<sub>2</sub>-, Abgas-CO<sub>2</sub>- vs. Gelöstsauerstoff

Der Verlauf der  $pO_2$ -Kurve in Abbildung 20 und 22 ist typisch für eine Batch-Kultur unter den gewählten Bedingungen: Ausgehend von optimaler Sättigung des Nährmediums mit gelöstem Sauerstoff ( $pO_2 = 100\%$ ) fällt die Kurve anfangs nur sehr langsam (entsprechend der Akzelerationsphase der Mikroorganismen), dann jedoch ab ca. der dritten Stunde nach der Inkubation ganz rapide. Anhand des starken Anstiegs der optischen Dichte zu diesem Zeitpunkt (Abb. 20 und 21) läßt sich dies mit dem Beginn der exponentiellen Phase korrelieren. Nachdem der  $pO_2$ -Wert bis auf Null abgefallen ist, bleibt er ca. 30 bis 50 Minuten bei sehr niedrigen Werten, dann kommt es zu einem sehr schnellen Anstieg zurück auf 100% Sättigung. Das 100%-Niveau bleibt bis zum Abbruch der Kultivierung (in diesem Fall nach 24 Stunden) konstant.

In Abb. 22 sind die Verläufe von Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt im Abgas gegen den Verlauf des  $pO_2$ -Wertes während Kultivierung Nr. 1 aufgetragen. Abgas- $O_2$  und Abgas- $CO_2$  verhalten sich fast genau spiegelbildlich: Erreicht die Abgas- $O_2$ -Kurve ein Minimum, so findet sich in der Abgas- $CO_2$ -Kurve zur selben Zeit ein Maximum. Dieser Zusammenhang zwischen den Kurvenverläufen wurde in allen durchgeführten Fermentationen gefunden.

Ganz deutlich läßt sich anhand der beiden Abgaskurven das Wachstum der Bakterien verfolgen. Ungefähr die ersten 2 Stunden nach dem Animpfen bleiben die Werte konstant, dann kommt es beim Abgaskohlendioxidgehalt erst zu einem langsamen, dann exponentiellen Anstieg. Analog dazu sinkt der Abgassauerstoffgehalt erst langsam und dann ab der 2,5. Stunde exponentiell ab. Nach etwa 6,5 Stunden Kultivierungszeit sinkt der  $pO_2$ -Wert auf Null, was sich auch in einem Maximum an Abgaskohlendioxid und einem Minimum an Abgassauerstoff auswirkt.

Der rasche Anstieg der  $pO_2$ -Kurve nach einer kurzen Zeit der Sauerstofflimitierung wurde in allen ähnlich geführten Bioreaktorkultivierungen in gleicher Weise gefunden. Er läßt sich so deuten, daß die Bakterien sehr schnell auf die eingetretene Sauerstofflimitierung mit einer Umstellung von aerobem auf den anaeroben Stoffwechsel reagieren, den sie beibehalten. Dies ist möglich weil *E. coli* als Darmbakterium fakultativ anaerob wachsen kann. Unter aeroben Bedingungen, wie sie am Anfang der Kultivierung noch herrschen, nutzen die Bakterien die Zellatmung um chemische Energie aus den vorhandenen Nährstoffen zu gewinnen und ATP zu produzieren. Sowie aber Sauerstoffmangel herrscht kann, statt aus der Atmung, aus der Gärung Energie gewonnen werden. Allerdings hat die Gärung den Nachteil, daß sie weniger effektiv ist und viel weniger Energie nutzbar macht, als die Atmung [Campbell, 1998].

#### 4.2.1.2 Sauerstoffversorgung im Bioreaktor

In der als Beispiel gezeigten Kultivierung Nr. 1 kam es nach ca. 6,5 Stunden zu einer Sauerstofflimitierung bei welcher der pO<sub>2</sub>-Wert bis auf Null abfiel. Dies hat eine Umstellung des Bakterienstoffwechsels zur Folge, die sich später als sehr wichtiger Punkt der Kulturführung herausstellte. Daher soll kurz auf das Prinzip der Sauerstoffversorgung der Zellen im Bioreaktor eingegangen werden.

Sauerstoff ist in wäßrigen Lösungen nur wenig löslich (10 mg/L entspricht einer gesättigten Lösung). Der Sauerstoffeintrag in die Lösung wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L)$$

mit:  $C_L$  = Konzentration an gelöstem Sauerstoff [mmol/L]

$t$  = Zeit [h]

$C^*$  = Konzentration an gelöstem Sauerstoff bei Sättigung [mmol/L]

$K_L$  = Massentransferkoeffizient [cm/h]

$a$  = Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit pro Volumeneinheit

$d C_L / dt$  = Sauerstofftransfergeschwindigkeit [mmol/Lh]

Die Werte für  $K_L$  und  $a$  sind während der Kultivierung sehr schwierig bestimmbar, daher wird  $K_L \cdot a$  als volumetrischer Transferkoeffizient zusammengefaßt. Sein Wert ist eine Maßzahl für die Belüftungskapazität eines Reaktors und hängt von vielen verschiedenen Parametern (z. B. Reaktoraufbau, Begasungsrate, Viskosität des Mediums) ab.

Die Sauerstoffversorgung im verwendeten Bioreaktor wird durch die Luft gewährleistet, die während der Kultivierung durch viele kleine Löcher im Begasungsring eingeblasen und von den Rührerblättern zerschlagen wird (s. Abb. 4). Dabei läßt sich der Sauerstoffeintrag ins Nährmedium leichter durch Erhöhen der Rührgeschwindigkeit als durch Erhöhung der Begasungsrate steigern. Es hat sich aber in Vorversuchen gezeigt, daß die Bakterienzellen auf zu hohe Rührgeschwindigkeiten während der Akzelerationsphase mit einer starken Wachstumsverzögerung reagieren. Als optimale Werte für die Anfangsphase haben sich Rührerdrehzahlen von 450 bis maximal 500 RPM herausgestellt. Der Einfluß des Gelöstsauerstoffgehaltes auf die spezifische Sauerstoffaufnahme-geschwindigkeit der Mikroorganismen entspricht einer Michaelis-Menten-Kinetik wie in Abbildung 23 gezeigt wird. Die spezifische Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme steigt bis zu einem Maximum an, wenn die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zunimmt. Die niedrigste Konzentration an gelöstem Sauerstoff, bei der die spezifische Sauerstoffaufnahme-geschwindigkeit maximal ist, wird  $C_{krit.}$  genannt. Um die Kultivierung also unter vollständig aeroben Bedingungen zu halten, muß im Reaktor eine

Konzentration an gelöstem Sauerstoff aufrechterhalten werden, die höher als  $C_{\text{krit.}}$  ist. Es gibt aber viele Beispiele, daß sich die optimalen Belüftungsbedingungen zur Herstellung eines Produkts von denen zur Biomasseerzeugung unterscheiden [Trevan, 1993]. Wie z. B. bei der Alkoholproduktion mit Hefen. Da die Alkoholbildung ein anaerober Prozeß ist, wird hier die Gelöstsauerstoffkonzentration unterhalb  $C_{\text{krit.}}$  gehalten.

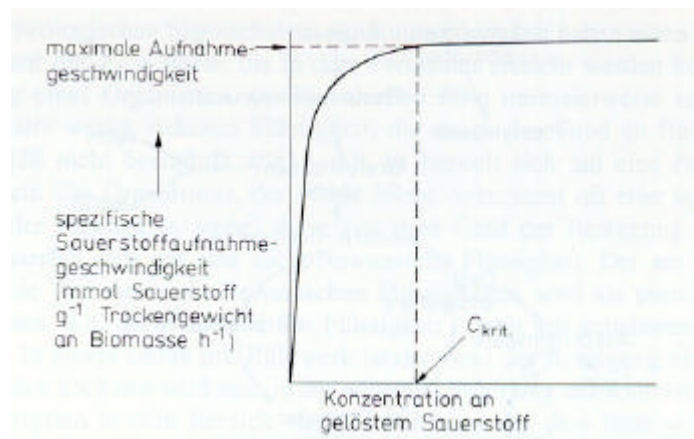


Abb. 23: Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die spezifische Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme einer mikrobiellen Kultur (nach [Trevan, 1993])



#### 4.2.1.3 In Wachstumsexperimenten ermittelte Grundparameter der Kulturführung im Bioreaktor

In den Tabellen 5 und 6 sind die wichtigsten Parameter der ersten zehn durchgeführten Bioreaktorkultivierungen aufgeführt. Die Versuche bauten meist aufeinander auf, daher sind in einer Versuchsreihe jeweils die geänderten Parameter durch fette Schrift hervorgehoben. Zusätzlich sind die zusammenhängenden Versuchsreihen durch vertikale Doppellinien voneinander abgegrenzt.

Tabelle 5: Grundparameter der Bioreaktorkultivierungen Nr. 1 bis 6

über die Kultivierungszeit konstant gehaltene Parameter	Bioreaktorkultivierung					
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6
Nährmedium	<b>LB</b>	<b>2YT</b>	<b>Super-LB</b>	<b>LB</b>	<b>2YT</b>	<b>Super-LB</b>
Temperatur	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
pH-Wert	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Rührergeschwindigkeit	<b>500 RPM</b>	500 RPM	500 RPM	450 RPM	450 RPM	450 RPM
Begasungsrate	1 vvm	1 vvm	1 vvm	1 vvm	1 vvm	1 vvm
ASM	60 µL/L Desmophen 3900	60 µL/L Desmophen 3900	60 µL/L Desmophen 3900	<b>100 µL/L Desmophen 3900</b>	<b>100 µL/L Desmophen 3900, auf 180 µL/L erhöht</b>	<b>150 µL/L Desmophen 3900, auf 200 µL/L erhöht</b>
Schaumbildung beobachtet?	Ja, deutlich	Ja, deutlich	Ja, sehr deutlich	Ja, wenig	Anfangs ja, nach Erhöhung der ASM-Konz. nicht mehr	Ja, nach Erhöhung der ASM-Konz. weniger aber trotzdem deutlich
Zeitpunkt des Eintretens der Sauerstofflimitierung	Ca. 6,5 h	Ca. 4 h	Ca. 4 h	Ca. 5 h	Ca. 3,5 h	Ca. 4 h
OD <sub>600</sub> nach 7 Stunden	4,9	6,5	5,1	5,5	7,2	6,5
Zeitpunkt der letzten Probenahme	7 h	9 h	8,5 h	9 h	9,5 h	8 h
OD <sub>600</sub> bei der letzten Probenahme	4,9	7,4	7,4	6,4	8,1	7,2
BTM bei der letzten Probenahme	2,4 g/L	5,0 g/L	2,8 g/L	2,6 g/L	4,8 g/L	3,5 g/L

Die Kultivierungen Nr. 1 bis 3 bilden die erste Versuchsreihe, in der getestet werden sollte, welches Medium unter den Bioreaktor-Bedingungen, die in Tab 5, Spalte Nr. 1 bis 3 aufgeführt sind, den Bakterien das beste Wachstum erlaubt. Außer dem jeweils anderen Nährmedi-

um wurden die drei Kultivierungen unter identischen Bedingungen durchgeführt. Auffällig war besonders, daß es trotz Verwendung von 60 µL/L Desmophen 3900 – was in Schüttelkolbenversuchen als ausreichende Konzentration zur Schaumunterdrückung ermittelt worden war – in allen drei Fermentationen zu deutlicher Schaumbildung kam. Besonders starke Schaumentwicklung zeigte Kultivierung Nr. 3 mit Super-LB-Medium. Um den negativen Einfluß des gebildeten Schaums auszuschließen wurden die Kultivierungen unter denselben Bedingungen wiederholt, nur die Desmophen-Konzentration wurde höher gewählt. Die Kultivierungen Nr. 4 bis 6 bilden somit die zweite Versuchsreihe, in der neben den Nährmedien die ASM-Konzentrationen variiert wurden und die Rührergeschwindigkeit geringfügig herabgesetzt wurde. 100 µL/L Desmophen 3900 in Kultivierung Nr. 4 (LB-Medium) reichten nicht für eine vollständige Schaumunterdrückung aus, deshalb wurde in Kultivierung Nr. 5 (2YT-Medium) die anfängliche Konzentration von 100 µL/L Desmophen nach der beobachteten Schaumbildung auf 180 µL/L erhöht. Dies unterdrückte den Schaum wirksam. In Kultivierung Nr. 6 (Super-LB-Medium) wurde von Beginn an mit 150 µL/L mehr Antischaummittel eingesetzt, als in Nr. 4 und Nr. 5. Da sich trotzdem Schaum entwickelte, wurde nochmal auf 200 µL/L Desmophen erhöht. Die Schaummenge schien danach zwar abzunehmen, der Schaum blieb aber bis zum Abbruch der Fermentation deutlich erkennbar.

In den beiden beschriebenen Versuchsreihen erreichten die Kultivierungen in 2YT-Medium jeweils die mit Abstand besten Biomassen. Daher wurde in den weiteren Wachstumsversuchen nur noch in 2YT-Medium gearbeitet. Außerdem wurde die für dieses Medium als günstig ermittelte ASM-Konzentration von 180 µL/L Desmophen 3900 in den weiteren Versuchen beibehalten.

Tabelle 6: Grundparameter der Bioreaktorkultivierungen Nr. 7 bis 10

über die Kultivierungszeit konstant gehaltene Parameter	Bioreaktorkultivierung			
	Nr. 7	Nr. 8	Nr. 9	Nr. 10
Nährmedium	2YT	2YT	2YT	2YT
Temperatur	<b>35°C</b>	<b>36°C</b>	37°C	37°C
pH-Wert	7,0	7,0	<b>6,8</b>	<b>6,5</b>
Rührergeschwindigkeit	450 RPM	450 RPM	450 RPM	450 RPM
Begasungsrate	1 vvm	1 vvm	<b>1,5 vvm</b>	<b>1,5 vvm</b>
ASM	180 µL/L Desmophen 3900	180 µL/L Desmophen 3900	180 µL/L Desmophen 3900	180 µL/L Desmophen 3900
Schaumbildung beobachtet	nein	nein	nein	nein
Zeitpunkt des Eintretens der Sauerstofflimitierung	Ca. 5 h	Ca. 4,75 h	Ca. 3,5 h	Ca. 3,25 h
OD <sub>600</sub> nach 7 Stunden	4,7	5,1	7,0	7,4
Zeitpunkt der letzten Probenahme	8,5 h	8,5 h	8,5 h	8,5 h
OD <sub>600</sub> bei der letzten Probenahme	5,5	6,2	7,9	8,2
BTM bei der letzten Probenahme	3,4 g/L	3,85 g/L	4,9 g/L	5,1 g/L

Die Kultivierungen Nr. 7 und Nr. 8 ergeben zusammen mit Kultivierung Nr. 5 eine Versuchsreihe bei der die Temperaturen von 35°C, 36°C und 37°C getestet wurden. Dabei stellte sich heraus, daß bei den beiden tieferen Temperaturen die exponentielle Wachstumsphase später beginnt und geringere optische Dichten und Biomassen erreicht werden als bei 37°C. Folglich wurde in den weiteren Fermentationen mit 37°C gearbeitet.

In den Kultivierungen Nr. 9 und Nr. 10 wurde der pH-Wert auf 6,8 bzw. 6,5 abgesenkt. Außerdem wurde die Begasungsrate leicht erhöht auf 1,5 vvm, statt 1 vvm in allen vorherigen Fermentationen. Die Kultivierungen Nr. 9 und Nr. 10 sind ansonsten annähernd mit Kultivierung Nr. 5 vergleichbar, so daß sie eine Versuchsreihe zu den pH-Werten 7,0, 6,8 und 6,5 bilden. Es zeigte sich, daß die Biomasseproduktion bei niedrigeren pH-Werten etwas besser verlief. Mit einem pH-Wert von 7,0 ergab sich nach 9,5 Stunden eine OD von 8,1 und eine geerntete Biotrockenmasse von 4,8 g/L. Bei pH 6,8 waren es 4,9 g/L bereits nach 8,5 Stunden und es wurde eine optische Dichte von 7,9 erreicht. Mit einem pH-Wert von 6,5 ergab sich sogar eine noch etwas höhere BTM von 5,1 g/L und ein OD-Wert von 8,2 nach 8,5 Stunden. Die Verbesserungen in der Biomasseproduktion durch die leichte Absenkung des pH-Werts waren zwar nicht groß, aber es ließ sich doch eine Abfolge erstellen, bei der pH 6,5

gegenüber den anderen getesteten Werten die besseren Ergebnisse erbrachte. Daher wurde der pH-Wert 6,5 bei den weiteren Kultivierungen beibehalten.

Zusammenfassend läßt sich zu den Wachstumsexperimenten im Bioreaktor sagen, daß ausgehend von den im Schüttelkolben gewonnenen Erkenntnissen folgende Grundparameter als geeignet ermittelt werden konnten:

- 2YT-Nährmedium
- Temperatur 37°C
- 180 µL/L Desmophen 3900
- Begasungsrate 1,5 vvm
- pH 6,5

Mit diesen Kulturführungsparametern lassen sich in ca. 8,5 Stunden Fermentationszeit Bio-trockenmassen von ca. 5 g/L erreichen. Sie dienen als Ausgangspunkt für die folgenden Experimente zur Endostatinproduktion.

Die Wahl der Rührergeschwindigkeit, die mit 450 bis 500 RPM für eine *E. coli*-Kultivierung recht niedrig ist, wurde nach Vorversuchen im Bioreaktor (nicht aufgeführt) getroffen. Sie konnte nicht höher gewählt werden, weil sich die Bakterien sehr empfindlich gegenüber hohen (>550 RPM) Rührergeschwindigkeiten gezeigt hatten. Dies äußerte sich derart, daß die Zellen teilweise länger als 7 Stunden in der Akzelerationsphase blieben, also nur sehr langsames Wachstum zeigten, um dann nach einer Senkung der Drehzahl unvermittelt in die exponentielle Phase überzugehen. Es wurde in den späteren Experimenten zur Produktionsoptimierung versucht die Rührerdrehzahl nach einer moderaten Anfangsphase zu steigern, wenn die Zellen die exponentielle Phase erreicht hatten, aber die Bioreaktor-Steuereinheit erwies sich für diese geplante Regelungsart als nicht geeignet.

## 4.2.2 Endostatinproduktion in Bioreaktorkultivierungen

Wenn das Ziel der Kultivierung die Biomasseproduktion wäre, ließe sich diese sicherlich problemlos noch steigern, indem höhere Begasungsraten, höhere Rührergeschwindigkeiten, ein nährstoffreicheres Medium und eventuell noch tiefere pH-Werte, oder höhere Temperaturen gewählt würden. Für die Produktion des rekombinanten Proteins Endostatin aber ist zuerst eine Induktion der Protein-Expression notwendig. Dies bedeutet für die Führung der Kultivierung, daß nach einer anfänglichen Phase in der die Zellen auf eine ausreichende Zellzahl anwachsen sollen, und daher also gute Wachstumsbedingungen eingestellt werden müssen, eine Umstellung auf gute Produktionsbedingungen stattfinden muß. Wie diese Umstellung durch die Variation eines oder mehrerer Kulturführungsparameter bewirkt werden konnte soll anhand einer kurzen Zusammenstellung der durchgeführten Kultivierungen und einiger ausführlicher beschriebener Beispiele gezeigt werden.

### 4.2.2.1 Wege zur Produktivitätsoptimierung. Kultivierung Nr. 11 als Beispiel für schlechte Produktivität

Startet man die Protein-Expression durch Zugabe von IPTG, ohne die optimalen Wachstumsbedingungen zurückzunehmen, so kommt es nur zu weiterem Wachstum ohne nachweisbare Produktion des Zielproteins. Dies war z. B. in Kultivierung Nr. 11 gut zu beobachten. Diese Fermentation wurde mit den aus den Wachstumsexperimenten ermittelten Parametern durchgeführt: 2YT-Nährmedium, Temperatur 37°C, Begasungsrate 1,5 vvm, pH 6,5, 180 µL/L Desmophen 3900. Nur die Rührergeschwindigkeit wurde leicht gesenkt: Als Anfangswert wurde 400 RPM eingestellt, später im Kultivierungsverlauf wurde dann eine automatische Regelung mittels Variation der Rührergeschwindigkeit gestartet.

In Kultivierung Nr. 11 wurde gewartet bis der  $pO_2$ -Wert fast die Nulllinie erreicht hatte, dann wurde mit 2 mM IPTG induziert und über die Biostat-Steuereinheit eine Regelung auf einen konstanten  $pO_2$ -Wert von 10% gestartet (Abb. 24). (Die Gründe für diese Art der Versuchsführung werden in 4.2.2.2 genauer dargelegt.) Die optische Dichte lag zu diesem Zeitpunkt bereits bei ca. 3,2. Über die Steuereinheit wurde automatisch die Rührergeschwindigkeit entsprechend der gemessenen  $pO_2$ -Werte erhöht oder gesenkt um durch den höheren oder niedrigeren Sauerstoffeintrag auf den eingestellten  $pO_2$ -Sollwert zu kommen. Dies führte auch nach der Induktion noch zu einem weiteren exponentiellen Wachstum der Bakterien. Erst ca 8,5 Stunden nach Kultivierungsbeginn wurde eine stationäre Phase erreicht, was am Kurvenver-

lauf der optischen Dichte erkennbar ist (Abb. 24 und 25). Am Ende der Kultivierung nach 10,5 Stunden lag der Wert der optischen Dichte bei 6,5 und es wurde eine Biotrockenmasse von ca. 2,7 g/L erreicht. Bei der späteren Aufarbeitung zeigte sich aber, daß trotz des guten Zellwachstums kein Endostatin in nachweisbarer Menge produziert wurde.

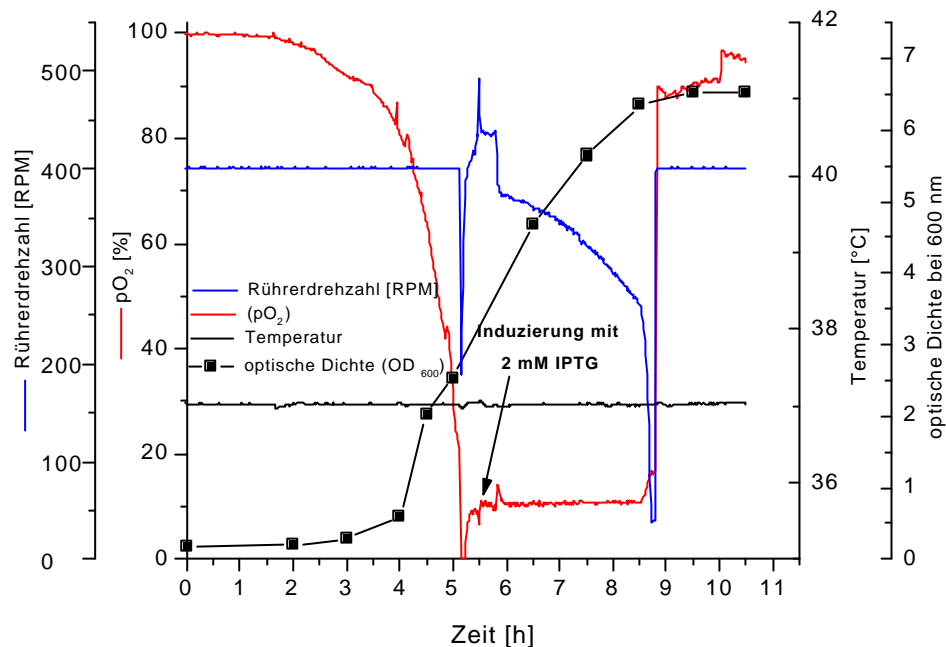


Abb. 24: Bioreaktorkultivierung Nr. 11,  $pO_2$  und Temperatur vs. optische Dichte und BTM (Online-Daten vs. Offline-Daten)

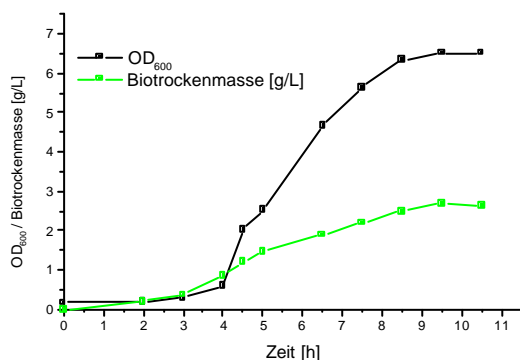


Abb. 25: Bioreaktorkultivierung Nr. 11, optische Dichte und BTM

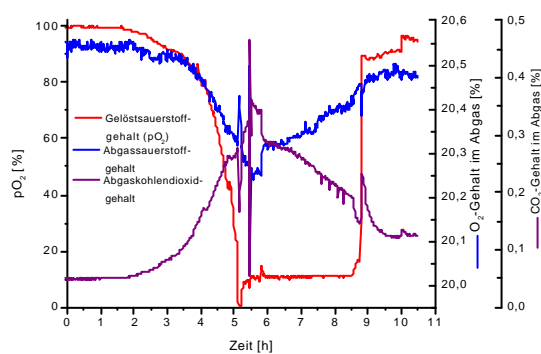


Abb. 26: Bioreaktorkultivierung Nr. 11, Abgas- $O_2$ -, Abgas- $CO_2$ - vs. Gelöstsauerstoff

In Abb. 26 sind die Verläufe von Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt im Abgas gegen den Verlauf des  $pO_2$ -Wertes während der Kultivierung aufgetragen. Abgas- $O_2$  und Abgas- $CO_2$  verhalten sich fast genau spiegelbildlich: Erreicht die Abgas- $O_2$ -Kurve ein Minimum, so fin-

det sich in der Abgas-CO<sub>2</sub>-Kurve zur selben Zeit ein Maximum. Ganz deutlich läßt sich in Kultivierung Nr. 11 anhand der beiden Abgaskurven das Wachstum der Bakterien verfolgen. Die ersten 2,5 Stunden nach dem Animpfen bleiben die Werte konstant, dann kommt es beim Abgaskohlendioxidgehalt erst zu einem langsamen, dann exponentiellen Anstieg. Analog dazu sinkt der Abgassauerstoffgehalt erst langsam und dann ab der 4. Stunde exponentiell ab. Nach etwa 5,25 Stunden Kultivierungszeit sinkt der pO<sub>2</sub>-Wert auf Null, was sich auch in einem Maximum an Abgaskohlendioxid und einem Minimum an Abgassauerstoff auswirkt.

#### **4.2.2.2 Entwicklung einer optimierten Kulturführung**

Die Kulturführung im Bioreaktor wurde aufbauend auf den Versuchen zum Wachstumsverhalten und vielen anderen Experimenten optimiert. Dazu wurden jeweils nur möglichst wenige Parameter wie z. B. Begasungsrate, Rührergeschwindigkeit, pH-Wert, IPTG-Konzentration und Induktions- und Erntezeitpunkte geändert. Je nachdem wie die Kultur reagierte wurden die günstigeren Einstellungen beibehalten oder in den nächsten Versuchen weiterverändert. Dies führte nach und nach zur Entwicklung eines Modellverlaufs für eine optimierte Kultivierung.

Um beurteilen zu können wie gut oder schlecht die Produktivität bei einer Kultivierung war, mußte die Menge des produzierten Endostatins quantifiziert werden. Dies war problematisch, weil die für Zellaufschluß und Ni-NTA-Chromatographie benutzten Puffer alle sehr stark salzhaltig sind und jede einfache Meßmethode wie z. B. photometrische Tests wie Lowry- oder Bradford-Test stören. Ebenso scheiterte der Versuch die Kapillarelektrophorese einzusetzen an der Empfindlichkeit gegenüber den Pufferlösungen. Eine direkte Konzentrationsmessung z. B. aus den FPLC-Eluaten der Ni-NTA-Chromatographie war nicht möglich. Versuche die bei den FPLC-Läufen mit der Ni-NTA-Chromatographie erhaltenen Chromatogramme mit einem Endostatin-Standard zu kalibrieren und durch Integration der Eluatpeaks auf die Konzentration zu schließen erwiesen sich als nicht reproduzierbar. Für die Entwicklung einer HPLC-Methode fehlte sowohl die Zeit, als auch die Kapazität an den vorhandenen Anlagen, außerdem wäre auch hierfür eine Entsalzung unumgänglich gewesen. Ein ELISA-Test für Endostatin wäre zwar kommerziell erhältlich gewesen, aber die Anwendbarkeit war wegen des koexprimierten N-terminalen 6xHis-Tag unsicher.

Es wurden daher die Schnittgrenzen des Fraktionssammlers für die FPLC-Eluatpeaks der Ni-NTA-Chromatographie so großzügig gesetzt, daß der vollständige Peak gesammelt wurde. Dann wurde das Material über Dialyse oder FPLC-Gelchromatographie vollständig entsalzt

---

und anschließend durch Lyophilisation volumenreduziert bis zur Trockne. Das so gewonnene Rohprodukt wurde in einem kleinen, definierten Volumen 0,1% TFA wieder gelöst und nach entsprechender Verdünnung mittels Lowry-Test die Proteinkonzentration bestimmt.

Da es bei der Prozedur von der Ernte des Reaktorinhalts über den Zellaufschluß, die Proteinisolierung und die Entsalzung viele Schritte gibt, die mit schwer kalkulierbaren Produktverlusten einhergehen können (z. B. die Beladung der Ni-NTA-Säule, eventuelles nicht vollständiges Eluieren von der Entsalzungssäule, bzw. Verluste bei der Dialyse, Verspritzen winziger Mengen bei der Lyophilisation), sind die gemessenen Konzentrationen sicherlich fehlerbehaftet und gegenüber den wahren Werten zu niedrig.

In den Tabellen 7 und 8 wird anhand der wichtigsten Kultivierungsparameter der Weg beschrieben, der zu den gefundenen Bedingungen geführt hat.

Es werden nur die wichtigsten Details der jeweiligen Kultivierungsverläufe besprochen und die daraus gewonnenen Erkenntnisse und gezogenen Konsequenzen dargestellt. Der Verlauf von Fermentationen mit guter Produktivität der Zellen wird später beispielhaft und im Detail an den Kultivierungen Nr. 15 und 17 gezeigt.



Tabelle 7: Grundparameter der Bioreaktorkultivierungen Nr. 11 bis 14

Kultivierungs-Parameter	Bioreaktorkultivierung			
	Nr. 11	Nr. 12	Nr. 13	Nr. 14
Nährmedium	2YT	Super-LB	<b>Super-LB</b>	LB
Temperatur	37°C	37°C	37°C	37°C, für Induktion gesenkt auf 26°C
pH-Wert	6,5	6,5	6,5	6,5
Rührergeschwindigkeit	400 RPM mit Regelung für pO <sub>2</sub> -Wert (10%)	400 RPM mit Regelung für pO <sub>2</sub> -Wert (20%)	400 RPM konstant	400 RPM konstant
Begasungsrate	1,5 vvm	1,5 vvm	1,5 vvm	1,5 vvm
ASM	180 µL/L Desmophen 3900	200 µL/L Desmophen 3900	200 µL/L Desmophen 3900	180 µL/L Desmophen 3900
IPTG-Konzentration	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM
Zeitpunkt der Induktion	5,5 h	4,25 h	4 h	5,25 h
OD <sub>600</sub> zum Zeitpunkt der Induktion	3,2	2,6	0,66	1,4
Zeitpunkt des Eintretens der Sauerstofflimitierung	Ca. 5,25 h	Ca. 4 h	Ca. 4 h	Keine Limitierung! Nach ca. 4 h Minimum
Auf welchen pO <sub>2</sub> -Wert abgesunken?	0%	10%	20%	72%
Zeitpunkt der Ernte (Gesamtkultivierungszeit)	10,5 h	9 h	9 h	9,5 h
Einwirkdauer des IPTG	5 h	4,75 h	5 h	4,25 h
OD <sub>600</sub> bei der Ernte	6,5	5,5	3,1	2,4
BTM bei der Ernte	2,7 g/L	2,4 g/L	1,7 g/L	1,4 g/L
Produzierte Endostatin-konzentration bezogen auf die Rohsuspension (Lowry-Test aus den Lyophilisaten)	Keine Produktion	Keine Produktion	Endostatin zwar qualitativ nachweisbar, aber nicht quantifizierbar	31,22 mg/L
Spezifische Endostatin-konzentration bezogen auf die BTM	Keine Produktion	Keine Produktion	Endostatin zwar qualitativ nachweisbar, aber nicht quantifizierbar	22,3 mg Endostatin/g BTM

Die Kultivierung Nr. 11, die schon in 4.2.2.1 detailliert beschrieben wurde, war die erste durchgeführte Bioreaktorkultivierung mit dem Ziel der Endostatinproduktion. Zu diesem Zeitpunkt war noch unklar, ob sich das immer wieder beobachtete Phänomen des Absinkens des pO<sub>2</sub>-wertes bis auf Null und der anschließende schnelle Wiederanstieg (s. Abb. 20) im Zusammenhang mit der geplanten Endostatinproduktion ausnutzen ließe. Unter der Annahme,

daß aerobe Bedingungen bessere Produktionsbedingungen wären, wurde deshalb zunächst versucht das komplette Absinken des  $pO_2$ -Wertes bis auf 0% zu verhindern und einen von der Steuereinheit über Variation der Rührergeschwindigkeit (s. Abb. 24) geregelten Minimum-Gelöstsauerstoffwert von 10% konstant zu halten. In dieser Phase mit geringer Sauerstoffversorgung, die aber nicht ganz auf 0% abfallen sollte, hätte durch die Induktion mit IPTG die Proteinproduktion starten sollen. Die Idee hinter diesem Vorgehen war, daß man so einerseits die Induktion bei höheren Zelldichten starten könnte um bei der späteren Ernte mehr Biomasse zur Aufarbeitung zur Verfügung zu haben und andererseits durch den konstant gehaltenen Gelöstsauerstoffwert leicht reproduzierbare und vergleichbare Kultivierungsbedingungen zu haben.

Leider sank der  $pO_2$ -Wert in der exponentiellen Phase so schnell, daß die Regelung mittels Änderung der Rührergeschwindigkeit zu schwerfällig reagierte und nicht in der Lage war, ein „Durchschlagen“ des Wertes auf 0% zu verhindern. Die Bakterien stellten also genauso wie in den Wachstumsversuchen ihren Stoffwechsel auf anaerobes Wachstum um und kehrten – unter den gegebenen Bedingungen – auch nicht wieder in den ursprünglichen Zustand zurück. Dies zeigte sich deutlich am Verlauf der automatisch geregelten Rührergeschwindigkeit. Nach der Umstellung von konstanter auf geregelte Rührergeschwindigkeit kommt es erst zu einem kurzen gerätebedingten Absinken bis die Regelung beginnt, dann ist ein kurzer Anstieg auf höhere Geschwindigkeiten von maximal 495 RPM zu verzeichnen, der etwa 35 Minuten dauert. Dies stimmt überein mit der Phase in der der  $pO_2$ -Wert auch in anderen Fermentationen in einem Minimum verharrte (s. Abb. 20). Danach wird der Rührer immer langsamer, bis er schließlich in der ca. 8,75. Stunde der Kultivierung fast stehenblieb. Daraufhin wurde wieder auf die konstante Rührergeschwindigkeit von 400 RPM umgestellt und der  $pO_2$ -Wert schnellte sofort in die Höhe.

Wie schon in 4.2.2.1 geschrieben, ließ sich in der späteren Aufarbeitung kein Endostatin nachweisen, die gewählten Kultivierungsbedingungen waren also für eine Produktion nicht gut geeignet.

Trotzdem wurde zunächst am Gedanken einer  $pO_2$ -Regelung festgehalten. Kultivierung Nr. 12 (ohne Abbildung) wurde mit Super-LB-Medium und nur halb so hoher IPTG-Konzentration durchgeführt. Die sonstigen Bedingungen waren vergleichbar mit Kultivierung Nr. 11, nur sollte diesmal durch einen früheren Beginn der Regelung und auch eine frühere Induktion der Proteinexpression das Absinken auf 0% und damit anaerobe Bedingungen verhindert werden. Außerdem wurde der Soll- $pO_2$ -Wert mit 20% doppelt so hoch eingestellt wie

in der vorangegangenen Fermentation. Die Regelung wurde gestartet, als der  $pO_2$ -Wert ca. 50% betrug und es gelang auch das Absinken abzufangen. Allerdings zeigte sich auch hier wieder, daß die Biostat-Steuereinheit nur zu einer sehr groben Regelung imstande war, so daß im Mittel zwar der 20%-Wert gehalten wurde, es aber zu großen Abweichungen nach oben und unten kam, bevor gegengesteuert wurde. Auch in dieser Kultivierung wurde kein Endostatin in nachweisbarer Menge produziert.

Kultivierung Nr. 13 (ohne Abbildung) wurde ohne  $pO_2$ -Regelung bei konstanter Rührergeschwindigkeit von 400 RPM und einer Temperatur von  $37^\circ C$  in Super-LB-Medium durchgeführt. Die Induktion wurde diesmal anhand der optischen Dichte vorgenommen, wie es auch in den Versuchen im Schüttelkolben gefunden wurde (s. 4.1.5.2). Nach ca. 4 Stunden hatte die optische Dichte einen Wert von 0,66 erreicht und es wurde mit 2 mM IPTG induziert. Kurz nach der Induktion erreichte die  $pO_2$ -Kurve ein Minimum, fiel aber nur auf 20%, nicht bis auf Null. Auch fehlte die sonst üblicherweise gefundene Phase von 30 bis 50 Minuten Dauer, in der der  $pO_2$ -Wert auf dem Minimum-Niveau blieb. Stattdessen stieg der  $pO_2$ -Wert sofort wieder an und pendelte sich bis zum Abbruch der Kultivierung auf einen konstanten Wert von ca. 85% ein. Die Biotrockenmasse war mit 1,7 g/L deutlich schlechter als die bisher erzielten Biomassen. Bei der Aufarbeitung konnte zwar auf den SDS-PAGE-Gelen deutlich die Endostatin-Bande identifiziert werden, bei der Elution der Ni-NTA-Säule waren die gefundenen Mengen aber so gering, daß eine weitere Isolierung aussichtslos erschien und deshalb nicht durchgeführt wurde. Die Endostatin-Konzentration konnte in diesem Versuch daher nicht quantifiziert werden.

In Kultivierung Nr. 14 (Abbildung 27) wurde zum erstenmal im Bioreaktor mit einem Temperaturprofil gearbeitet. Der im Schüttelkolben durchgeführte Vorversuch zu diesem Thema (4.1.5.4) hatte mit einem Absenken von  $37^\circ C$  auf  $28^\circ C$  kein eindeutiges Ergebnis gebracht, deshalb wurde in Kultivierung Nr. 14 auf eine noch tiefere Temperatur von  $26^\circ C$  abgesenkt. Die Temperaturänderung wurde nach ca. 4,25 Stunden vorgenommen, als die optische Dichte einen Wert von ca. 0,6 erreicht hatte. Erst als eine Temperatur von  $26^\circ C$  erreicht war, wurde mit 1 mM IPTG induziert. Da der Thermostat der Biostat-Steuereinheit nur einen geringen Kühlwasserdurchfluß hatte dauerte die Absenkphase von  $37^\circ C$  auf  $26^\circ C$  fast eine Stunde, was bedeutete, daß erst bei einer ungünstig hohen  $OD_{600}$  von ca. 1,4 induziert werden konnte. Bemerkenswert war aber, daß es trotz der zu langsamen Temperaturänderung schon zu einer deutlich erkennbaren Wachstumsverlangsamung der Bakterien gekommen war, die sich im

Verlauf der  $pO_2$ - und der OD-Kurve zeigte. Es kam zum ersten Mal nicht zu einer Sauerstofflimitierung, sondern der  $pO_2$ -Wert sank nur auf ein Minimum von 72% ab, bevor er wieder auf Werte  $>80\%$  anstieg. Die Wachstumsverzögerung während der exponentiellen Phase führte außerdem zu nur geringen optischen Dichten von maximal 2,4 nach 9,5 Stunden und einer ebenfalls geringen Biotrockenmasse von 1,4 g/L. Aus den auf die beschriebene Weise (s. 4.2.2.2., Einleitung) aufgearbeiteten FPLC-Eluaten der Ni-NTA-Chromatographie konnte bestimmt werden, daß bei Kultivierung Nr. 14 ca. 31,2 mg Endostatin pro Liter geernteter Rohsuspension produziert wurde.

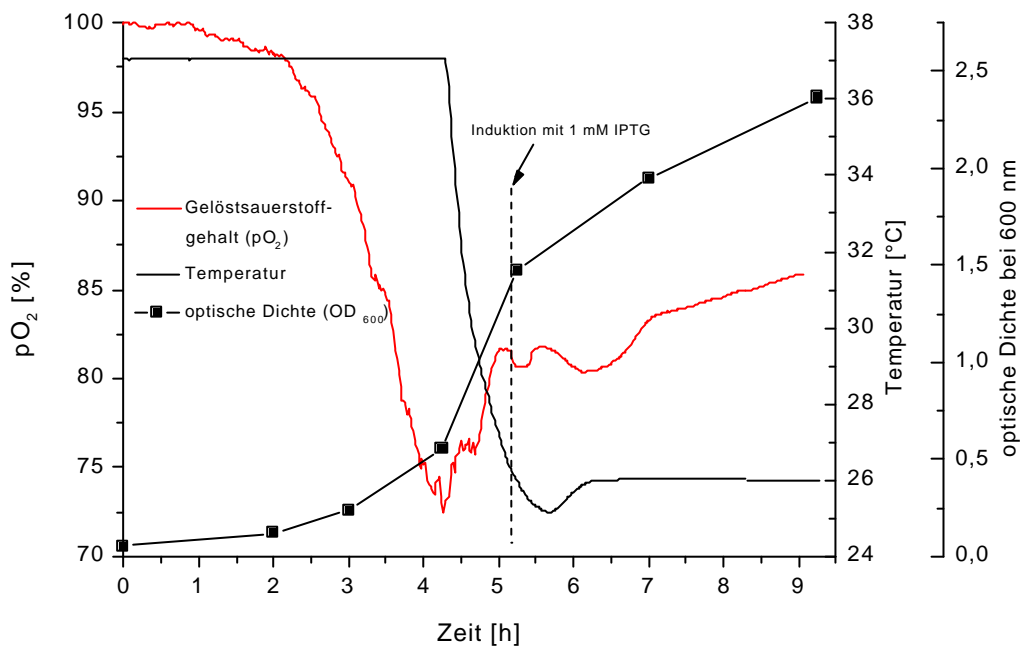


Abb. 27: Bioreaktorkultivierung Nr. 14,  $pO_2$  und Temperatur vs. optische Dichte

Tabelle 8: Grundparameter der Bioreaktorkultivierungen Nr. 15 bis 17

Kultivierungs-Parameter	Bioreaktorkultivierung		
	Nr. 15	Nr. 16	Nr. 17
Nährmedium	2YT	2YT	LB
Temperatur	37°C, für Induktion gesenkt auf 30°C	37°C, für Induktion gesenkt auf 30°C	37°C, für Induktion gesenkt auf 30°C
pH-Wert	6,5	6,5	6,5
Rührergeschwindigkeit	450 RPM konstant	450 RPM konstant	450 RPM konstant
Begasungsrate	2,5 vvm	2,5 vvm	3,0 vvm
ASM	180 µL/L Desmophen 3900	180 µL/L Desmophen 3900	180 µL/L Desmophen 3900
IPTG-Konzentration	1 mM	0,5 mM	1 mM
Zeitpunkt der Induktion	3,25 h	3,5 h	6 h
OD <sub>600</sub> zum Zeitpunkt der Induktion	0,85	0,55	0,79
Zeitpunkt des Eintretens der Sauerstofflimitierung	Keine Limitierung! Nach ca. 3,25 h Minimum	Keine Limitierung! Nach ca. 3,5 h Minimum, dann Anstieg auf Plateau von 85%, nach weiteren 3 h Abfall des pO <sub>2</sub> -Werts bis Abbruch der Fermentation	Keine Limitierung! Nach ca. 6,25 h Minimum
Auf welchen pO <sub>2</sub> -Wert abgesunken?	67%	80%	87%
Zeitpunkt der Ernte (Gesamtkultivierungszeit)	8,25 h	9 h	10,5 h
Einwirkdauer des IPTG	5 h	5,5 h	4,5 h
OD <sub>600</sub> bei der Ernte	2,5	3,2	2,1
BTM bei der Ernte	1,4 g/L	1,5 g/L	0,6 g/L
Produzierte Endostatin-konzentration (Lowry-Test aus den Lyophilisaten)	48,21 mg/L	40,47 mg/L	53,05 mg/L
Spezifische Endostatin-konzentration bezogen auf die BTM	34,44 mg Endostatin/g BTM	26,98 mg Endostatin/g BTM	88,42 mg Endostatin/g BTM

Da die Produktausbeute in Kultivierung Nr. 14 mit nur 22,3 mg Endostatin/g BTM recht niedrig war, aber auch nur geringe Biomassen (1,4 g/L) erreicht wurden, sollte in der nächsten Kultivierung die Temperatur weniger tief gesenkt werden. Dies hat auch den Vorteil, daß der Thermostat eine geringere Temperaturdifferenz bewältigen muß, was in kürzerer Zeit geschehen kann. Die Induktion sollte diesmal im günstigen OD-Bereich von 0,5 bis 0,8 erfolgen. Außerdem wurde die Begasungsrate von 1,5 auf 2,5 vvm erhöht, da sich in den vorherigen

Versuchen abgezeichnet hatte, daß die Vermeidung der Sauerstofflimitierung ein wichtiger Parameter für die Produktbildung sein könnte.

Die Bakterien wurden in Kultivierung Nr. 15 nach ca. 3,25 Stunden, als eine OD von 0,85 erreicht war, mit 1 mM IPTG induziert. Die Temperatur wurde 5 Minuten vorher von 37°C auf 30°C gesenkt, was nur ca. 30 Minuten dauerte. Wie in Abbildung 28 anhand des Verlaufs der optischen Dichte zu erkennen ist, begann ab der 3. Stunde die exponentielle Wachstumsphase, was sich in einem steilen Anstieg der OD-Werte und einem gleichzeitigen schnellen Absinken des  $pO_2$ -Wertes bemerkbar macht. Allerdings steigt die OD nur auf ca. 2,0 an und flacht dann ab, um bis zum Kultivierungsende nach 8,25 Stunden einen Wert von 2,5 zu erreichen. An der Kurve der Biotrockenmasse (ebenfalls Abbildung 28) wird deutlich, daß die Temperatursenkung nach 3,25 Stunden einen stark dämpfenden Einfluß auf das Zellwachstum hatte. Die Kurve steigt bis zur 3. Stunde steil an, knickt dann aber abrupt ab und bleibt bis zur 7,5. Stunde auf einem fast konstanten Wert von ca. 1 g/L. Erst kurz vor Ende der Fermentation steigt der Wert noch auf 1,4 g/L an.

Besonders wichtig ist der Verlauf der  $pO_2$ -Kurve: Zwar fällt sie zum Beginn der exponentiellen Phase steil ab, wie es auch in vielen vorherigen Kultivierungen gefunden wurde, aber hier erreicht sie ein Minimum bei ca. 63% und steigt dann sofort wieder steil an um schließlich auf einem konstanten Niveau von etwa 90% zu bleiben.

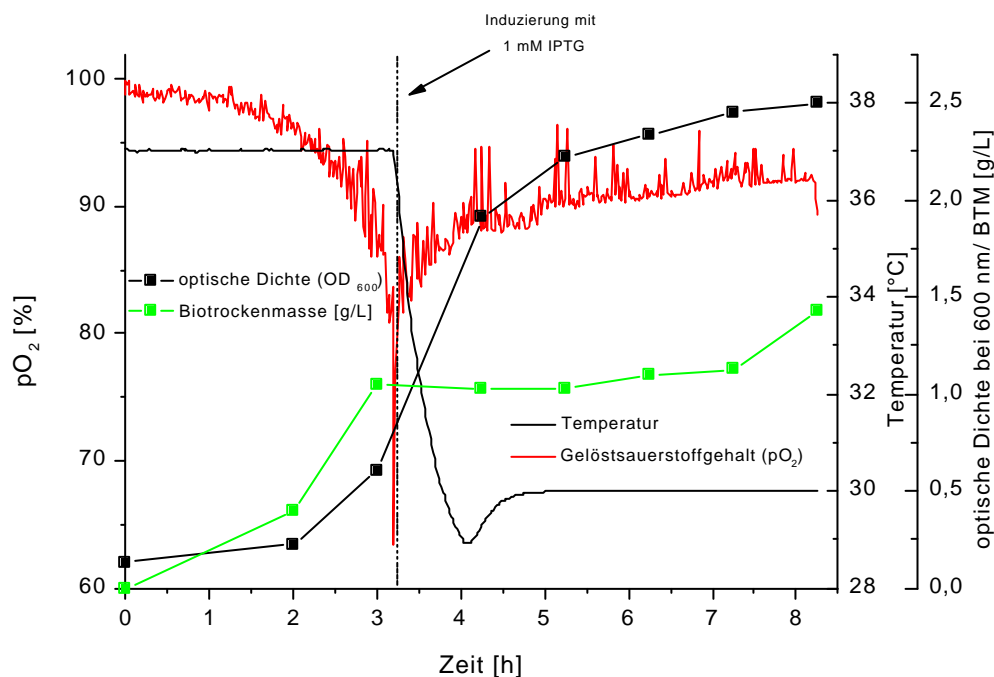


Abb. 28: Bioreaktorkultivierung Nr. 15,  $pO_2$  und Temperatur vs. optische Dichte und BTM

Die Endostatin-Ausbeute war bei Kultivierung Nr. 15 mit 34,44 mg Endostatin/g BTM schon wesentlich besser als bei der vorherigen Kultivierung, obwohl optische Dichte und bei der Ernte erreichte Biotrockenmasse fast identisch waren. Der Unterschied zwischen den Kultivierungen Nr. 14 und 15 lässt sich am ehesten dem weniger tiefen Temperatursprung und der besseren Sauerstoffversorgung durch die höhere Begasungsrate zuordnen.

Kultivierung Nr. 16 (ohne Abbildung) wurde unter fast identischen Bedingungen durchgeführt wie Kultivierung Nr. 15, nur die Konzentration an IPTG zur Induktion wurde mit 0,5 mM geringer gewählt. Die Kurvenverläufe waren denen in Kultivierung Nr. 15 sehr ähnlich, auch die erreichten OD- und Biotrockenmassewerte waren vergleichbar. Allerdings wurde mit ca. 27 mg Endostatin/g BTM weniger Endostatin produziert als in Kultivierung Nr. 15. Ein Grund dafür kann die geringere IPTG-Konzentration sein, deshalb wurde in der nächsten Fermentation wieder mit 1 mM induziert.

Kultivierung Nr. 17 sollte mit einer höheren Begasungsrate als die vorherigen Fermentationen durchgeführt werden. Obwohl die Bakterien in der Anwachphase zwar empfindlich auf hohe Rührergeschwindigkeiten reagieren, hatte sich doch eine stärkere Begasung als günstig erwiesen. Die Begasung mit Druckluft wurde daher in dieser Kultivierung auf 3 vvm (6 L/min), gegenüber 2,5 vvm (5 L/min) in den vorherigen Versuchen, erhöht. Da bei dieser Kultivierung viele Offline-Probenahmen geplant waren, die in ihrer Summe zu einer Reduzierung des Flüssigkeitsvolumens um ca. 80 mL führen würden, sollte ein zusätzlicher Feuchtigkeitstrag durch die schnell strömende Abluft vermieden werden. Die Zuluft wurde daher vor dem Reaktoreingang durch eine wassergefüllte Waschflasche geleitet und so vorbefeuchtet (s. 3.5.3.2).

In Kultivierung Nr. 17 dauerte die Akzelerationsphase ungewöhnlich lange. Erst ca. 5,5 Stunden nach dem Animpfen begann die exponentielle Phase. Nach der sechsten Stunde war eine optische Dichte von ca. 0,75 erreicht und es wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die Temperatur wurde 20 Minuten vorher von 37°C auf 30°C gesenkt. Sämtliche Kurvenverläufe sind – abgesehen von der wesentlich längeren Anfangsphase – den in Kultivierung Nr. 15 beobachteten sehr ähnlich: Die optische Dichte steigt zwar nach Erreichen der exponentiellen Phase steil an und geht dann als Auswirkung der Temperatursenkung in einen flacheren Anstieg über, erreicht aber insgesamt am Ende der Fermentation nur einen Wert von 2,1 (s. Abbildung 29 und 30). Auch der Verlauf der Biotrockenmassekurve ist dem aus Kultivierung Nr. 15 ähnlich. Nach dem Anstieg während der exponentiellen Phase geht die Kurve in einen fast konstanten

Teil über. Es werden Biotrockenmassen von nur ca. 0,75 g/L erreicht. Die  $pO_2$ -Kurve sank diesmal nur auf ein Minimum von 86% und pegelte sich danach wieder auf einen konstanten Wert von ca. 93% ein (s. Abbildung 29).

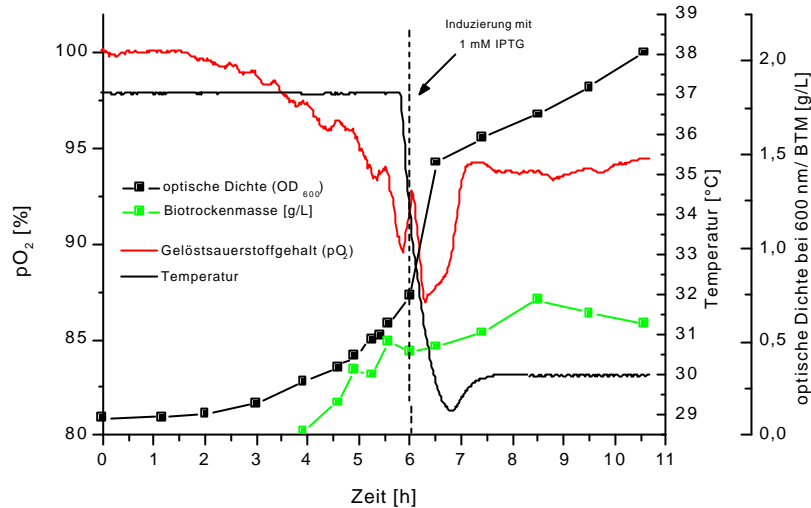


Abb. 29: Bioreaktorkultivierung Nr. 17,  $pO_2$  und Temperatur vs. optische Dichte und BTM (Online-Daten vs. Offline-Daten)

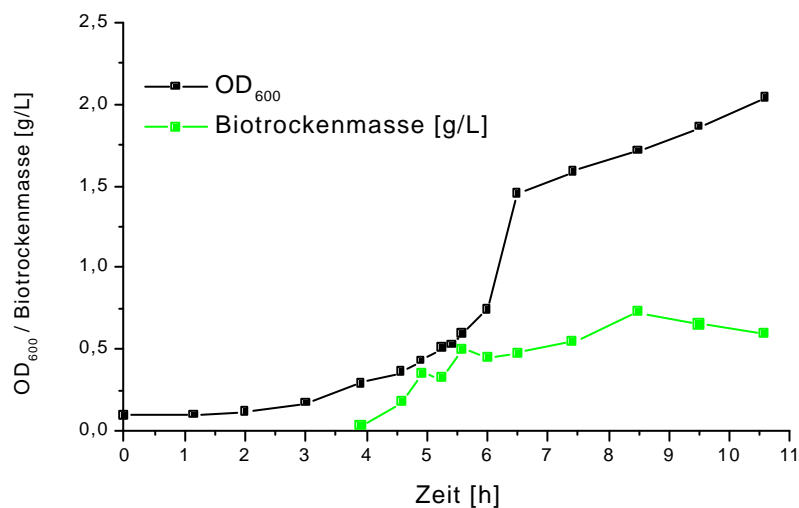


Abb. 30: Bioreaktorkultivierung Nr. 17, optische Dichte und BTM

Trotz der schlechtesten in einer Bioreaktorkultivierung gefundenen Biomasseproduktion (0,6 g/L bei der Ernte) war in Kultivierung Nr. 17 die Endostatin-Produktivität mit 53 mg/L bzw. der spezifischen Ausbeute von 88,42 mg Endostatin/g BTM viel höher als die in Kulti-



vierung Nr. 15. Als wichtig für gute Produktivität lassen sich beim bisherigen Stand der Versuche folgende Faktoren benennen:

- Die Bakterien dürfen keine zu hohe Zelldichte erreichen bevor die Proteinexpression gestartet wird. Eine optische Dichte von 0,5 bis maximal 0,75 kennzeichnet den Beginn der exponentiellen Phase zu dem induziert werden sollte.
- Das Wachstum muß vor der Induktion durch Temperatursenkung gebremst werden.
- Der  $pO_2$ -Wert darf nicht zu tief absinken. In allen Fällen, in denen der  $pO_2$ -Wert bis auf Null gefallen ist, konnte keine Produktivität der Bakterien mehr festgestellt werden.

### 4.3 Produktisolierung, -reinigung und -identifizierung

Anhand der Kultivierung Nr. 17 soll zusammenfassend der Ablauf der Produktisolierung, -reinigung und der -identifizierung dargestellt werden. Die Kultivierung, deren Verlauf bereits beschrieben wurde (s. 4.2.2.2), wurde ca. 4,5 Stunden nach der Induktion mit 1 mM IPTG abgebrochen. Insgesamt 880 mL Zellsuspension wurden geerntet und unter Kühlung ( $4^{\circ}C$ ) abzentrifugiert (3345 g, 30 Minuten). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets einmal mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde unter denaturierenden Bedingungen lysiert (s. 3.8.1.3). Das klare Lysat wurde dann auf die Ni-NTA-Säule aufgetragen und am FPLC-System mit den beschriebenen Puffern für denaturierende Bedingungen gewaschen und eluiert (s. 3.8.5.2).

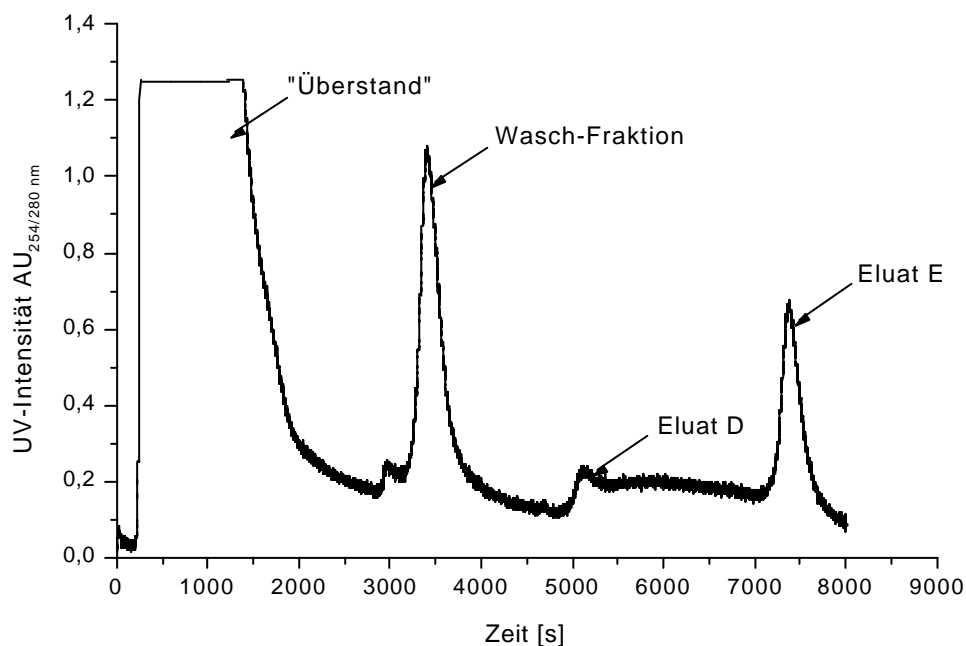


Abb. 31: FPLC-Chromatogramm der Trennung der Lysatbestandteile von Kultivierung Nr. 17 mit Ni-NTA-Superflow

Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, eluierte die Hauptproduktmenge erst in Schritt E (Eluat E bei pH 4,5). Die verschiedenen Fraktionen wurden gesammelt. Für die weitere Aufarbeitung wurde nur die Eluat-E-Fraktion weiterverwendet, die anderen Fraktionen wurden für eine spätere Analyse eingefroren. Die Schnittgrenzen für die Fraktion wurden so gesetzt, daß ein Volumen von ca. 12 mL aufgefangen wurde. Die Probe lag in sehr stark salzhaltiger Lösung vor, daher folgte zunächst ein Entsalzungsschritt. Es wurde 2 Stunden mit viermaligem Wasserwechsel gegen Reinstwasser dialysiert. Das danach auf ca. 22 mL angewachsene Probenvolumen wurde eingefroren und anschließend lyophilisiert bis zur Trockne. Das Lyophilisat wurde in 2 mL Wasser aufgenommen. Von dieser aufkonzentrierten Lösung wurden 3,5  $\mu$ L zusammen mit einer verdünnten Probe (1:30) des rohen Lysats und dem Größenstandard auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Wie in Abb. 32 zu sehen ist, findet sich im Bereich von ca. 20 kDa die typische Doppelbande des Endostatins, wie sie auch der Endostatin-Standard zeigt. Allerdings sind auch noch deutliche Verunreinigungen zu erkennen, deren Hauptmenge bei ca. 34 kDa und ca. 50 kDa liegt.

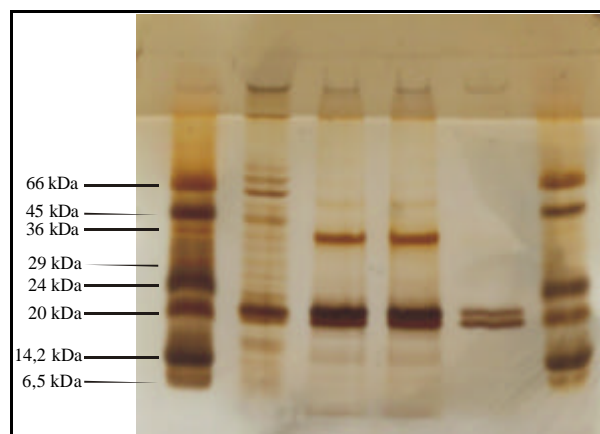


Abb. 32: SDS-PAGE-Gel, Silberfärbung. Belegung von links: Low Molecular Weight Standard (Sigma, 6fach verdünnt), Lysat (denaturierende Lyse, 30fach verdünnt), FPLC-Eluat E (von Kultivierung Nr. 17) nach Aufkonzentrierung, FPLC-Eluat E (von Kultivierung Nr. 17) nach Aufkonzentrierung, Endostatin Standard (BioVision), Low Molecular Weight Standard (Sigma, 10fach verdünnt)

Die Endostatinhaltige Probe wurde mittels präparativer HPLC quantitativ in ihre Bestandteile aufgetrennt, die Fraktionen gesammelt und die gereinigte Endostatin-Fraktion für weitere Analyseschritte verwendet. Dieser und die folgenden massenspektroskopischen Schritte wurden bei der Firma BioVision AG von Dr. Heß durchgeführt.

Es wurde ein HPLC-System mit Gradientenpumpe und Fraktionssammler (HP 1100, Fa. Hewlett Packard, jetzt Agilent Technologys, Waldbronn) verwendet. Zur Trennung wurde eine Reversed-Phase-Trennsäule (PLRP-S 300 $\text{\AA}$ , Fa. Polymer Laboratories Ltd.) mit den

Abmessungen 150 x 4,6 mm eingesetzt. Es wurde ein sehr flacher Eluentengradient (Start ab der 5. Minute mit 30 % Puffer B bis zur 65. Minute mit 50% Puffer B) angewendet, der nach der Elution der Haupt-Produktpeaks nach 35,4 Minuten abgebrochen und durch einen steileren Gradienten (75 % Puffer B Start auf 88 % Puffer B bei Minute 43) ersetzt wurde (s. Abb. 33). Wie in Abb. 33 erkennbar ist, begann die Elution des Hauptpeaks ab der 24. Minute (entspricht 36,4 % Eluent B). Da der Start des Fraktionssammlers 2,4 Minuten nach Start des Chromatographielaufs erfolgt war und in Abständen von 1 Minute gesammelt wurde, handelte es sich bei den für die weitere Analytik abgenommenen Fraktionen um Nr. 24 und 25 (im Chromatogramm markiert).

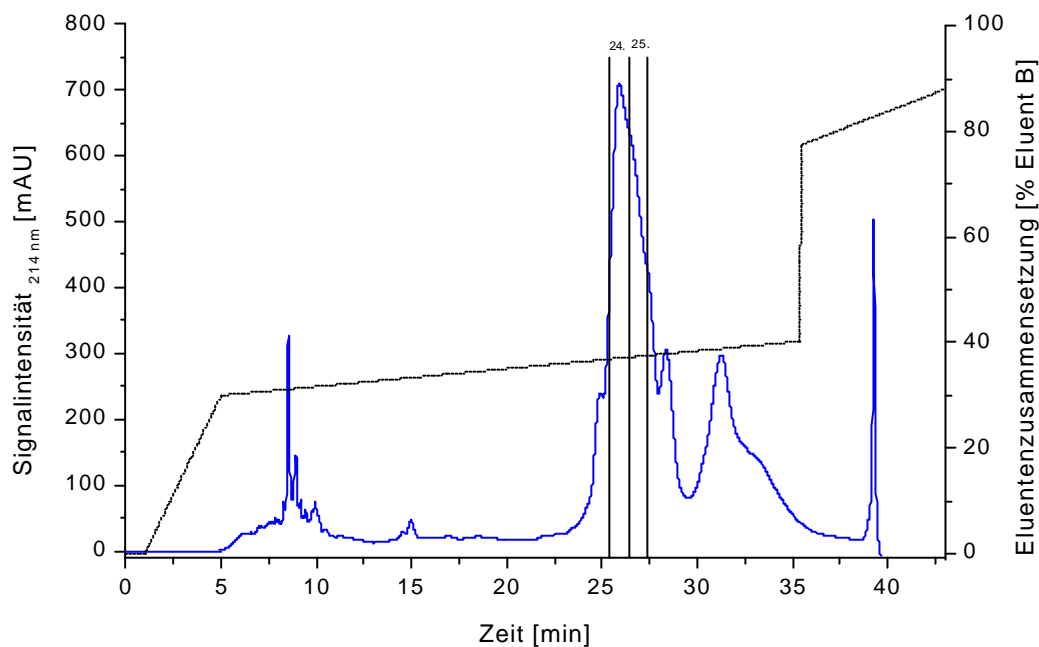


Abb. 33: HPLC-Chromatogramm der durch FPLC (Ni-NTA-Superflow) gewonnenen aufkonzentrierten Probe aus Kultivierung Nr. 17 (Eluent A = 5% Acetonitril (0,06% TFA), Eluent B 100% Acetonitril (0,05% TFA))

Von den Fraktionen 24 und 25 aus dem beschriebenen HPLC-Lauf, sowie einem dem erwarteten Produkt genau entsprechenden Endostatin-Standard (mit N-terminalem 6xHis-Tag und C-Terminal fehlendem Lysin), wurden sowohl MALDI- als auch ESI-Messungen durchgeführt.

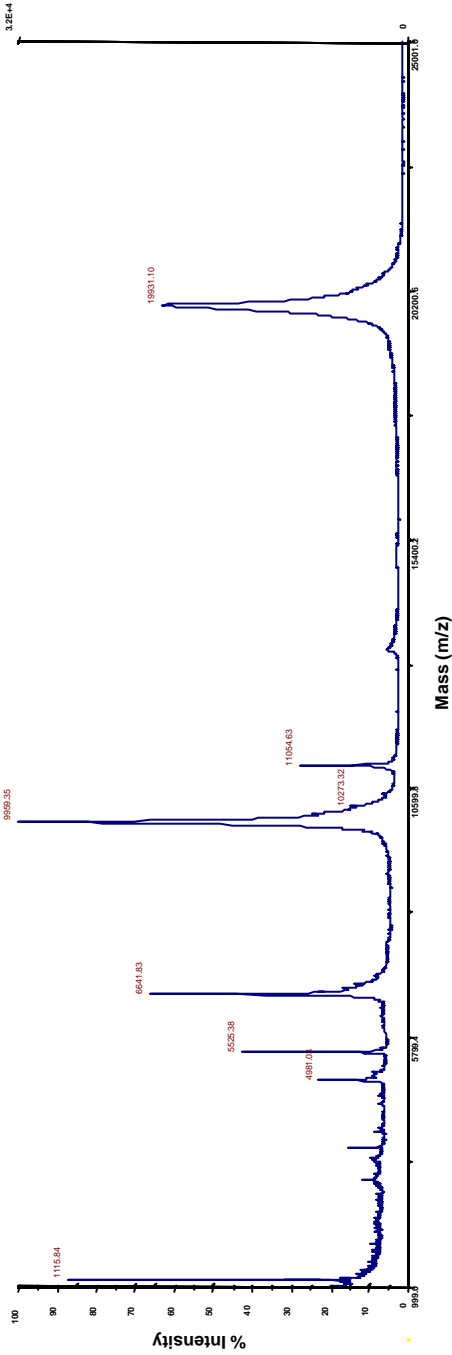


Abb. 34: MALDI-Spektrum des Endostatin-Standards

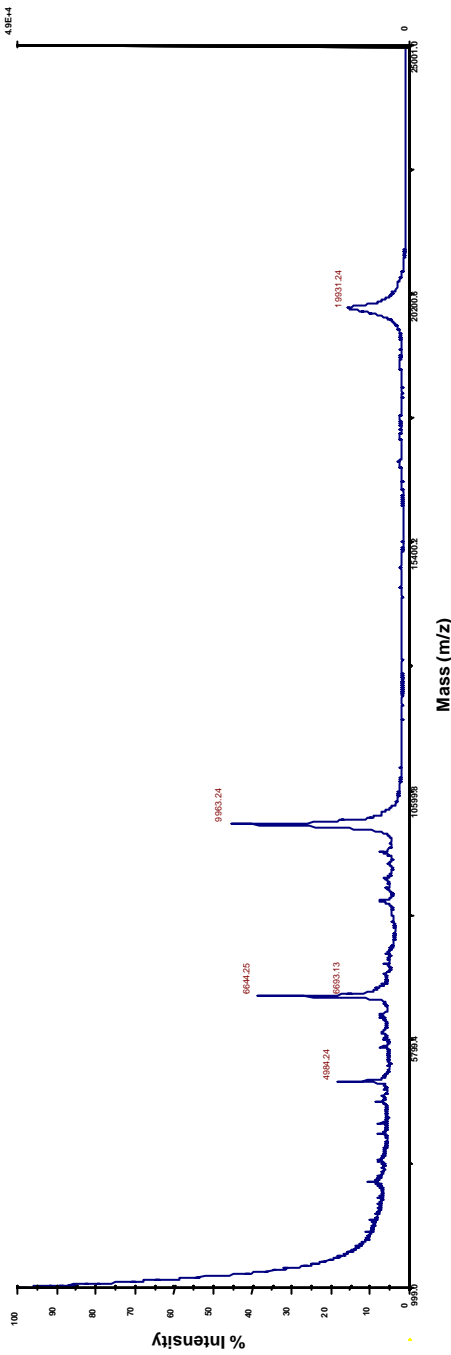


Abb. 35: MALDI-Spektrum der HPLC-Fraktion 24 von Kultivierung Nr. 17

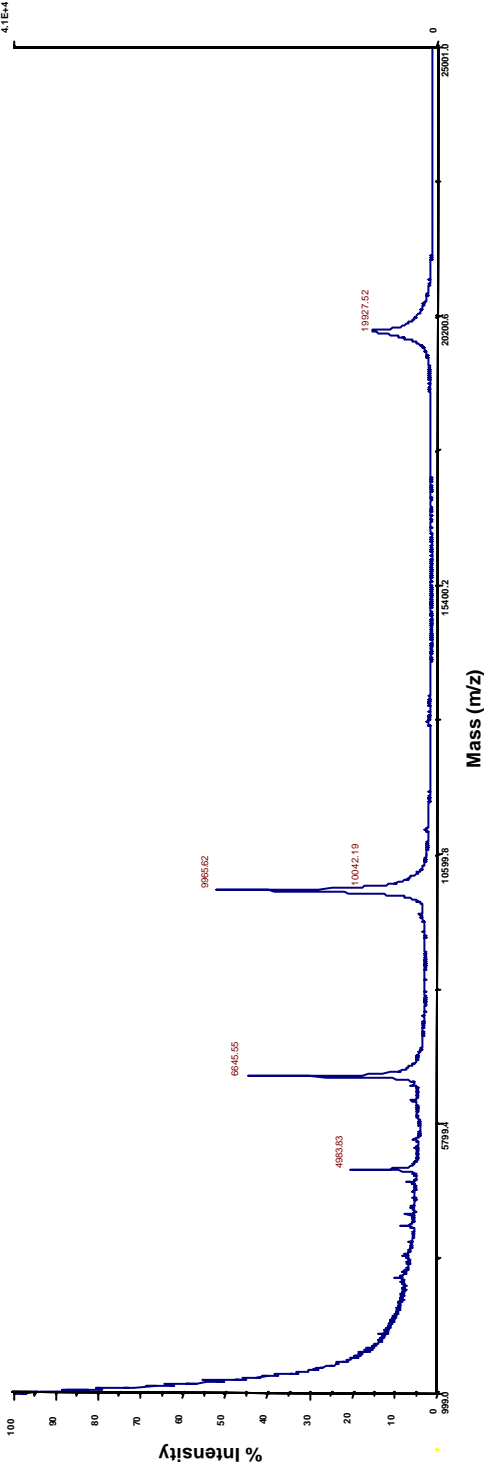


Abb. 36: MALDI-Spektrum der HPLC-Fraktion 25 von Kultivierung Nr. 17

In den Abbildungen 34, 35 und 36 sind die MALDI-Spektren des Endostatin-Standards und der beiden HPLC-Fractionen 24 und 25 gezeigt. Das Peakmuster und die Peaklagen sind in allen drei Spektren fast identisch. Der Haupt-Peak ( $M^+$ ) des Endostatin-Standards liegt bei 19.931,10 atomaren Masseneinheiten (amu). Das entspricht 19.776,35 Da.

Die für Fraktion 24 (19.931,24 amu = 19.776,49 Da) und Fraktion 25 (19.927,52 amu = 19.772,8 Da) gefundenen Werte des  $M^+$ -Peaks liegen so dicht beieinander, daß man davon ausgehen kann, daß es sich um identische Moleküle handelt.

Dies läßt sich auch anhand der mittels ESI-Massenspektrometrie aufgenommenen Spektren des Endostatin-Standards und der beiden HPLC-Fractionen beweisen. Die ESI-Massenspektrometrie liefert exaktere Massen für größere Moleküle als die MALDI-MS.

In Abbildung 37 ist das ESI-Spektrum des Endostatin-Standards gezeigt. Es lassen sich den Peaks vom 11fach- bis zum 20fach geladenen Quasi-Molekülion genaue Massen zuordnen über deren Auswertung mittels Dekonvolution (s. 3.9.3.2) sich eine mittlere Molekülmasse von 19.896,35 amu = 19.741,87 Da errechnen läßt. Die Wertetabelle der Dekonvolution ist als Tabelle 9 angefügt.

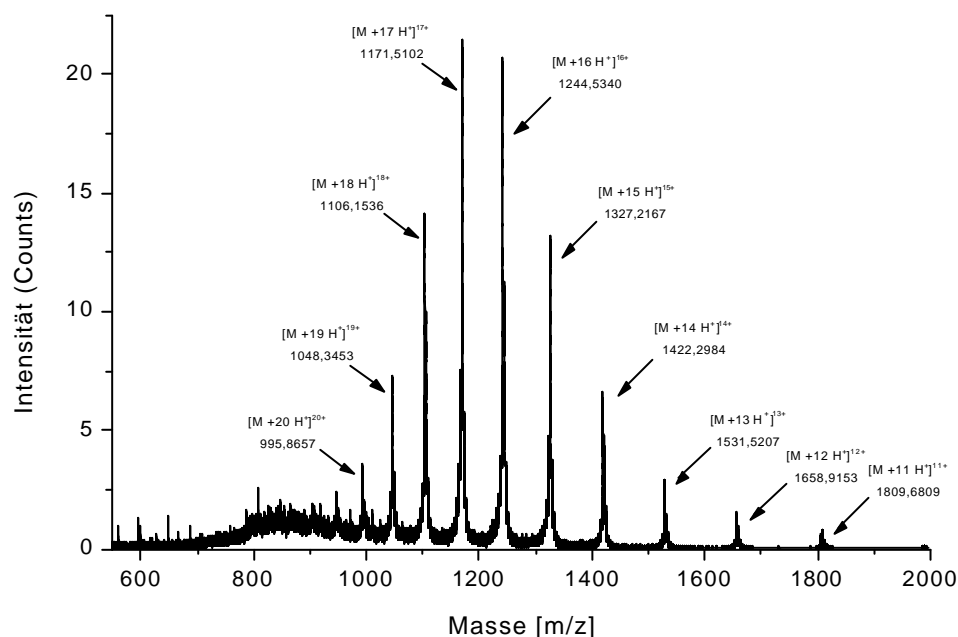


Abb. 37: ESI-Spektrum des Endostatin-Standards

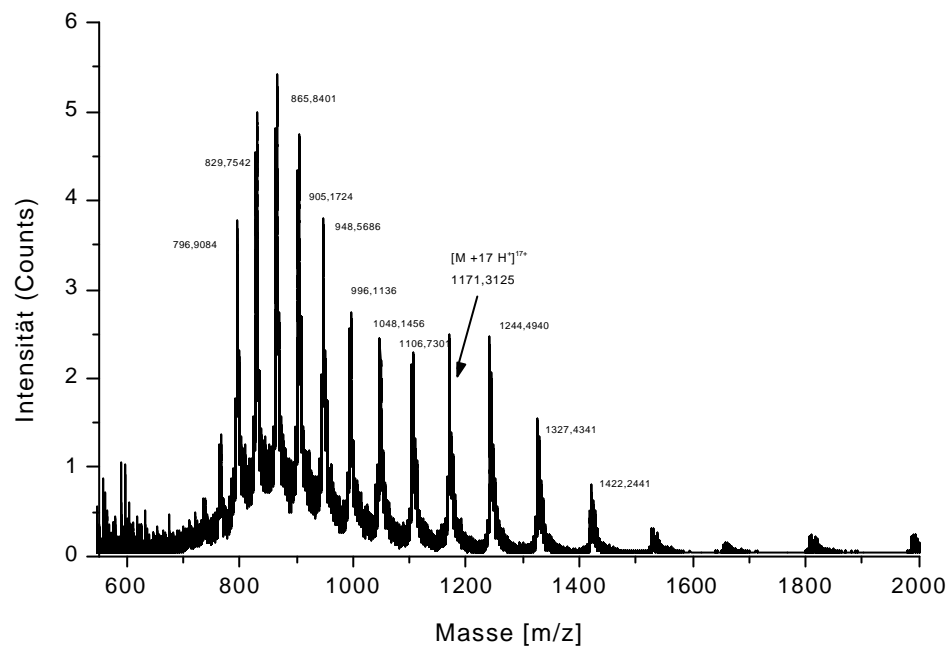


Abb. 38: ESI-Spektrum der Endostatin-HPLC-Fraktion 24 aus Kultivierung Nr. 17

Die ESI-Spektren der HPLC-Fractionen 24 und 25 waren fast identisch, daher wird in Abbildung 38 nur das Spektrum von Fraktion 24 gezeigt. Die aus dem Spektrum erhaltenen Massen der mehrfach geladenen Quasi-Molekülonen (von M14+ bis M25+) wurden wiederum mittels Dekonvolution ausgewertet. Die Wertetabelle der Dekonvolution ist als Tabelle 10 angefügt.

Die so errechnete mittlere Molekülmasse lag bei 19.896,36 amu = 19.741,88 Da und hat somit einen so gut wie identischen Wert wie der Endostatin-Standard. Damit ist gezeigt, daß genau das richtige Protein, nämlich dem Standard entsprechendes humanes Endostatin mit einem 6xHis-Tag, produziert wurde und daß eine Isolierung und Reinigung mit den gewählten Methoden durchführbar ist.

Tabelle 9: Wertetabelle zur Dekonvolution der ESI-Massen des Endostatin-Standards

$n_1$	$(m/z)_1$ [amu]	$M = n_1 [(m/z) - 1]$ [amu]
11	1809,6809	19895,49
12	1658,9153	19894,98
13	1531,5207	19896,77
14	1422,2984	19898,18
15	1327,2167	19893,25
16	1244,5340	19896,54
17	1171,5102	19898,67
18	1106,1536	19892,76
19	1048,3453	19899,56
20	995,8657	19897,31
		<b>Mittelwert: 19896,35</b>

Tabelle 10: Wertetabelle zur Dekonvolution der ESI-Massen der HPLC-Fraktion 24 aus Kultivierung Nr. 17

$n_1$	$(m/z)_1$ [amu]	$M = n_1 [(m/z) - 1]$ [amu]
14	1422,2441	19897,42
15	1327,4341	19896,51
16	1244,4940	19895,90
17	1171,3125	19895,31
18	1106,7301	19903,22
19	1048,1456	19895,77
20	996,1136	19902,27
21	948,5686	19898,94
22	905,1724	19891,79
23	865,8401	19891,32
24	829,7542	19890,10
25	796,9084	19897,71
		<b>Mittelwert: 19896,36</b>



### 4.3.1. Kapillarelektrophoretische Analytik des Endostatin

Die Kapillarelektrophorese ist als eine mögliche Methode zur schnellen Quantifizierung des Endostatins in Proben aus dem Downstream-Processing getestet worden. Dazu wurde sowohl versucht Realproben aus der Mini-Batch-Chromatographie und Eluate der FPLC-Läufe, als auch Proben des zur Verfügung stehenden Endostatin-Standards in verschiedenen Konzentrationen und in verschiedenen Puffern gelöst, zu vermessen.

Der als Feststoff vorliegende Endostatin-Standard wurde in zwei verschiedenen Puffern gelöst, zum einen in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und zum anderen im denaturierenden Elutionspuffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-Cl, 8 M Harnstoff), der dem Lösungsmittel der meisten Realproben entsprach. Die Messungen wurden in einer 60 cm langen Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  und 40 mM Boratpuffer mit einem pH-Wert von 10,6 als Elektrolyten durchgeführt. Dafür wurden in einer Verdünnungsreihe verschiedene definierte Konzentrationen des Endostatin-Standards im jeweiligen Lösungsmittel hergestellt. In den folgenden beiden Abbildungen 39 und 40 sind Elektropherogramme mit Konzentrationen von 500  $\mu\text{g/mL}$  und 5  $\mu\text{g/mL}$  dargestellt.

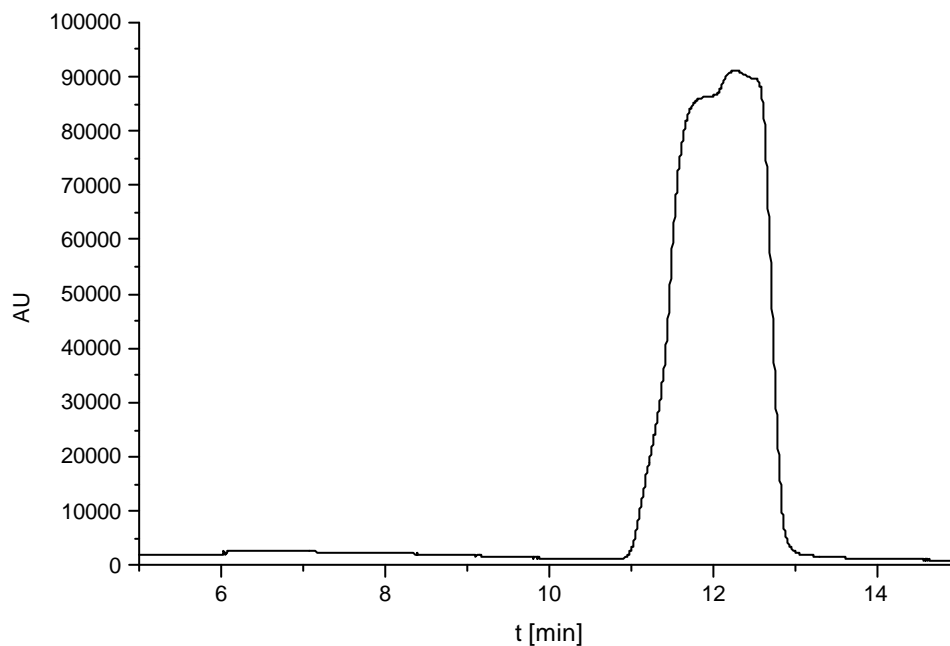


Abb. 39: Endostatin in der Konzentration 500  $\mu\text{g/mL}$

Spannung: 20 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 50  $\mu\text{m}$  x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 40 mM Boratpuffer pH 10,6; Probe: 500  $\mu\text{g/mL}$  Endostatin in 0,1% Trifluoressigsäure; Detektion: UV 214 nm [Becker, 2002]

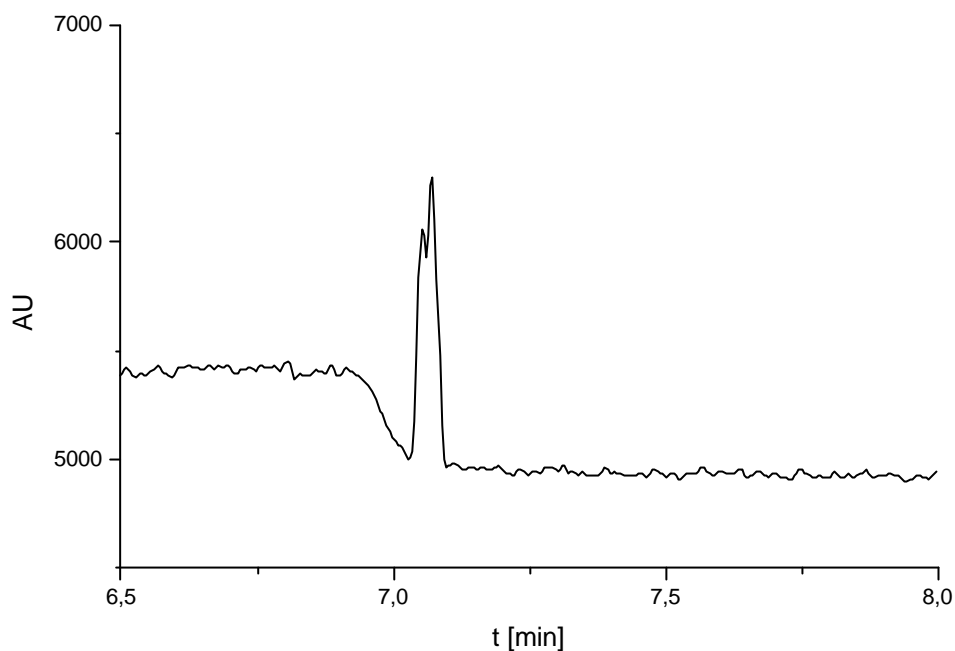


Abb. 40: Endostatin in einer Konzentration von 5 µg/mL  
Spannung: 20 kV; Temperatur: 25°C; Kapillare: 50 µm x 60 cm fused silica; 5 s Druckinjektion; CE-Puffer: 40 mM Boratpuffer pH 10,6; Probe: 5 µg/mL Endostatin in 0,1% Trifluoressigsäure; Detektion: UV 214 nm [Becker, 2002]

Es zeigte sich in beiden Elektropherogrammen jeweils ein Peak, der zwei „Spitzen“ aufwies. Es handelte sich also um zwei sehr dicht nacheinander migrierende Substanzen, was auch die typische Doppelbande erklärt, die immer wieder auf den SDS-PAGE-Gelen gefunden wurde. Im ersten Elektropherogramm (Abb. 42) war die Konzentration des Standards viel zu hoch, deshalb wurde der Peak sehr breit. Erst in sehr großer Verdünnung (5 µg/mL, s. Abb. 40) ließen sich beide Substanzen als Signal mit zwei Spitzen darstellen. Leider ist es nicht gelungen, beide Substanzen bis auf die Grundlinie zu trennen, um sie zu sammeln und massenspektrometrisch näher zu spezifizieren.

Die Messungen des in denaturierendem Elutionspuffer gelösten Endostatin-Standards blieben ebenso erfolglos wie die Versuche Realproben zu vermessen. Es gelang nicht reproduzierbare Elektropherogramme zu erhalten bzw. bei den Realproben auch nur den Endostatin-Peak von anderen Peaks zu unterscheiden. Mögliche Ursachen sind eine für die Erfassung mit der Kapillarelektrophorese zu geringe Konzentration des in den Proben vorhandenen Endostatins oder die Zersetzung des Endostatins in den Puffern. Außerdem wirkt sich der sehr hohe Salzgehalt in den Realproben stark störend aus. Damit erwies sich die Kapillarelektrophorese für den vorgesehenen Einsatz zur Quantifizierung des in Schüttelkolben oder Bioreaktoren produzierten Endostatins als nicht geeignet.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Produktionsprozeß für rekombinantes, humanes Endostatin in *E. coli* entwickelt. Dazu wurde von der Firma BioVisioN AG, Hannover freundlicherweise ein kleines Volumen eines eigens dafür hergestellten rekombinanten Bakterienstamms zur Verfügung gestellt.

### Stammhaltung

Ausgehend von einer minimalen Probe (1 mL) mußte zunächst eine Stammhaltung gefunden werden, die gewährleistete, daß langfristig mit den Bakterien gearbeitet werden konnte. Dazu wurden mehrere Möglichkeiten parallel getestet (DMSO- und Glycerin- Gefrierkulturen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen). Die Stammhaltung des *Escherichia coli*-Stammes erfolgte schließlich als Gefrierkultur in Glycerin (50% v/v) bei  $-78^{\circ}\text{C}$ . Als Sicherheitsmaßnahme für den Fall von Stromausfällen oder Versagen des Tieftemperatur-Gefrierschranks wurden immer Reserven der Gefrierkulturen in anderen Gefrierschränken bei ca.  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, auf die aber nie zurückgegriffen werden mußte.

### Schüttelkolbenexperimente

In Schüttelkolbenexperimenten wurden Wachstumskurven unter verschiedensten Bedingungen aufgenommen, um die Parameter für optimales Wachstum zu bestimmen. Außerdem wurden erste Produktionsversuche im Schüttelkolben unternommen, um die Grundparameter für gute Produktivität zu ermitteln.

In den Wachstumsexperimenten wurden drei komplexe Nährmedien (LB-, 2YT- und Super-LB-Medium), sowie ein synthetisches Minimalmedium (HDF-Medium) miteinander verglichen. Optimales Wachstum unter den gewählten Bedingungen bot das Super-LB-Medium, das auch das nährstoffreichste der vier Medien ist. Das getestete Minimalmedium (HDF-Medium), das für Hochzelldichtekultivierungen von Bakterien optimiert ist, erbrachte in den Schüttelkolbenversuchen trotz Modifizierung des Glucosegehalts nur relativ schlechte Biomassen. Da es außerdem in der Zusammensetzung wesentlich komplizierter und daher aufwendiger in der Herstellung war als die Komplexmedien, wurden die Versuche mit HDF-Medium nicht weiter verfolgt.

Es wurde das Wachstumsverhalten der Bakterien bei verschiedenen Temperaturen ( $28^{\circ}\text{C}$ ,  $32^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ) untersucht. Erwartungsgemäß zeigte sich  $37^{\circ}\text{C}$  als die geeignetste Temperatur für gutes Wachstum, aber auch bei  $32^{\circ}\text{C}$  wurden noch relativ hohe Zelldichten erreicht. Die bei  $28^{\circ}\text{C}$  kultivierten Bakterien zeigten dagegen bereits eine starke Wachstumsverlangsa-

mung. Eine exponentielle Phase war nicht mehr erkennbar. Ein kurzfristiges Absinken der Temperatur während einer Kultivierung hat also kein Absterben oder eine ernsthafte Schädigung der Zellen zur Folge, es kommt nur zu Wachstumsverzögerungen.

Da beobachtet wurde, daß es bei Verwendung von Komplexmedien bei hohen Schüttelgeschwindigkeiten zu starker Schaumbildung kam, die mit schlechter Biomasseproduktion einherging, wurden Mittel zur Schaumunterdrückung getestet. Es wurden Versuche durchgeführt um die Wirksamkeit und die Auswirkungen der Antischaummittel ASM 289 (Fa. Sigma) und Desmophen 3900 (Fa. Bayer) auf die Zellkultur zu bestimmen.

ASM 289 zeigte eine wachstumshemmende Wirkung auf die Bakterien und wurde daher nicht für weitere Versuche eingesetzt. Für Desmophen 3900 wurde unter den getesteten Bedingungen eine gute schaumunterdrückende Wirkung bei einer Konzentration von 60 µL/L gefunden.

Um die Endostatinproduktion zu starten mußte vorher eine Induktion der Proteinexpression mit Isopropyl β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) vorgenommen werden. In diesem Zusammenhang wurde untersucht welche Einwirkzeit notwendig war bevor geerntet werden konnte, welche IPTG-Konzentration am günstigsten war und zu welchem Zeitpunkt bzw. in welchem Bereich der Wachstumsphase die Induktion am besten durchgeführt werden konnte.

Hierfür wurde zum ersten Mal eine Analytik für das Zielprotein Endostatin notwendig. Da es aber in den kleinvolumigen Schüttelkolbenexperimenten noch nicht geplant war eine Produktionsoptimierung durchzuführen, mußte nur gewährleistet sein, daß Endostatin qualitativ erkannt werden konnte und daß Trends und Tendenzen in der Produktbildung beurteilt werden konnten. Als geeignetste Methode zur schnellen, kostengünstigen und verlässlichen Beurteilung der in großen Mengen angefallenen Proben aus den verschiedensten Kultivierungsversuchen hat sich die SDS-PAGE-Gelelektrophorese herausgestellt. Das ca. 20 kDa große Protein Endostatin ergibt auf SDS-PAGE-Gelen eine sehr charakteristische Doppelbande, deren Zustandekommen nicht aufgeklärt werden konnte, die aber eine leichte Identifikation ermöglicht. Auch der von der Firma BioVisioN AG, Hannover zur Verfügung gestellte Endostatin-Standard zeigte die Doppelbande auf SDS-PAGE-Gelen und auch zwei eng beieinander liegende Peaks bei der Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese. In der späteren Aufarbeitung und Charakterisierung mittels Massenspektrometrie erhält man aber nur ein Produkt.

Bei den Untersuchungen zu den mit der Induktion zusammenhängenden Bedingungen wurde festgestellt, daß vier bis fünf Stunden nach der Induktion geerntet werden sollte. Die Induktion sollte zu dem Zeitpunkt erfolgen, wenn die optische Dichte einen Wert von 0,5 bis maximal 0,9 erreicht hat. Die Versuche eine optimale IPTG-Konzentration für die Induktion zu

bestimmen blieben ergebnislos. Es wurden Konzentrationen zwischen 1 und 10 mM IPTG getestet, aber anscheinend entstanden unabhängig von der zur Induktion verwendeten IPTG-Konzentration ungefähr dieselben Produktmengen. Allerdings hatten die sehr hohen IPTG-Konzentrationen wachstumshemmende Auswirkungen auf die Zellen. In den weiteren Versuchen wurde mit IPTG-Konzentrationen zwischen 0,5 bis maximal 2 mM gearbeitet.

### **Isolierung und Quantifizierung des produzierten Endostatins**

Da vor allem in den Vorversuchen meist nur mit kleinen Volumina gearbeitet wurde, fielen viele kleine unterschiedliche Proben an, die auf ihren Endostatingehalt hin überprüft werden mußten. Da das Zielprotein Endostatin mit einem 6xHis-Tag koexprimiert wurde, war eine Isolierung und Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie möglich. Es wurde das kommerziell erhältliche Ni-NTA-Superflow-Harz eingesetzt. Für die Bearbeitung der kleinvolumigen Proben wurde eine Mini-Batch-Methode entwickelt, bei der das Chromatographieharz nicht in einer Säule gepackt wurde, sondern einem Chromatographielauf entsprechend in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durch Schütteln mit den verschiedenen Wasch- und Eluierungspuffern versetzt wurde. Zwischen den einzelnen Schritten wurde abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die Mini-Batch-Methode wurde zwar bei Verwendung hochaufkonzentrierter Proben den Erwartungen gerecht und lieferte in den Eluaten das isolierte Endostatin, mit niedrig konzentrierten Proben versagte sie jedoch. Ein weiterer gravierender Nachteil der Methode bestand darin, daß immer erst alle Schritte komplett abgearbeitet werden mußten, um danach über SDS-PAGE-Gele von den einzelnen Fraktionen Rückschlüsse auf den Erfolg ziehen zu können. Da jede einzelne Fraktion des Chromatographielaufs in mehreren Aliquots für eine eventuelle weitere Aufarbeitung aufbewahrt werden mußte, bedeutete dies bereits wegen der Beschriftung der Aliquots einen enormen logistischen und zeitlichen Aufwand.

Daher wurde für die weiteren Versuche eine größere Säule (ca. 28 mL) mit Ni-NTA-Superflow gepackt und mit einer FPLC-Anlage (Fa. Biorad) gearbeitet. Die Chromatographie an der FPLC-Anlage bot den großen Vorteil, daß das Eluat einen UV-Detektor durchläuft und so eine viel bessere Kontrolle der Elution möglich ist. Außerdem wurde durch das größere Ni-NTA-Volumen auch eine quantitative Aufarbeitung größerer Probenmengen möglich.

Die Quantifizierung der produzierten Endostatinmenge war problematisch, weil die für die Lyse der Bakterienzellen und die Ni-NTA-Chromatographie benutzten Puffer sehr stark salzhaltig sind und jede einfache Meßmethode wie z. B. photometrische Tests wie Lowry- oder Bradford-Test stören. Eine direkte Konzentrationsmessung z. B. aus den FPLC-Eluaten der

Ni-NTA-Chromatographie war nicht möglich. Es wurden daher die FPLC-Eluate der Ni-NTA-Chromatographie vollständig gesammelt, das Material über Dialyse oder FPLC-Gelchromatographie vollständig entsalzt und anschließend durch Lyophilisation volumenreduziert bis zur Trockne. Das so gewonnene Rohprodukt wurde wieder gelöst und nach entsprechender Verdünnung mittels Lowry-Test die Proteinkonzentration bestimmt. Diese Prozedur geht auf jeden Fall mit schwer kalkulierbaren Produktverlusten einher, deshalb sind die gemessenen Konzentrationen sicherlich fehlerbehaftet und gegenüber den wahren Werten zu niedrig. Anwendung fand diese Methode nur auf die Ernten aus den Bioreaktor-Kultivierungen in denen es um die Produktivitätsoptimierung ging.

### **Kultivierungen im Bioreaktor**

Nachdem in den Schüttelkolbenexperimenten viele Wachstums- und Produktionsparameter in Volumina von maximal 100 mL ermittelt worden waren, sollten diese Erkenntnisse als Grundlagen für die Maßstabsvergrößerung auf 2 L Arbeitsvolumen im Biostat-B-Bioreaktor dienen. Dabei stellte sich schnell heraus, daß nur das wenigste aus den Vorversuchen unmodifiziert übernommen werden konnte. Im Bioreaktor ist eine bessere Durchmischung des Nährmediums und damit auch eine ganz andere Sauerstoffversorgung der Zellkultur möglich, als im Schüttelkolben. Auch die pH-Kontrolle und -Regelung ist ein Faktor, der im Schüttelkolbenmaßstab technisch nicht machbar war, jetzt aber möglich wurde.

In den ersten zehn Bioreaktorkultivierungen wurden daher einige der Vorversuche unter den geänderten Bedingungen wiederholt und so Erfahrungen zum Wachstumsverhalten der Bakterien unter Bioreaktorbedingungen gesammelt. Es wurden noch einmal die drei LB-Nährmedien (LB-, 2YT-, Super-LB-Medium) getestet und es wurden Temperaturversuche mit Temperaturen die über den kompletten Zeitraum der Kultivierung konstant gehalten wurden durchgeführt, um die optimale Wachstumstemperatur zu bestimmen. Dasselbe wurde mit verschiedenen pH-Werten versucht, und ebenso wurde die optimale Rührergeschwindigkeit ermittelt.

Die in den Vorversuchen ermittelte Konzentration des Antischaummittels Desmophen 3900 von 60 µL/L reichte im Bioreaktor nicht aus und mußte auf 180 µL/L erhöht werden um eine sichere Schaumunterdrückung zu gewährleisten. Als bestes Nährmedium erwies sich das 2YT-Medium. Die beste Temperatur war –wie auch im Schüttelkolben- 37°C. Außerdem erwiesen sich ein leicht saurer pH-Wert von 6,5 und eine Begasungsrate von 1,5 vvm als geeignet für gute Biomasseproduktion.

### **Endostatinproduktion in Bioreaktorkultivierungen**

Die Produktionsbedingungen im Bioreaktor unterschieden sich von den Bedingungen für gutes Wachstum.

Für die Produktion des rekombinanten Proteins Endostatin war zuerst eine Induktion der Protein-Expression notwendig. Dies bedeutete für die Führung der Kultivierung, daß nach einer anfänglichen Phase in der die Zellen auf eine ausreichende Zellzahl anwachsen sollten, und daher also gute Wachstumsbedingungen eingestellt werden mußten, eine Umstellung auf gute Produktionsbedingungen stattfinden mußte. Geschah dies nicht, oder fand die Umstellung zu spät statt d. h. bei zu weit fortgeschrittener Wachstumsphase der Bakterien, so kam es nur zu sehr geringer bzw. gar keiner Produktion.

Als wichtigste Marker für die erfolgreiche Produktion stellten sich der Verlauf der  $pO_2$ -Kurve und die optische Dichte zum Zeitpunkt der Induktion heraus. In der exponentiellen Wachstumsphase stieg der Sauerstoffbedarf der Bakterien so schnell an, daß es ohne Bremsung des Wachstums zu einem Abfallen des Wertes bis auf Null kam. In diesem Fall stellten die Bakterien ihren Stoffwechsel auf anaerobe Bedingungen um und es kam nicht mehr zu einer meßbaren Endostatinproduktion. Gelang es aber das Bakterienwachstum rechtzeitig am Anfang der exponentiellen Phase so zu dämpfen, daß die Induktion mit IPTG im optimalen OD-Bereich von 0,5 bis 0,75 stattfinden konnte, wurden  $pO_2$ -Werte von ca. 65% nicht unterschritten und es kam zu guter Produktivität der Zellen.

Um das Wachstum am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase zu bremsen hat sich eine Temperaturabsenkung von 37°C auf 30°C gut bewährt. Wichtig war ein relativ schneller Durchlauf des Temperaturprofils: Je kürzer das Zeitintervall zwischen den beiden Temperaturen war, desto effektiver wurde das Zellwachstum gebremst und desto besser war die Produktausbeute. Eine Erhöhung der Begasungsrate hat sich zwar positiv auf die Ausbeute ausgewirkt, aber es kam genauso zu einer sehr stark verlängerten Anwachsphase zu Beginn der Kultivierung, wie bei einer zu hohen Rührergeschwindigkeit. Dies führte wiederum zu sehr schlechter Biomassebildung.

Es ist mit den beschriebenen Methoden gelungen eine Kulturführung für eine Batch-Kultivierung im 2L-Biostat-B-Reaktor zu entwickeln, die eine Ausbeute von ca. 30 bis maximal 53 mg Endostatin pro Liter geernteter Rohsuspension bzw. eine spezifische Endostatin-Ausbeute von 22 bis maximal 88,4 mg pro Gramm Biotrockenmasse erbrachte.

---

**Ausblick**

Zu einer weiteren Optimierung des Verfahrens wäre es wünschenswert eine Methode zu finden, um gute Produktausbeute und hohe Biomassebildung zu vereinen. Ein Weg dafür könnte die Entwicklung eines Begasungsprofils in Kombination mit einem Rührgeschwindigkeitsprofil darstellen, das am Beginn der Kultivierung moderate Bedingungen sicherstellt um den Zellen ein schnelles Anwachsen im Bioreaktor zu ermöglichen, bei Erreichen höherer Zelldichten aber genug Sauerstoff zur Verfügung stellt, damit die kritische Sauerstoffkonzentration im Nährmedium nicht unterschritten wird. So sollte es möglich werden die Zellen zu höheren Zelldichten anwachsen zu lassen, bevor die Induktion vorgenommen wird. Weiterhin wären für eine wirtschaftliche Anwendung weitere Upscaling-Schritte notwendig.

Außerdem müßte entweder ein Weg gefunden werden um das Produkt unter nativen Bedingungen aufarbeiten zu können, oder unter Beibehaltung der denaturierenden Aufarbeitung müßte das Protein wieder in seine biologisch aktive Form rückgeführt werden. Auch die Möglichkeit bzw. die Notwendigkeit zur Abspaltung des 6xHis-Tag ist noch nicht geklärt.



## 6. Literaturverzeichnis

Arbiser JL.

Angiogenesis and the skin: a primer.

J Am Acad Dermatol. Mar;34(3):486-97. Review. (1996)

Barinaga M.

Designing therapies that target tumor blood vessels.

Science. Jan 24;275(5299):482-4 (1997)

Becker, S

TCI Universität Hannover

Laufende Dissertation. (2002)

Berger AC, Feldman AL, Gnant MF, Kruger EA, Sim BK, Hewitt S, Figg WD, Alexander HR, Libutti SK.

The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing.

J Surg Res. Jun 1;91(1):26-31 (2000)

Bertolini F, Fusetti L, Mancuso P, Gobbi A, Corsini C, Ferrucci PF, Martinelli G, Pruneri G.

Endostatin, an antiangiogenic drug, induces tumor stabilization after chemotherapy or anti-CD20 therapy in a NOD/SCID mouse model of human high-grade non-Hodgkin lymphoma.

Blood. Jul 1;96(1):282-7 2000)

Bloch W, Huggel K, Sasaki T, Grose R, Bugnon P, Addicks K, Timpl R, Werner S.

The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing

FASEB J. Dec;14(15):2373-6 (2000)

Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS.

Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance.

Nature. Nov 27;390(6658):404-7 (1997)

Boehm T, O'reilly MS, Keough K, Shiloach J, Shapiro R, Folkman J.

Zinc-binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity.

Biochem Biophys Res Commun. Nov 9;252(1):190-4 (1998)

Boehm T, Pirie-Shepherd S, Trinh LB, Shiloach J, Folkman J.

Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of full-length murine and human endostatin

Yeast 15, 563-72 (1999)

Brock, TD, Madigan, MT, Martinko, JM, Parker, J  
Biology of Microorganisms  
8<sup>th</sup> Edition, 1996

Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF.  
Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine.  
EXS.;79:233-69. Review (1997)

Bussolino, F. , Mantovani, A. and Persico, G.  
Molecular mechanisms of blood vessel formation.  
Trends Biochem. Sci., 22, 251-256 (1997)

Campbell, NA  
Biologie  
Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 1. Korr. Nachdr. (1998)

Carlos TM, Harlan JM.  
Leukocyte-endothelial adhesion molecules.  
Blood. Oct 1;84(7):2068-101. Review (1994)

Demain A L, Davies J E  
Manual of industrial microbiology and biotechnology, 2<sup>nd</sup> ed.  
ASM Press, Washington. (1999)

Denekamp J.  
Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours.  
Acta Radiol Oncol.;23(4):217-25 (1984)

Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP.  
Endostatin induces endothelial cell apoptosis  
J Biol Chem. Apr 23;274(17):11721-26 (1999)

Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, Simons M, Sukhatme VP.  
Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin.  
Biochem Biophys Res Commun. May 10;258(2):345-52 (1999)

Ding YH, Javaherian K, Lo KM, Chopra R, Boehm T, Lanciotti J, Harris BA, Li Y, Shapiro R, Hohenester E, Timpl R, Folkman J, Wiley DC.  
Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin.  
Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 1;95(18):10443-8 (1998)

Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W.  
Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII.  
EMBO J. Mar 15;19(6):1187-94 (2000)

Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J.  
Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases.  
FEBS Lett. Dec 15;486(3):247-251 (2000)

Griffioen AW, Molema G.  
Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation.  
Pharmacol Rev. Jun;52(2):237-68. Review (2000)

Hanahan, D. and Folkman, J.  
Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.  
Cell, 86, 353-364 (1996)

Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, Timpl R.  
Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution.  
EMBO J. Mar 16;17(6):1656-64 (1998)

Hohenester E, Sasaki T, Mann K, Timpl R.  
Variable zinc coordination in endostatin.  
J Mol Biol. Mar 17;297(1):1-6 (2000)

Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J.  
Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth.  
Nature. Dec 6;348(6301):555-7 (1990)

John H, Preissner KT, Forssmann WG, Standker L.  
Novel glycosylated forms of human plasma endostatin and circulating endostatin-related fragments of collagen XV.  
Biochemistry. Aug 10;38(32):10217-24 (1999)

Kuo CJ, LaMontagne KR Jr, Garcia-Cardena G, Ackley BD, Kalman D, Park S, Christoffer-son R, Kamihara J, Ding YH, Lo KM, Gillies S, Folkman J, Mulligan RC, Javaherian K.  
Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NC1/endostatin domain.  
J Cell Biol. Mar 19;152(6):1233-46 (2001)

- Lawrence WT, Diegelmann RF.  
Growth factors in wound healing.  
Clin Dermatol. Jan-Mar;12(1):157-69 (1994)
- Lottspeich F., Zorbas H. (Hrsg.)  
Bioanalytik  
Heidelberg, Berlin; Spektrum Akad. Verl. 1998
- Lu H, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Ramchandran R, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP.  
Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells.  
Biochem Biophys Res Commun. May 19;258(3):668-73 (1999)
- Lush RM, Rudek MA, Figg WD.  
Review of Three New Agents That Target Angiogenesis, Matrix Metalloproteinases, and Cyclin-Dependent Kinases.  
Cancer Control. Oct;6(5):459-465 (1999)
- Miosge N, Sasaki T, Timpl R.  
Angiogenesis inhibitor endostatin is a distinct component of elastic fibers in vessel walls.  
FASEB J. Oct;13(13):1743-50 (1999)
- Myers JC, Li D, Bageris A, Abraham V, Dion AS, Amenta PS.  
Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens.  
Am J Pathol. Dec;151(6):1729-40 (1997)
- Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T.  
Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in Escherichia coli.  
Appl Environ Microbiol. Mar;66(3):884-9 (2000)
- Oh, S.P. , Kamagata, Y. , Muragaki, Y. , Timmons, S. , Ooshima, A. and Olsen, B.R.  
Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins.  
Proc. Natl Acad. Sci. USA, 91, 4229-4233 (1994)
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J.  
Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.  
Cell. Oct 21;79(2):315-28 (1994)

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J.

Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.  
Cell. Jan 24;88(2):277-85 (1997)

Perletti G, Concari P, Giardini R, Marras E, Piccinini F, Folkman J, Chen L.

Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors.  
Cancer Res. Apr 1;60(7):1793-6 (2000)

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.

Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.  
Nature; **258**:598-99 (1975)

Porath J.

Immobilized metal ion affinity chromatography.  
Protein Expr Purif Aug;3(4):263-81 (1992)

Präve P., Faust U., Sittig W., Sukatsch D. A.

Handbuch der Biotechnologie  
München, Wien; Oldenbourg Verlag, 4. Neu bearb. Aufl. 1994

Qiagen

The QIAexpressionist™, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.

Firmenhandbuch, Jan. (2000)

Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R, Ruoslahti E.

Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display.  
J Clin Invest. Jul 15;102(2):430-7 (1998)

Rehn, M. and Pihlajaniemi, T.

Identification of three N-terminal ends of type XVIII collagen chains and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts.

J. Biol. Chem., 270, 4705-4711 (1995)

Riesenberg D., Menzel K., Schulz V., Schuhmann K., Veith G., Zuber G., Knorre W. A.

High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon  $\alpha 1$ .

Appl. Microbiol. Biotechn. 34, 77-82 (1990)

Risau, W.

Mechanisms of angiogenesis.

Nature, 386, 671-674 (1997)

Ryan DP, Penson RT, Ahmed S, Chabner BA, Lynch TJ.

Reality testing in cancer treatment: the phase I trial of endostatin.

Oncologist 4(6):501-8 (1999)

Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R.

Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin.

EMBO J. Aug 3;17(15):4249-56 (1998)

Sasaki T, Larsson H, Kreuger J, Salmivirta M, Claesson-Welsh L, Lindahl U, Hohenester E, Timpl R.

Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin.

EMBO J. Nov 15;18(22):6240-8 (1999)

Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Claesson-Welsh L, Hohenester E, Timpl R.

Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity.

J Mol Biol. Sep 1;301(5):1179-90 (2000)

Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL.

Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25;97(9):4802-7

Shichiri M, Hirata Y.

Antiangiogenesis signals by endostatin.

FASEB J., Apr;15(6):1044-53 (2001)

Ständker L, Schrader M, Kanse SM, Jurgens M, Forssmann WG, Preissner KT.

Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin.

FEBS Lett. Dec 29;420(2-3):129-33 (1997)

Trevan MD, Boffey S, Goulding KH, Stanbury P.

Biotechnologie: Die biologischen Grundlagen.

Springer Verlag (1993)

Vasina JA, Baneyx F.

Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems.

Protein Expr Purif. Mar;9(2):211-8 (1997)

Wen W, Moses MA, Wiederschain D, Arbiser JL, Folkman J.

The generation of endostatin is mediated by elastase.

Cancer Res. Dec 15;59(24):6052-6 (1999)

Wu, Chi-san (Ed.)

Column Handbook for Size Exclusion Chromatography

Academic Press (1999)

Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R, Que I, Lowik C, Timpl R, Olsen BR.

Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding.

EMBO J. Aug 16;18(16):4414-23 (1999)

Yang QH, Wu CL, Lin K, Li L.

Low concentration of inducer favors production of active form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*.

Protein Expr Purif. Aug;10(3):320-4 (1997)

Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, Sukhatme VP, Ramakrishnan S.

Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth.

Cancer Res. Apr 15;60(8):2190-6 (2000)

Yokoyama Y, Green JE, Sukhatme VP, Ramakrishnan S.

Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinoma in a transgenic mouse model.

Cancer Res. Aug 15;60(16):4362-5 (2000)

Yoon SS, Eto H, Lin CM, Nakamura H, Pawlik TM, Song SU, Tanabe KK.

Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases.

Cancer Res. Dec 15;59(24):6251-6 (1999)

Zatterstrom UK, Felbor U, Fukai N, Olsen BR.

Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis.

Cell Struct Funct. Apr;25(2):97-101 (2000)

---

## Anhang

### Zusammensetzung der Puffer für die native Aufarbeitung:

#### 1. Lysispuffer = Puffer A (nativ)

50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol

**Mit NaOH auf pH 8,0 einstellen**

#### 2. Waschpuffer = Puffer B (nativ)

50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM	NaCl
20 mM	Imidazol

**Mit NaOH auf pH 8,0 einstellen**

#### 3. Elutionspuffer = Puffer C (nativ)

50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM	NaCl
250 mM	Imidazol

**Mit NaOH auf pH 8,0 einstellen**



---

**Zusammensetzung der Puffer für die denaturierende Aufarbeitung:****1. Lysispuffer (denaturierend)**

100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM	Tris Cl
8 M	Harnstoff

**Mit HCl auf pH 8,0 einstellen****2. Waschpuffer (denaturierend)**

100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM	Tris Cl
8 M	Harnstoff

**Mit HCl auf pH 6,3 einstellen****3. Elutionspuffer (denaturierend)**

100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM	Tris Cl
8 M	Harnstoff

**Mit HCl auf pH 5,9 einstellen****4. Elutionspuffer (denaturierend)**

100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM	Tris Cl
8 M	Harnstoff

**Mit HCl auf pH 4,5 einstellen**

**Aminosäuresequenz des humanen Endostatins (Teil-Sequenz des humanen Collagen XVIII von AS 1334 bis 1516) im Ein-Buchstaben-Code:**

HSHRDFQ PVLHLVALNS PLSGGMRGIR GADFQCFQQA RAVGLAGTFR  
 AFLSSRLQDL YSIVRRADRA AVPIVNLKDE LLFPSWEALF SGSEGPLKPG  
 ARIFSFQDGD VLRHPTWPQK SVWHGSDPNG RRLTESYCET WRTEAPSATG  
 QASLLGGRL LGQSAASCHH AYIVLCIENS FMTASK

**Aminosäuresequenz des humanen Endostatins (Teil-Sequenz des humanen Collagen XVIII von AS 1334 bis 1516) in Brand-Edsallschen Abkürzungen:**

His Ser 1335

1336 His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn Ser 1350  
 1351 Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln 1365  
 1366 Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg 1380  
 1381 Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg 1395  
 1396 Arg Ala Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu 1410  
 1411 Leu Leu Phe Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly 1425  
 1426 Pro Leu Lys Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp 1440  
 1441 Val Leu Arg His Pro Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly 1455  
 1456 Ser Asp Pro Asn Gly Arg Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr 1470  
 1471 Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu 1485  
 1486 Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His 1500  
 1501 Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ala Ser 1515  
 1516 Lys

**In dieser Arbeit hergestelltes rekombinantes Endostatin mit 6xHis-Tag (die blau markierte Sequenz ist mit der des oben aufgeführten humanen Endostatins identisch. Berechnete Molekülmasse 19896,36 Da):**

MRGSHHHHHHGS VALNS PLSGGMRGIR GADFQCFQQA RAVGLAGTFR  
 AFLSSRLQDL YSIVRRADRA AVPIVNLKDE LLFPSWEALF SGSEGPLKPG  
 ARIFSFQDGD VLRHPTWPQK SVWHGSDPNG RRLTESYCET WRTEAPSATG  
 QASLLGGRL LGQSAASCHH AYIVLCIENS FMTAS

**Ein-Buchstaben-Code:**

A	Ala (Alanin)	M	Met (Methionin)
C	Cys (Cystein)	N	Asn (Asparagin)
D	Asp (Asparaginsäure)	P	Pro (Prolin)
E	Glu (Glutaminsäure)	Q	Gln (Glutamin)
F	Phe (Phenylalanin)	R	Arg (Arginin)
G	Gly (Glycin)	S	Ser (Serin)
H	His (Histidin)	T	Thr (Threonin)
I	Ile (Isoleucin)	V	Val (Valin)
K	Lys (Lysin)	W	Trp (Tryptophan)
L	Leu (Leucin)	Y	Tyr (Tyrosin)

---

**Abkürzungsverzeichnis**

∅	Durchmesser
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
Abb.	Abbildung
aq.	wässrig
amu	Atomare Masseneinheit
ASM	Antischaummittel
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Rinder-Serum-Albumin
BTM	Biotrockenmasse
ca.	circa
CE	Kapillarelektrophorese
CHC	α-Cyano-4-hydroxymizsäure
DCU	digitale Meß- und Regeleinheit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	elektronische Datenverarbeitung
EPO	Erythropoietin
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations- Massenspektroskopie
Fa.	Firma
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
g	Zentrifugalkraft
h	Stunde
HDF-Medium	Glucose-Mineralsalz-Medium
6xHis-	Sechsfach- Histidin-Rest (6 konsekutive Histidinreste am C- oder N-Terminus der Aminosäuresequenz eines Proteins)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalaktopyranosid
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton [Masseneinheit, 1 Da = 1,007825 amu = Masse des Wasserstoffatoms]
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Nährmedium
M	Molar
MALDI-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Massenspektro-

---

	skopie
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
m/z	Masse/ Ladungsquotient
NCI	National Cancer Institut
nm	Nanometer
NTA	Nitriloessigsäure [vierzähliger Chelatligand]
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Personalcomputer
PDGF	platelet-derived growth factor
pO <sub>2</sub>	Gelöstsauerstoffgehalt
RISP	Real Time Integrating Software Platform
RPM	Umdrehungen pro Minute (Rührerdrehzahl)
RSD	Relative Standardabweichung
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
t-PA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator
Tris-	[Tris(hydroxymethyl)aminomethan]-
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
v/v	Volumenanteil
vvm	Volumen Gaszufuhr pro Volumen Kulturlösung und Minute
vWF	von Willebrand Faktor
2YT-Medium	Variation des LB-Mediums

---

## Lebenslauf

Persönliche Daten	Ralf Finke, geboren am 6.9.1967  in Langenhagen/ Niedersachsen
Schulbildung	Im Mai 1987 habe ich am Gymnasium Langenhagen die allgemeine Hochschulreife erlangt.
Wehrdienst	Von Juli 1987 bis September 1988 habe ich meinen Wehrdienst in der Transport- und Versorgungseinheit des 1. Panzer-Lehrbataillons 93 in Munster abgeleistet.
Hochschulausbildung	Von Oktober 1988 bis Januar 1998 Studium der Chemie an der Universität Hannover. Von Juli 1997 bis Januar 1998 Diplomarbeit am Institut für technische Chemie. Thema: „Grundlegende Untersuchungen zur Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Vitalitätsbestimmung mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie“ Von Januar 1998 bis März 2002 Doktorarbeit am Institut für Technische Chemie bei Professor Thomas Scheper. Thema: „Prozessentwicklung und -optimierung zur Herstellung pharmazeutisch interessanter rekombinanter Proteine am Beispiel des human-identischen Endostatins“.