

**Rekombinante Produktion eines
Kollagen-mimetischen Proteins in
Komagataella phaffii (syn. *Pichia pastoris*)**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat

genehmigte Dissertation

von

Caroline Schneider-Barthold, M. Sc.

geboren am 27.12.1987 in Königstein/Taunus

2018

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 09.02.2018

*Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden,
wo sie aufhört.*

Justus Freiherr von Liebig (1803 - 1873)

Danksagung

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

Für die inhaltliche Hilfsbereitschaft sowie die Übernahme des Korreferats danke ich Prof. Dr. Ursula Rinas. Bei PD Dr. Ulrich Krings bedanke ich mich für die Unterstützung in der Massenspektrometrie sowie für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Andreas Pich für die Durchführung der Massenspektrometrie-Analytik und für die freundliche Beratung.

Von ganzem Herzen danke ich Dr. Iliyana Pepelanova für die liebevolle und gleichzeitig fachlich fordernde Betreuung während der Promotion. Vielen Dank für die unzähligen Gespräche, die konstruktive Kritik, für den kreativen Input und für die gemeinsame Dienstreise nach Freiberg.

Für die elektrotechnische Unterstützung danke ich Thorleif Hentrop und für experimentelle Hilfestellungen danke ich Martina Weiß und Martin Pähler.

Der Arbeitskreis ist heute ein anderer als zu Beginn meiner Promotion, dennoch danke ich allen für die wundervollen Jahre und für den kollegialen Zusammenhalt. Eine Atmosphäre wie im TCI ist einmalig, deshalb bedanke ich mich bei allen TCILern für das herzliche Miteinander und das angenehme Arbeitsklima, das diese Zeit so besonders macht. Mein großer Dank gilt im Besonderen Sarah, Anne und Daniel für die gegenseitige Motivation, die tolle gemeinsame Zeit und die tiefe Freundschaft.

Meinen Eltern sowie meinem Bruder danke ich für den liebevollen Rückhalt, die bedingungslose Unterstützung sowie das unerschütterliche Vertrauen in mich und meine Ziele. Bei Marcel möchte ich mich für seine unendliche Geduld, die moralische Unterstützung und hilfreichen Ratschläge bedanken. Vielen Dank, dass du mich bei guter und schlechter Laune motiviert hast und nach einem anstrengenden Tag ein offenes Ohr für mich hattest.

Abstract

Collagen is the most abundant protein in the connective tissue of mammals and the main component of the extracellular matrix. Most fibril-forming collagens contribute to the flexibility and elasticity of tissue and are found in ligaments, tendons, bones, cartilage and skin. Extraction from animal tissue carries the risk of zoonosis and immune reaction if transplanted which is disadvantageous for medical application. These risks can be avoided by heterologous expression of human collagen in the yeast *Pichia pastoris*. Protein production in yeast has several advantages like post-translational modification, secreted production, strong promoters as well as the ability to process repetitive sequences.

A collagen-mimetic protein consisting of 400 amino acids of the human collagen I $\alpha 1$ chain and repetitive ProGlyPro sequences was produced. The PGP repeats can form a triple helix like in native collagen and thus can form a protein network. The collagen domain ensures good biocompatibility of the protein. After cloning and transformation, a producing strain was identified and tested for protein production. Temperature and methanol concentration were varied to increase the protein content. Afterwards, the cultivation was transferred into a benchtop bioreactor for more efficient protein production. Methanol induction was initiated with set pump rates which resulted in the built-up of toxic methanol concentrations. A methanol control system with a feedback loop of an online methanol sensor was developed which resulted in consistent protein production (16,9 g/L). Isolation of the collagen-mimetic protein from supernatant revealed three different protein bands: ca. 45 kDa, 65 kDa und 75 kDa. Mass spectrometry showed that all protein bands in the SDS gels belong to the protein of interest. In order to explain the discrepancy of the molecular weight, a glycosylation assay was conducted but showed no glycosylation. The reason for the difference of the molecular weights could not be concluded with certainty, but collagen is known to be able to form strong intra-molecular bonds that might resist reducing conditions. Rheology results show polymerization of the network which proves a collagen-like behavior.

Keywords: collagen-mimetic protein, ECM, fermentation, methanol induction, methanol sensor, *Pichia pastoris*

Zusammenfassung

Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein in Wirbeltieren und Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. In strukturgebenden Gewebearten wie Knorpel und Knochen sowie in Sehnen und Bändern trägt es zu Stabilität und Elastizität bei. Um bei einem medizinischen Einsatz geringe Immunogenität zu gewährleisten sowie die Übertragung von Zoonosen zu verhindern, müssen u. a. rekombinante Kollagenquellen genutzt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Kollagen-mimetisches Protein in *Pichia pastoris* hergestellt. Es besteht aus einer Teilsequenz der humanen Kollagen I $\alpha 1$ Kette, die eine gute Biokompatibilität sicherstellt und von repetitiven PGP-Domänen zur Trimerisierung und Netzwerkbildung flankiert wird. Vorteile der Expression in *P. pastoris* sind die sekretorische Produktion, die starke Induktion über den Alkoholoxidase-Promotor, post-translationale Modifikationen sowie die Biosynthese repetitiver Sequenzen.

Nach Abschluss der molekularbiologischen Arbeiten wurde ein produzierender Stamm identifiziert und auf seine Proteinproduktion getestet. Für eine optimale Proteinkonzentration wurden Temperatur und Methanolkonzentration variiert und die Kultivierung anschließend in ein Bioreaktorsystem übertragen. Nach Kultivierungen mit festen Pumpraten, die zu toxischen Methanolkonzentrationen im Reaktor führten, wurde ein Feedback-System mithilfe des Methanolsensors entwickelt, mit dem eine konsistente Produktion von bis zu 16,9 g/L erreicht werden konnten. Die Isolation des Proteins vom Kulturüberstand ergab, dass Proteine in drei Größen auftraten: ca. 45 kDa, 65 kDa und 75 kDa. Per Massenspektrometrie konnten die drei Banden dem Zielprotein zugeordnet werden. Die Ursache der verschiedenen Größen konnte nicht abschließend geklärt werden, vermutet werden aber starke tripelhelikale Wechselwirkungen, die auch unter reduzierenden Bedingungen bestehen. Über einen Glykosidasetest konnten Glykosylierungen des Proteins ausgeschlossen werden. Rheologische Messungen ergaben eine schwache Gelbildung des Proteins, womit ein Kollagen-ähnliches Verhalten nachgewiesen werden konnte.

Schlagerwörter: Kollagen-mimetisches Protein, Extrazelluläre Matrix, Fermentation, Methanolsensor, *Pichia pastoris*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Zielsetzung	15
2	Theoretischer Teil	16
2.1	Kollagen	16
2.1.1	Kollagenfamilie	16
2.1.2	Medizinischer Nutzen von Kollagen	22
2.1.3	Klassische Kollagengewinnung	25
2.2	Biotechnologische Produktion von Kollagen	26
2.2.1	<i>Pichia pastoris</i> als Expressionssystem	26
2.2.2	Kollagenproduktion in <i>P. pastoris</i>	29
2.2.3	Alternative Expressionssysteme	30
3	Molekularbiologische Arbeiten	33
3.1	Auswahl des Proteinkonstruktes	33
3.2	Design und Gensynthese des Kollagens	34
3.3	Konstruktion des Expressionsvektors	36
3.4	Transformation	38
3.5	Screening der transformierten Kolonien	40
4	Kultivierung und Proteinproduktion	42
4.1	Kultivierung im Schüttelkolben	42
4.1.1	Kultivierung unter Standardbedingungen	42
4.1.2	Kultivierung mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen	46
4.1.3	Kultivierung mit unterschiedlichen Temperaturen	48

4.1.4	Fazit	49
4.2	Kultivierung im Bioreaktor	49
4.2.1	Kultivierung ohne Methanol-Regelung	52
4.2.2	Fazit	56
4.3	Kultivierung im Bioreaktor mit Methanol-Regelung	57
4.3.1	Entwicklung des Feedback-Loops des Methanolsensors	57
4.3.2	Kultivierung mit Feedback-Loop des Methanolsensors	60
4.3.3	Vergleich der Proteinproduktion bei Regelung der Methanolkonzentration	62
4.3.4	Fazit	64
5	Isolierung und Charakterisierung	66
5.1	Fällungen	66
5.1.1	Aceton-Fällung	68
5.1.2	Fraktionierte Acetonfällung	68
5.1.3	Fraktionierte Acetonfällung mit Ammoniumsulfat-Schritt	69
5.1.4	Fazit	70
5.2	Chromatographie	71
5.2.1	Ionenaustauschchromatographie	71
5.2.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie	77
5.2.3	Größenausschlusschromatographie	78
5.2.4	Fazit	81
5.3	Analyse der unterschiedlichen Proteinbanden	82
5.3.1	Trimerisierungsanalyse	82
5.3.2	Untersuchung zur Thermolyse des CMPs	84
5.4	Massenspektrometrie	86
5.5	Glykosidasetest	87
5.6	Rheologie	89
6	Zusammenfassung	94
6.1	Ausblick	98

A	Materialien	100
A.1	Verbrauchsmaterialien	100
A.2	Chemikalien	101
A.3	Puffer, Lösungen, Medien	103
A.4	Geräte	105
A.5	Reaktionskits und Biomoleküle	107
B	Methoden	108
B.1	Molekularbiologische Methoden	108
B.1.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	108
B.1.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	108
B.1.3	Restriktionsverdau	108
B.1.4	Ligation	109
B.1.5	Kolonie-PCR	109
B.2	Proteinexpression	109
B.2.1	Anlegen von Cryo-Kulturen	109
B.2.2	Kultivierung im Schüttelkolben	110
B.2.3	Kultivierung im Bioreaktor	110
B.2.4	Methanol-Sensor Setup	111
B.3	Proteinanalytik	112
B.3.1	Proteinassay	112
B.3.2	SDS-PAGE	112
B.3.3	Coomassie-Färbung	113
B.3.4	Silberfärbung	113
B.3.5	Western Blot	113
B.4	Proteinisolierung und -charakterisierung	114
B.4.1	Proteinfällung	114
B.4.2	Chromatographie	116
B.4.3	Glykosidasetest	117
B.4.4	Rheologie	117
C	Weitere experimentelle Daten	118

Verzeichnisse	124
Abkürzungsverzeichnis	124
Abbildungsverzeichnis	126
Tabellenverzeichnis	130
Literaturverzeichnis	130
Liste der an dieser Arbeit beteiligten Personen	143
Curriculum Vitae	144
Publikationsliste	145

1 Einleitung

In Deutschland wurden im Jahr 2014 149.000 Knieprothesen eingesetzt, davon waren 21.000 Eingriffe sogenannte Wechseleingriffe [7]. Wechseleingriff bedeutet, dass eine fehlerhafte oder infizierte Prothese entnommen und durch eine neue Prothese ersetzt wird. Diese Zahlen verdeutlichen, dass 14 % der Knieoperationen Reoperationen waren und somit immer noch ein hohes Risiko mit Gelenkersatz verbunden ist. Vergleicht man die Zahlen von 2014 und 2015, so lässt sich eine Steigerung von 16 % erkennen, was den wachsenden Bedarf an künstlichen Gelenken verdeutlicht.

Es gibt heutzutage noch erhebliche Risiken bei einer Gelenkprothese. Neben Infektionen durch Bakterien kann es auch durch Abrieb des verwendeten Metalls zu Immunreaktionen kommen [8, 19]. Selbst die Einheilung eines Implantats in das umgebende Gewebe kann problematisch werden und Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Um komplizierte und die Gesundheit belastende Mehrfachoperationen zu vermeiden, wird der Bedarf an personalisierten Implantaten immer größer. Da durch den demographischen Wandel die Nachfrage an Prothesen und Implantaten verschiedener Arten weiter steigen wird, ist die Notwendigkeit für neue Ansätze der Medizintechnik heute schon vorhanden.

Was unterscheidet personalisierte Implantate von herkömmlichen Implantaten? Für personalisierte Implantate werden organische und anorganische Materialien mit Oberflächenfunktionalisierungen versehen oder in festgelegten Strukturen hergestellt, sodass anschließend patientenspezifische Zellen darauf angesiedelt werden können. Ein wichtiger Bestandteil für diese Art von Implantaten ist bioaktives, nicht-immunogenes Material, aus dem die Implantate bestehen können oder das als Beschichtung von herkömmlichen Prothesen dienen kann. Um das Einwachsen der Implantate in das native Gewebe

zu gewährleisten, müssen den Zellen natürliche Strukturen zum Anwachsen gegeben werden. Da Kollagen als Hauptbestandteil der Extrazellulären Matrix (ECM) eins der wichtigsten strukturgebenden Proteine ist, kann es für diesen Nutzen eingesetzt werden. Klassischerweise wird Kollagen aus Tiergewebe extrahiert und aufgereinigt. Da dies jedoch bei einem geplanten medizinischen Einsatz mit Risiken wie Krankheitsübertragung oder Immunreaktionen behaftet ist, müssen alternative Kollagenquellen, wie z. B. eine rekombinante Produktion, genutzt werden.

1.1 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die rekombinante Herstellung eines Kollagenproteins untersucht werden. Dafür wird zunächst ein natürliches, verbreitetes Kollagenprotein gesucht, das strukturgebend in verschiedenen medizinischen Einsätzen angewendet werden kann. Um die molekularbiologischen Arbeiten zu vereinfachen wird zudem der Einsatz eines Kollagenfragmentes in Betracht gezogen. Weitere Anforderungen der Genauswahl sind ein leicht klonierbares Konstrukt und eine hohe Biokompatibilität des Zielproteins, um den Einsatz als Hydrogel zu gewährleisten. Als Produktionsstamm wird *Pichia pastoris* verwendet, da die gut charakterisierte Hefe in der Lage ist, komplexe Proteine sowie Wiederholungssequenzen während der Proteinbiosynthese zu prozessieren. Des Weiteren kann das heterologe Protein von den Zellen sekretiert werden.

Nach Abschluss der Klonierungsarbeiten soll ein produzierender Stamm identifiziert und kultiviert werden. Für eine optimale Proteinproduktion können die Methanolkonzentration sowie die Kultivierungstemperatur angepasst werden. Außerdem soll der sekretorisch produzierende Stamm in verschiedenen Labormaßstäben kultiviert werden, um eine hohe Proteinmenge zu erreichen. Letztlich kann das Protein über verschiedene Isolierungsstrategien aus dem Kulturüberstand aufgereinigt und für den späteren Einsatz getestet werden. Verschiedene Fällungen sowie chromatographische Methoden sollen für die Isolation des Proteins analysiert und verglichen werden. Nach der Bestimmung einer geeigneten Methode werden mehrere Charakterisierungen des Proteins durchgeführt. Die Eigenschaft zur Gelbildung wird mittels Rheologie untersucht und zeigt damit, ob das Protein Merkmale eines Kollagen-mimetischen Proteins besitzt. Anschließend kann das Protein in Zellkulturversuchen auf seine Biokompatibilität untersucht werden.

2 Theoretischer Teil

In diesem Teil wird Hintergrundwissen zu Kollagen sowie dessen Nutzung und Gewinnung vermittelt. Anschließend wird die biotechnologische Produktion von Kollagen in Mikroorganismen und verschiedenen Insekten- und Säugetierzellen beschrieben.

2.1 Kollagen

Zunächst wird die Kollagenfamilie sowie die verschiedenen Eigenschaften der unterschiedlichen Kollagentypen näher betrachtet. Außerdem wird auf die Form und Art der medizinischen Anwendung von Kollagen eingegangen, sowie die klassische Kollagenengewinnung mittels Extraktion aus tierischem Gewebe dargestellt.

2.1.1 Kollagenfamilie

Die Familie der Kollagene besteht aktuell aus 28 verschiedenen Typen, die unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Je nach Art der Kollagene verteilen sich die Aufgaben auf Stabilität, Elastizität sowie Zugfestigkeit. Kollagen ist die Hauptkomponente in Bindegewebe und daher ein großer Bestandteil in Sehnen, Bändern, Knorpel, Knochen, Zähnen, Blutgefäßen und in Basalmembranen [6]. In Sehnen befindet sich Kollagen in langen seilähnlichen Strukturen, die eine hohe Reißfestigkeit ergeben, während die starren Kollagenstrukturen der Knochen und Zähne durch Kalziumeinlagerungen entstehen. Über unterschiedliche Verbindungen zwischen den Kollagenfibrillen können sowohl zweidimensionale Strukturen für Haut als auch dreidimensionale Gerüste für Knorpel gebildet werden.

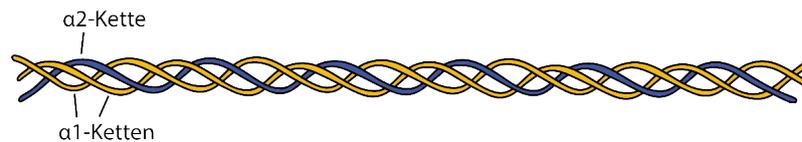


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung von Kollagen I, bestehend aus zwei $\alpha 1$ -Ketten und einer $\alpha 2$ -Kette.

Alle Kollagene bestehen aus drei Polypeptidketten, die sich in einer Linksdrehung umeinander wickeln und dabei eine rechtsdrehende Tripelhelix bilden (siehe Abbildung 2.1). Die Polypeptidketten können gleich oder unterschiedlich sein und damit Homo- oder Heterotrimere darstellen. Die dichte Packung der Tripelhelix wird durch die Wiederholung von Glycin an jeder dritten Position begünstigt, da durch die geringe Größe dieser Aminosäure eine enge Anlagerung der Ketten möglich ist. Die weiteren Positionen können von jeder beliebigen Aminosäure belegt sein, allerdings befinden sich häufig Prolin und Hydroxyprolin in diesem Muster. Die Aminosäureabfolge GlyProHyp ist die häufigste Kombination in Kollagen (10,5 %) [72]. Die Hydroxylierung von Prolin in der zweiten Position nach Glycin führt zu einer Stabilisierung der Tripelhelix über einen stereoelektronischen Effekt [80].

Fibrillenbildende Kollagene

Nach der Bildung der Tripelhelix lagern sich viele Kollagenmoleküle zu einer Mikrofibrille und anschließend zu einer Fibrille zusammen (siehe Abb. 2.2). Dieser als Fibrillogenese bezeichnete Vorgang wird nach der Abspaltung der N- und C-Propeptide eingeleitet.

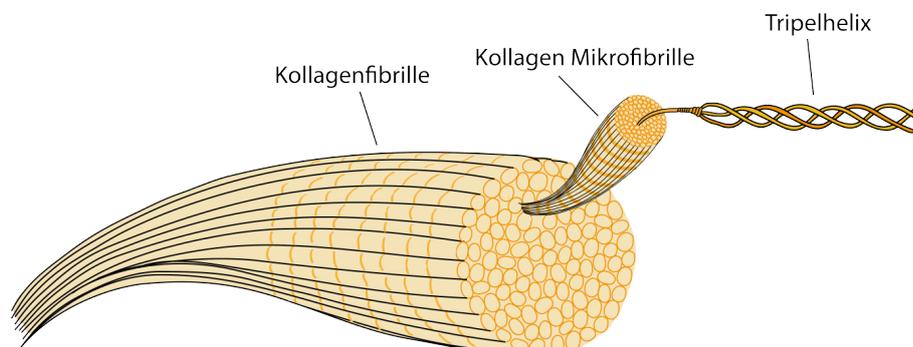


Abbildung 2.2 Darstellung einer Kollagenfibrille mit Zerlegung in die unterschiedlichen Helicen.

Obwohl die Propeptide für die Helixbildung wichtig sind, verhindern sie anschließend den Beginn der Fibrillenbildung [40]. Die Anlagerung der Tropokollagenmoleküle geschieht mit definierten Abständen der unterschiedlichen Helicen zueinander. Zwei nebeneinander angeordnete Helicen sind um 67 nm zueinander verschoben, was als Abstand D definiert wurde. Der Abstand zwischen zwei hintereinander angeordneten Helicen beträgt $0,54 D$, wodurch sich ein Überlappungsbereich von $0,46 D$ ergibt, der in Mikroskopaufnahmen von Kollagen als Bandenmuster zu erkennen ist (siehe Abbildung 2.3) [64].

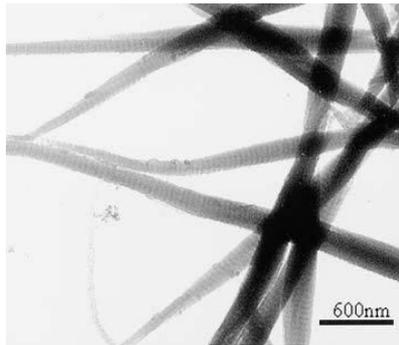


Abbildung 2.3 Bandenmuster auf Kollagenfibrillen [61].

Insgesamt liegen die Kollagenmoleküle in einer Fibrille als quasi-hexagonalen Anordnung vor [63]. Die Verbindung der verschiedenen Helicen ist jedoch nicht nur eine Anlagerung der Moleküle, sondern die Mikrofibrillen greifen fingerartig ineinander, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung von Kollagen führt. Durch die gedrehte, seilartige Form der Tropokollagen-Monomere ergibt sich eine spiralförmigen Struktur des reifen Kollagens [62]. Die Tropokollagene sind außerdem über verschiedene inter- und intramolekulare Quervernetzungen miteinander verbunden, die von Lysyloxidasen hergestellt werden. Dabei werden Lysin-Seitenketten der Telopectide zur Bildung von Desmosin und Iso-desmosin mit Hydroxylysin verknüpft, wodurch der Fibrille zusätzlich Stärke und Stabilität verliehen wird [22]. Ein weiterer Effekt dieser Verknüpfung der Telopectide ist der Schutz vor Proteolyse durch Matrixmetalloprotease 1 (MMP 1). Da die MMP 1 für einen proteolytischen Abbau zunächst das Telopectid angreift, ist dieses durch die vielen Quervernetzungen geschützt [71]. Ohne die Telopectide könnte eine Fibrillenbildung stattfinden, allerdings würde sie durch das Fehlen der stabilitätsverleihenden Verlinkungen in

deutlich schwächeren Fibrillen resultieren. Der Ablauf der Fibrillogenese ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

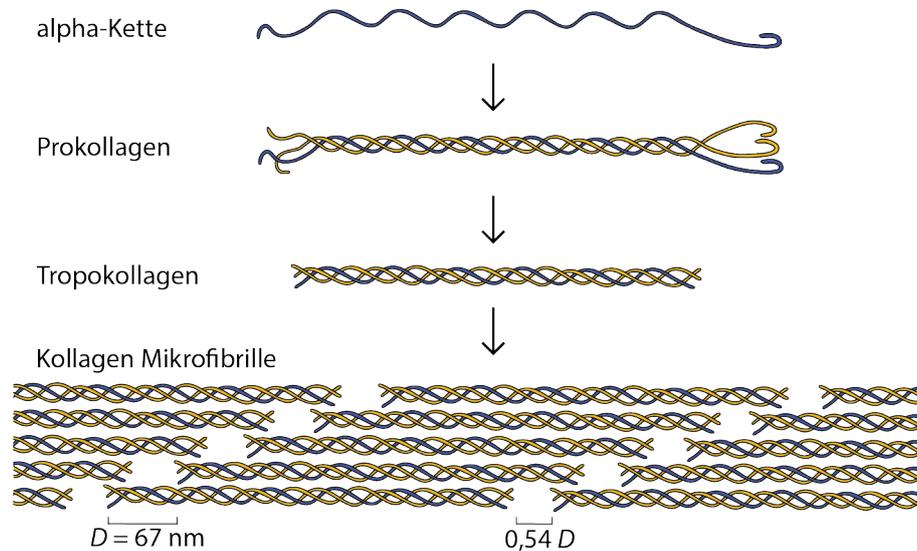


Abbildung 2.4 Bildung der Kollagenfibrille aus einzelnen α -Ketten.

Weitere Kollagenarten

Neben fibrillenbildenden Kollagenen gibt es noch weitere Arten. Dazu zählen fibrillen- oder membranassoziierte Kollagene genauso wie Ankerfibrillen, netzwerkbildende Kollagene und Multihelix-Kollagene. In Tabelle 2.1 ist eine Übersicht über die Kollagentypen und ihre Zuordnung zu den verschiedenen Arten gegeben.

Fibrillenassoziierte Kollagene sind in drei Regionen einzuteilen: die erste Region bildet tripelhelikale Domänen aus und ist für die Anknüpfung des Moleküls an eine Fibrille zuständig. Die zweite Region, ebenfalls als Tripelhelix, dient als Arm, der von der Kollagenfibrille absteht und die dritte Region in die Nähe von Zellen oder anderen Gerüststrukturen bringt. Da die Moleküle nicht komplett aus Tripelhelices bestehen, werden sie als *fibril-associated collagen with interrupted triple helices*, kurz *FACITs*, bezeichnet.

Eine ähnliche Funktion erfüllen Ankerfibrillen. Diese werden ausschließlich von Kollagen VII gebildet und binden an Basalmembranen und naheliegende Plaques. In diese Verbin-

ung werden andere Kollagene mit eingeschlossen, was zu einer Stärkung des Gewebes führt. [73].

Netzwerkbildende Kollagene bilden Proteinmembranen, die verschiedene Gewebearten umgeben, wie z. B. die Basalmembran. Die Strukturen sind sehr unterschiedlich und daher nicht miteinander vergleichbar, wie es bei fibrillenbildenden Kollagenen möglich ist. In die Netzwerke werden andere Moleküle, beispielsweise Kollagene oder Proteoglykane, eingeschlossen.

Tabelle 2.1 Verteilung der Kollagentypen auf die unterschiedlichen Arten [80]

Art	Kollagentyp
Fibrillär	I-III, V, XI, XXIV, XXVII
Fibrillenassoziiert	IX, XII, XIV, XVI, XIX-XXII, XXVI
Membranassoziiert	XIII, XVII, XXIII, XXV
Netzwerkbildend	IV, VI, VIII, X
Ankerfibrillen	VII
Multihelix	XXV, XXVIII

Membranassoziierte Kollagene werden als *membrane-associated collagens with interrupted triple-helices*, kurz *MACITs*, bezeichnet. Sie bestehen aus einer N-terminalen zytosolischen Domäne, einer kurzen Transmembrandomäne sowie drei (Kollagen XIII, XXIII und XXV) oder mehr (Kollagen XVII) Helixdomänen, die von nicht-helikalen Sequenzen unterbrochen werden [94]. Die molekularen Mechanismen und Funktionen dieser Art von Kollagenen sind nicht vollständig aufgeklärt.

Die letzte Einordnung sind Multihelix-Kollagene. Diese werden so bezeichnet, da es sich dabei um Kollagene mit multiplen Tripelhelix-Domänen mit Unterbrechungen handelt. Die C-terminalen Domänen dieser Kollagene können abgespalten werden und resultieren somit in den anti-angiogenen Molekülen Endostatin und Restin [26]. Die kompletten Prote-

ine Kollagen XXV und XXVIII sind sich sehr ähnlich und besitzen ähnliche Eigenschaften, werden jedoch von unterschiedlichen Zelltypen produziert.

Kollagen XXVIII kann keiner dieser Arten zugeordnet werden. Sequenzen des Von-Willebrand-Faktor-A (ein Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors VIII) flankieren dieses Kollagen, und obwohl es ähnliche Sequenzen wie Kollagen VI besitzt, kann keine geometrische Einordnung in die gleiche Kollagenart gefunden werden [26].

Kollagen-Zell-Verbindungen

Für die Interaktionen zwischen Kollagen und Zellen sind verschiedene Zellrezeptoren bzw. Verbindungsmoleküle sowie entsprechende Erkennungssequenzen im Kollagen notwendig. Die bekannteste Erkennungssequenz für Zellbindungen besteht aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure und wird nach dem Einbuchstabencode als RGD-Sequenz bezeichnet. Neben Kollagen kommt diese Sequenz außerdem in weiteren Matrixproteinen wie Fibronectin vor, das eine indirekte Verbindung zwischen Zelle und Kollagen herstellt. Die RGD-Sequenz dient der Erkennung durch den Zellrezeptor Integrin [67].

Eine weitere Möglichkeit für Zell-Matrix-Interaktionen sind direkte Bindungen, die durch verschiedene Zellrezeptoren hergestellt werden können. Diese werden in vier Subgruppen eingeteilt, die sich in der Peptiderkennungssequenz voneinander unterscheiden. Die Rezeptoren der ersten Gruppe binden an die Aminosäurenabfolge Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (GPO), wie z. B. das Glykoprotein VI [84]. Die zweite Gruppe besteht aus Mitgliedern der Integrinfamilie sowie den Discoidindomänen-Rezeptoren 1 und 2 (DDR1 und DDR2), die jeweils spezifische Erkennungssequenzen haben. Häufig wird von diesen Rezeptoren das Motiv Glycin-Phenylalanin-Hydroxyprolin (GFO) gebunden [43–45]. Weitere Integrinrezeptoren sind in Gruppe drei zu finden, die noch nicht vollständig aufgeklärte Sequenzen in Kollagen erkennen und binden [29]. Alle weiteren direkt bindenden Rezeptoren erkennen Motive in den nicht-kollagenen Domänen der Kollagenmoleküle und werden in der vierten Subgruppe zusammengefasst [67].

2.1.2 Medizinischer Nutzen von Kollagen

Aufgrund der starken Verteilung von Kollagen in verschiedenen Geweben, sowie der Fähigkeit stabile Fasern und Netzwerke zu bilden, ist Kollagen gut für medizinische Anwendungen geeignet. Weitere Vorteile sind die Bioabbaubarkeit sowie die niedrige Immunogenität. Kollagen kann in verschiedenen Strukturen einen medizinischen Einsatz leisten. Dazu zählen Formen wie Scheiben [23], Schwämme [101], Gerüste [97, 108, 114] und Gele [20]. Dabei ist die Form der kollagenhaltigen Matrix von der Anwendung abhängig. Für den Einsatz im Auge ist eine festere Form wie eine Scheibe notwendig, während Gele oder Schwämme auf Wundverletzungen aufgetragen werden können.

Kollagen-Hydrogele

Die Hauptanwendung von Kollagen geschieht in der Form von Hydrogelen. Diese sind aufgrund ihrer elastischen und formbaren Eigenschaften als Basis für die Kultivierung von Zellen geeignet. Seit den 1970er Jahren ist der Bedarf an solch einem Material groß. Komplexe Reaktionen in gewebeähnlichen Systemen konnten damals nicht fachgerecht untersucht werden, sodass biologische Materialien wie z. B. Kollagen und Alginat als Immobilisierungsplattform für verschiedene Zellen eingesetzt wurden [5, 41, 89].

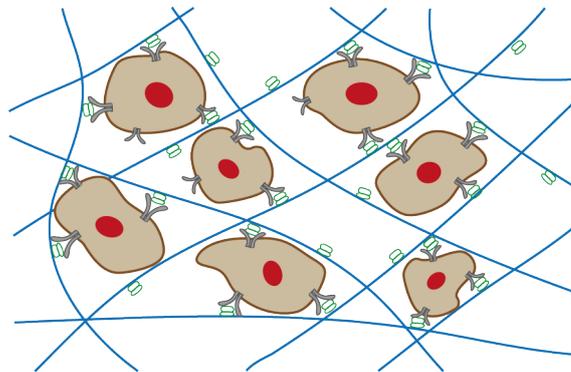


Abbildung 2.5 Schematische Darstellung eines mit Zellen besiedelten Hydrogels. Ankerproteine sorgen für eine Bindung der Zellen an das Hydrogel.

Besonders Kollagen ist als Hauptbestandteil der ECM ein vielversprechendes Material für die Einbindung von Zellen, da es wichtige RGD-Bindesequenzen enthält und zudem

mechanische Stabilität liefert. Eine schematische Darstellung von Zellen in einem Hydrogel ist in Abbildung 2.5 zu sehen. Die Polymerisierung geschieht bei nativem Kollagen durch die natürliche Fibrillenbildung [1]. Bei extrahiertem Kollagen kann die Bildung einer Matrix durch die Erhöhung der Temperatur und des pH-Wertes erreicht werden [100]. Gele aus Kollagen können zwar durch die Konzentration hinsichtlich ihrer Gelstärke beeinflusst werden, jedoch sind damit keine sehr festen, mechanischen Gebilde möglich [110]. Oft ist es notwendig, weitere natürliche oder synthetische Polymere oder Crosslinker einzusetzen.

Anwendung von Kollagen-Hydrogelen

Von den 28 bekannten Kollagentypen finden hauptsächlich die ersten drei Anwendung in verschiedenen biomedizinischen Zwecken und im Tissue Engineering. Diese fibrillären Kollagene werden überwiegend aus tierischen Quellen extrahiert und anschließend für Zellkulturzwecke oder biomedizinische Anwendungen aufgereinigt.

Eine der häufigsten Anwendungen von Kollagen in der Biomedizin ist als Hornhautimplantat nach Verletzungen oder Krankheiten [103, 111]. Dafür werden azelluläre Kollagenstrukturen implantiert, die anschließend von körpereigenen Zellen besiedelt werden und somit die Hornhaut ersetzen können [23]. Eine weitere, verbreitete Anwendung findet Kollagen als Hauttransplantat. Die Gründe, weshalb ein Hauttransplantat notwendig sein kann, reichen von Geschwüren bei Diabetikern über großflächige mechanische Verletzungen der Haut bis hin zu Verbrennungen. Einige der Kollagenanwendungen sind bereits kommerziell erhältlich, wie z. B. Biobrane[®] (bei Verbrennungen), Apligraf[®] (nach Hautgeschwüren) oder INTEGRA[™] Bilayer Matrix Wound Dressing (mit spezieller Beschichtung gegen Austrocknung). Ebenfalls als Produkt für Hautverletzungen ist Alloderm[®] auf den Markt gekommen, allerdings hat sich der Nutzen inzwischen Richtung Weichgewebeimplantate verschoben. Heutzutage wird es für die Rekonstruktion von Brüsten oder inneren Organen verwendet.

Des Weiteren kann Kollagen eingesetzt werden, um Nervenschäden zu beheben. Kommerziell erhältlich ist NeuraGen[®] (INTEGRA[™]), das schlauchförmig eingesetzt wird und die

Nervenregeneration über eine Lücke hinweg fördert (siehe Abbildung 2.6). Bei Schädel- oder Rückenoperationen kann DuraGen® (INTEGRA™) eingesetzt werden, um verletzte Hirnhaut zu ersetzen und den Verlust von Spinalflüssigkeit zu verhindern. Für den gleichen Zweck wurde TissuDura (Baxter) entwickelt [21, 24].

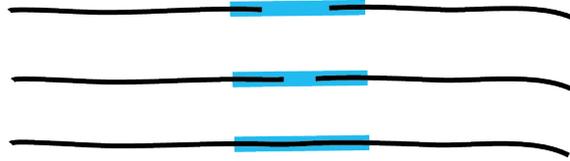


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung eines schlauchförmigen Kollagenkonstruktes zur Überbrückung einer Nervenverletzung und Abbildung des erwarteten Heilungsfortschritts.

Die Verwendung von Kollagen beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Rekonstruktion von weichem Gewebe. Als Knochen- oder Knorpelimplantat gibt es ebenfalls kommerzielle Anwendungen [14]. Von Matricel werden verschiedene Membranen hergestellt, die zur Knochenregeneration (Remaix) oder Knorpelregeneration (Cartimaix) eingesetzt werden.

In der Zellkultur werden die Typ I, II und III Kollagene eingesetzt, um als biologisches und induzierendes Gerüst für Zellen zu dienen. Da Kollagen alleine ein sehr weiches Netzwerk bildet, werden häufig weitere Komponenten zur Stabilisierung dazu gegeben, z. B. Polyethylenglykol (PEG) [77], Fibrin [74], oder Hyaluronsäure [42]. So wurden z. B. embryonale Pankreasvorläuferzellen in einer Matrix aus Kollagen I und PEG eingeschlossen und konnten zu reifen Zellen differenzieren und inselähnliche Strukturen bilden [56].

Ein weiterer Nutzen von Kollagen in biomedizinischer Sicht ist die Untersuchung von Tumorgewebe in 3D-Hydrogelen [88]. In solchen *in vitro*-Tumoren können Zell-Zell-Interaktionen und tumorerzeugende Mechanismen untersucht werden. Außerdem können Studien zur Nährstoffversorgung und Sauerstoffmangelerscheinungen der Zellen durchgeführt werden. Dies ermöglicht ein genaueres Bild von Tumorgewebe im Körper.

2.1.3 Klassische Kollagengewinnung

Da Kollagen eine Hauptkomponente der ECM ist, befindet es sich in allen stützenden und strukturgebenden Geweben, wie z. B. Sehnen, Bänder, Knorpel und Knochen. Doch auch in verschiedenen Basalmembran oder dem Auge sind unterschiedliche Kollagentypen zu finden. Die klassische Gewinnung von Kollagen geschieht über verschiedene Extraktionen aus diversen Gewebearten. Dafür werden sowohl Schlachtabfälle von Rindern, als auch humanes Gewebe wie Placenta verwendet [57, 69].

Die Extraktion von Kollagen geschieht entweder über eine saure oder eine alkalische Aufarbeitung. In beiden Fällen ist eine Vorbehandlung bei über 45 °C notwendig, um das native, unlösliche Kollagen für die Extraktion vorzubereiten. Je nach pH-Wert der Extraktion kann das gewonnene Kollagen in zwei Typen unterschieden werden, das sich in seinem isoelektrischen Punkt unterscheidet (pI von 8-9 bei saurer Behandlung und pI von 4-5 bei alkalischer Extraktion) [25].

Da mit der Verwendung von Rindergewebe gewisse Übertragungsrisiken von Krankheitserregern nicht ausgeschlossen werden können, gibt es inzwischen eine Vielzahl von Alternativen zur Kollagengewinnung. Kollagen aus Schweingewebe, das eine hohe Ähnlichkeit zu humanem Kollagen zeigt, hat ein geringes immunogenes Potenzial, kann jedoch auch Krankheiten übertragen. Im Gegensatz dazu steht Kollagen aus Meerestieren, die als sichere Quellen betrachtet werden [68]. Einige der Gründe für diese Kennzeichnung sind [83]:

- Keine Zoonosen wie bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE) und Maul- und Klauenseuche (MKS)
- Hoher Kollagengehalt
- Umweltfreundlich
- Geringere Immunogenität
- Geringe regulatorische Probleme und einfachere Qualitätskontrolle

Weitere neue Kollagenquellen sind Geflügel [25], Känguru [39], Alligator [107], Ratte, Ente und Frosch [83]. Obwohl die Extraktion aus Quellen wie Schweinehaut, Rinderknochen und -hufen die höchste Ausbeute an Kollagen liefert, wird die Nutzung von zusätzlichen Tierquellen beliebter, um die Abfälle der Fischindustrie einem zusätzlichen Nutzen zuführen zu können [25]. Des Weiteren besitzt Kollagen in Meerestieren andere Eigenschaften, wie z. B. höhere Denaturierungstemperaturen [82], die genutzt werden können, um Verbesserungen im medizinischen Nutzen zu bewirken.

Bei allen tierischen Quellen bleibt allerdings der Nachteil bestehen, dass lediglich ein Gemisch von Kollagen extrahiert werden kann. Alleine über die Auswahl des Gewebes kann keine Sicherheit erlangt werden, dass beispielsweise reines Kollagen I aus Sehnen extrahiert werden kann. Zudem gibt es zwischen unterschiedlichen Ansätzen Variationen, da sich das verwendete Gewebe minimal voneinander unterscheidet. Zuletzt gibt es bei Schweinen und Rindern auch ethisch-religiöse Gründe, weshalb das gewonnene Kollagen nicht eingesetzt werden kann. Diese Nachteile können mit einer rekombinanten Herstellung des Kollagens umgangen werden [9].

2.2 Biotechnologische Produktion von Kollagen

Alternativ zur klassischen Kollagengewinnung aus tierischen und menschlichen Quellen können biotechnologische Methoden zur Expression der Gene eingesetzt werden. In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Biosynthesysteme erläutert und die Vor- und Nachteile kurz betrachtet.

2.2.1 *Pichia pastoris* als Expressionssystem

Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* wurde 1995 dem Organismus *Komagataella* zugeordnet und in *Komagataella pastoris* umbenannt [109]. Diese Einordnung bestand bis 2009, als über Multigen-Sequenz-Analysen festgestellt wurde, dass die *Pichia pastoris*-Stämme, die in Laboren weltweit für die rekombinante Produktion von Proteinen benutzt werden,

Komagataella phaffii sind [46]. Da die internationale Literatur weiterhin von *Pichia pastoris* handelt, wird der Hefestamm auch in dieser Arbeit so bezeichnet.

Die Hefe wächst als einzelliger Organismus, ist mit simplen Methoden genetisch veränderbar und kann in günstigen Medien kultiviert werden [33]. Diese prokaryotischen Eigenschaften werden durch eukaryotische Eigenschaften, wie post-translationale Modifikationen (z. B. Glykosylierungen und Disulfidbrücken) oder die Eigenschaft auch repetitive Bereiche synthetisieren zu können, ergänzt [48, 50, 53]. Zudem haben die Zellen eine ähnlich kurze Generationszeit wie Bakterien und können sich somit in Komplexmedium in ca. 90 Minuten, in definiertem Medium in ca. 3 Stunden und in Medium mit Methanol als Kohlenstoffquelle in ca. 5 Stunden teilen [18]. In Abbildung 2.7 ist eine mit *Pichia-pastoris*-Kolonien bewachsene Agarplatte gezeigt.



Abbildung 2.7 *Pichia-pastoris*-Kolonien auf einer Agarplatte.

Als methylotrophe Hefe kann *P. pastoris* Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid verstoffwechseln. Dieser erste Schritt des Methanolmetabolismus wird von dem Enzym Alkoholoxidase (AOX, EC 1.1.3.13) katalysiert. Die Alkoholoxidase befindet sich im Peroxisom der Zellen und kann bei wachstumslimitierenden Methanolkonzentrationen bis zu 30 % der gesamten Proteinmenge einer Zelle einnehmen [16]. Zwei verschiedene Gene kodieren für das Enzym, *AOX1* und *AOX2*, jeweils unter der Kontrolle eines stark regulierbaren Promotors. Wenn Methanol als einzige Kohlenstoffquelle im Medium vorhanden ist, werden beide Promotoren induziert. Nach Induktion liefert *AOX1* die Mehrheit der Alkoholoxidasen in den Zellen, da der *AOX1*-Promotor bis zu 1000-fach induziert werden kann, was zu einem hohen Methanolstoffwechsel führt [17]. Bei Integration einer Genkassette mit Erhalt der *AOX1* wird ein Methanol utilization plus (Mut^+)-Stamm

hergestellt. Der *AOX2*-Promotor wird deutlich schwächer induziert, was bei einer Deletion von *AOX1* einen langsamen Methanolstoffwechsel zur Folge hat. Bei einem Verlust des *AOX1*-Gens wird der Stamm als Methanol ut ilization slow (*Mut^s*) bezeichnet. Falls keine der beiden Alkoholoxidasen ein natives Gen besitzt und demnach kein Methanol verstoffwechselt werden kann, liegt ein Methanol ut ilization minus (*Mut⁻*)-Stamm vor.

Der stark regulierbare *AOX1*-Promotor kann für die heterologe Proteinproduktion genutzt werden. Die Mehrheit der in *P. pastoris* produzierten Proteine werden unter der Kontrolle dieses Promotors produziert. Die Vorteile des Promotors sind die einfache Regulierung über die Zugabe der Kohlenstoffquelle. Wenn sich Glycerol, Glukose oder andere übliche Kohlenstoffquellen im Medium befinden, sind die *AOX*-Promotoren inhibiert und es wird keine *AOX* produziert. Die Abwesenheit der genannten Medienbestandteile ist nicht ausreichend für eine Induktion des Promotors, zusätzlich muss Methanol im Medium vorliegen [50]. So kann die Kultivierung in eine Wachstums- und in eine Produktionsphase geteilt werden, indem zunächst unter Zugabe klassischer Kohlenstoffquellen eine hohe Biomasse generiert wird und anschließend über einen Wechsel zu Methanol als Kohlenstoffquelle die Proteinproduktion induziert wird.

Daneben stehen eine Reihe von weiteren Promotoren in *Pichia pastoris* zur Verfügung: *P_{GAP}*, *P_{FLDI}*, *P_{PEX8}* und *P_{YPTI}* [12]. Diese Promotoren werden hauptsächlich genutzt, wenn Methanol nicht im Prozess erwünscht ist, z. B. bei der Produktion von Lebensmittelkomponenten, oder wenn Methanol aufgrund seiner Brandgefahr nicht eingesetzt werden soll. Die Promotoren *P_{GAP}* und *P_{FLDI}* liefern vergleichbare Proteinausbeuten wie unter der Kontrolle des *AOX1*-Promotors und können durch weniger gefährliche Reagenzien, z. B. Glukose bzw. Methylamin/Glukose, induziert werden. Wenn ein geringeres Expressionslevel gewünscht ist, kann auf die Promotoren *P_{PEX8}* und *P_{YPTI}* zurück gegriffen werden. Dies kann von Vorteil sein, wenn ein großer Teil der unter einem starken Promotor produzierten Proteine fehlgefaltet oder fehllokalisiert ist [32]. Zudem können auch diese Promotoren sowohl von Methanol als auch von anderen Induktoren (Glukose, Mannitol) induziert werden, sodass auch hier eine Wahl zwischen toxischen und brandgefährdenden sowie ungefährlichen Reagenzien besteht.

2.2.2 Kollagenproduktion in *P. pastoris*

Die Kollagene I-III wurden bereits rekombinant in *P. pastoris* produziert [59, 98], jeweils unter Koexpression der beiden Untereinheiten der Prolyl-4-hydroxylase (P4H). Sie waren in ihrer Zusammensetzung identisch mit nicht-rekombinantem Kollagen und hatten nativ und rekombinant jeweils das gleiche Verhältnis an 4-Hydroxyprolin. Die Produktion der verschiedenen Strukturproteine wurde anschließend optimiert, sodass für alle drei Kollagene hohe Ausbeuten möglich sind [65, 75]. Die Produktionsstrategien beruhten jedoch ausschließlich auf einer intrazellulären Produktion der Kollagene, sodass anschließend weitere Prozessschritte zur Aufreinigung notwendig waren.

Neben den vollständigen Kollagenmolekülen wurden ebenfalls Teilmoleküle produziert. Bereits 1998 wurden Fragmente von Kollagen III inklusive der Untereinheiten der P4H intrazellulär in *Saccharomyces cerevisiae* produziert [95]. Myllyharju *et al.* beschäftigen sich seit 2006 mit der Produktion von Kollagen-Einzelketten [66]. Obwohl die Einzelketten sekretiert werden konnten, gelang dies bei den vollständigen Kollagenketten bei Verwendung desselben Sekretionssignals nicht. Über die Produktion von rekombinanter Gelatine für den Einsatz als Hydrogel [104, 105] erreichten auch Wertén *et al.* die Produktion eines „Kollagen inspirierten Triblock-Kopolymers“ [106]. Der Fokus liegt bei diesen Arbeiten jedoch nicht auf der Produktion eines Kollagens, sondern auf der Produktion von stabilen, temperaturbeständigen und mechanisch justierbaren Hydrogelen.

Obwohl bereits der Zusammenhang einer gesteigerten Ausbeute von Kollagen bei zusätzlicher Expression der P4H-Gene dargestellt wurde [98], erreichen Wertén *et al.* die Produktion der gelatine- und kollagenähnlichen Einzelketten ohne die Expression dieser Gene. Die höhere Ausbeute an Kollagen bei Koexpression der P4H ist auf zusätzliche Disulfidbindungen zurückzuführen, die erst nach der Hydroxylierung von Prolin entstehen [98]. Das von Wertén *et al.* produzierte kollagenähnliche Produkt ist ein synthetisches Protein, das in seiner Aminosäurezusammensetzung optimiert wurde, sodass bis auf Prolin keine hydrophobe Aminosäure enthalten ist. Des Weiteren wurden die stark hydrophilen Aminosäuren Asparagin und Glutamin vermehrt eingesetzt sowie der isoelektrische Punkt mithilfe von basischen und sauren Aminosäureresten an den isoelektrischen Punkt

von Knochengelatine angepasst. Die kollagensynthetische Sequenz ist mit repetitiven Endblöcken versehen, die bei Temperaturänderung zu Tripelhelixen trimerisieren.

2.2.3 Alternative Expressionssysteme

Neben der Expression von Kollagen in *Pichia pastoris* steht eine Vielzahl von weiteren Expressionssystemen zur Verfügung. Dazu zählen andere Hefen, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, aber auch Pflanzen-, Insekten- und Säugetierzellen sowie transgene Mäuse.

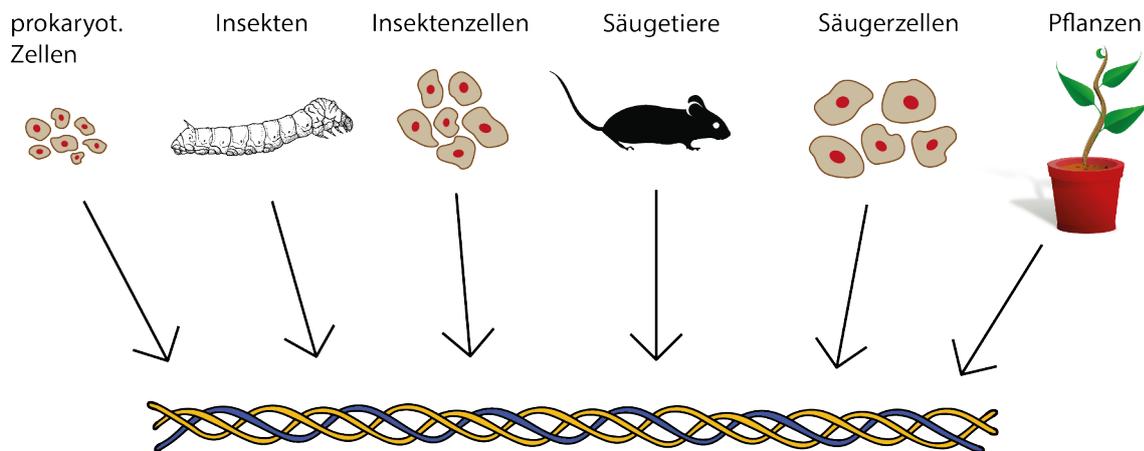


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung der verschiedenen Expressionssysteme für rekombinantes Kollagen.

Verschiedene Kollagentypen wurden bereits rekombinant in *Saccharomyces cerevisiae* produziert. Sowohl tripelhelikale Prokollagene [91] als auch Kollagenfragmente [95] konnten so hergestellt werden, allerdings gibt es Differenzen zu nicht-rekombinanten Kollagen. In beiden Fällen wurde nicht das gleiche Level an Hydroxyprolin wie in nativem Kollagen erreicht und zudem zeigten sich Unterschiede in der Schmelztemperatur des Kollagens.

Nicht nur in mikrobielle Zellen können Gene für Kollagen rekombinant eingebracht werden, sondern ebenfalls in Insekten bzw. Insektenzellen. Ein Beispiel für kollagenproduzierende Insekten sind die Raupen des Seidenspinners, die kollagenhaltige Kokons produzieren. Die Gene wurden als Fusionsprotein mit eGFP über Vektoren in die Seidenspinnereier eingebracht, aus denen daraufhin Raupen schlüpften, deren Seidendrüsen und anschließend die Kokons GFP und somit auch Kollagen enthielten [93]. Da das Wachstum

eines ganzen Organismus erheblich länger dauert als das Wachstum einzelner Zellen, werden gleichermaßen Insektenzelllinien für die rekombinante Proteinproduktion eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist die Ovarzelllinie Sf9 des Heerwurm (*Spodoptera frugiperda*), in denen Prokollagen I, Kollagen III sowie die Untereinheiten der P4H produziert wurden [47, 58, 96]. Für die Transformation der Zellen wurde in allen Fällen ein Baculovirus verwendet. Allerdings gab es bei diesen Kollagenen ebenfalls Abweichungen in der Schmelztemperatur im Vergleich zu nativem Kollagen.

Pflanzen können gleichermaßen für die Produktion von Kollagen eingesetzt werden. Die humanen Gene für Kollagen I, die P4H und die Lysylhydroxylase 3 (LH3) wurden in Tabakpflanzen eingebracht und resultierten in intaktem Prokollagen, das nach Extraktion stabile Tripelhelixen geformt hat [86]. Die Biokompatibilität wurde anschließend mithilfe von endothelialen Vorläuferzellen überprüft und ist mit nativem humanen Kollagen vergleichbar.

Da Säugetierzellen natürlicherweise Kollagen produzieren, sind in den Zellen die entsprechenden Modifikationssysteme vorhanden [2]. Daher ist die Kollagen-Biosynthese in Säugerzellen dann von Vorteil, wenn komplizierte posttranslationale Modifikationen notwendig sind oder Krankheiten untersucht werden sollen, die durch Mutation oder Deletion in Kollagenen zustande kommen [79]. Aufgrund der vielen Nachteile von heterologer Genexpression in Säugetierzellen (langsameres Wachstum, schwierig genetisch zu verändern, geringe Ausbeuten) wurde die Kollagenproduktion mittels Zellkultur von mikrobiellen Systemen weitgehend abgelöst [4].

Eine weitere Möglichkeit, Säugetiere für die Produktion von rekombinanten Kollagen zu nutzen, sind transgene Mäuse. Bisherige Versuche zeigen die Produktion von unterschiedlichen Homotrimeren, die löslich, tripelhelikal und hydroxyliert waren [38, 92]. Die Gene wurden mit einem Milchdrüsen-spezifischen Promotor gekoppelt, sodass die Kollagenmoleküle in den Milchdrüsen der Mäuse produziert wurden und im Nachhinein aus der Milch extrahiert werden konnten.

Zusätzlich zu den genannten eukaryotischen Systemen wurden Expressionsversuche mit prokaryotischen Systemen gemacht. Ein Nachteil von prokaryotischen Expressions-

stammen ist, dass sie keine post-translationalen Modifikationen machen können und die Proteinbiosynthese bei repetitiven Sequenzen eine hohe Abbruchrate hat. Dennoch wurden verschiedene Kollagene bzw. Kollagenfragmente in *Escherichia coli* produziert. Um die Modifikationen an Prolin und Lysin zu realisieren, wurden bei der Produktion eines Kollagen III-Fragments die entsprechenden Enzyme aus dem Mimivirus mitproduziert und führten zu einer nativ-ähnlichen Verteilung der Hydroxylierungen in dem rekombinanten Kollagen [76]. Ein weiterer Ansatz beschäftigt sich mit dem ko-translationalen Einbau von Hydroxyprolin bei der Kollagenproduktion in *E. coli*, der die post-translationalen Modifikation überflüssig macht [10]. Vergleichbar mit der Expression von Kollagenen in Hefen können außerdem die Gene der humanen P4H mitexprimiert werden, sodass ein aktives heterologes Enzym die Modifikationen durchführen kann [60].

3 Molekularbiologische Arbeiten

Im praktischen Teil dieser Arbeit werden die Klonierungsarbeiten eines Kollagengens und die Transformation des Expressionsvektors in *P. pastoris*, sowie das Screening eines positiven Stamms dargestellt. Im Anschluss wird die Kultivierung des positiven Stamms in unterschiedlichen Kultivierungsmaßstäben betrachtet und die Proteinproduktion untersucht. Zuletzt werden verschiedene Methoden zur Isolierung und Charakterisierung des Zielproteins miteinander verglichen.

In diesem Abschnitt wird zunächst die Wahl des verwendeten Kollagengens betrachtet. Daraufhin werden die Erstellung des Expressionvektors, die Transformation der Hefezellen sowie das Screening nach einem positiven Stamm erläutert.

3.1 Auswahl des Proteinkonstruktes

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung eines Kollagenproteins, das zu biomedizinischen Zwecken eingesetzt werden kann. Da für die meisten medizinischen Anwendungen die ersten drei Kollagentypen verwendet werden, wurde die Auswahl des Zielgens auf diese fibrillären Kollagene reduziert. Ein weiterer Faktor für die Auswahl des Proteins ist die Betrachtung der Zielanwendung. Da das Produkt möglichst vielfältig eingesetzt werden soll, ist die Verwendung von Kollagen I als ubiquitär verbreitetes Kollagen sinnvoll.

Nach dem Vorbild von Wertens *et al.* ist die Klonierung der P4H-Gene nicht notwendig, daher dient diese Vorgehensweise als Grundlage für die weitere Planung des Proteinkonstruktes. Dies schafft nicht nur einen Sekretionsvorteil, da das Proteinkonstrukt kleiner als natives Kollagen ist, sondern zudem einen zeitlichen Vorteil, da anstelle von 4 Genen nur

1 Gen in die Hefe eingebracht werden muss. Somit wird nach Abschluss der praktischen Arbeiten ein semisynthetisches, kollagen-ähnliches Protein zur Verfügung stehen, das mithilfe von Temperaturänderung trimerisieren und dadurch Netzwerke bilden kann. Aufgrund der Kollagensequenz im Mittelstück wird von einer nativen Biokompatibilität ausgegangen, sodass sich das Konstrukt für den Einsatz mit humanen Zellen eignet.

3.2 Design und Gensynthese des Kollagens

Der Aufbau des Proteins wurde so gewählt, dass nach dem Vorbild von Wertens *et al.* ein kollagen-ähnliches Mittelstück von trimerisierenden Endblöcken umgeben sein soll. Für die Endblöcke wurde das von der Gruppe um Wertens verwendete Muster von Prolin-Glycin-Prolin beibehalten, da dies die Grundstruktur aller Kollagenmoleküle ist und aufgrund von Glycin an jeder dritten Position eine enge Packung der Tripelhelix sichergestellt werden kann. Aufgrund der Erfahrungen von Wertens, wurde eine PGP-Blocklänge von 9 für das vorliegende Protein beschlossen, um eine Schmelztemperatur von etwa 40 °C zu erreichen [81]. Damit ergibt sich ein Gebilde von $(PGP)_9$ -Kollagenpeptid- $(PGP)_9$, was in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt ist.

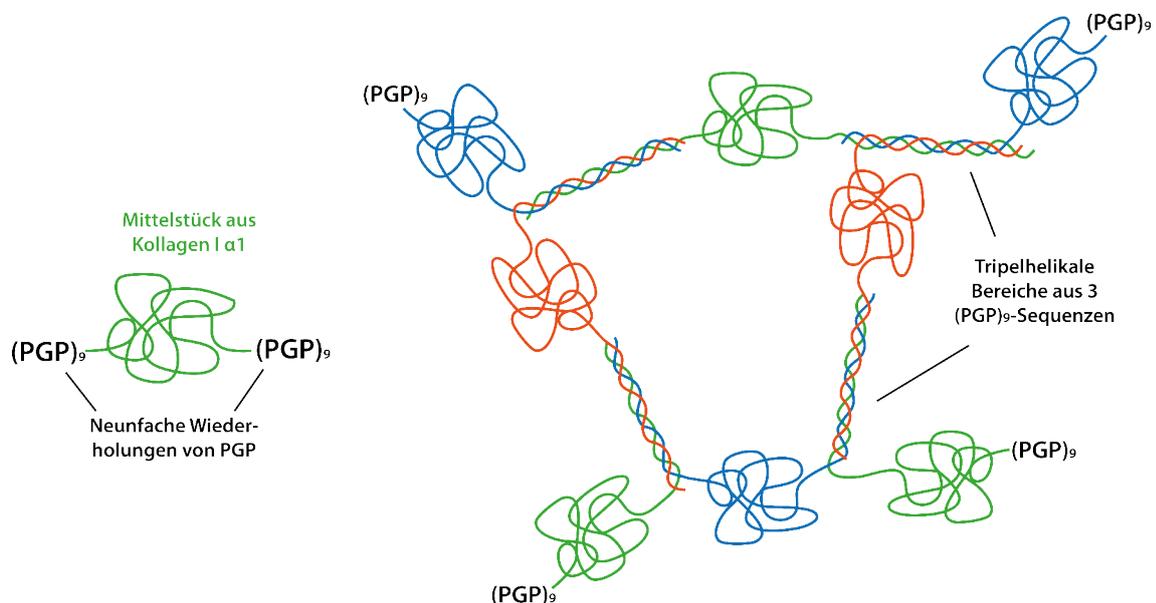


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Kollagen-mimetischen Proteins, sowie der temperaturabhängigen Netzwerkbildung.

Für das Mittelstück wurde natives Kollagen verwendet, um die Biokompatibilität zu erhöhen und natürliche Proteinbindestellen zu integrieren. Da die unterschiedlichen Kollagentypen in verschiedenem Gewebe andere Eigenschaften und Verteilungen besitzen, ist die Wahl des Mittelstückes entscheidend für den späteren Einsatz in biomedizinischen Zwecken. Um die Biosynthese in den Hefezellen zu vereinfachen, wird nicht eine komplette α -Kette, sondern lediglich eine 400 Aminosäuren umfassende Sequenz als Mittelstück für das Kollagenkonstrukt verwendet. Aufgrund der RGD-Bindesequenz bei Position 745 in der $\alpha 1$ -Kette wurde der Aminosäurebereich 541-940 gewählt, sodass die Bindestelle mittig im Konstrukt liegt. Abbildung 3.2 zeigt die Aminosäuresequenz des fertigen Konstrukts.

PGPPGPPGPP GPPGPPGPPG PGP

TS**T**SGSPGSPG **P**DGKTGPPG **A**QDGRPGPP **G**PPGARGQAG **V**MGFP**G**PKGA **A**GE**P**GKAGER
 G**V**PGPPGAVG **P**AGKDGEAGA **Q**GPPG**P**AGPA **G**ERGEQGPAG **S**PGFQGL**P**GP **A**GPPGEAG**K**P
 G**E**QGV**P**GD**L**G **A**PGPSG**A**RGE **R**GF**P**GERGVQ **G**PPG**P**AGPRG **A**NGAPGNDGA **K**GDAGAP**G**A**P**
 G**S**Q**A**PGL**Q**G **M**PGERGA**A**GL **P**G**P**KGD**R**GD**A** **G**PKGADG**S**PG **K**DGVRGL**T**GP **I**GPPG**P**AG**A**P
 G**D**KGESG**P**SG **P**AGPTG**A**RGA **P**GDRG**E**PPG **G**PAGFAG**P**PG **A**DGQ**P**GAK**G**E **P**GDAGAK**G**DA
 G**P**PG**P**AG**P**AG **P**PGI**G**NVGA **P**GAKG**A**RGSA **G**PPGAT**G**FPG **A**AGRVG**P**PGP **S**GNAG**P**PG**P**P
 G**P**AGKEGG**K**G **P**RGET**G**PAG**R** **P**GEV**G**PP**G**PP **G**PAGEK**G**SPG **A**D**L**I**N**

PGPPGPPGPP GPPGPPGPPG PGP

Abbildung 3.2 Aminosäuresequenz des Proteinkonstrukts, grün: trimerisierende Endblöcke, orange: Kollagenmittelstück.

Das Kollagenmittelstück wird flankiert von Erkennungssequenzen für unterschiedliche Restriktionsendonukleasen. Am 5'-Terminus ist eine Basenabfolge angehängt, die eine Erkennungssequenz für das Enzym SpeI liefert, und am 3'-Terminus befindet sich eine Restriktionsschnittstelle für PacI. Diese Schnittstellen können später genutzt werden, um andere Kombinationen von Mittelstück und Endblöcken zu untersuchen. Außerhalb dieser Abfolgen sind die codierenden Sequenzen für die PGP-Wiederholungen, die wiederum von Schnittstellen für Restriktionsenzymen umgeben sind. Das gesamte Konstrukt beginnt am 5'-Terminus mit der Restriktionssequenz für EcoRI und endet am 3'-Terminus mit einer Schnittstelle für NotI. Die eingebrachten Basenabfolgen für die Endonukleasen wurden jeweils unter Berücksichtigung des Leserasters hinzugefügt. Somit ergibt sich ein Konstrukt mit einer Länge von 459 Aminosäuren und einem theoretischen Moleku-

largewicht von 39,4 kDa. Die Gensequenz wird folgend als TcolT benannt, wobei T die Endblöcke und col das Kollagenmittelstück bezeichnet.

Die entsprechende Gensequenz für dieses Konstrukt wurde von Life Technologies hergestellt. Vor der Synthese wurde die Sequenz für die Codonnutzung in *P. pastoris* optimiert. Dies ist notwendig, da nicht jeder Organismus alle tRNAs während der Proteinbiosynthese gleich häufig verwendet. Da es insgesamt 64 Codons im genetischen Code gibt, im Gegensatz dazu aber nur 20 Aminosäuren stehen, können die meisten Aminosäuren von verschiedenen Codons codiert werden. Um einen Abbruch oder eine Verzögerung in der Translation zu verhindern, wurde die Sequenz so optimiert, dass wenig genutzte Codons einer Aminosäure durch häufiger genutzte Codons derselben Aminosäure ersetzt wurden. Da die 1200 Basen lange Sequenz im Mittelstück des Konstruktes aus humanem Kollagen entnommen ist, wurden 242 Basen während der Codonoptimierung ersetzt, um die Sequenz für *P. pastoris* exprimierbar zu machen. Die vollständige Gensequenz befindet sich im Anhang C.

3.3 Konstruktion des Expressionsvektors

Um das Zielgen in *P. pastoris* einzubringen, wurde der Vektor pPIC9K von Invitrogen™ ausgewählt. Dabei handelt es sich um einen 9276 Basenpaare (bp) großen Fusionsvektor, der neben einer Ampicillinresistenz eine Kanamycinresistenz besitzt und zudem über ein Sekretionssignal sowie verschiedene Restriktionsschnittstellen verfügt (Abb. 3.3). Der Vektor ist für Klonierungen in den *Pichia pastoris*-Stämmen GS115 und KM71 konstruiert worden und besitzt daher das 5'-AOX1-Promotorfragment und das 3'-AOX1-Terminierungssignal. Des Weiteren ist das α -mating-factor-Sekretionssignal aus *Saccharomyces cerevisiae* in diesem Vektor vorhanden, sodass das Zielprotein aus den Zellen sekretiert werden kann.

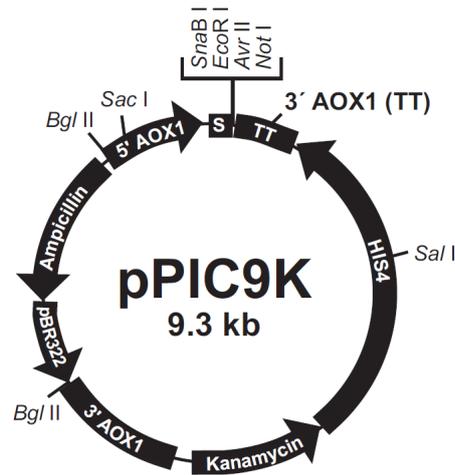


Abbildung 3.3 Expressionsvektor pPIC9K für die Produktion des Kollagen-mimetischen Proteins.

Die Ampicillinresistenz dient nach Transformation in *E. coli* der Selektion auf antibiotikahaltigem Medium, während die Kanamycinresistenz nach Transformation in *P. pastoris* für die Selektion von Klonen mit multiplen Genkassetten genutzt werden kann. Das Gen für die Kanamycinresistenz überträgt keine Widerstandsfähigkeit gegen Kanamycin in *P. pastoris*, sondern gegen Geneticin[®]. Die Widerstandsfähigkeit gegen Geneticin[®] ist abhängig von der Anzahl an Resistenzgenen, sodass annäherungsweise auf die Anzahl der Genkassetten geschlossen werden kann. Ein Gen der Kanamycinresistenz liefert eine Widerstandsfähigkeit gegen ca. 0,25 mg/mL. Mehrfache Integration des Kanamycingens kann die Resistenz gegen ca. 4 mg/mL erhöhen.

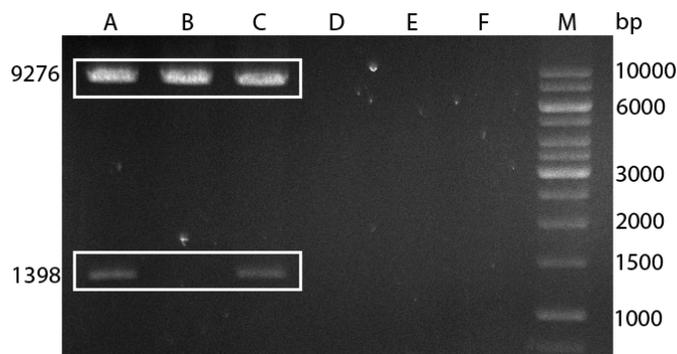


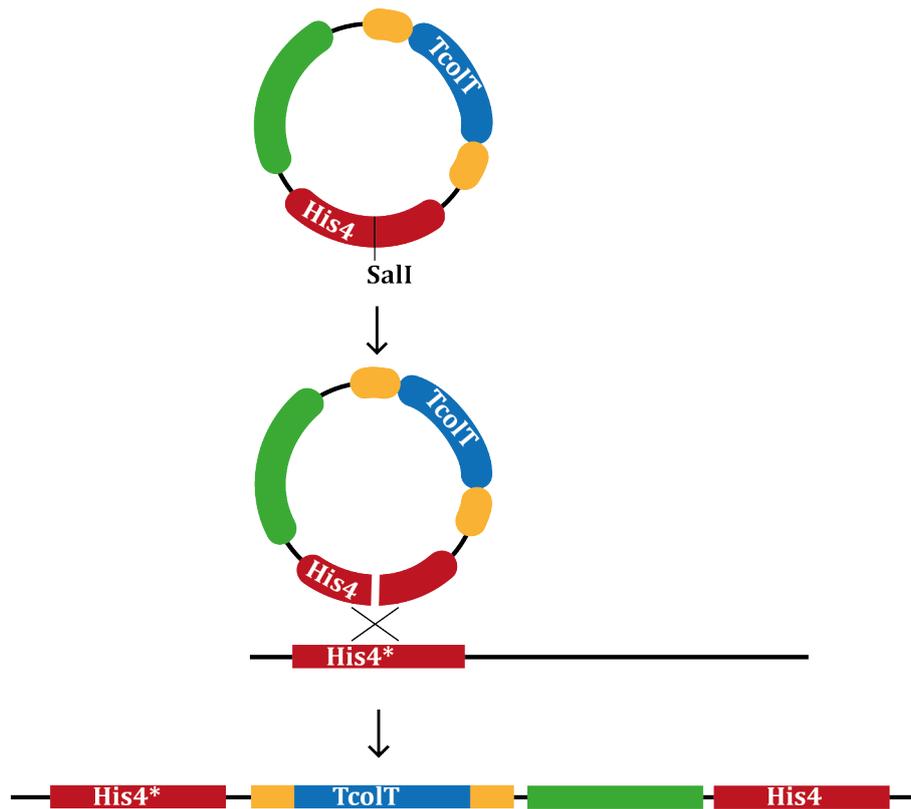
Abbildung 3.4 Ergebnis der Ligation von pPIC9K und TcolI. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M) und verschiedene Ligationsansätze (A-F). Die erwarteten Größen liegen bei 9276 bp für den Vektor und 1398 bp für das Zielgen.

Das Zielgen wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme NotI und EcoRI gerichtet in den Vektor eingebracht, sodass es zwischen dem Sekretionssignal und dem AOX1-Terminierungssignal vorlag. Das Ergebnis der Klonierung wurde im Anschluss per Restriktionsverdau überprüft (Abb. 3.4) und mittels Sequenzierung bestätigt.

3.4 Transformation

Da die Transformation der Hefezellen mit dem linearisierten Plasmid erfolgt, wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym SalI durchgeführt. Nach Linearisierung des Vektors kann mittels homologer Rekombination ein Einbau der Genkassette in das Genom erfolgen, da das Gen für die Histidinol-Dehydrogenase (*His4*) sowohl im Genom von *P. pastoris* als auch in der Sequenz des Vektors vorkommt (siehe Abb. 3.5). Da der GS115-Stamm eine Mutation im nativen *his4*-Gen besitzt, kann anschließend selektiert werden, da ausschließlich Klone mit integriertem Expressionsvektor auf Histidin-defizientem Medium wachsen können.

Der linearisierte Vektor pPIC9K-TcolT wurde per Elektroporation in den Hefestamm *Pichia pastoris* GS115 (*his4*) transformiert. Dafür wurde das kondensierte Protokoll von Lin-Cereghino [51] verwendet, das eine verkürzte Kombination aus einem Hitzeschock-Protokoll und einem Elektroporations-Protokoll darstellt. Um kompetente Zellen herzustellen, wurden Methoden aus dem Protokoll für eine Hitzeschocktransformation übernommen und mit Methoden der Elektroporation ergänzt, um die Zellen zu transformieren. Dieses Protokoll profitiert von einer kürzeren Dauer, weniger Handgriffen und geringerer Reagenzienmenge, sodass eine hohe Transformationseffizienz sowie eine geringere Kontaminationsgefahr erreicht werden können.



His4* = Histidinol-Dehydrogenase-Gen mit Mutation

Abbildung 3.5 Homologe Rekombination zwischen dem nativen, mutierten His4-Gen und dem funktionsfähigen His4-Gen des Vektors

Nach der Elektroporation der Zellen wurden diese auf Histidin-selektiven MD-Platten (Minimal Dextrose Medium) ausplattiert und über 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 6 Einzelkolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR und AOX1-spezifischen Primern untersucht. Die Amplifikate der Kolonie-PCR wurden per Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden angefärbt (Abb. 3.6). Das Zielgen hat eine Größe von ca. 1,9 Kilobasen (kb), da zu der Größe des Konstruktes (1398 bp) aufgrund der gewählten AOX1-spezifischen Primer ein PCR-Produkt von 492 bp addiert werden muss. Somit liegt das Zielgen in einer ähnlichen Größenordnung wie das native AOX1-Gen vor, das eine Größe von etwa 2,2 kb besitzt. Bei Vorhandensein des nativen Alkoholoxidasegens und damit einhergehenden Mut⁺-Klonen ist daher auf dem Gel mit einer Doppelbande zu rechnen. Kann kein Amplifikat bei 2,2 kb nachgewiesen werden, liegt das native Gen nicht vor, und es wurden Mut^s-Klone produziert.

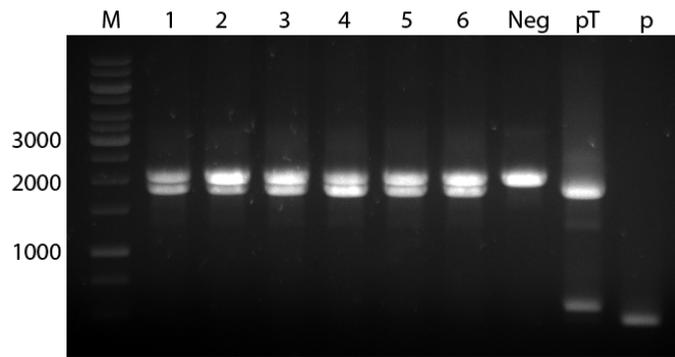


Abbildung 3.6 Nachweis der erfolgreichen Transformation mittels Kolonie-PCR. Aufgetragen sind ein molekularer Größenmarker (M), die Amplifikate der ausgewählten Kolonien (1-6), mit Leervektor transformierte *P. pastoris*-GS115-Zellen (Neg), aufgereinigtes Plasmid (pT) und Leerplasmid (p).

Abbildung 3.6 zeigt, dass alle sechs ausgewählten Klone sowohl das Insert (1,9 kb) als auch das native *AOX1*-Gen (2,2 kb) besitzen, sodass bei allen Klonen Mut^+ -Wachstum erwartet werden kann. Die Sequenzlänge des Zielgens in den Klonen 1 bis 6 stimmt mit der Positivkontrolle, dem aufgereinigten Plasmid (pPIC9K-TcolT), überein. Als Negativkontrolle wurde eine mit Leervektor transformierte Kolonie vervielfacht und aufgetragen. In dieser konnte in Übereinstimmung mit der Erwartung kein Zielgen nachgewiesen werden, lediglich das native *AOX1*-Gen ist in dieser Probe (Neg) vorhanden.

3.5 Screening der transformierten Kolonien

Nach der genetischen Bestimmung der positiven Klone wurde ein Screening auf Geneticin[®]-haltigem Medium durchgeführt. Dafür wurden YPD-Agarplatten (YPD = Hefeextrakt-Pepton-Dextrose-Medium) verschiedenen Konzentrationen an Geneticin[®] angefertigt und die Kolonien über eine Stempelmethode auf die Platten übertragen. Die getesteten Konzentrationen liegen zwischen 0,5 mg/mL und 4 mg/mL.

Tabelle 3.1 Screeningergebnisse der 6 ausgewählten Klone auf Geneticin[®]-haltigen YPD-Platten. Die Antibiotikakonzentration ist angegeben in mg·ml⁻¹ (++ gutes Wachstum, + Wachstum, o kein Wachstum erkennbar).

Klon	0,5	0,75	1	1,5	1,75	2	3	4
1	+	o	+	+	+	o	+	o
2	+	+	+	++	+	o	o	o
3	+	+	+	++	+	+	+	o
4	+	+	+	+	o	+	+	o
5	+	+	+	++	+	+	+	+
6	+	+	+	+	++	+	+	o

Wie in Tabelle 3.1 zu erkennen ist, zeigen alle getesteten Klone Wachstum auf dem Medium mit höheren Geneticin[®]-Konzentrationen. Da dies ein Indiz für die mehrfache Integration der Genkassette ins Genom des Klons ist, werden von den sechs Stämmen zunächst die Klone 1, 4 und 5 kultiviert, um sie auf die Produktion des Zielproteins zu testen.

4 Kultivierung und Proteinproduktion

In diesem Abschnitt werden die unterschiedlichen Kultivierungen in verschiedenen Maßstäben dargestellt. Zunächst wurden Schüttelkolbenkultivierungen mit drei der sechs positiv getesteten Klonen durchgeführt. Daraus folgend wurde ein Klon mit guter Proteinproduktion gewählt, der im Bioreaktor kultiviert wurde. Um optimale Induktionsbedingungen zu gewährleisten, wurde ein Methanol-Sensorsystem in das Bioreaktorsystem integriert und die Proteinproduktion optimiert.

4.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Zunächst wurden mit den drei Stämmen 1, 4 und 5 Schüttelkolbenkultivierungen durchgeführt. Der korrekte Einbau der Genkassette ins Genom konnte mittels Kolonie-PCR bestätigt werden. Um Fehler in der Proteinbiosynthese oder Sekretion auszuschließen, werden die positiv getesteten Klone in einer Kultivierung auf Proteinproduktion untersucht. Nach einer Wachstumsphase werden die Kulturen mit Methanol induziert, um die Proteinproduktion der Stämme zu analysieren. Sollte keiner der drei Stämme eine ausreichende Proteinproduktion zeigen, werden die verbleibenden drei Stämme ebenfalls kultiviert.

4.1.1 Kultivierung unter Standardbedingungen

Die Kultivierungen der positiven Klone zur Proteinproduktion wurde in einem Schüttelinkubator bei 30 °C und 150 rpm durchgeführt. Dafür wurde zunächst über Nacht eine

Vorkultur inkubiert, die zum Animpfen einer Hauptkultur genutzt wurde. Die Hauptkultur wurde auf eine optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD_{600}) von 1 angesetzt. Zur Induktion wurde ein Medium verwendet, das sich in seiner Zusammensetzung bezüglich der Kohlenstoffquelle von dem Vorkulturmedium unterschied, da Methanol anstelle von Glycerol zugegeben wurde. In regelmäßigen Abständen wurde zusätzlich Methanol ins Medium gegeben, um die Konzentration von 0,5 % konstant und somit die Induktion aufrecht zu halten. Die Kultivierung endete 3 Tage nach Beginn der Hauptkultur.

Während der Kultivierung wurden täglich zwei Proben zu je 2 mL entnommen, die per Zentrifugation in Zellpellet und Medienüberstand getrennt und mittels SDS-PAGE auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht wurden. Da bei einem korrekten Ablauf der Proteinbiosynthese sowie der anschließenden Prozessierung des Proteins der α -Faktor zu einer Sekretion des Zielproteins führt, werden zunächst die Kulturüberstände auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht.

Kollagenmoleküle verhalten sich bekannterweise in SDS-PAGE-Gelen nicht ihrer Größe entsprechend, da sie in einer Höhe laufen, die einem größeren Molekulargewicht entspricht. Dies wird mit der hohen Glycin- und Prolinmenge in den Proteinen begründet, da diese kleinen Aminosäuren zu einem besonders geringen mittleren Gewicht der Aminosäurereste führen (91,6 Da) im Vergleich zu bekannten Standardproteinen (ca. 115 Da) [11]. Durch die Glycine ist eine höhere Anzahl von Aminosäuren pro Einheit Molekulargewicht vorhanden, wodurch die SDS-PAGE-Ergebnisse scheinbar ein zu hohes Molekulargewicht anzeigen. Wird vor diesem Hintergrund die elektrophoretische Mobilität der Proteine in einer SDS-PAGE mit der Anzahl der Aminosäuren statt mit dem Molekulargewicht ins Verhältnis gesetzt, kann diese Verschiebung erklärt werden. Somit zeigen sich Kollagene in Banden korrespondierend zu einem ca. 1,4-fachen Molekulargewicht. In Proteinen, die eine gleiche Verteilung aller Aminosäuren besitzen, kann die elektrophoretische Mobilität hingegen mit dem Molekulargewicht verglichen werden. Aufgrund dieser Erklärung wird das Kollagenprotein rechnerisch bei einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa erwartet, obwohl das theoretische Molekulargewicht 39,4 kDa beträgt.

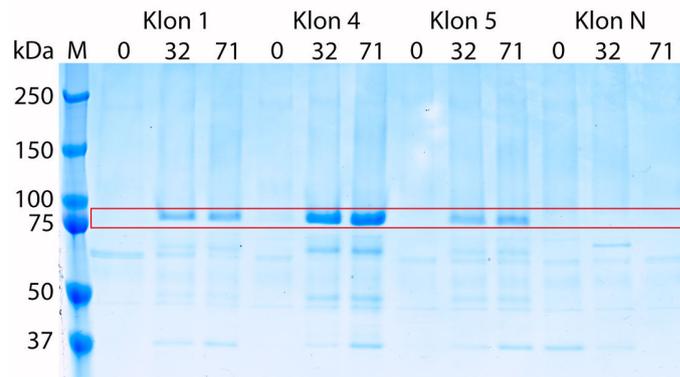


Abbildung 4.1 SDS-Gel der Probenüberstände von Klon 1, 4, 5 und einem Negativklon N bei Kultivierung im Schüttelkolben (30 °C, 150 rpm). Aufgetragen sind ein Größenstandard (M) und die Zeitproben der verschiedenen Kultivierungen (0 h, 32 h, 71 h), Comassiefärbung.

Auf dem Gel in Abbildung 4.1 ist zu erkennen, dass es eine deutliche Bande bei ca. 75 kDa gibt, die bei jedem der Klone unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Über den Verlauf der Kultivierung ist in jedem einzelnen Klon eine Steigerung der Bandenintensität zu erkennen. Zudem sind weitere Banden mit deutlich schwächerer Intensität zu erkennen, bei denen es sich um Abbauprodukte des Zielproteins handeln könnte. Da die erwarteten Molekulargewichte des Kollagenkonstruktes bei 39,4 kDa (theoretisch) bzw. 55,2 kDa (1,4-fach höher als theoretisches Molekulargewicht) liegt, muss ermittelt werden, ob es sich bei den Banden bei ca. 75 kDa um das Zielprotein handelt.

Um die Bandenzusammensetzung weitergehend zu untersuchen, wurde eine erneute Kultivierung von Klon 4 gemacht. Hierfür wurde ein definiertes Medium ohne Proteinzusätze verwendet, um die Aufreinigung der Proben aus dem Medium zu vereinfachen (Medienzusammensetzung siehe Anhang, Kapitel A.3). Die Kultivierung wurde erneut bei 30 °C, 150 rpm und 0,5 % Methanol durchgeführt. Die zweimal täglich entnommenen Proben wurden in Zellpellet und Überstand getrennt bei -20 °C gelagert. Nach Abschluss der Kultivierung wurde eine Analyse per SDS-PAGE und Western Blot mit einem Kollagen-I-spezifischen Antikörper durchgeführt (siehe Abb. 4.2).

In diesem Gel ist ebenfalls eine deutliche Bande zwischen 75 kDa und 100 kDa zu erkennen. Die Hauptbande ist bei Start der Induktion 0 h nicht vorhanden und beginnt 6 h nach Induktion. Die Bandenintensität steigt über den Verlauf der Kultivierung bis 54 h, danach

ist keine deutliche Zunahme erkennbar. Weitere Banden zwischen 37 kDa und 75 kDa nehmen ebenfalls während der Dauer der Kultivierung zu. Das Ergebnis der SDS-PAGE lässt sowohl im Fall des Kollagenproteins als auch im Fall der niedermolekularen Banden auf eine methanolbasierte Induktion schließen. Die Abweichung des Molekulargewichts kann durch Glykosylierungen und andere post-translationale Modifikationen entstehen. Außerdem befinden sich in Kollagen starke intra-molekulare Wechselwirkungen, die durch die reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE nicht aufgelöst werden können. Mittels verschiedener Analysen des Proteins im Anschluss an die Produktion kann dies untersucht werden.

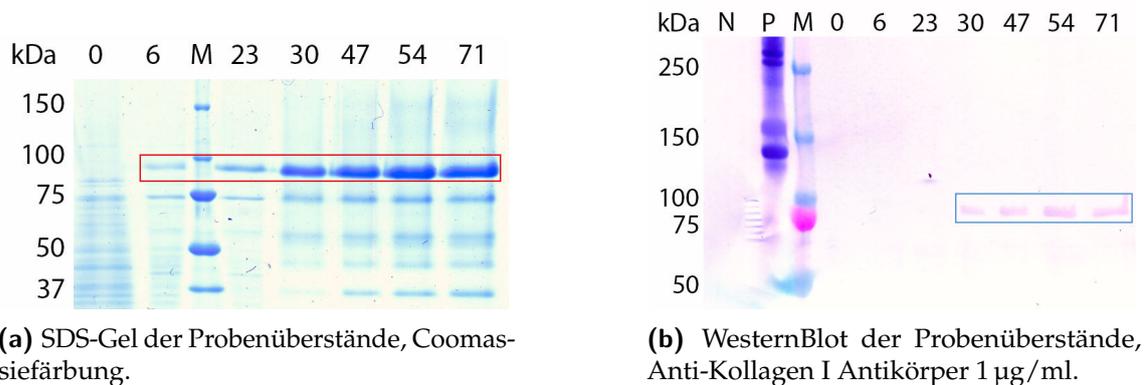
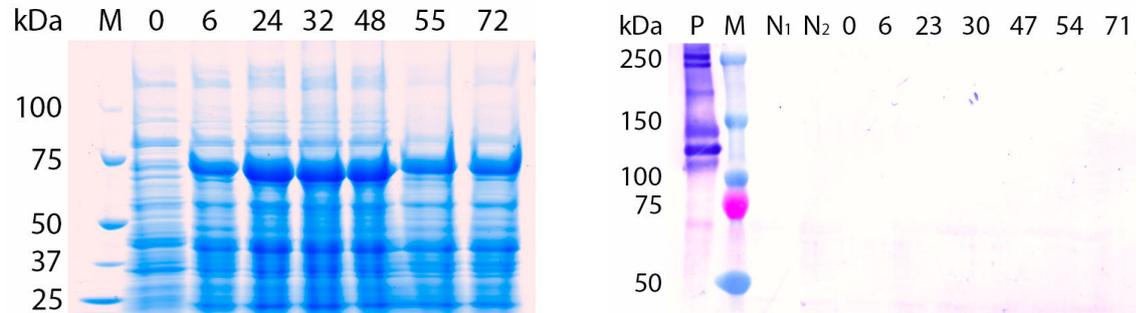


Abbildung 4.2 Aufgetragen sind die Probenüberstände der Kultivierung von Klon 4 (0-71 Stunden), ein molekularer Größenstandard (M), und zusätzlich beim Western Blot: humanes Kollagen I als Positivkontrolle (P), sowie der Probenüberstand aus der Kultivierung eines Klons transformiert mit Leervektor als Negativkontrolle (N).

Im Vergleich zwischen dem Gel der SDS-PAGE und der angefärbten Membran aus dem Western Blot ist zu erkennen, dass sich die Bande zwischen 75 kDa und 100 kDa im Western Blot wiederfindet und daher anzunehmen ist, dass es sich dabei um das Kollagenmimetische Protein (CMP) handelt. Der Antikörper ist allgemein gegen Kollagen I aus Säugetieren gerichtet und daher in der Lage, das Konstrukt mit der Teilsequenz aus humanem Kollagen I erkennen. Zum Vergleich wurde ebenfalls eine Western-Blot-Analyse mit Proben des Zellpellets durchgeführt, um sicher zu stellen, dass kein CMP intrazellulär zu finden ist. In Abbildung 4.3 sind das SDS-Gel sowie der Western Blot dargestellt. Obwohl im SDS-Gel viele Banden zu erkennen sind, und vor allem eine starke Bande in der Größe von 75 kDa auftritt, kann im Western Blot keine Detektion der Banden mittels Antikörper beobachtet werden. Daher kann kein intrazellulärer Verbleib des Proteins

bestätigt werden und die Bande bei 75 kDa muss von einem endogenen Protein stammen. In einem späteren Versuch wurde durch eine Untersuchung mittels Massenspektrometrie nachgewiesen, dass es sich bei der Bande um AOX handelt.



(a) SDS-Gel der Pelletproben von Klon 4, Coomassiefärbung.

(b) Western Blot der Pelletproben von Klon 4, Anti-Kollagen I Antikörper 1 µg/ml.

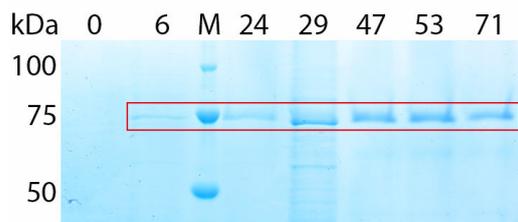
Abbildung 4.3 Aufgetragen sind die aufgeschlossenen Zellpellets der Kultivierung von Klon 4 in *buffered minimal medium* (BMM) (0-72 Stunden), ein molekularer Größenstandard (M), humanes Kollagen I als Positivkontrolle (P), sowie das aufgeschlossene Zellpellet aus der Kultivierung eines Klons transformiert mit Leervektor als Negativkontrolle (N₁ und N₂)

4.1.2 Kultivierung mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen

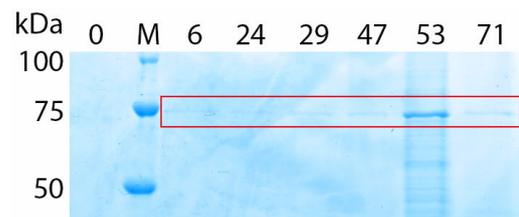
Nach der erfolgreichen Identifizierung eines produzierenden Stamms wurden weitere Experimente zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Dazu wurden zunächst verschiedene Methanolkonzentrationen getestet, um eine mögliche Steigerung der Produktion bei höheren Methanolkonzentrationen analysieren zu können. Die Induktion der Proteinproduktion ist eine Gratwanderung zwischen Optimierung der Produktivität und dem Erreichen toxischer Bedingungen. Die Produktivität wurde in dieser Arbeit als Protein pro Biotrockenmasse (BTM) pro Stunde definiert und setzt sich damit aus den wichtigsten Parametern der Proteinproduktion zusammen. Toxische Bedingungen können bei höheren Methanolkonzentrationen erreicht werden, da die Alkoholoxidase Methanol zu Formaldehyd verstoffwechselt und dieses zytotoxisch ist. Unter optimalen Bedingungen wird das entstandene Formaldehyd unmittelbar nach Bildung durch eine Peroxidase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut. Bei einer Akkumulation von Formaldehyd in der Zelle kommt jedoch es zu unspezifischen Reaktionen des Formaldehyds mit allen organischen Molekülen [27]. Da es keine einheitlichen Angaben zur Toxizität von

Methanol bei *P. pastoris* gibt, wurde eine Erhöhung der Methanolkonzentration von 0,5 % auf 1 % und 2 % getestet.

Die Kultivierung wurde bei 30 °C und 150 rpm durchgeführt. Zwei mal täglich wurden Proben für die Analytik entnommen und Methanol bis zur entsprechenden Konzentration zugegeben. Die Proben wurden nach Abschluss der Kultivierung per SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.4).



(a) SDS-Gel der Probenüberstände von der Kultivierung mit 1 % Methanol



(b) SDS-Gel der Probenüberstände von der Kultivierung mit 2 % Methanol

Abbildung 4.4 Vergleich der Kultivierungsproben mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen, aufgetragen in SDS-Gelen. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M) und die Zeitproben der Kultivierungen (0 h bis 71 h), Coomassiefärbung.

Vergleich man die Gele in Abbildung 4.4 mit dem SDS-Gel in Abbildung 4.2a, so ist deutlich zu erkennen, dass die erhöhte Methanolkonzentration nicht zu einer höheren Proteinproduktion geführt hat. In der Laufhöhe um 75 kDa sind Banden zu erkennen, die in Abb. 4.4a nach 6 Stunden Inkubation starten und über den Verlauf der Kultivierung stärker werden. In Abb. 4.4b sind kaum Banden zu erkennen. Die zusätzlichen Banden bei 29 h im Gel der Kultivierung mit 1 % Methanol und bei 53 h im Gel der Kultivierung mit 2 % Methanol sind auf unsauberes Abtrennen von Überstand und Zellpellet zurück zu führen, sodass ein paar Zellen mit der Probe des Überstands aufgetragen wurden.

Beim Vergleich der Abbildungen 4.3a und 4.4 lassen sich die dickeren Bande bei 75 kDa in den Proben 29 h (4.4a) und 53 h (4.4b) erklären. Da in der Auftragung der Zellpellets auf der gleichen Höhe die stark exprimierte AOX auftaucht, ist durch den Übertrag von wenigen Zellen zusammen mit dem Überstand die Bande der Größe 75 kDa deutlich verstärkt worden.

4.1.3 Kultivierung mit unterschiedlichen Temperaturen

Ein weiterer Faktor, der die Proteinproduktion wesentlich beeinflussen kann, ist die Kultivierungstemperatur. Durch eine hohe Kultivierungstemperatur kann es zu Zellschädigungen kommen, die dazu führen, dass aufgrund der Zellyse eine erhöhte Proteasenmenge im Überstand zu finden ist. Um die Wachstumsrate zu verlangsamen und dadurch die Bildung funktionaler Proteine zu unterstützen, kann die Kultivierungstemperatur mit Beginn der Induktion gesenkt werden. Bei der Produktion eines Hering Anti-Frost-Proteins in *P. pastoris* konnte durch die Absenkung der Temperatur von 30 °C auf 23 °C eine zehnfache Steigerung der Proteinausbeute erreicht werden [49]. Hong *et al.* [34] konnten die Aktivität einer rekombinanten Laccase steigern, indem bei der Kultivierung eine niedrigere Temperatur (20 °C statt 30 °C) sowie eine niedrigere Methanolkonzentration (0,5 % statt 1 %) gewählt wurden.

Um die Proteinbanden im Bereich zwischen 37 kDa und 75 kDa untersuchen zu können, wurde getestet, ob es sich dabei um Abbruchprodukte der Proteinbiosynthese handelt. Dafür wurden nach 30 °C-Vorkulturen Hauptkultivierungen bei 20 °C und 25 °C durchgeführt. Aufgrund der niedrigeren Temperaturen wird eine geringe Zellmasse erwartet, da das Wachstum verlangsamt stattfindet. Daraus folgend wird außerdem eine geringere Proteinmenge erwartet, da weniger Zellen für die Proteinproduktion zur Verfügung stehen. Untersucht wird in diesem Experiment, ob die niedermolekularen Banden unter diesen Kultivierungsbedingungen ebenfalls in der Analytik zu erkennen sind.

In der Auswertung der Proteinproben wurde erwartungsgemäß festgestellt, dass durch das Absenken der Kultivierungstemperatur eine deutlich geringere Proteinmenge produziert wurde. Da die Gesamtproteinmenge erheblich abgenommen hat, waren die Banden im Bereich zwischen 37 kDa und 75 kDa nicht mehr sichtbar. Allerdings lässt sich nicht abschließend feststellen, ob dies das Ergebnis der niedrigeren Wachstumstemperatur ist oder ob diese Proteine weiterhin vorlagen, allerdings aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht detektierbar waren. Da die niedrigeren Temperaturen zu einem stärkeren Rückgang der Proteinkonzentration als erwartet geführt haben, wurde die Kultivierungstemperatur in den folgenden Kultivierungen bei 30 °C belassen, da das Wachstumsoptimum von *P.*

pastoris bei 28 °C - 30 °C liegt [37]. Diese Temperatur sollte allerdings nicht überschritten werden, da bereits bei einer Kultivierungstemperatur von 32 °C die Proteinexpression stoppt und das Zellwachstum aufhört [15].

4.1.4 Fazit

In diesem Abschnitt wurde dargestellt, wie ein produzierender Klon identifiziert sowie die Kultivierungstemperatur und Methanolkonzentration analysiert wurden. Da aus dem Screening der gepickten Klone mehrere Kolonien mit gutem Wachstum auf den Geneticin[®]-haltigen Platten identifiziert werden konnten, wurden diese anschließend im Schüttelkolben auf ihre Proteinproduktion untersucht. Trotz erfolgreicher Integration der Genkassette in das Genom kann es zu Problemen bei der Proteinbiosynthese oder der Sekretion kommen. Daher müssen die positiv getesteten Stämme zusätzlich in einer Kultivierung getestet werden. Dabei stellte sich ein Klon im Vergleich der Bandenintensität als besonders stark produzierend heraus, sodass dieser für weitere Kultivierungen selektiert wurde. Nach einer Antikörper-Analyse mittels Western Blot konnte verifiziert werden, dass es sich bei dem produzierten Protein um das Zielprotein handelte. Mit diesem Klon wurden die Kultivierungsparameter Temperatur und Methanolkonzentration variiert, um die Bedingungen für eine hohe Proteinproduktion zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass die empfohlenen Standardparameter von 30 °C sowie eine Methanolkonzentration von 0,5 % bereits die stärkste Proteinproduktion bewirkten.

4.2 Kultivierung im Bioreaktor

Nach der Testung verschiedener Bedingungen im Schüttelkolben, wurde die Kultivierung in den Bioreaktor übertragen. Da bei einer Kultivierung im Bioreaktor eine deutlich höhere Biomassekonzentration produziert wird, besteht ein stark erhöhter Nährstoffbedarf und es werden dafür andere Medien verwendet als im Schüttelkolbenmaßstab. Daher wurden verschiedene Fermentationsmedien für ihren Einsatz im Bioreaktor getestet und

das Wachstum der Zellen darin mit dem Wachstum der Zellen in einem Schüttelkolbenmedium verglichen. Die Analyse mit dem Schüttelkolbenmedium dient als Beurteilung für minimales Wachstum. Analysiert wurden die Medien nach Zhang [112], Gurramkonda [30], und Stratton (Basalsalzmedium, BSM) [87] sowie das Schüttelkolbenmedium BMM nach Invitrogen [37]. In Tabelle 4.1 sind die wichtigsten Unterschiede der Medien dargestellt.

Tabelle 4.1 Vergleich der wichtigsten Nährstoffquellen sowie des pH-Werts der analysierten Medien

	Zhang	Gurramkonda	Stratton (BSM)	BMM
C-Quelle	4 % Glycerol	9,5 % Glycerol	4 % Glycerol	1 % Glycerol
N-Quelle	Ammoniumsulfat	Ammoniumsulfat	Ammoniak	Yeast Nitrogen Base
P-Quelle	Natriumhexametafosphat	Kaliumphosphat	Phosphorsäure	Kaliumphosphat
pH-Wert	5	5,5	5	5

Diese Untersuchung dient zunächst der Beurteilung, in welchem Medium eine große Zellmasse generiert werden kann. Die Kultivierung mit *P. pastoris* lässt sich in drei verschiedene Phasen einteilen: eine Wachstumsphase, eine Übergangsphase und eine Produktionsphase [50]. Während der ersten Phase wird eine hohe Zellzahl angestrebt, die in der zweiten Phase mit Beginn der Induktion ihren Stoffwechsel auf Methanol umstellt. Schließlich wird in der dritten Phase die Induktion gesteigert, sodass eine starke Proteinproduktion entsteht. Um in der dritten Phase viel Protein produzieren zu können, müssen die Zellen in der ersten Phase gut wachsen können.

Alle folgenden Reaktorkultivierungen wurden in einem 2 L-Edelstahlreaktor mit 1,6 L Arbeitsvolumen durchgeführt, der zur Prozesskontrolle an einen Biostat B angeschlossen wurde. Die entsprechenden Vorkulturen wurden bei 30 °C und 150 rpm im jeweiligen Fermentationsmedium für 24 h inkubiert. Aus der Vorkultur wurden Zellen entnommen und das Medium im Bioreaktor auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft. Die Kultivierungsparameter

wurden auf pH = 5, 30 °C und pO₂ = 30 % festgelegt. Für die Beobachtung der Prozessparameter wurden jeweils eine pO₂-Sonde, eine pH-Sonde und ein Temperaturfühler in den Reaktor integriert. Zur Regelung des pH-Wertes wurde 1 M Salzsäure und 25 % Ammoniak zugegeben. Der Sauerstoffgehalt wurde über das integrierte Kaskaden-Rührsystem des Biostat geregelt und bei Bedarf über die Zugabe von Sauerstoff ergänzt.

Während der Kultivierung wurden zwei mal täglich Proben entnommen und diese photometrisch analysiert. Die Ergebnisse der OD₆₀₀-Messungen sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Verglichen werden die Medien nach Zhang, Gurramkonda und BMM. Im Medium nach Stratton konnte kein Zellwachstum festgestellt werden, was vermutlich auf eine starke Präzipitation der Medienkomponenten zurückzuführen ist. Daher standen den Zellen in diesem Medium nicht ausreichend lösliche Nährstoffe zur Verfügung. Dieses Problem ist bei verschiedenen Kultivierungsmedien für *P. pastoris* bekannt [15, 50]. Aufgrund der geringen Löslichkeit der verschiedenen Inhaltsstoffe der zugegebenen Salzlösung PTM₁ (Pichia Trace Metals 1) kann es zum Ausfallen dieser Salze kommen [113].

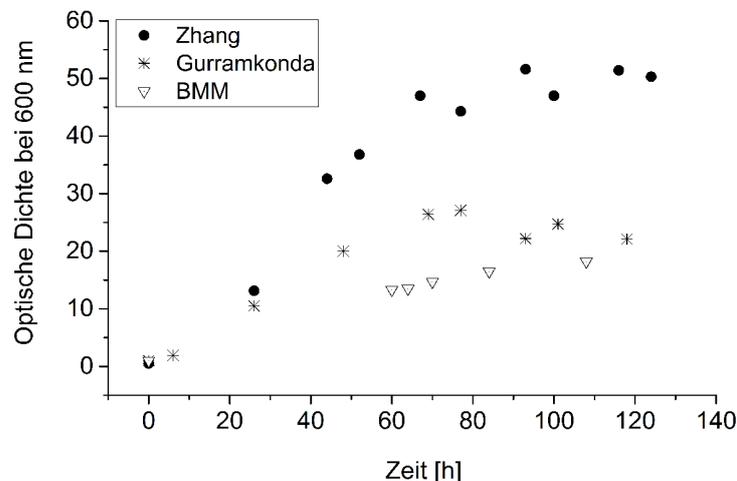


Abbildung 4.5 Vergleich der OD-Werte bei Kultivierung in unterschiedlichen Fermentationsmedien.

Nach den beschriebenen Testkultivierungen des produzierenden Klons in den vier Medien wurde aufgrund des deutlich besseren Wachstums das Medium nach Zhang für die folgenden Kultivierungen verwendet. Im Vergleich mit Tabelle 4.1 ist zu erkennen,

dass das gute Zellwachstum nicht auf eine besonders hohe Konzentration der Kohlenstoffquelle zurückzuführen ist, sondern die Gesamtkomposition des Mediums eine gute Wachstumsgrundlage liefert.

4.2.1 Kultivierung ohne Methanol-Regelung

Nach der Auswahl eines Fermentationsmediums für starkes Zellwachstum wurde die Proteinproduktion in einen Tabletop-Bioreaktor übertragen. In Kapitel 4.1 wurden die optimalen Kultivierungsbedingungen für Zellwachstum und Proteinproduktion im Schüttelkolben identifiziert. Diese ermittelten Parameter werden weitestgehend auf die Reaktorkultivierung übertragen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Kultivierungen im Schüttelkolben und Reaktor ist die deutlich bessere Sauerstoffversorgung im Bioreaktor. Dies ist durch den Eintrag von Druckluft bzw. Sauerstoff sowie durch das Rührsystem des Bioreaktors möglich. Im Schüttelkolben gibt es nur einen passiven Sauerstoffeintrag, der durch die Schüttelbewegung sowie die Verwendung von Schüttelkolben mit Schikanen beeinflusst werden kann. Aufgrund des höheren Sauerstoffeintrags kann im Bioreaktor eine höhere Methanolkonzentration eingestellt werden [36]. Für die Kultivierung eines Mut⁺-Stamms werden in den Pichia Fermentation Process Guidelines von Invitrogen spezifische Pumpraten empfohlen. Der Methanol-Feed wird über eine peristaltische Pumpe gesteuert, die zunächst für 4 h 3,6 ml/h zugibt. Nach dieser Adaptionsphase wurde der Feed für 2 h auf 7,3 ml/h erhöht und anschließend für die restliche Dauer der Kultivierung auf 10,9 ml/h festgelegt. Diese Pumpraten entsprechen jeweils den Konzentrationen von 0,24 %, 0,49 % und 0,73 % Methanol im Fermentationsmedium.

Die Schwierigkeit an der Induktion mit Methanol liegt in der Herausforderung, den Methanolgehalt in der Kultivierung konstant einstellen zu können. Für eine konstante Methanolkonzentration muss der Verbrauch der Zellen gemessen werden. Klassische Bestimmungsmethoden sind u. a. Gaschromatographie, HPLC sowie Feedstrategien basierend auf *dissolved-oxygen*-Spikes (DO-Spikes). Ein DO-Spike ist ein rapider Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Medium und tritt unter limitierenden Wachstumsbedin-

gungen auf. Steht keine Kohlenstoffquelle im Medium zur Verfügung, steigt die Sauerstoffkonzentration innerhalb von 15 - 30 s um etwa 10 % [3]. Nachteile aller genannten Methoden sind zum einen eine lange Reaktionszeit bei offline-Analysen und zum anderen die Gefahr von nicht-induzierbaren Methanolkonzentrationen bei der Anwendung von DO-Spikes. Da die große Zellmasse im Bioreaktor mit ausreichend Methanol versorgt werden soll, wird für die Kultivierung auf die Methanolversorgung mittels empfohlener Pumpraten zurückgegriffen.

Nach einer Batchphase der Kultivierung, die der Biomasseproduktion dient und auf glycerolhaltigem Medium durchgeführt wurde, beginnt durch die Zugabe der Feed-Lösung (99,565 % Methanol und 0,435 % PTM₁) die Fed-Batch-Phase der Kultivierung und damit die Induktion des AOX-Promoters. Über den Sauerstoffverbrauch der Zellen im Medium kann mithilfe von DO-Spikes erkannt werden, ob das Glycerol aus der Batchphase schon verbraucht wurde. Erst nach der vollständigen Erschöpfung des Glycerols sollte die Fed-Batch-Phase gestartet werden, da die Zellen sonst weiterhin Glycerol verbrauchen und die Induktion verzögert werden könnte. Über den Verlauf der Kultivierung wurden zweimal täglich Proben für die Analytik der Biofeucht- und Biotrockenmasse, der OD und der Proteinkonzentration entnommen (siehe Anhang, Abschnitt B.2).

Die Auswertung der Proben der Proteinanalytik aus Kultivierung A in Abbildung 4.6 zeigt deutliche Proteinbanden im SDS-Gel. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Schüttelkolbenkultivierung wird 6 h nach Beginn der Induktion die Bande bei 75 kDa sichtbar und über den Verlauf der Kultivierung stärker. Die niedermolekularen Banden sind ebenfalls zu erkennen. Um die Proteinkonzentration bestimmen zu können, wurde ein BCA-Assay verwendet. Da *Pichia pastoris* kaum endogene Proteine sekretiert, kann der Kulturüberstand ohne weitere Aufreinigungsschritte für die Konzentrationsbestimmung des Zielproteins eingesetzt werden. Es wurde eine Proteinkonzentration von 8,5 g/L ermittelt. Die Proteinkonzentration setzt sich zusammen aus dem Zielprotein und den bisher nicht näher bestimmten niedermolekularen Banden, bei denen es sich möglicherweise um Fragmente des Zielproteins handelt.

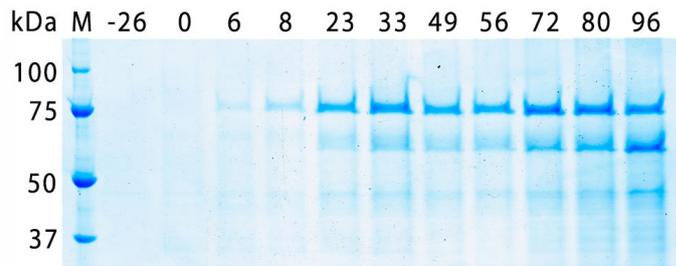


Abbildung 4.6 SDS-Gel der Proben von Reaktorkultivierung A, aufgetragen wurden ein molekularer Größenstandard (M), eine Probe von Kultivierungsbeginn (-26 h) sowie die Kultivierungsproben nach Induktion (0-96 h), Coomassiefärbung.

Das Ergebnis zeigt, dass die Überführung der Kultivierung in den Bioreaktor erfolgreich war und zu einer deutlichen Proteinproduktion geführt hat. Die eingestellten Pumpraten für den Methanolfeed waren hoch genug für eine Induktion des Promotors. Um in folgenden Kultivierungen die Methanolkonzentration bestimmen zu können, wurde das *online*-Methanolsensorsystem *Raven Methanol Sensor System* in den Reaktor integriert. Das Sensorsystem besteht aus einer Probereinheit mit einer Silikonmembran, Luftschläuchen sowie einem Sensorelement. Die Probereinheit wird in das Kultivierungsmedium eingetaucht, damit Methanol durch die Membran diffundieren und über verbundene Schläuche mit einem Luftstrom zu der Sensoreinheit transportiert werden kann. Die Sensoreinheit besteht aus einem Zinnoxid-Gassensor, der den Methanolgehalt über erhöhte Konduktivität misst und das Messsignal als Spannung in Millivolt ausgibt. Der Sensor ist für einen Messbereich zwischen 0 % und 1 % Methanol kalibriert. Mithilfe des Methanolsensors kann unmittelbar die Konzentration im Medium dargestellt und auf Variationen im Methanolverbrauch reagiert werden.

Die Probereinheit des *Raven Methanol Sensor Systems* wurde in einen 25 mm-Anschluss des Reaktors eingebracht und die Methanolkonzentration während der Kultivierungen aufgezeichnet. Die Zugabe des Methanolfeeds erfolgte bei dieser Kultivierung weiterhin über die peristaltische Pumpe mit den festen Pumpraten. Um den Zellen eine längere Wachstumsphase und somit eine Steigerung der Biomasseproduktion zu ermöglichen, wurde der Glycerolgehalt in der Batchphase der Kultivierung verdreifacht.

In Abbildung 4.7 ist die Methanolkonzentration über den Verlauf der Kultivierung B sowie der Sollwert der Konzentration dargestellt. Bei Anstieg der Methanolkonzentration

über 1 % wurde die Pumpe manuell gestoppt und anschließend bei einem Abfall der Konzentration unter 0,5 % erneut gestartet. Der hohe Peak bis 7 % bei ca. 70 h ist während einer Nachtphase der Kultivierung entstanden. Der Wechsel zwischen hohen und nicht-induzierenden Methanolkonzentrationen ist in der Kultivierung mehrfach zu beobachten. Die Methanolversorgung mittels fester Pumpraten lieferte mehr Methanol ins Medium, als die Zellen verstoffwechselt haben. Daher akkumulierte die Kohlenstoffquelle im Medium und wurde erst nach Abschaltung der Pumpe von den Zellen verbraucht. Auf eine Veränderung der Pumpraten wurde verzichtet, um eine mögliche Adaption der Zellen an die schnelle Bereitstellung des Methanols untersuchen zu können. Aufgrund der starken Steigung der Konzentrationspeaks ist deutlich, dass eine Überversorgung der Zellen mit Methanol vorliegt.

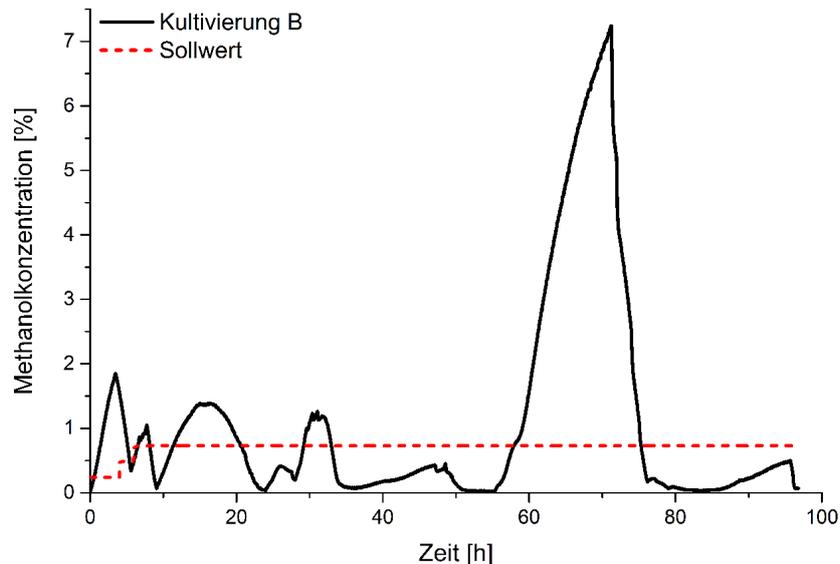


Abbildung 4.7 Methanolkonzentration über den Verlauf von Kultivierung B mit festen Pumpraten des Methanolfeeds und Sollwert zum Vergleich.

Die Proben von Kultivierung B wurde mittels SDS-PAGE aufgetragen und auf den Proteininhalt untersucht. In dem Gel in Abbildung 4.8 ist die CMP-Bande bei 75 kDa zu erkennen. Zusätzlich zu den bisher aufgetretenen niedermolekularen Banden sind in diesem Gel weitere, teils intensive Banden sichtbar, während die CMP-Bande im Verlauf der Kultivierung an Intensität verliert. Da in dieser Kultivierung die Methanolkonzentration bekannt

ist, können die zusätzlichen Banden durch die hohe, vermutlich toxische, Methanolkonzentration erklärt werden. Die Banden entstehen durch die Freigabe endogener Proteine aus lysierten Zellen als Reaktion auf toxischen Stress. Die Vermutung der lysierten Zellen wird durch die sehr niedrige Biotrockenmasse von 69,2 g/L am Ende der Kultivierung unterstützt. Bei der Lyse werden außerdem Proteasen freigesetzt, die zu einem proteolytischen Abbau des CMP im Medium geführt haben können. Mittels BCA-Assay wurde eine Proteinkonzentration von 10 g/L ermittelt. Dieser Wert setzt sich aus den verschiedenen Proteinen im Medium zusammen und kann nicht mit der CMP-Produktion begründet werden.

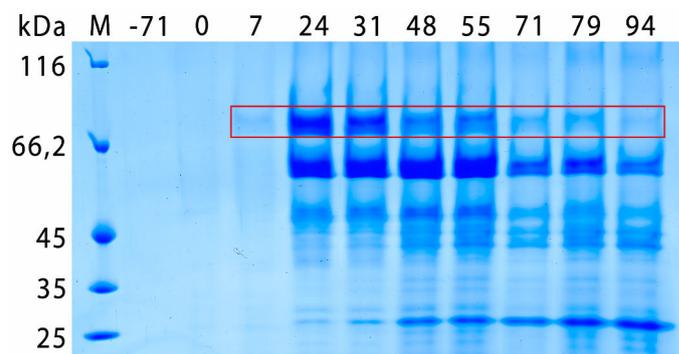


Abbildung 4.8 Vergleich der Kultivierungsproben bei festen Methanolkumpraten. Aufgetragen sind ein Größenstandard (M), der Beginn der Kultivierung (-71 h) sowie die Zeitproben ab Induktion (0 h bis 94 h), Coomassiefärbung.

Die festen Kumpraten in dieser Kultivierung führten zu deutlichen Abweichungen der Methanolkonzentration und resultierten somit in Zellschädigungen und inkonsistenter Proteinproduktion. Um eine durchgehend induzierende Methanolkonzentration zu erreichen, die keine Ausreißer in den toxischen Bereich enthält, wird eine andere Lösung für die Zugabe des Methanolfeeds benötigt.

4.2.2 Fazit

Für die Kultivierung im Bioreaktor konnte mithilfe von Testkultivierungen ein Fermentationsmedium gefunden werden. Durch den Vergleich der Wachstumskurven konnte sich das Medium nach Zhang deutlich von den anderen Fermentationsmedien abheben, sodass die weiteren Kultivierungen in diesem Medium durchgeführt wurden.

Die gemessene Proteinkonzentration der betrachteten Kultivierungen liegt in einem Bereich zwischen 8,5 g/L (Kultivierung A) und 10 g/L (Kultivierung B). Die zu hohe Methanolkonzentration (bis zu 7 %) in Kultivierung B führte vermutlich zu einer starken Zellyse, sodass im Kultivierungsüberstand viele Proteine zusätzlich zum Zielprotein gemessen wurden. Dies muss bei der Betrachtung der mittels BCA-Assay ermittelten Proteinkonzentration von 10 g/L berücksichtigt werden. Des Weiteren gab es niedrige Methanolkonzentrationen unter 0,2 %, die unter dem Induktionsniveau liegen, daher findet in diesen Zeiträumen weniger rekombinante Proteinbiosynthese statt.

Die empfohlenen Pumpraten waren für den hier verwendeten rekombinanten *Pichia pastoris*-Stamm nicht anwendbar, obwohl dieser als Mut⁺ getestet wurde. Da jeder rekombinante Stamm eine spezifische Stoffwechselrate von Methanol besitzt, können keine festgelegten Pumpraten für die Produktion verwendet werden, sondern der Methanolfeed muss reguliert werden.

4.3 Kultivierung im Bioreaktor mit Methanol-Regelung

Um die Methanolkonzentration im Reaktor regulieren zu können, wurde ein alternatives System zu festen Pumpraten entwickelt. Kriterien für die Entwicklung des neuen Systems waren eine online-Überwachung der Methanolkonzentration, eine schnelle Reaktionszeit bei Abweichungen der Methanolkonzentration und ein automatisiertes System, das auch über einen längeren Zeitraum die gewünschte Methanolkonzentration im Reaktor beibehält.

4.3.1 Entwicklung des Feedback-Loops des Methanolsensors

Da der eingesetzte Methanolsensor über eine RS232-Schnittstelle verfügt, wurde ein System entwickelt, in dem die Zugabe des Methanolfeeds über einen Computer gesteuert wird. Dies geschieht über einen Feedback-Loop des Sensors an den Computer, der die vom Methanolsensor übermittelten Werte mit Sollwerten abgleicht und entsprechend dieser Werte die Pumpe ansteuert. Dafür ist neben dem Sensor auch eine Pumpe mit

RS232-Schnittstelle notwendig. Die beiden Geräte werden an einen Einplatinen-Computer angeschlossen, auf dem die Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Geräten des Netzwerks abläuft. Neben diesem Computer wird auf einem Desktop-Computer eine Software eingerichtet, in die der Sollwert sowie die Umdrehung der Pumpe eingegeben werden können und aus der die aktuellen Werte des Methanolsensor abgelesen werden können. Dieser Computer ist mit dem gleichen Netzwerk verbunden, wie der Einplatinen-Computer, sodass dieser die Werte empfangen und mit den Werten des Sensors abgleichen kann.

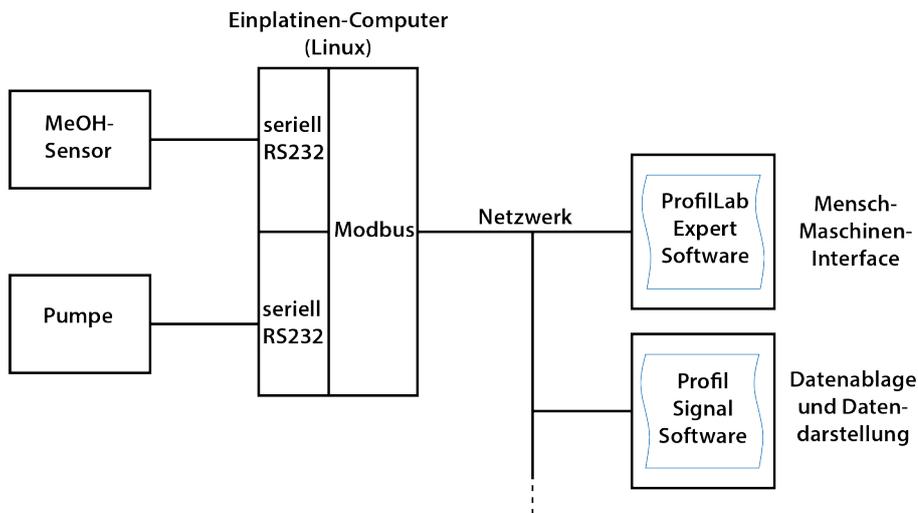


Abbildung 4.9 Darstellung des Netzwerkplans für die Planung des Feedback-Loops des Methanolsensors.

Für die Kontrolle der Methanolwerte und die Eingabe des Sollwerts wurde eine Software mit ProfiLab Expert entwickelt. Die Software zeigt die Pumprate (in rpm), den Messwert (in mV), einen Serial-Alive-Counter, den Sollwert (in mV) und eine Hysterese an (vgl. Abb. 4.10). Der Serial-Alive Counter ist ein Überwachungssystem, das die Übertragung der Messwerte an die Software sicherstellt. Bei jeder Übertragung eines neuen Werts zählt der Serial-Alive-Counter um 1 hoch, sodass selbst im Fall eines stabilen Messwerts beobachtet werden kann, ob aktuelle Messwerte übertragen werden. Die Hysterese des Systems bezeichnet einen Bereich der Messwerte, in dem die Messwerte von dem Sollwert abweichen, ohne dass die Pumpe aktiviert wird. Dies ist notwendig, da die Pumpe sonst bei einer Abweichung von 1 mV aktiviert werden könnte.

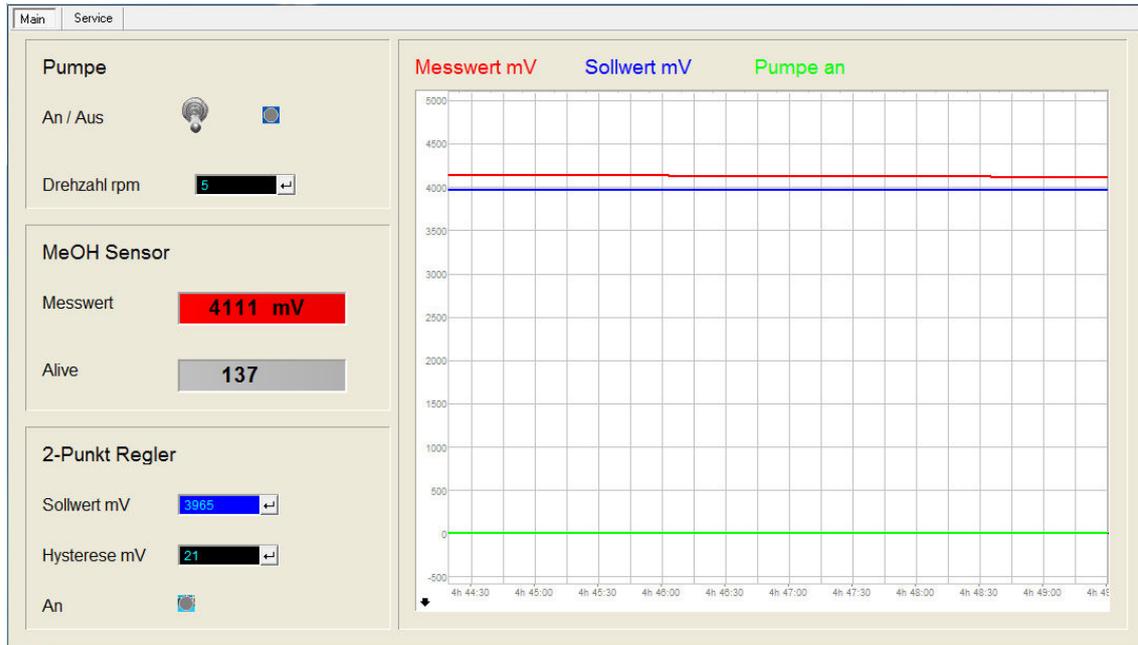
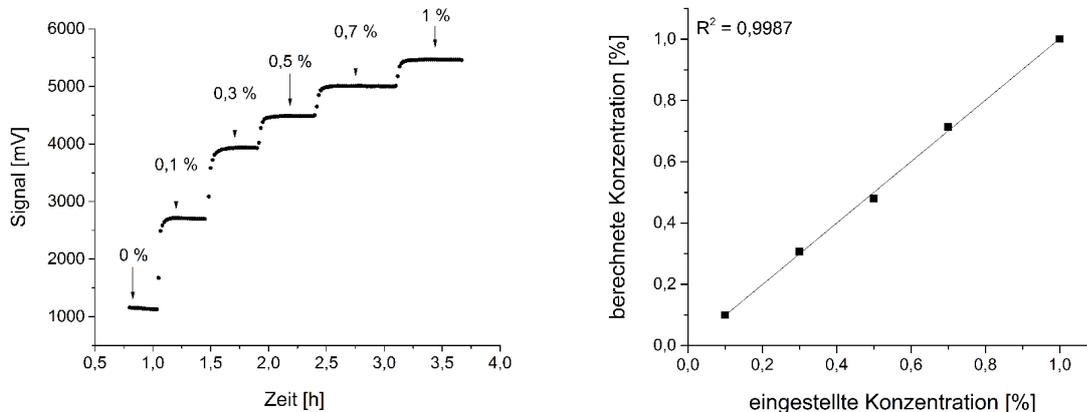


Abbildung 4.10 Darstellung der Kontrollsoftware zur Eingabe des Sollwerts und zum Ablesen des aktuellen Sensorwerts.

Die Einstellungen der Hysterese beeinflussen die Reaktionszeit des Systems, daher sollte hier keine zu große Abweichung zum Sollwert eingestellt werden. Wenn die Hysterese allerdings zu klein gewählt wird, wird die Pumpe öfter als notwendig aktiviert. In diesen Kultivierungen wurde die Hysterese so gewählt, dass sie bei einem Sollwert von 0,5 % dem Bereich zwischen 0,49 % und 0,51 % Methanol entspricht. Die Pumprate beeinflusst, wie stark die Hysterese überschritten wird. Bei einer hohen Pumprate können Abweichungen von dem Sollwert schnell ausgeglichen werden, allerdings wird durch die Reaktionszeit des Systems die Hysterese stärker überschritten. Wenn eine niedrigere Pumprate eingestellt wird, wird der Sollwert langsamer erreicht, dafür wird die Hysterese nicht so weit überschritten wie bei einer hohen Pumprate. In diesen Experimenten wurde die Pumprate auf 5 rpm eingestellt und auf 10 rpm erhöht, falls die Pumpe durchgehend aktiviert war.

Vor dem Einsatz des Methanolsensors wurde dieser mit steigenden Methanolkonzentrationen zwischen 0 % und 1 % Methanol in Fermentationsmedium kalibriert (siehe Abb. 4.11a). In Abbildung 4.11b ist die Validierung der Kalibration gezeigt, in der die eingestellten Methanolkonzentrationen gegen die mithilfe der Kalibrationsgeraden berechneten Methanolkonzentrationen aufgetragen sind. Anschließend wurde die Kalibrierungsgleichung in

die ProfiSignal-Software eingegeben, um die aktuelle Methanolkonzentration (in Prozent) neben dem Messwert (in mV) anzuzeigen.



(a) Darstellung der Kalibrierung des Methanolsensor zwischen 0% und 1% Methanol in Fermentationsmedium.

(b) Validierung der Kalibrierung, aufgetragen sind die eingestellten gegen die berechneten Methanolkonzentrationen.

Abbildung 4.11 Kalibrierung und Validierung des Methanolsensors.

4.3.2 Kultivierung mit Feedback-Loop des Methanolsensors

Nach der Implementierung des Feedback-Loops in das Bioreaktor-System wurden vier Kultivierungen (C, D, E und F) durchgeführt, bei denen die Methanolkonzentration über den Methanolsensor gesteuert wurde. Zu Beginn jeder Kultivierung wurde eine Adaptionsphase durchgeführt, in der niedrigere Methanolkonzentrationen eingestellt wurden. Diese Phasen sind für die Zellen notwendig, da der Stoffwechsel zunächst auf Methanol als Kohlenstoffquelle umgestellt werden muss. Die erste Konzentration wurde anhand der Induktionsgrenze von Methanol gewählt [99] während sich die finale Induktionskonzentration an Empfehlungen von Invitrogen [35] sowie an diversen Literaturwerten orientiert [34, 61, 65]. Der mittlere Wert basiert auf der halben Differenz zwischen erstem und drittem Induktionswert. Die Anfangskonzentration wurde für 4 h auf 0,2% (v/v) Methanol eingestellt. Anschließend wurde für 2-3 h auf 0,35% (v/v) Methanol erhöht, bevor der Sollwert schließlich auf eine Konzentration von 0,5% festgesetzt wurde. Zusätzlich zur Testung des Methanol-Feedback-Loops für eine konstante Proteinproduktion wurde untersucht, ob sich die niedermolekularen Banden durch das Verwenden von proteaseinhibierenden Einstellungen verhindern lassen. Daher wurden die Kultivierungen D und F bei

einem niedrigeren pH-Wert von 3 durchgeführt. Den Kultivierungen E und F wurde 1 % Caseinhydrolysat zugesetzt, um ebenfalls mögliche Proteasen im Kultivierungsüberstand zu inhibieren.

Nachfolgend sind die Methanolkonzentrationen der vier Kultivierungen sowie der Sollwert zu sehen (Abb. 4.12). Die Methanolkonzentration in Kultivierung C zeigt einen sprunghaften Verlauf, mit vielen nicht-induzierenden Bereichen. Dies war die erste Kultivierung mit Feedback-Loop und zeigt durch den unsteten Verlauf die Schwierigkeiten bei der Erstellung eines funktionierenden Feedback-Loops. Nach dieser Kultivierung wurde die Funktion der Geräte überprüft und ein technischer Defekt in der Kommunikation zwischen Methanolsensor und Pumpe beseitigt. Kultivierung D bis F zeigen eine konstante Methanolkonzentration und damit die Funktion des Feedback-Loops. Die Adaptionsphasen zu Beginn der Kultivierung sind für die Kultivierungen D, E und F im Bereich vor 10 h gut erkennbar. Die minimalen Abweichungen der Kurven um den Wert 0,5 % sind auf die Einstellungen der Hysterese zurück zu führen.

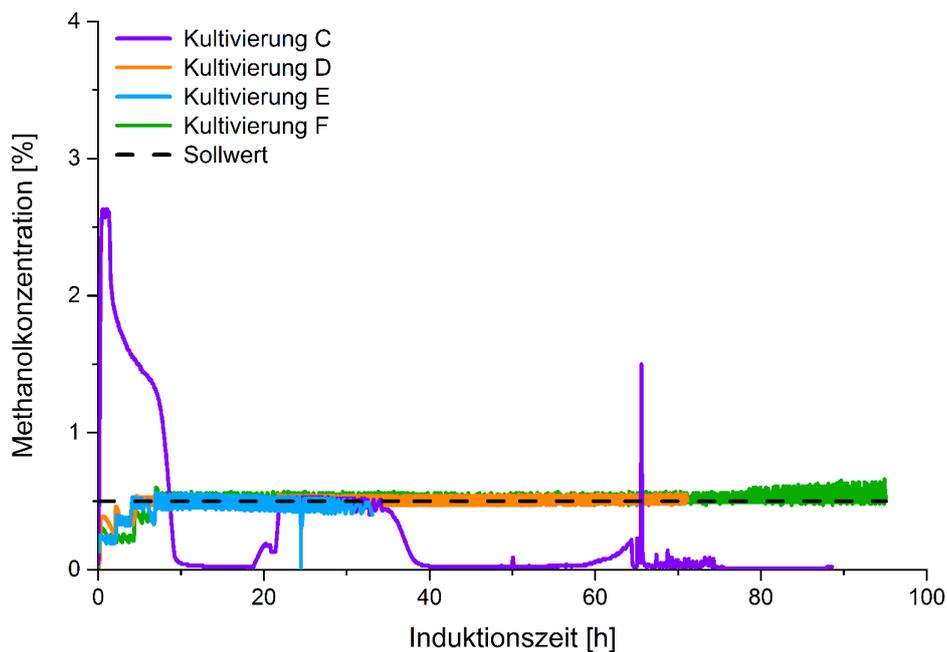


Abbildung 4.12 Darstellung der Methanolkonzentration der Kultivierungen unter Kontrolle des Feedback-Loops.

Die Entwicklung eines Systems zur kontinuierlichen Überwachung der Methanolkonzentration und der stetigen Regulierung der Messwerte wurde abgeschlossen. Die Methanolkonzentration konnte über den Verlauf von 95 h konstant gehalten werden. Es sind in den Kultivierungen D, E und F keine Methanolpeaks oder Konzentrationen unterhalb des Induktionsniveaus zu beobachten.

4.3.3 Vergleich der Proteinproduktion bei Regelung der Methanolkonzentration

Um die Auswirkungen der regulierten Methanolzugabe auf die Proteinproduktion zu analysieren, wurden die Proben der Kultivierung C, D, E und F mittels SDS-PAGE und BCA-Assay untersucht.

In Abbildung 4.13 sind die SDS-Gele der Proben aus den vier Kultivierungen zu sehen. In allen vier Gelen ist, wie bereits in Kultivierung A und B, eine deutliche Proteinproduktion zu erkennen. Die Proben der Kultivierung C zeigen erheblich intensivere niedermolekulare Banden, ähnlich zu den Proben in Kultivierung B (vgl. Abb. 4.8). Da in dieser Kultivierung ebenfalls keine konstante Methanolkonzentration erreicht werden konnte, und bereits in den ersten 10 h der Kultivierung eine Überversorgung mit Methanol eintrat, ist hier erneut von toxischen Bedingungen auszugehen, die zu Zelllyse und einer Freisetzung endogener Proteine geführt haben. In den SDS-PAGE-Gelen der Proben aus Kultivierung D, E und F ist im Wesentlichen die Produktion des Zielproteins CMP (bei 75 kDa) sichtbar. Die sichtbare Abweichung der Proteinbande zwischen 75 kDa und 100 kDa wird durch prozessbedingte Schwankungen der SDS-PAGE verursacht. Durch das wiederkehrende Bandenmuster können die Proteinbanden dennoch zweifelsfrei zugeordnet werden. Die Intensität der Bande des Zielproteins bei 75 kDa hat im Vergleich zu Kultivierung B und C erheblich zugenommen. Mithilfe einer densitometrischen Untersuchung wurde ermittelt, dass in Kultivierung C etwa 32 % des Proteins in der Hauptbande vorliegt, während in Kultivierung E ca. 60 % des Proteins in der Hauptbande ist. Entsprechend ist die Konzentration der niedermolekularen Banden von 68 % auf 40 % gesunken. Es wird

deutlich, dass durch die geregelte Methanolkonzentration keine toxische Bedingung im Medium erreicht wird, wodurch Zellyse verhindert wird.

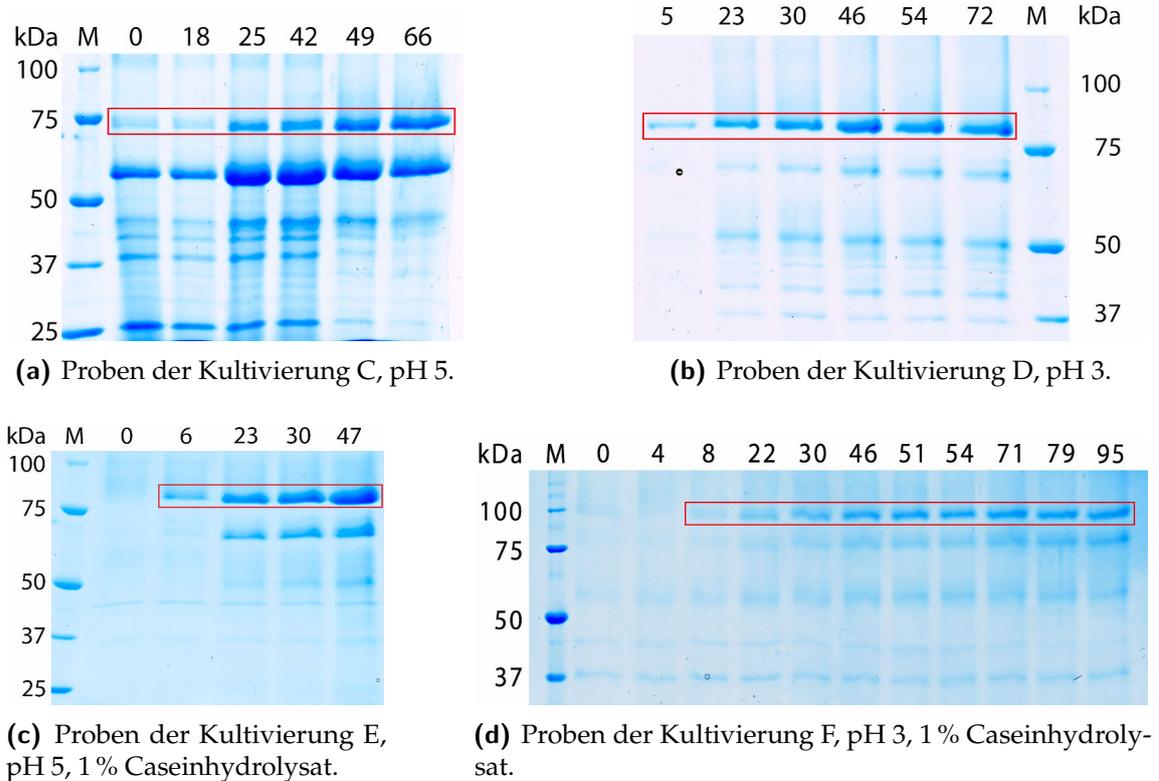


Abbildung 4.13 Vergleich der SDS-Gele der verschiedenen Kultivierungen mit geregelter Methanolkonzentration. Aufgetragen wurden ein molekularer Größenstandard (M) sowie die Proben der Kultivierungen (0-95), Coomassiefärbung.

Die unterschiedliche Intensität der Banden ist auf die verschiedenen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen. So findet bei einem niedrigeren pH-Wert langsames Zellwachstum und dadurch auch eine geringere allgemeine Proteinproduktion statt (vgl. Tabelle 4.2). Durch das Absenken des pH-Werts sowie die Zugabe von Caseinhydrolysat konnte die Bildung der niedermolekularen Banden jedoch nicht verhindert werden. Die Proteinkonzentration am Ende jeder Kultivierung wurde mittels BCA-Assay bestimmt und liegt bei den Kultivierungen mit niedrigerem pH-Wert bei 6,7 g/L (Kult. D) und 2,2 g/L (Kult. F) und bei der Kultivierung mit pH = 5 (Kult. E) bei 16,9 g/L. Die Auswirkung des

Caseinhydrolysats auf die gemessene Proteinkonzentration wurde berücksichtigt und ist von den vorliegenden Werten bereits subtrahiert worden.

4.3.4 Fazit

Um eine konsistente Methanolversorgung der Zellen während der Reaktorkultivierung zu gewährleisten, wurde ein Feedback-Loop mithilfe des *Raven Methanol Sensor Systems* entwickelt. Dazu wurde ein Einplatinencomputer an den Methanolsensor angeschlossen, der gleichzeitig mit einer peristaltischen Pumpe verbunden war. Zur Kontrolle der Mess- und Sollwerte wurde eine Software entwickelt, über die der Feedback-Loop gesteuert wurde. Die Kultivierungen mit diesem System resultierten in konstanten Methanolkonzentrationen während der gesamten Kultivierung. Über eine Adaptionsphase zu Beginn wurden die Zellen an die neue Kohlenstoffquelle gewöhnt. Die Kultivierungen D-F zeigen, dass die Kultivierung mit Methanol ohne toxische Effekte und daraus folgender Zellyse durchgeführt werden kann.

Zusätzlich zur Testung des Feedback-Loops wurde die Entstehung der Proteine kleiner als 75 kDa in diesem Kapitel mithilfe verschiedener Kultivierungsbedingungen untersucht. Da die Hypothese bestand, dass es sich um die Produkte durch proteolytischen Abbau handelt, wurden zwei verschiedene proteasehemmende Bedingungen in den Kultivierungen getestet (niedriger pH-Wert und der Zusatz von Caseinhydrolysat sowie die Kombination der zwei Bedingungen). Die Bildung der niedermolekularen Banden konnte damit allerdings nicht verhindert werden. Durch die Verwendung des sauren pH-Wertes wurde jedoch das Wachstum der Zellen gehemmt. Da die Proteinproduktion an das Wachstum der Zellen gekoppelt ist, ist eine Kultivierung bei dem niedrigen pH-Wert nicht empfehlenswert.

In Tabelle 4.2 sind die wichtigsten Parameter und Ergebnisse der Kultivierungen zusammengefasst. Hier wird deutlich, dass die höchste Proteinproduktion sowie die höchste Produktivität (g Protein pro g BTM pro Stunde) in Kultivierung E auftraten. Diese Kultivierung wurde bei einem pH-Wert von 5 sowie dem Zusatz von Caseinhydrolysat

durchgeführt. Die Auswirkung des Caseinhydrolysats auf die Proteinkonzentration wurde berücksichtigt. Die Bedingungen aus dieser Kultivierung führten zu der höchsten Protein- und BTM-Ausbeute und sollten bei weiteren Kultivierungen zur Proteinproduktion verwendet werden.

Tabelle 4.2 Zusammenfassung der Parameter und Ergebnisse aller Kultivierung mit Methanolsensor

Kultivierung	pH	Caseinhydrolysat	Produktivität (g _p ·BTM ⁻¹ ·h ⁻¹)	Proteinkonzentration ^a (g·L ⁻¹)	BTM (g·L ⁻¹)	BTM pro h
B	5		<i>8,6·10⁻⁴</i>	<i>10</i>	69,2	0,42
C	5		<i>7,2·10⁻⁴</i>	<i>15,6</i>	153,4	1,08
D	3		<i>7,4·10⁻⁴</i>	<i>6,7</i>	64,5	0,46
E	5	+	15,3·10 ⁻⁴	16,9	121,7	1,04
F	3	+	4,4·10 ⁻⁴	2,2	134,6	0,81

^a = Mittels BCA-Assay ermittelt, Auswirkung des Caseinhydrolysats wurde subtrahiert.

Kursiv gedruckte Werte sind möglicherweise durch endogene Proteine beeinflusst.

5 Isolierung und Charakterisierung

In den bisherigen Kapiteln wurde die Erstellung sowie Kultivierung eines produzierenden Stamms beschrieben. In der Proteinproduktion wurde jedoch deutlich, dass zusätzlich zum Zielprotein bei etwa 75 kDa weitere Proteine in der Analytik zu erkennen sind, deren Ursache und Identität geklärt werden muss. In diesem Kapitel werden verschiedene Isolierungsstrategien für das CMP getestet und anschließend das Protein charakterisiert. Da die angestrebte medizinische Anwendung des Proteins auf einem definierten Ausgangsprotein basiert, wurde getestet, ob sich die unterschiedlichen Proteingrößen voneinander trennen lassen. Dafür wurden zum einen verschiedene differenzierte Fällungen und zum anderen unterschiedliche chromatographische Methoden hinsichtlich ihrer Trenneigenschaften untersucht. Nach Abschluss dieser Experimente wurden ein Glykosidasetest sowie ein Trimerisierungstest gemacht, um die Ursache der verschiedenen Proteingrößen herauszufinden. Mithilfe von Massenspektrometrie wird die Identität der verschiedenen Proteinbanden untersucht und schließlich rheologische Messungen mit dem Zielprotein durchgeführt.

5.1 Fällungen

In diesem Abschnitt werden unterschiedliche Fällungsmethoden verwendet, um zu untersuchen, ob das Zielprotein bei 75 kDa von allen weiteren Proteinen getrennt werden kann. Da es sich bei dem CMP um ein Strukturprotein und kein Enzym handelt, muss nicht auf einen möglichen Aktivitätsverlust geachtet werden, sodass auch eine hohe Konzentration an Lösemitteln eingesetzt werden kann. Außerdem kann zeitgleich mit einer Fällung eine Aufkonzentrierung gemacht werden, was einen zeitlichen Vorteil bietet. In diesem

Abschnitt werden drei verschiedene Acetonfällungen verwendet, die sich in zusätzlichen Fällungsschritten voneinander unterscheiden.

Um die Unterschiede der verwendeten Fällungen besser zu veranschaulichen, ist in Abbildung 5.1 eine schematische Übersicht der Fällungen dargestellt.

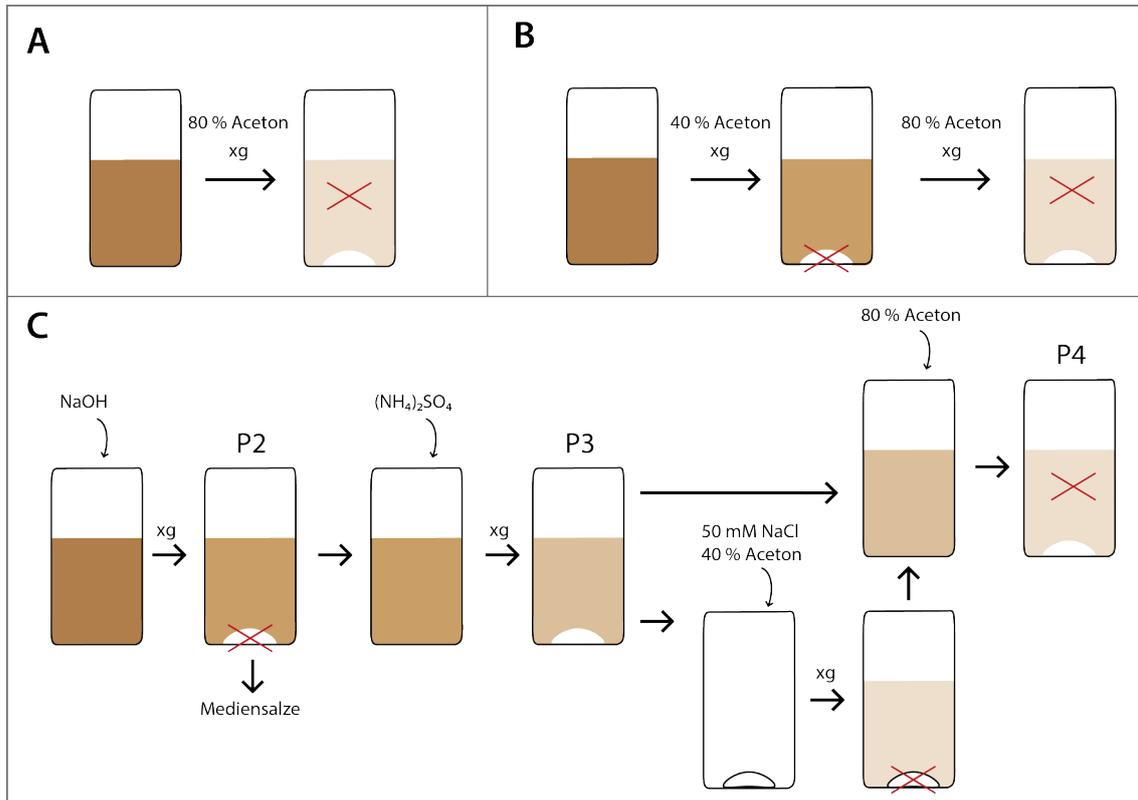


Abbildung 5.1 Schematischer Vergleich der verwendeten Fällungen: einfache Acetonfällung (A), fraktionierte Acetonfällung (B, nach [105]) und fraktionierte Acetonfällung mit Ammoniumsulfat-Schritt (C, nach [106]).

Der Hauptunterschied der Fällungen sind die vielen Vorbereitungsschritte in der fraktionierten Acetonfällung mit Ammoniumsulfat-Schritt (C). Diese sollen der Isolierung des Zielproteins von Medienbestandteilen und Fremdprotein dienen. In der einfachen Acetonfällung (A) gibt es keinen Vorbereitungsschritt, weshalb hier alle Proteine gefällt werden. Die fraktionierte Acetonfällung (B) besteht lediglich aus der Fällung mit zwei verschiedenen Acetonkonzentrationen, die eine Isolierung des Zielproteins von Fremdprotein erreichen soll.

5.1.1 Aceton-Fällung

Zunächst wurde mit einer einfachen Acetonfällung gearbeitet, die einen Fällungsschritt bei 80 % beinhaltet. Dieser Fällungsschritt soll das Zielprotein aus dem Überstand fällen, sodass dieses danach in einem ausgewählten Puffer gelöst und analysiert werden kann. Nach der Fällung werden die Proben mittels SDS-PAGE auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht.

In Abbildung 5.2 ist zu sehen, dass sich das Protein bei 75 kDa mittels Aceton aus dem Überstand fällen und aufkonzentrieren lässt. Des Weiteren lassen sich ebenfalls die kleineren Proteine im Bereich unterhalb von 75 kDa von Aceton fällen und aufkonzentrieren.

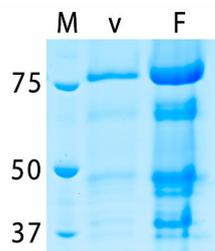


Abbildung 5.2 SDS-PAGE der Proben der Acetonfällung. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M), die Probe vor der Fällung (v) und die Probe nach der Fällung (F), Coomassiefärbung.

Um das Zielprotein bei 75 kDa von den restlichen Proteinen im Kultivierungsüberstand zu trennen, werden im Weiteren fraktionierte Fällungen getestet.

5.1.2 Fraktionierte Acetonfällung

Da die einfache Acetonfällung keine Trennung der Proteine erreichte, wurde im weiteren Verlauf eine fraktionierte Acetonfällung getestet. Dabei wurde zunächst ein Fällungsschritt bei 40 % Aceton durchgeführt und abzentrifugiert, bevor mit dem Überstand ein Fällungsschritt bei 80 % Aceton vorgenommen wurde. Mithilfe der unterschiedlich hohen Konzentration soll getestet werden, ob es möglich ist, eine Isolierung des Zielproteins von den kleineren Proteinen zu erreichen. Zur Untersuchung der Fällungseffizienz wird eine SDS-PAGE durchgeführt.

Abbildung 5.3 zeigt das SDS-Gel der Fällungsproben. In beiden Fällungsproben ist eine Aufkonzentrierung der Proteine im Gegensatz zur Probe vor der Fällung klar zu erkennen. In der Probe der 40 % Fällung ist eine starke Bande bei 75 kDa zu sehen, sodass hier ein großer Anteil an Zielprotein gefällt wurde. In beiden Proben sind sowohl Zielprotein als auch die Proteine im geringen Größenbereich vorhanden. Da die Banden der kleinen Proteine in der 80 %-Fällung etwas intensiver sind und zudem die Bande des Zielproteins deutlich schwächer ist, sind in dieser Probe verhältnismäßig mehr kleine Proteine vorhanden. Allerdings hat der Trennungsversuch des Zielproteins von den weiteren Proteinen des Überstands auch mit der fraktionierten Acetonfällung keine komplette Isolierung des Zielproteins gebracht.

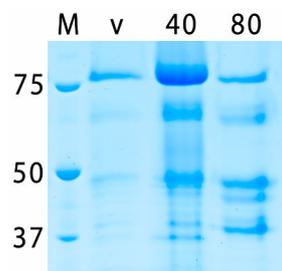


Abbildung 5.3 SDS-PAGE der Proben der fraktionierten Acetonfällung. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M), die Probe vor der Fällung (v), die Probe des ersten Fällungsschritts (40) und die Probe des zweiten Fällungsschritts (80), Coomassiefärbung.

5.1.3 Fraktionierte Acetonfällung mit Ammoniumsulfat-Schritt

Die dritte verwendete Fällungsmethode ist ebenfalls eine fraktionierte Acetonfällung, jedoch beinhaltet diese Methode verschiedene vorbereitende Fällungsschritte. Vor der Acetonfällung mit verschiedenen Konzentrationen werden zunächst die Mediensalze durch eine Erhöhung des pH-Werts sowie Nebenproteine durch die Zugabe von Ammoniumsulfat in Fällung gebracht. Dies bringt im Gegensatz zu den reinen Acetonfällung eine Aufreinigung des Kultivierungsüberstandes für die fraktionierte Acetonfällung. Nach Abschluss der Fällung wird das Protein resuspendiert und gegen ddH₂O dialysiert, um eine Entsalzung der Probe zu erreichen. Die Dialyse geschieht bei 4 °C und mit einer Dialysemembran mit einem Cut-off von 6 kDa bis 8 kDa. Anschließend werden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert.

Das SDS-Gel der Fällungsproben ist in Abbildung 5.4 zu sehen. Die Überstände der Fällung konnten aufgrund der niedrigen Dichte nach Acetonzugabe nicht mittels SDS-PAGE analysiert werden. Das Gel zeigt die Analyse der Pellets der unterschiedlichen Fällungsschritte. Die drei Proben Pv, P3 und P4 zeigen das gleiche Bandenmuster mit unterschiedlichen Intensitäten. Ein großer Teil der Proteine befindet sich im Pellet P3, das nach der Ammoniumsulfatfällung entsteht. In diesem Schritt sollte eine Isolierung des Zielproteins von den Proteinen im niedrigen Größenbereich stattfinden. Aufgrund der Fällung aller Proteine in diesem Schritt sollte das Protokoll hinsichtlich der Ammoniumsulfatkonzentration überarbeitet werden. Das Pellet P2 enthält kein Protein, wie im SDS-Gel erkennbar ist. Dies ist der Schritt, bei dem die Mediensalze selektiv über eine Erhöhung des pH-Wertes gefällt werden. Die Dialyseproben D1 und D2 zeigen keine Proteinbanden, obwohl in der Probe P4 Proteinbanden zu sehen sind. Dieser Verlust ist auf eine Bindung der Proteine an die Membran der Dialyseschläuche zurück zu führen.

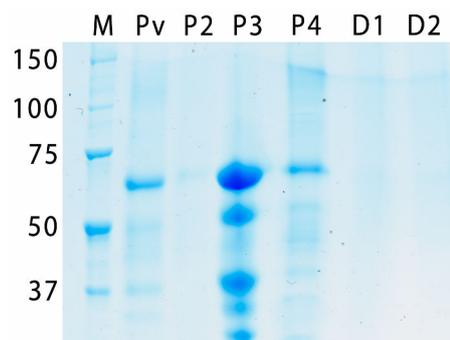


Abbildung 5.4 SDS-PAGE der Proben der fraktionierten Acetonfällung mit Ammoniumsulfat. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M) sowie die Proben vor der Fällung (Pv), nach der Entsalzung (P2), nach dem Ammoniumsulfatschritt (P3), nach 80% Aceton (P4) und nach der Dialyse aus zwei verschiedenen Dialyseschläuchen (D1 und D2), Coomassiefärbung.

5.1.4 Fazit

Mit allen drei angewendeten Fällungen konnte eine Aufkonzentrierung der Probe erreicht werden. Da für eine Aufkonzentrierung jedoch nicht mehrere Fällungsschritte notwendig sind, kann für eine alleinige Aufkonzentrierung die einfache Acetonfällung verwendet werden. Für die gezielte Isolierung des CMP eignet sich keine der Fällungen mit den verwendeten Protokollen. Da die fraktionierte Acetonfällung mit Ammoniumsulfatschritt

eine deutliche Fällung der Proteine im Ammoniumsulfatschritt zeigt, wurden weitere Fällungen mit unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen getestet, um eine Isolierung des Zielproteins zu testen. Diese unterschiedlichen Fällungen waren allerdings auch nur bezüglich einer Aufkonzentrierung erfolgreich und konnten keine Isolierung der Proteinbande bei 75 kDa erreichen.

5.2 Chromatographie

Da sich die Fällungen als nicht geeignet zur selektiven Isolierung des Zielproteins erwiesen haben, wurde die Trennaufgabe auf chromatographische Methoden übertragen. Durch verschiedene Ansätze (Ionenaustausch-, hydrophobe Interaktions- und Größenausschlusschromatographie) wurde getestet, ob dadurch eine selektive Isolierung erreicht werden kann.

5.2.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie (IEX, *ion-exchange chromatography*) ist eine Methode, die auf ionischen Bindungen zwischen der stationären Phase und den Trennmolekülen basiert. Es wird zwischen Anionenaustauschern und Kationenaustauschern unterschieden. Anionenaustauscher besitzen eine positiv geladene stationären Phase, die Anionen binden kann. Kationenaustauscher sind dementsprechend negativ geladen, um Kationen zu binden. Der pH-Wert der mobilen Phase wird so eingestellt, dass das Protein in seiner Nettoladung dem Trennprinzip angepasst wird. Dabei wird der pH-Wert um mindestens eine Einheit höher oder niedriger als der pI des aufzutrennenden Proteins gewählt, um die Ladung sicher einstellen zu können. Nach der Bindung wird über eine Salzzugabe in den Elutionspuffer eine Verdrängung der gebundenen Proteine durch die Salzionen gewährleistet und die Proteine eluieren nach ihrer Ionenstärke in unterschiedlichen Fraktionen.

Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde ein Sartobind® Q MA 75 Membranadsorber von Sartorius verwendet. Da der berechnete pI des Kollagenproteins bei 7,03 liegt, wird ein 10 mM Phosphatpuffer mit pH 8 eingesetzt, um eine negative Ladung des Proteins zu erreichen. Die Probe zur Analyse wurde dem Kultivierungsüberstand aus Kultivierung A entnommen und ohne Fällung oder sonstige Vorbehandlungsschritte eingesetzt. Der pH-Wert des Kultivierungsüberstands beträgt 5, sodass eine Abweichung zum verwendeten Phosphatpuffer besteht. Im ersten Versuch wird getestet, ob der Kultivierungsüberstand so eingesetzt werden kann, oder ob aufgrund der pH-Wert-Abweichung Vorbehandlungen notwendig sind.

Für die Elution wurde dem Phosphatpuffer 1 M Natriumchlorid zugefügt. Das Chromatogramm ist in Abbildung 5.5 zu sehen. Zu Beginn ist deutlich der Durchbruch erkennbar. Die Elution beginnt nach ca. 15 min mit Zugabe des Elutionspuffers. Mit Zunahme der Elutionslösung steigt ebenfalls die Konduktivität, allerdings ist im Graph der UV-Adsorption kein Peak zu erkennen, der auf eine Elution des Proteins schließen lässt. Da die Konduktivität während des Durchbruchs sehr hoch war, könnte die Bindung des Proteins an die Membran verhindert worden sein. Durch den hohen Salzgehalt des Kultivierungsüberstands können die Bindungsstellen der Membran besetzt sein, und das Protein findet sich dann in den Durchbruchfraktionen wieder. Zudem kann die pH-Wert-Abweichung des Kultivierungsüberstands zu groß gewesen sein, sodass keine Bindung erfolgte.

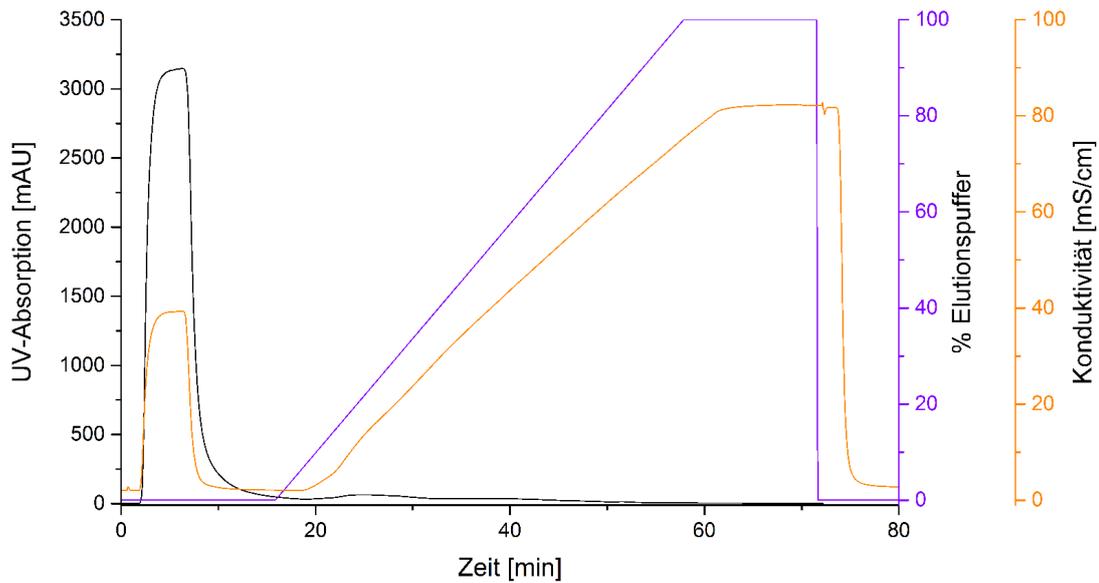


Abbildung 5.5 Chromatogramm der AIEX mit der ungefällten Probe, dargestellt sind die Konduktivität (orange), die UV-Absorption (schwarz) und die Konzentration an Elutionslösung (violett).

Da sich das Protein möglicherweise im Durchbruch befindet, wurde eine SDS-PAGE der Fraktionen durchgeführt, um den Verbleib des Proteins zu klären. In Abbildung 5.6 ist das SDS-Gel der Fraktionen zu den Retentionszeiten 0 min bis 20 min zu sehen. Die Retentionszeiten 2 min bis 5 min entsprechen den Durchbruchfraktionen und enthalten eindeutig Banden für das Kollagen-ähnliche Protein. Daher ist davon auszugehen, dass das Protein nicht an die Membran gebunden hat.

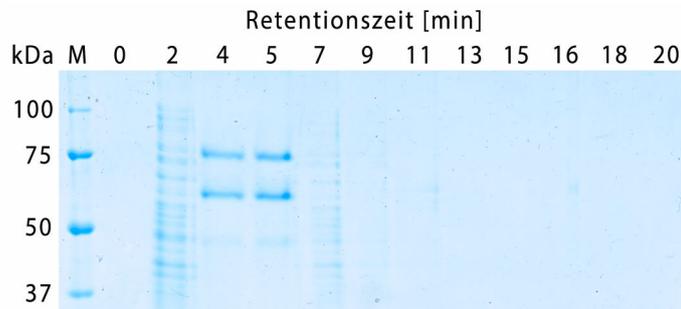


Abbildung 5.6 SDS-Gel der Proben der AIEX, aufgetragen sind ein Größenstandard (M) und die Proben der Retentionszeiten 0 min bis 20 min, Coomassiefärbung.

Um sicher zu gehen, dass die Bindung nicht von einer erhöhten Salzkonzentration sowie einem abweichenden pH-Wert im Kultivierungsüberstand verhindert wurde, wurde der Versuch mit einer gefällten Probe wiederholt. Dafür wurden erneut eine Probe aus dem Kultivierungsüberstand entnommen und diese vor einem weiteren Durchlauf durch eine einfache Acetonfällung gefällt, um das Protein vom Kultivierungsüberstand zu trennen. Nach der Fällung wurde das Protein im Laufpuffer (pH 8) gelöst. Das Chromatogramm zeigt erneut eine hohe Konduktivität im Durchbruch, was bedeutet, dass die Fällung keine Abnahme der Salzkonzentration in der Probe erreicht hat. Während der Elution ist kein Proteinpeak erkennbar und es konnte mittels SDS-PAGE kein Protein in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden, sondern es befand sich erneut in den Durchbruchfraktionen (zusätzliche Daten im Anhang C).

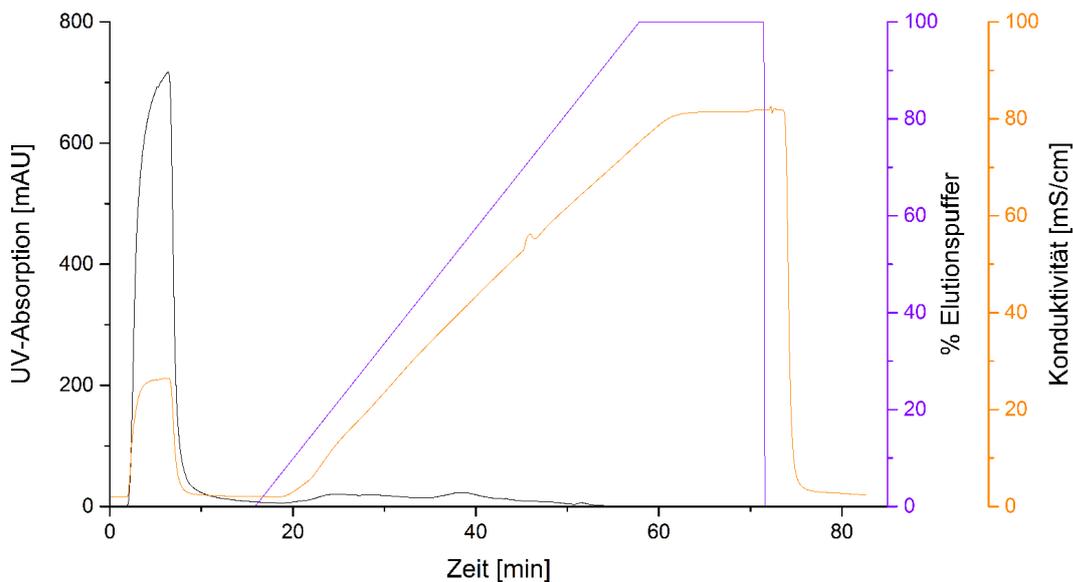


Abbildung 5.7 Chromatogramm der AIEX mit der gefällten Probe, dargestellt sind die Konduktivität (orange), die UV-Absorption (schwarz) und die Konzentration an Elutionslösung (violett).

Da die anionische Austauschmembran keine Bindung des Proteins erreichen konnte, wurde ebenfalls eine Kationenaustauschmembran getestet. Bei dieser Membran wird ein Laufpuffer verwendet, der den gleichen pH-Wert wie der Kultivierungsüberstand besitzt.

Dies könnte die Löslichkeit des Proteins positiv beeinflussen und eine Bindung an die Membran begünstigen.

Kationenaustauschchromatographie

Um zu untersuchen, ob das Protein besser an eine kationische Membran binden kann, wurde der gleiche Versuch mit einem Sartobind® S MA 75 Membranadsorber von Sartorius wiederholt. Dabei wurde ein 10 mM Phosphatpuffer mit pH 5 eingesetzt. Das Protein wurde zunächst analog zur Anionenaustauschchromatographie ohne Vorbehandlung im Kultivierungsüberstand (pH = 5), im späteren Verlauf ebenfalls nach Fällungen, auf die Säule gegeben. Für die Elution wurden dem Laufpuffer 1 M Natriumchlorid zugesetzt. In Abbildung 5.8 ist das Chromatogramm gezeigt, das nach Auftragung der unbehandelten Probe aus dem Kultivierungsüberstand entstanden ist.

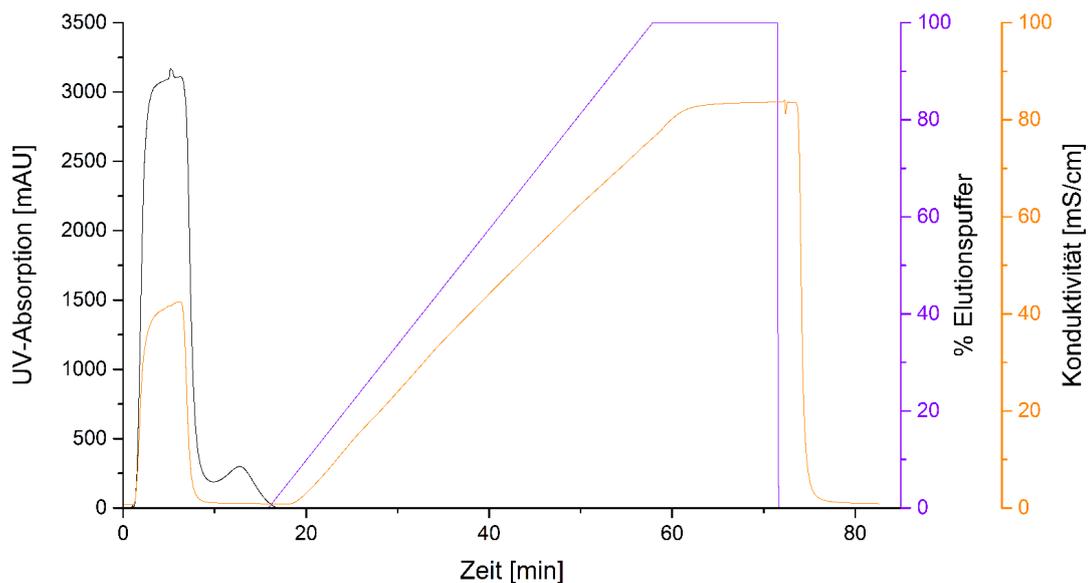


Abbildung 5.8 Chromatogramm der CIEX mit der ungefällten Probe, dargestellt sind die Konduktivität (orange), die UV-Absorption (schwarz) und die Konzentration an Elutionslösung (violett).

Nach dem Durchbruch ist ein Peak zwischen 10 min und 20 min zu sehen. Dieser ergab sich durch das Waschen der Membran im Anschluss an die Auftragung, sodass geringe

Mengen nicht gebundenes Protein weggespült wurde. Es ist ebenso wie bei der Anionenaustauschchromatographie zu sehen, dass es keinen Proteinpeak während der Elution gibt. In diesem Durchlauf ist erneut eine hohe Salzkonzentration durch die hohe Konduktivität während des Durchbruchs gezeigt. Über eine SDS-PAGE wurde bestätigt, dass sich das Protein im Durchbruch befindet.

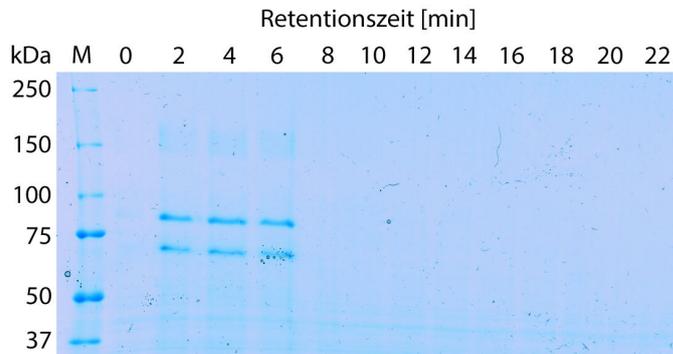


Abbildung 5.9 SDS-Gel der Proben der CIEX, aufgetragen sind ein Größenstandard (M) und die Proben der Retentionszeiten 0 min bis 22 min, Coomassiefärbung.

Um zu untersuchen, ob die Bindung erneut von einer hohen Salzkonzentration verhindert wurde, wurde der Versuch nach zwei verschiedenen Fällungen der Probe (Aceton und TCA) der Probe wiederholt. In diesen Durchläufen konnte ebenfalls keine Bindung des Proteins an die Membran beobachtet werden, obwohl die Konduktivität im Durchbruch der TCA-gefällten Probe deutlich niedriger war. Somit lässt sich das Protein weder mit einer Anionen- noch mit einer Kationenaustauschchromatographie auftrennen, da die Bindung an die Membran in keinem der beiden Fälle erfolgte. Da sich die hohe Salzkonzentration nachteilig auf die Bindung des Proteins an die Membranen auswirken kann, wurde im Anschluss eine Untersuchung mittels Hydrophober Interaktionschromatographie gemacht. Bei dieser Chromatographiemethode ist eine hohe Salzkonzentration in der Probe gewünscht, da die Bindung der Proteine an die Membran über hydrophobe Wechselwirkungen geschieht.

5.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Da die Ionenaustauschchromatographie keinen Erfolg bei der Isolierung des Zielproteins zeigte, wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) getestet. Bei einer HIC wird eine hydrophobe stationäre Phase eingesetzt, an die hydrophobe Bereiche der Proteine binden können. In diesem Versuch wurde eine HiTrap Capto Phenyl ImpRes 1 ml Säule von GE Healthcare eingesetzt. Um die notwendige Hydrophobizität zu erreichen, ist eine erhöhte Salzkonzentration im Laufpuffer notwendig, da diese den Proteinen teilweise die Hydrathülle entfernen kann und somit zu freigelegten hydrophoben Seitenketten führt. Dafür wurde ein 10 mM Phosphatpuffer mit pH 7 eingesetzt, dem verschiedene Salzkonzentrationen zugesetzt wurden. Der pH-Wert des Laufpuffers wird so gewählt, dass das Protein ungeladen vorliegt und daher die hydrophoben Wechselwirkungen am größten sind. Abbildung 5.10 zeigt das Chromatogramm bei Zugabe von 1 M Natriumchlorid in den Laufpuffer.

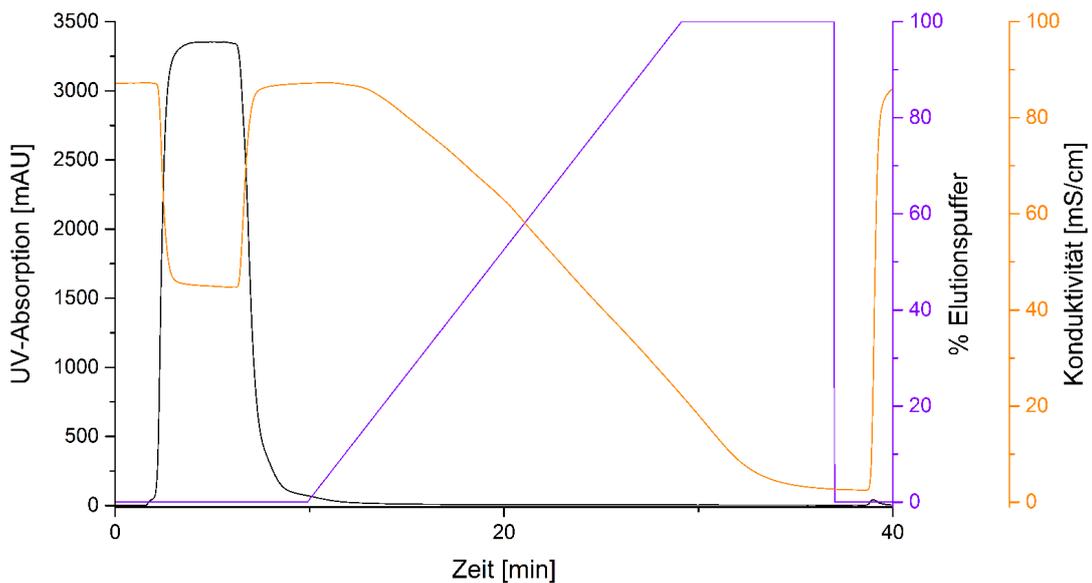


Abbildung 5.10 Chromatogramm der HIC der ungefällten Probe bei Zugabe von NaCl in den Laufpuffer, dargestellt sind die Konduktivität (orange), die UV-Absorption (schwarz) und die Konzentration an Elutionslösung (violett).

Während des Durchbruchpeaks ist eine niedrigere Konduktivität zu sehen, da die Salzkonzentration in der Probe niedriger war als im Laufpuffer. Während der Zugabe des Elutionspuffers ist erneut kein Proteinpeak zu beobachten. Mittels SDS-PAGE wurde bestätigt, dass das Protein nicht gebunden hat und im Durchbruch zu finden ist (siehe Anhang C).

Des Weiteren wurden Laufpuffer mit 3 M Natriumchlorid und 1 M Ammoniumsulfat untersucht, um die Hydrophobizität zu erhöhen. Um in der Probe eine ähnliche Salzkonzentration wie im Laufpuffer zu erreichen, und damit eine Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkungen zu gewährleisten, wurden der Probe unterschiedliche Salzkonzentrationen zugesetzt. In keinem der getesteten Verläufe konnte eine Bindung des Proteins an die Säule beobachtet werden. Ein Überblick über die untersuchten Lauf- und Probenpuffer mit den verschiedenen Zusätzen ist in Anhang C, Tabelle C.1 dargestellt.

5.2.3 Größenausschlusschromatographie

Für eine weitere Untersuchung der Proteinbanden wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) ausgewählt. Bei dieser Trennmethode gibt es keine Wechselwirkungen ionischer Art, da die Auftrennung aufgrund des hydrodynamischen Volumens geschieht. Als stationäre Phase wurde die Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex 75 prep grade von GE Healthcare verwendet. Diese Säule hat einen kalibrierten Trennbereich zwischen 3 kDa und 70 kDa und wird verwendet, um die Proteinbanden der SDS-Gele im Bereich zwischen 37 kDa und 60 kDa zu untersuchen. Der Laufpuffer besteht aus 0,05 M Natriumphosphat sowie 0,15 M Natriumchlorid und besitzt einen pH-Wert von 7,2. Der Kultivierungsüberstand der ungefällten Probe hat einen pH-Wert von 5.

Für die Untersuchung wird sowohl mit einer Probe aus dem Kultivierungsüberstand als auch mit einer Aceton-gefällten Probe gearbeitet. Die gefällte Probe wurde anschließend in Laufpuffer gelöst. Zum Vergleich wurde zusätzlich ein Lauf mit einem Größenstandard gemacht. Dieser besteht aus den fünf Proteinen Aprotinin (6,5 kDa), Ribonuklease A (13,7 kDa), α -Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Conalbumin (75 kDa).

Die Proteine liegen jeweils in einer Konzentration von 3 mg/ml bzw. Ovalbumin in einer Konzentration von 4 mg/ml vor.

Im Chromatogramm (Abb. 5.11) sind in blau die Peaks des Größenstandards dargestellt. In orange und lila sind die beiden aufgetragenen Proben zu sehen, wobei die orange Kurve die gefällte und in Laufpuffer gelöste Probe und die lila Kurve die ungefällte Probe darstellt. Im direkten Vergleich dieser beiden Kurven ist zu erkennen, dass in der ungefällten Probe größere und breitere Peaks zu sehen sind, was auf Medienbestandteile zurückgeführt werden kann.

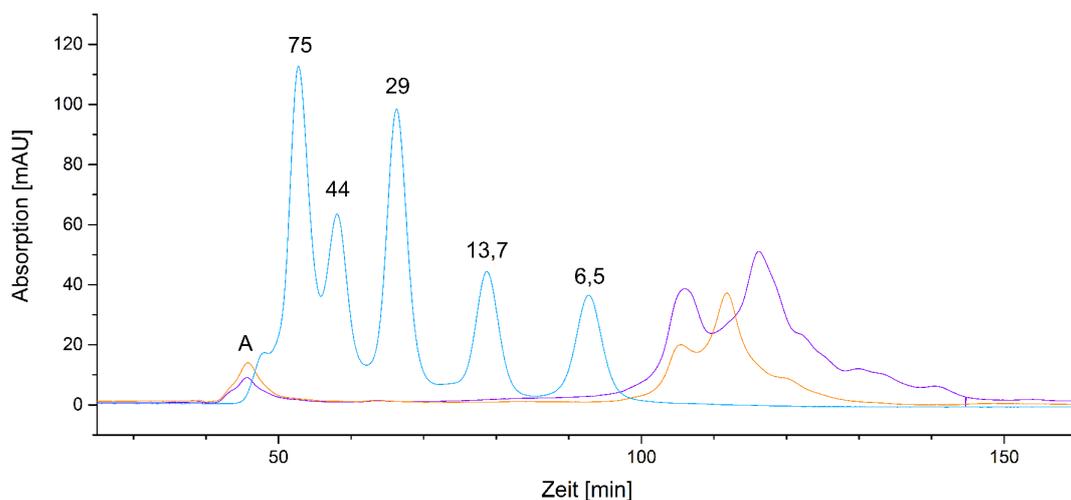


Abbildung 5.11 Chromatogramm der SEC, dargestellt sind die UV-Absorption des Größenstandards (blau), die UV-Absorption der ungefällten Probe (violett) und die UV-Absorption der gefällten Probe (orange).

Der Vergleich mit dem Größenstandard gibt Aufschluss über die Größenverteilung der in der Probe enthaltenen Proteine. Der erste Probenpeak ist etwas vor dem 75 kDa Peak eluiert, sodass dieser Peak der Bande in den SDS-Gelen bei ca. 75 kDa zugeordnet werden kann. Zwar liegt dieser Peak außerhalb des kalibrierten Trennbereichs, allerdings ist aus den Analysen mittels SDS-PAGE bekannt, dass es im Bereich größer als 70 kDa nur eine Proteinbande gibt, sodass Peak und Bande dennoch zugeordnet werden können. Alle weiteren Peaks der beiden Proben eluieren erst nach dem letzten Größenstandardpeak, der bei 6,5 kDa liegt. Da in beiden Proben eine Steigung der Konduktivität zeitgleich zu

den Peaks zwischen 100 min und 130 min beobachtet wurde, ist dies ein Hinweis auf die Elution von Salzen. Die Banden, die in den SDS-Gelen im Bereich zwischen 37 kDa und 75 kDa auftreten, sind nicht im Chromatogramm erkennbar.

Die Größe des Peaks bei etwa 45 min gibt keinen Aufschluss über die detektierte Proteinmenge. Obwohl die Standardproteine in Konzentrationen zwischen 3 mg/ml und 4 mg/ml vorliegen, sind die detektierten Peaks sehr unterschiedlich und alle deutlich höher als der Peak des Zielproteins. In der ungefällten Probe lag das CMP in einer Konzentration von 8,5 mg/ml vor, und somit deutlich höher konzentriert als die Standardproteine. Der Detektor des verwendeten Systems detektiert jedoch nur aromatische Aminosäuren, die in jedem Protein in einer anderen Häufigkeit vorliegen. Daher kann die Proteinkonzentration nicht direkt mit der Peakgröße korreliert werden.

Die gesammelten Fraktionen der Chromatographie wurden anschließend auf SDS-Gele aufgetragen, um die Probenzusammensetzung untersuchen zu können. Das Gel der Retentionszeiten 38 min bis 60 min der gefällten Probe ist in Abbildung 5.12 zu sehen. Dabei ist auffällig, dass die Fraktionen, die dem Peak etwas über 75 kDa entsprechen, im Gel nicht nur eine Bande zeigen. In diesen Proben ist erneut das bekannte Bandenmuster zu sehen, das in den SDS-Gelen der verschiedenen Kultivierungen sowie nach den Fällungen zu beobachten war. Obwohl auf diesem Gel nur die Fraktionen des Peaks bei ca. 45 min aufgetragen wurden, sind unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht wiederzufinden. Bei den weiteren Fraktionen dieses Laufs konnten in den SDS-Gelen keine Banden detektiert werden.



Abbildung 5.12 SDS-Gel der Fraktionen um den Peak bei 45 min. Aufgetragen sind ein Größenstandard (M), die Retentionszeiten 38 min bis 60 min sowie eine Vorher-Proteinprobe (P), Coomassiefärbung.

Die Beobachtung der verschiedenen Banden im SDS-Gel nach dem Auftragen eines einzelnen Peaks der Größenausschlusschromatographie ist ein Hinweis auf Wechselwirkungen der Proteine. Unter nativen Bedingungen könnten sich die Proteine durch die PGP-Domänen an beiden Enden zu Trimeren zusammen lagern. Diese könnten anschließend mithilfe der SEC aufgetrennt werden. Die nachfolgende SDS-PAGE würde durch die Zugabe von SDS sowie β -Mercaptoethanol zu einer teilweisen Aufspaltung der Trimeren in Monomere bzw. Dimere der Proteine führen. Daher würden sich die Banden im Größenbereich zwischen 37 kDa und 60 kDa nicht vermeiden lassen.

5.2.4 Fazit

In diesem Abschnitt wurden die vier Chromatographiearten AIEX, CIEX, HIC und SEC für die Trennung des Zielproteins getestet. Keine der untersuchten Methoden konnte das gewünschte Ergebnis, eine Trennung des Zielproteins bei 75 kDa von weiteren Proteinen der Probe (37 kDa bis 65 kDa), erreichen. Mit den beiden verwendeten Membranen für AIEX und CIEX sowie mit der HIC-Säule konnte keine Bindung des Proteins an die stationäre Phase beobachtet werden. Variationen in der Probenvorbereitung, im Laufpuffer sowie im Probenpuffer verbesserten die Ergebnisse nicht (eine Zusammenfassung der untersuchten Parameter befindet sich im Anhang C, Tabelle C.1). In allen untersuchten Läufen dieser drei Methoden befand sich das Protein jeweils im Durchbruch der Auftragung und wurde teilweise zusätzlich im anschließenden Waschschrift eluiert. Während der kontrollierten Elution wurde kein Protein detektiert. Da die Probe nicht über ionische Wechselwirkungen isoliert werden konnte, wurde anschließend eine SEC durchgeführt. Dabei wird nach dem hydrodynamischen Volumen aufgetrennt, sodass keine Ladungseffekte die Ergebnisse beeinflussen können. Das Chromatogramm zeigt einen einzelnen erkennbaren Peak, der etwa der Größe von 75 kDa zugeordnet werden kann. Da nach dem Auftrennen der Peakfraktionen im SDS-Gel erneut mehrere Banden zu erkennen waren, kann auf eine Trimerisierung des Proteins geschlossen werden. Diese Erklärung unterstützt die Ergebnisse der unterschiedlichen Fällungen, bei denen das Zielprotein bei 75 kDa nicht von den Banden im Bereich zwischen 37 kDa und 65 kDa isoliert werden konnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, werden weitere Proteinanalysen durchge-

führt, die die Zusammensetzung der unterschiedlichen Proteinbanden bestimmen sollen. Zunächst wird ein Trimerisierungstest im SDS-Gel durchgeführt und anschließend die Proteinzusammensetzung der Banden mittels Massenspektrometrie analysiert.

5.3 Analyse der unterschiedlichen Proteinbanden

Die Analysen mittels Fällung und Chromatographie weisen darauf hin, dass die verschiedenen Proteinbanden, die im SDS-Gel beobachtet werden konnten, möglicherweise Zusammenlagerungen des Zielproteins sein könnten. Mit den verschiedenen Fällungen ließ sich keine Auftrennung der Proteinbande bei 75 kDa von den weiteren Proteinen erreichen. Die Größenausschlusschromatographie ergab einen einzelnen Peak im Bereich größer als 70 kDa während die im SDS-Gel aufgetragenen Fraktionen dieses Peaks erneut das bekannte, mehrteilige Bandenmuster zeigten. Daher wird hier mit zwei verschiedenen Experimenten untersucht, ob es eine Zusammenlagerung der Proteine gibt, oder ob es sich um Proteinfragmente handeln könnte. In Abbildung 5.13 ist beispielhaft die Vernetzung zwischen drei CMPs gezeigt.

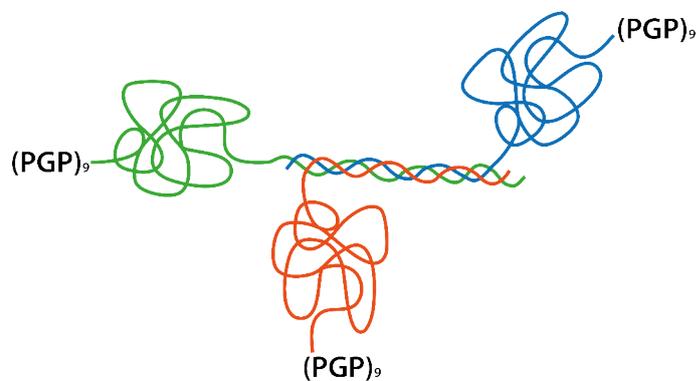


Abbildung 5.13 Schematische Darstellung der Proteinvernetzung zwischen mehreren CMP-Molekülen.

5.3.1 Trimerisierungsanalyse

Für die Analyse der Zusammenlagerung des Zielproteins werden einzelne Proteinbanden aus einem SDS-Gel ausgeschnitten, in einem Extraktionspuffer inkubiert und nach einer

Zentrifugation zum Abtrennen der Gelstücke erneut mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 5.14 dargestellt.

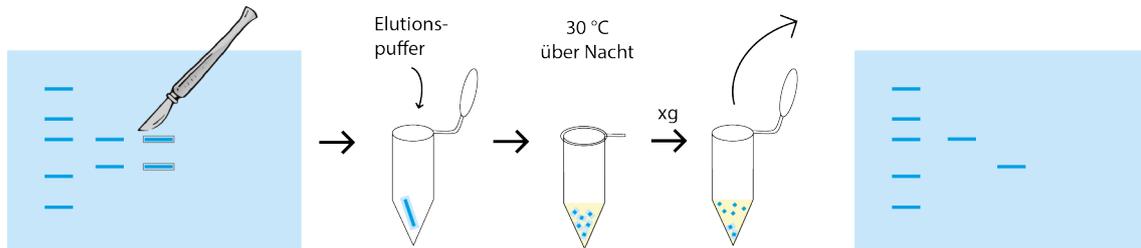


Abbildung 5.14 Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des Trimerisierungstests.

Mithilfe dieses Versuchs soll überprüft werden, ob die unterschiedlichen Proteinbanden durch Zusammenlagerung des Zielproteins entstehen. Da Zusammenlagerungen von Monomeren häufig in einer Gleichgewichtsreaktion geschehen, wurde untersucht, ob eine einzelne Proteinbande nach Extraktion und erneutem Auftrag auf ein SDS-Gel das bekannte Proteinmuster, also mehrere Proteinbanden, bildet. Ist dies der Fall, können die unterschiedlichen Proteingrößen auf Di- und Trimerisierungen des Zielproteins zurückgeführt werden.

In Abbildung 5.15b ist das Ergebnis dieses Versuchs dargestellt. Die untersuchten Proben wurden aus dem Gel in Abbildung 5.15a ausgeschnitten, mittels Extraktionspuffer über Nacht bei 30 °C aus dem Gel eluiert und anschließend erneut mittels SDS-PAGE analysiert. Um die Proteinmenge zu erhöhen wurden jeweils 3 Banden derselben Proteingröße in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proben jeweils Banden einer einzigen Größe enthalten. Die Proben 1a und 2a wurden mit dem empfohlenen Extraktionspuffer [90] behandelt, für die Proben 1b und 2b wurde dem Extraktionspuffer 0,1 % SDS zugefügt, um die Elution aus dem Gel zu verbessern.

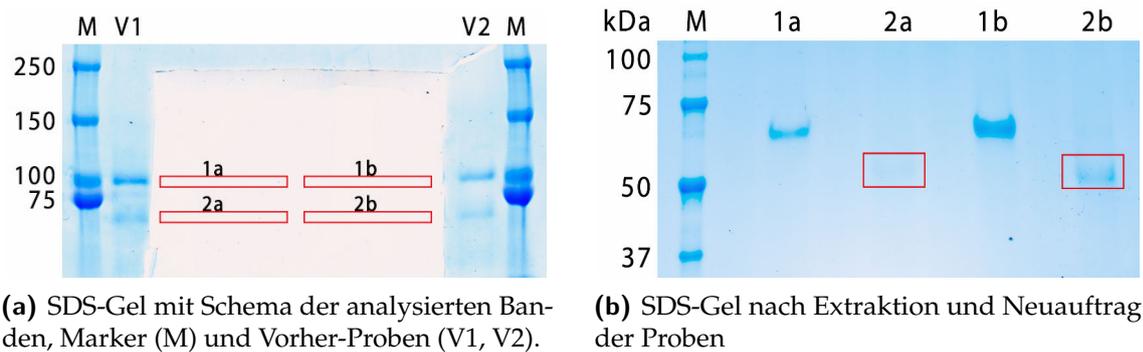


Abbildung 5.15 SDS-Gele der Trimerisierungsanalyse: vor (a) und nach (b) der Extraktion und Neuauftrag, Coomassiefärbung.

Da mit diesem Versuch nicht das bekannte Bandenmuster der SDS-Gele reproduziert werden konnte, können verschiedene Gründe dafür verantwortlich sein. Einerseits ist es möglich, dass die Hypothese falsch ist und es sich hier nicht um eine Zusammenlagerung der Proteine handelt. Andererseits kann es sich hier um eine Zusammenlagerung der Moleküle handeln, die allerdings keiner Gleichgewichtsreaktion unterliegt. Kollagen ist dafür bekannt, starke intramolekulare Bindungen zu bilden, die sich durch die reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE nicht auflösen lassen. Ob solche Verbindungen in dem Zielprotein vorliegen, ist nicht bekannt. Daher kann die Hypothese der Zusammenlagerung nicht vollständig ausgeschlossen, allerdings auch nicht bewiesen werden.

5.3.2 Untersuchung zur Thermolyse des CMPs

Da die Untersuchung der Trimerisierung die Bildung der unterschiedlichen Proteinbanden nicht erklären kann, wurde eine weitere Untersuchung zur Entstehung dieser Banden gemacht. Dabei wurde getestet, ob die Inkubation der Proben mit SDS-Probenpuffer zu einem thermischen Abbau der Proteine führt. Dies würde zudem erklären, weshalb die Fraktionen des einzelnen Peaks in der SEC nach Auftragen auf ein SDS-Gel das bekannte Bandenmuster gezeigt haben.

Für diese Analyse wurden die Inkubationsbedingungen der Proben vor der Auftragung mittels SDS-PAGE variiert. Dabei wurden unterschiedliche Temperaturen und Zeiträume für die Inkubation in SDS-Probenpuffer verwendet, und anschließend das Bandenmuster

der verschiedenen Proben miteinander verglichen. So soll bestimmt werden, ob durch das Absenken der Inkubationstemperatur weniger Thermolyse, also weniger oder kleinere Banden im Bereich der niedrigeren Molekulargewichte, erreicht werden kann. Außerdem wird untersucht, ob bei einer längeren Inkubationsdauer ein höherer Thermolysegrad, also mehr oder größere Banden im Bereich der niedrigeren Molekulargewichte, zu beobachten ist. In Tabelle 5.1 sind die Inkubationsbedingungen zusammen gefasst.

Tabelle 5.1 Auflistung der untersuchten Denaturierungstemperaturen und -zeiten

Probe	Temperatur [°C]	Dauer [min]
a	95	5
b	85	20
c	40	30
d	20	30
e	20	60
f	-	-

Probe a entspricht den Standard-Inkubationsbedingungen und dient somit als Referenz. Probe f wurde unmittelbar vor dem Auftragen der Proben in das SDS-Gel mit Probenpuffer versetzt, sodass keine Inkubationszeit vorlag. Das SDS-Gel der Proben ist in Abbildung 5.16 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass sich die Proben a bis f nicht im Bandenmuster unterscheiden. Die unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen haben keinen Effekt auf das Bandenmuster der Proben, sodass hier nicht von einem thermischen Abbau der Proben ausgegangen werden kann.

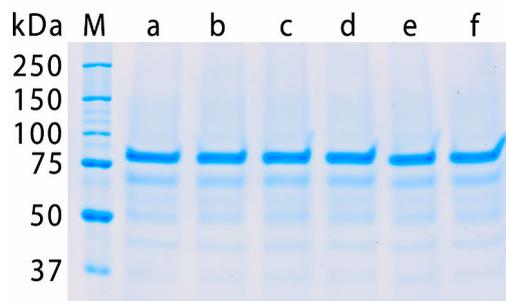


Abbildung 5.16 SDS-Gel der Proben mit verschiedenen Inkubationstemperaturen und -zeiten, Coomassiefärbung.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Versuche zeigen, dass die Ursache der verschiedenen Proteinbanden nicht vollständig geklärt werden kann. Sowohl die Analyse zur Trimerisierung als auch der Versuch zur Untersuchung der Thermolyse zeigen keinen Unterschied zu den Proben vor der Behandlung.

5.4 Massenspektrometrie

Da die bisherigen Untersuchungen keine eindeutige Aussage über eine mögliche Zusammenlagerung oder Abbau der Proteine zulassen, wird eine Untersuchung mittels Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. Dabei kann geklärt werden, ob in den Proben Fremdprotein vorhanden ist, oder ob es sich bei allen Proteinbanden um das CMP handelt. Dafür wurden aufkonzentrierte Proben nach einem Alkylierungsschritt auf ein SDS-Gel aufgetragen, die Proteine mit einer Coomassiefärbelösung sichtbar gemacht und die Banden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten. Nach mehreren weiteren Vorbereitungsschritten wurden die Proben mittels Flüssigchromatographie aufgetrennt und nachfolgend mit einem LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometer analysiert. Die Rohdaten der Messung wurden mit Proteome discoverer (Thermo Scientific) verarbeitet und gegen eine hauseigene Datenbank aus üblichen Kontaminanten und Kollagenproteinen abgeglichen.

In Abbildung 5.17 ist anhand des SDS-Gels gezeigt, wie sich die unterschiedlichen Proben zusammensetzen. Probe 1 entspricht dabei der Hauptbande bei 75 kDa während Probe 2 aus der zweitstärksten Bande bei etwa 65 kDa besteht. Da die unteren Banden eine deutlich schwächere Intensität besitzen, wurde der Bereich zwischen 37 kDa und 50 kDa aus drei gleichen Proben ausgeschnitten und miteinander vereint.

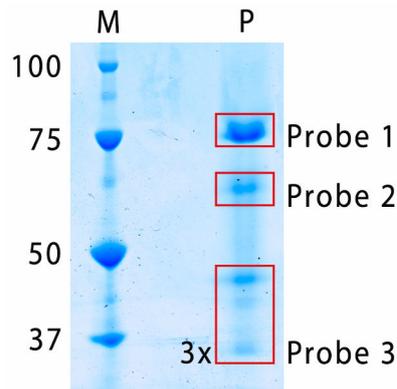


Abbildung 5.17 SDS-Gel der Probe für die MS-Messung, aufgetragen sind ein Größenstandard (M) sowie die Proteinprobe (P), Coomassiefärbung.

Die MS-Analyse ergab, dass das Zielprotein zu 99,34 % jeweils in den Proben 1 und 2 zu finden ist. In Probe drei wurde eine Übereinstimmung von 75,66 % bestimmt. Die Werte für die ersten beiden Proben zeigen eindeutig, dass es sich bei dem Protein um das Zielprotein handelt. Der etwas niedrigere Wert in Probe 3 ist auf die schwächere Intensität zurückzuführen und zeigt dennoch deutlich, dass auch in diesen Banden Zielprotein vorhanden ist. Die weiteren gefundenen Proteine der drei Proben sind übliche Kontaminanten, die während der Probenvorbereitung in die Probe gelangt sein können. Das Ergebnis der MS-Untersuchung stützt die Beobachtung aus Kapitel 5.2.3, dass es sich bei den unterschiedlichen Banden im SDS-Gel um verschiedene Zusammenlagerungen des Zielproteins handeln kann. Eine genaue Größenbestimmung ist mittels MS nicht möglich, da mit den Proteinen ein tryptischer Verdau durchgeführt wird. Daher kann mit dieser Untersuchung keine Aussage darüber getroffen werden, warum die unterschiedlichen Größen gebildet werden.

5.5 Glykosidasetest

Obwohl durch die MS-Messung bestätigt wurde, dass es sich bei allen sichtbaren Banden der SDS-Gele um das Zielprotein handelt, ist es wichtig, weitere Faktoren zu untersuchen, die die Laufgröße der Proteine im SDS-Gel beeinflussen können. Da es sich bei *P. pastoris* um ein Mikroorganismus handelt, der post-translationale Modifikationen vornehmen

kann, besteht die Möglichkeit für Glykosylierungen nach der Proteinbiosynthese. Glykosylierungen beeinflussen das praktische Molekulargewicht und müssen für Analysen wie SDS-PAGE bekannt sein, um Größenabweichungen erklären zu können.

Eine Glykosidase (EC 3.2.1), auch als Glykosid-Hydrolase bezeichnet, kann glykosidische Bindungen zwischen Glykonen und verschiedenen Aglykonen spalten. Dies kann für den Nachweis von Glykosylierungen an Proteinen eingesetzt werden. Für die verschiedenen Arten der Glykosylierungen, O- und N-Glykosylierungen, werden unterschiedliche Enzyme eingesetzt. Dabei wird durch einen Glykosidaseverdau und einem Vorher-Nachher-Vergleich bestimmt, ob und in welcher Größenordnung ein Protein Glykosylierungen besitzt. Durch das Fehlen der Enzyme für Prolin- und Lysinhydroxylierungen in *P. pastoris* gibt es keine Grundlage für O-Glykosylierungen, weshalb in diesem Versuch N-Glykosylierungen untersucht werden. Es wurde die Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F, 35,5 kDa) eingesetzt, um vorhandene Glykosylierungen vom Zielprotein abzuspalten und über den Auftrag auf ein SDS-Gel den Größenunterschied vor und nach dem Verdau zu bestimmen. Als Positivkontrolle wurde die Ribonuklease B (RNase B,) eingesetzt, um die Funktion der PNGase F zu überprüfen. RNase B ist ein Glykoprotein mit einem molekularen Gewicht von 17 kDa, das nach der Deglykosylierung auf 13,7 kDa sinkt.

Nach dem einstündigen Verdau wurden die unbehandelten Proben der Positivkontrolle und die verdauten Proben des Testverdaus auf eine SDS-PAGE aufgetragen und darüber der Größenunterschied bestimmt. Das Ergebnis des Glykosidasetests ist in Abbildung 5.18 dargestellt. Zwischen den Proben der Positivkontrolle (P und Pv) ist ein deutlicher Unterschied erkennbar. Die unbehandelte Probe P hat eine Bande knapp unterhalb von 20 kDa, was dem theoretischen Gewicht von 17 kDa entspricht. Die verdaute Probe hat eine Bande deutlich unterhalb von 20 kDa und zeigt damit die Funktionalität der PNGase F an, da die glykosidische Bindung hydrolysiert wurde und das Protein danach eine deutlich reduzierte Größe besitzt.

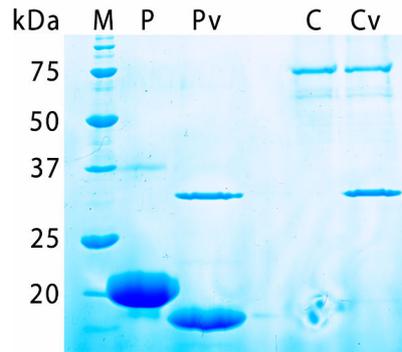


Abbildung 5.18 SDS-Gel des Glykosidasetests. Aufgetragen sind ein Größenstandard (M) sowie die unverdauten Proben P bzw. C für die Positivkontrolle bzw. das Kollagenprotein und die verdauten Proben Pv bzw. Cv für die Positivkontrolle bzw. das Kollagenprotein.

Auf einer Höhe etwas unterhalb von 37 kDa ist in der Probe Pv die Bande der PNGase F (35,5 kDa) zu erkennen. Im Testverdau mit dem Kollagen-ähnlichen Protein ist kein Unterschied zwischen der unbehandelten und der verdauten Probe zu erkennen. Beide Banden laufen auf gleicher Höhe bei 75 kDa. Die Bande der PNGase F in der Probe Cv zeigt, dass Enzym zugesetzt wurde und in ausreichender Menge vorhanden war. Aus diesem Ergebnis kann erkannt werden, dass das CMP keine N-Glykosylierungen besitzt.

5.6 Rheologie

Da sich die verschiedenen Proteinbanden als CMP herausgestellt haben und sich diese nicht voneinander trennen ließen, wurden mit dem produzierten Protein Rheologiemessungen durchgeführt. Gelbildung des CMPs ist ein wichtiger Parameter für einen angestrebten medizinischen Einsatz und zeigt zudem, dass das CMP Kollagen-ähnliche Eigenschaften besitzt.

Die Rheologie ist die Untersuchung von Fließverhalten und Deformationseigenschaften verschiedener Materialien (vgl. Abb. 5.19). Mithilfe der Rheologie können z. B. Hydrogele hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften charakterisiert werden. Die dafür eingesetzten Geräte werden als Rheometer bezeichnet. Das in diesem Versuch verwendete Rheometer ist das Oszillations- und Rotationsrheometer MCR 302 (Anton Paar) mit einer

Platte-Platte-Geometrie. Zwischen diesen Platten wird die Probe aufgetragen und kann anschließend über UV oder Temperaturwechsel zur Gelierung gebracht werden. Während der Gelierung rotiert oder oszilliert die obere Platte, sodass die Deformation der Probe gemessen werden kann.

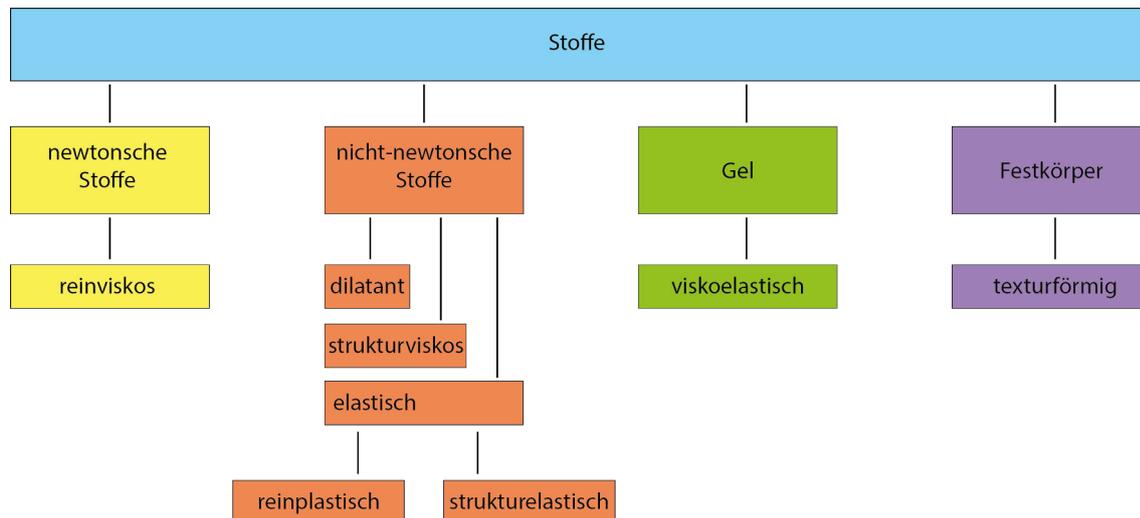


Abbildung 5.19 Einordnung der verschiedenen Stoffe, die rheologisch betrachtet werden können.

Die Ergebnisse der Messung werden in Werten des Speichermoduls G' und des Verlustmoduls G'' wiedergegeben. Die Werte des Speichermoduls G' stehen für die Energie, die in der Deformation des Materials gespeichert wird. Nach dem Ende der Deformation wird die Energie für die Reformation verwendet. Im Gegensatz dazu steht die Energie, die durch das Verlustmodul G'' beschrieben wird. Diese geht während der Deformation verloren, da sie für strukturelle Änderungen der Probe verwendet wird oder als Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Daher steht sie nach dem Ende der Deformation nicht mehr zur Verfügung. Bei Materialien, die sich wie ein viskoelastischer Festkörper verhalten, sind die Werte des Speichermoduls höher als die Werte des Verlustmoduls. Ist dies nicht der Fall, handelt es sich um eine viskoelastische Flüssigkeit. Während der Messung kann über ein eingebautes Peltier-Element an der unteren Platte eine konstante Temperatur eingestellt werden. Somit kann untersucht werden, ob die Temperatur einen Einfluss auf die Geleigenschaften von verschiedenen Materialien hat.

Für die Untersuchung der Geleigenschaften wurden Messungen bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten durchgeführt. Das Protein für diese Messungen wurde mit einer fraktionierten Acetonfällung mit Ammoniumsulfatschritt aus dem Kultivierungsüberstand gefällt, in einem Natriumphosphatpuffer (0,2 M) gelöst und anschließend gegen Reinstwasser dialysiert. In Abbildung 5.20 sind die Speicher- und Verlustmodule der Rheologiemessungen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen abgebildet. Beide Messungen wurden mit Proben durchgeführt, die nach der Fällung in einem Puffer mit pH-Wert 5 gelöst wurden und eine Proteinkonzentration von 0,15 g/L besaßen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Speichermodule bei beiden untersuchten Temperaturen über den Verlustmodulen liegen und somit eine Gelbildung nachgewiesen werden kann. Obwohl die Gelbildung bei einer Temperatur von 5 °C zu deutlich höheren Werten führte, sind beide untersuchten Gele schwach ausgebildet. Die maximal erreichten Werte liegen für die Probe bei 5 °C nach 234 min bei 10,6 Pa und für die Probe bei 20 °C nach 186 min bei 4,16 Pa. Im Gegensatz dazu war mit einer gleichkonzentrierten Gelatinelösung aus kommerziell erhältlichem Protein keine Gelbildung möglich, was einen Hinweis auf eine bessere Vernetzung des rekombinanten Proteins liefert.

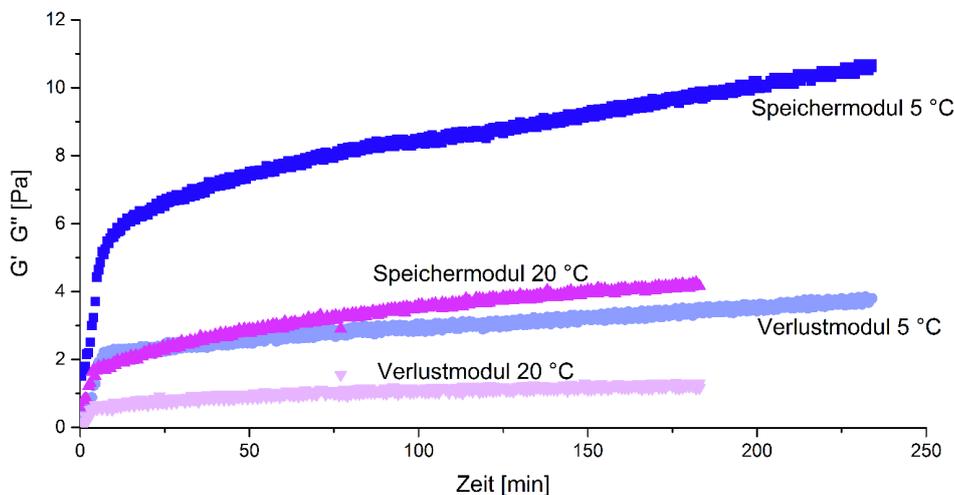


Abbildung 5.20 Darstellung der Rheologieergebnisse bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Puffer mit pH = 5.

Um den Einfluss des pH-Wertes zu untersuchen wurden außerdem Messungen mit Proben gemacht, die nach der Fällung in Puffern mit pH-Werten von 3 und 7 gelöst

wurden. Die Rheologiedaten aus der Messung mit pH 3 sind in Abbildung 5.21 dargestellt. Die Proteinkonzentration dieser Probe liegt bei 0,13 g/L. In dieser Messung ist ebenfalls eine deutliche Gelbildung zu erkennen. Die Gele sind etwas stabiler als die Gele bei einem pH-Wert von 5 und erreichen nach 139 min bei 5 °C einen Wert von 17 Pa bzw. nach 160 min bei 20 °C einen Wert von 8,32 Pa. Die Probe mit einem pH-Wert von 7 und einer Proteinkonzentration von 0,16 g/L führte zu keiner Gelbildung.

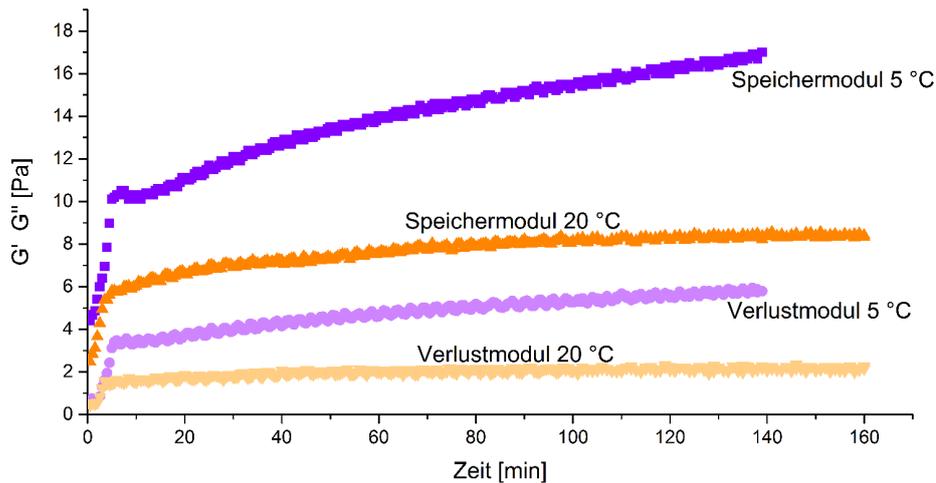


Abbildung 5.21 Darstellung der Rheologieergebnisse bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Puffer mit pH = 3.

Da die Kurven des Speichermoduls keinen konstanten Wert erreicht haben, wurde ein Langzeitversuch über 7 h durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine stationäre Phase der Gelbildung erreicht werden kann. Für diese Messung wurde erneut die Probe mit pH 3 ausgewählt und bei 20 °C untersucht. Wie in Abbildung 5.22 zu erkennen ist, wird auch nach 7 h keine stationäre Phase der Gelbildung erreicht. Das Speichermodul G' steigt weiter an und erreicht zum Ende der Messung (420 min) einen Wert von 9,76 Pa. Im Vergleich zu dem Wert von 8,32 Pa nach 160 min ist zwar eine Steigerung erkennbar, allerdings verändert sich die Gelstärke in dem Messzeitraum nicht signifikant.

Eine zusätzliche Messung bei 37 °C ergab ebenfalls eine Vernetzung der Proteine, allerdings resultierte die erhöhte Temperatur lediglich in einem Speichermodul von 2,8 Pa. Um für den Einsatz in medizinischen Zwecken geeignet zu sein, muss die Stabilität des Proteingels bei physiologischen Temperaturen verbessert werden.

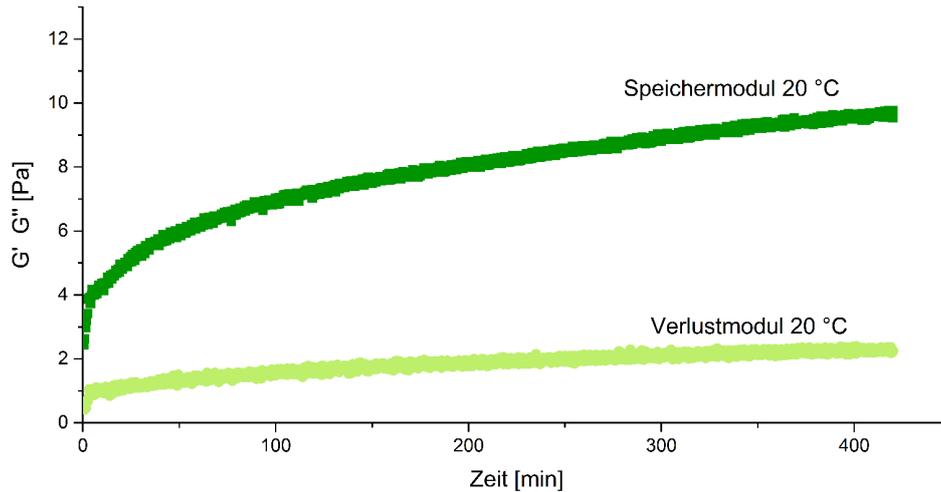


Abbildung 5.22 Darstellung der 7 h Rheologiemessung bei 20 °C in einem Puffer mit pH = 3.

Generell wurde mit den rheologischen Versuchen nachgewiesen, dass das CMP nach Lösung in einem geeigneten Puffer zur Gelbildung in der Lage ist. Jedoch sind die Gele unter den getesteten Bedingungen sehr schwach im Vergleich zu kommerziell erhältlichem Hydrogel und außerdem war in diesen Versuchen keine Gelbildung bei einem physiologischen pH-Wert möglich. Diese Nachteile können durch Veränderung der Polymerstruktur, beispielsweise durch Einbringen weiterer Polymere oder durch chemische Vernetzungen, ausgeglichen werden [78].

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein ausgewähltes Kollagen-ähnliches Protein mithilfe eines passenden Expressionsvektors in einen *Pichia-pastoris*-Stamm integriert und anschließend ein produzierender Stamm selektiert. Dieser wurde über verschiedene Parameter zunächst in Schüttelkolben-, darauf folgend ebenfalls in Reaktorkultivierungen hinsichtlich der Proteinproduktion optimiert. Mithilfe verschiedener Methoden wurde versucht, das produzierte Protein zu isolieren und abschließend wurde es auf unterschiedliche Weisen charakterisiert.

Auswahl des Gens und molekularbiologische Arbeiten

Zu Beginn der Arbeit wurde über eine Betrachtung der medizinischen Anwendungen verschiedener Kollagentypen Kollagen I als Basis für die Entwicklung des Zielproteins ausgewählt. Um die Klonierungsarbeiten zu vereinfachen, wurde ein Konstrukt verwendet, das aus einem Abschnitt des humanen Kollagen I sowie zwei endständigen Domänen aus ProGlyPro-Wiederholungen besteht. Das Mittelstück ist eine 400 Aminosäuren umfassende Sequenz und stammt aus der α -1-Kette von humanem Kollagen I. Über die PGP-Domänen kann eine Helixbildung stattfinden und somit eine Vernetzung der unterschiedlichen Moleküle erreicht werden.

Die Basenabfolge für dieses Protein wurde erfolgreich in einen Expressionsvektor und anschließend über Elektroporation in die Hefezellen eingebracht. Da der Expressionsvektor außerdem die Sequenz des α -mating-factor-Sekretionssignals enthält, wurde eine sekretorische Produktion des CMPs erwartet. Durch die Sekretion wird die Isolierung des

Zielproteins erleichtert, da *P. pastoris* kaum endogene Proteine sekretiert. Somit ist außerdem eine Überprüfung der produzierten Proteinmenge im Überstand mittels BCA-Assay möglich. Nachteil der Proteinbestimmung mittels BCA-Assay ist die zusätzliche Detektion endogener Proteine, wenn es zu einer Zellyse während der Kultivierung kommt.

Kultivierung und Proteinproduktion

Nach der Selektion positiver Stämme wurde eine Auswahl im Schüttelkolben kultiviert, um einen produzierenden Stamm zu identifizieren. Dabei zeigten sich bei einem der Stämme gut erkennbare Proteinbanden bei der Analyse per SDS-PAGE, sodass dieser für weitere Kultivierungen ausgewählt wurde. In weiteren Kultivierung zur Identifizierung des Zielproteins zeigte sich, dass nicht nur eine Proteingröße produziert wurde, sondern dass ein wiederkehrendes Bandenmuster beobachtet werden konnte. Mittels Western Blot Analyse konnte jedoch nur die Proteinbande mit dem höchsten Molekulargewicht (75 kDa) dem Zielprotein zugeordnet werden. Die folgenden Schüttelkolbenkultivierungen zur Optimierung der Kultivierungsparameter ergaben, dass die Standardparameter 30 °C und 0,5 % Methanol zum besten Zellwachstum und der höchsten Proteinproduktion führten. Anschließend wurde die Kultivierung in einen 2 L-Bioreaktor übertragen, um eine höhere Proteinausbeute zu ermöglichen.

Ein Gegenstand weiterer Untersuchungen war die Art der Methanolzugabe im Bioreaktor, die laut Vorgaben mit festgelegten Pumpraten durchgeführt wird. Nachteile dieser Methode sind die unspezifische Methanolversorgung ohne Regelung nach Bedarf und die Analytik mittels offline-Methoden, die zu einer langen Reaktionszeit führt. Andere Möglichkeiten liefert der Einsatz eines Methanolsensors, der zum einen zur Beobachtung der Methanolkonzentration eingesetzt werden und zum anderen über einen Feedback-Loop die Regelung des Methanolfeeds übernehmen kann.

Zur Untersuchung der Methanolversorgung wurden die zwei verschiedenen Systeme zur Methanolzugabe getestet und die Proteinproduktion verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Regelung mithilfe eines Feedback-Loops des Methanolsensors zu einer gleichmäßigen Proteinproduktion führte und bei diesen Kultivierungen eine höhere

Biotrockenmasse und Produktivität erreicht wurden. Das bereits nach den Schüttelkolbenkultivierungen beobachtete Proteinbandenmuster wurde nach den Reaktorkultivierungen ebenfalls beobachtet, sodass die Identität und Ursache der verschiedenen Proteingrößen mithilfe weitere Analysen untersucht wurde.

Isolierung und Charakterisierung

Nach der erfolgreichen Produktion des CMPs wurde untersucht, warum die unterschiedlichen Proteingrößen auftraten und wie sie sich voneinander trennen lassen. Da sich die niedrigmolekularen Proteine nicht durch Proteolyse-inhibierende Maßnahmen während der Kultivierung verhindern ließen, wurden anschließend analytische Methoden verwendet.

Verschiedene Fällungen sowie unterschiedliche Chromatographieprozesse wurden zur Trennung der Proteingrößen eingesetzt, zeigten jedoch keine Isolierung des Hauptproteins bei 75 kDa von den anderen Proteingrößen. Da sich die Proteine nicht aufgrund ihrer Eigenschaften voneinander trennen ließen, wurde für eine abschließende Identifikation der Proteinbanden Massenspektrometrieuntersuchungen mit drei Proben des Bandenmusters durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass es sich bei allen beobachteten Proteinbanden um das Zielprotein handelt. Allerdings konnten die Größenunterschiede der Proteine mit der MS-Untersuchung nicht geklärt werden, da keine Unterschiede im Zielprotein der verschiedenen Banden ermittelt werden konnten. Die zu Beginn der Arbeit durchgeführte Western Blot Analyse zeigte nur die Proteinbande bei etwa 75 kDa als CMP. Da es sich dabei um die stärkste Proteinbande handelt, war die Intensität der anderen Banden möglicherweise zu gering, um detektiert zu werden.

Um die Hypothese zu untersuchen, ob die diversen Proteingrößen auf helikalen Wechselwirkungen der einzelnen Moleküle untereinander beruhen, wurde ein Versuch zur Aufspaltung der verschiedenen Zusammenlagerungen gemacht. Das Ergebnis kann die Hypothese jedoch nicht bestätigen. Auch ein Versuch zum thermischen Abbau des Proteins bei Inkubation im SDS-Probenpuffer zeigte keine Unterschiede und somit keinen Einfluss der Temperatur auf die Proteingrößen.

Um eine weitere Ursache der verschiedenen Molekulargewichte in den SDS-PAGE-Analysen zu klären, wurde das Protein auf Glykosylierungen untersucht, da diese das Molekulargewicht beeinflussen können. Das Ergebnis des Glykosidasetests zeigte, dass das Protein keine N-glykosidischen Bindungen besitzt und die Größenunterschiede somit nicht darauf zurück zu führen sind.

Zuletzt wurden rheologische Untersuchungen mit dem Protein durchgeführt, um die Gelbildungseigenschaften zu untersuchen. Hier zeigte sich, dass das Protein schwache Gelstrukturen bilden kann, die Temperatur- und pH-Wert-abhängig sind.

In Tabelle 6.1 sind die bisher untersuchten und bekannten Eigenschaften des CMPs dargestellt. Weitere Aspekte, die bisher nicht abschließend geklärt werden konnten, sind die Ursache der verschiedenen Proteinbanden in den SDS-Gelen sowie die Differenz zwischen dem theoretischen sowie dem beobachteten Molekulargewicht.

Tabelle 6.1 Datenblatt zu CMP

theoretisches Molekulargewicht	39,4 kDa
beobachtetes Molekulargewicht	75 kDa, MS-bestätigt: CMP 65 kDa, MS-bestätigt: CMP 37-50 kDa, MS-bestätigt: CMP
theoretischer pI*	7,03
bindender Antikörper	Anti-Kollagen I (Acris Antibodies Nr. R1038)
SEC	1 Peak bei >70 kDa
N-Glykosylierungen	-
Gelbildung	+

* berechnet mit ExPASy ProtParam Tool unter web.expasy.org/protparam

6.1 Ausblick

Das Hauptziel der Arbeit, die Produktion des Kollagen-mimetischen Proteins konnte erreicht werden. Die Kultivierung liefert eine Ausbeute im Bereich von ca. 17 g/L, wenn die ermittelten Kultivierungsparameter verwendet werden. Im Vergleich dazu liegen andere rekombinante Proteinproduktionen in *P. pastoris* häufig in einem Bereich zwischen 2 g/l und 6 g/l [52, 105]. Einige Ausnahmen erreichen eine Konzentration von 19 g/l [28] und 22 g/l [31].

Da das CMP während der Analytik in drei verschiedenen Proteingrößen auftrat, sollten weitere Untersuchungen zur Ursache der Entstehung gemacht werden. Obwohl der Test zur Zusammenlagerung der Proteine keine Aufspaltung nachweisen konnte, ist nicht auszuschließen, dass es Wechselwirkungen der Proteine gibt. Eine weitere Untersuchung dieser Wechselwirkungen könnte durch eine native und eine semi-native PAGE erreicht werden. Zudem könnte eine SEC mit reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob dann mehrere Peaks detektiert werden können.

Der isoelektrische Punkt des Proteins wurde in dieser Arbeit theoretisch berechnet und anschließend verwendet. Für eine bessere Bestimmung der Eigenschaften in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten ist eine experimentelle Bestimmung des isoelektrischen Punktes CMPs sinnvoll. Somit könnte anschließend eine verbesserte Durchführung von Chromatographiemethoden erreicht werden.

Des Weiteren sollte die Gelbildung des CMPs für praktische Anwendungen im Tissue Engineering gestärkt werden. Dies ist über verschiedene Vernetzungen mit anderen natürlichen oder synthetischen Polymeren möglich. Als natürliche Kopolymere bieten sich z. B. Fibrin, Hyaluronsäure oder Chitosan an. Mit allen drei wurden bereits Kollagenetzwerke gebildet [74, 85, 102]. Natürliche Komponenten sind dann vorteilhaft, wenn die Biokompatibilität erhalten bleiben soll oder weitere Proteinbindesequenzen eingebracht werden sollen. Da diese häufig ebenfalls schwache Gelstrukturen bilden, kann auf synthetische Polymere für die Vernetzung zurückgegriffen werden. Diese bieten regulierbare mechanische Eigenschaften und können je nach Material zusätzliche Vorteile wie eine antibakterielle Wirkung in das Gel einbringen. Als Kopolymere synthetischen Ursprungs

kommen beispielsweise Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylalkohol (PVA), *carbon nanotubes* (CNT) oder funktionalisierte Silbernanopartikel in Frage. Diese wurden ebenfalls erfolgreich in biohybride Gele eingebunden [13, 54, 55, 70].

Um die Ausbildung der helikalen Strukturen zu untersuchen, können verschiedene Analysen wie z. B. dynamische Differenzkalorimetrie eingesetzt werden. Dies ist notwendig, da die Vernetzungen des CMPs durch die Helixbildung der PGP-Domänen nur möglich ist, wenn diese nicht bereits durch Zusammenlagerungen in Wechselwirkungen eingebunden sind. Für die Untersuchung eines CMP-Gels können Rasterelektronenmikroskopaufnahmen gemacht werden, um beispielsweise die Porengröße des Gels zu bestimmen.

In einem Versuch mit tierischen Zellen kann das CMP auf seine Biokompatibilität getestet werden. Dies kann zunächst durch eine Inkubation des Proteins in Zellkulturmedium und dem anschließenden Übertrag des Mediums auf tierische Zellen geschehen. Für die Untersuchung, ob die Zellen an das Material binden können, kann die Oberfläche eines Zellkulturgefäßes beschichtet und anschließend mit Zellen besiedelt werden. In einem Vergleich mit einem Zellkulturgefäß, das mit einem anderen biokompatiblen Protein wie beispielsweise Alginate beschichtet ist, kann die Zellanhaftung an das Protein untersucht werden. Abschließend können Zellen bei der Gelierung des CMPs mit ins Gel eingeschlossen werden, um zu untersuchen, ob das Protein als Basis für 3D-Kultursysteme geeignet ist.

Nach den beschriebenen Untersuchungen ist eine medizinischen Anwendungen des produzierten Proteins möglich. Als biokompatibles, modellierbares Biomaterial eignet es sich zur Verwendung in personalisierten Implantaten, um die Einheilung ins Gewebe zu verbessern und damit die Wahrscheinlichkeit für Wechseleingriffe zu senken.

A Materialien

A.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
FPLC-Säule HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare Life Science, Uppsala, SE
Kanülen Sterican	B. Braun, Melsungen, DE
Kimtech Science Kimwipes	Kimberly-Clark Professional, Roswell, GA
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotiterplatten 96 Well	Brand, Wertheim, DE
Petrischalen	Greiner Bio One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, DE
PVDF Immun-Blot-Membran	Bio-Rad, München, DE
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Skalpell	B. Braun Melsungen, Melsungen, DE
Spritzen Norm-Ject	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, DE
Spritzenvorsatzfilter Minisart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Western Blot Filterpapier	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA
ZelluTrans Dialysiermembran, Cut-off 6.000-8.000 Da	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Zentrifugengefäße, 15 ml, 50 ml	Corning Inc., Corning, NY

A.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Karl-Josef Kost, Koblenz, DE
Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ammoniak	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ammoniumsulfat $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
APS	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Biotin	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Borsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Fluka, Buchs, CH
Calciumsulfat-2-hydrat	Riedel-de-Haen GmbH, Seelze, DE
Coomassie G250	Serva, Heidelberg, DE
Dextrose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Formaldehyd	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Geneticin [®]	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Isopropanol	Karl-Josef Kost, Koblenz, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Kaliumhexacyanoferrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Kaliumsulfat	Fluka, Buchs, CH

Fortsetzung auf nächster Seite

Materialien

Chemikalien	Hersteller
Kanamycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
β -Mercaptopethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Methanol $\geq 99\%$	VWR Chemicals, Darmstadt, DE
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumhexametaphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Natriumthiosulfat	Fluka, Buchs, CH
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
ortho-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Roti Safe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Silberniträt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Trypton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
YNB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Zinkchlorid	Fluka, Buchs, CH

A.3 Puffer, Lösungen, Medien

Lösung	Inhaltsstoffe
Chromatographiepuffer A	10 mM Natriumphosphat, 1 M Natriumchlorid, pH 5
Chromatographiepuffer B	10 mM Natriumphosphat, 1 M Natriumchlorid, pH 7
Chromatographiepuffer C	10 mM Natriumphosphat, 1 M Natriumchlorid, pH 8
Chromatographiepuffer D	10 mM Natriumphosphat, 3 M Natriumchlorid, pH 7
Chromatographiepuffer E	10 mM Natriumphosphat, 1 M Natriumsulfat, pH 7
Elutionspuffer SDS-Gel	40 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5
Essigsäurelösung	5 % Essigsäure
<i>Farmers Reducer</i>	0,01 % $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 % $Na_2S_2O_3$
Fixierer/Entfärber	45 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Formaldehydlösung	0,3 % Formaldehyd in Na_2CO_3 -Lösung
Natriumcarbonatlösung	2,5 % Na_2CO_3
SDS-Probenpuffer	20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5 % SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 10 % Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau
Silberlösung	0,01 % Silbernitrat
TAE Puffer	40 mM TRIS, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, pH 8,5
TGS Puffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
Western Blot Transferpuffer	25 mM TRIS, 200 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,1 % SDS
Zellysepuffer	50 mM Natriumphosphat pH 7,4, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 % Glycerol

Materialien

Gellösungen	Komponenten
Polyacrylamid-Sammelgel (6%)	750 µl 40% Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 300 µl 1% SDS, 630 µl TRIS-HCl (pH 6,8), 3,77 ml ddH ₂ O, 10 µl TEMED, 10 µl 25% APS, 11 µl 1% Bromphenolblau
Polyacrylamid-Trenngel (10%)	1,25 ml 40% Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,5 ml 1% SDS, 1,4 ml TRIS-HCl (pH 8,8), 1,85 ml ddH ₂ O, 10 µl TEMED, 10 µl 25% APS
Agarosegel (1,5%)	1,5 g in TAE-Puffer

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium ^a	1 % Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 0,12 % Antibiotika
MD-Medium ^a	1,34 % YNB, 4 % Biotin, 2 % Dextrose
MM-Medium ^a	1,34 % YNB, 4 % Biotin, 0,5 % Methanol
BMG	2,12 % Kaliumphosphat, 1,34 % YNB, 4 % Biotin, 1 % Glycerol
BMM	2,12 % Kaliumphosphat, 1,34 % YNB, 4 % Biotin, 0,5 % Methanol
BMGY	2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 2,12 % Kaliumphosphat, 1,34 % YNB, 4 % Biotin, 1 % Glycerol
BMMY	2 % Pepton, 1 % Hefeextrakt, 2,12 % Kaliumphosphat, 1,34 % YNB, 4 % Biotin, 0,5 % Methanol
Zhang	2,5 % Natriumhexametaphosphat, 0,093 % Calciumsulfat, 1,82 % Kaliumsulfat, 1,49 % Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,9 % Ammoniumsulfat, 4 % Glycerol, 0,435 % PTM ₁
Gurramkonda	9,52 % Glycerol, 0,94 % Kaliumdigydrogenphosphat, 0,456 % YTM, 1,57 % Ammoniumsulfat, 0,46 % Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,028 % Calciumchlorid-Dihydrat, 0,000 04 % Biotin
Stratton	2,67 % Phosphorsäure (85 %), 0,093 % Calciumsulfat-Dihydrat, 1,82 % Kaliumsulfat, 1,49 % Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,413 % Kaliumhydroxid, 4 % Glycerol, Ammoniak (pH-Regulierung)

^a = für Agarplatten zusätzlich 1,5 % Agar

A.4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelkammer Advance Mupid One	TaKaRa, Kusatsu, JP
Fotometer WPA Biowave CO 8000	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
FPLC-System ÄktaPure	GE Healthcare Life Science, Uppsala, SE
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, DE

Fortsetzung auf nächster Seite

Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Kontrolleinheit Biostat B	B. Braun Biotech International, Melsungen, DE
Magnetrührer Ikamag RCT	Ika, Staufen, DE
Methanolsensor	Raven Biotech Inc., Vancouver, CA
Microplate-Reader Multiskan Go	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Peristaltikpumpe Reglo ICC	Ismatec, Wertheim, DE
pH-Meter HI 221	HANNA Instruments, Vöhringen, DE
Proteingelstation Mini PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, München, DE
Reinstwasseranlage arium pro VF	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments, Garbsen, DE
Scanner Perfection V750 Pro	Epson, Suwa, JP
Schüttelinkubator Certomat BS1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Sterilwerkbank HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermocycler Doppio	VWR International, Darmstadt, DE
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, DE
Western Blot TransBlot SD Cell	Bio-Rad, München, DE
Zentrifuge Micro Star 17 R	VWR International, Darmstadt, DE
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Zentrifuge Heraeus Multifuge X5 FR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Zentrifugenrotor Fiberlite F15-8×50cy	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Zentrifugenrotor TX-750	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA

A.5 Reaktionskits und Biomoleküle

Reaktionskits	Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
QIASpin Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, DE
WesternBreeze Chromogenic Immunodetektion Kit, Rabbit	Life Technologies, Carlsbad, CA

Biomoleküle	Hersteller
Anti-Kollagen I Antikörper, Kaninchen, polyklonal, # R1038	Acris Antibodies, Herford, DE
DNA-Polymerase KAPA2G	Kapa Biosystems, Wilmington, MA
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Kollagen I, human, # sc-136154	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX
PNGase F	New England Biolabs, Frankfurt a.M., DE
Precision Plus Protein Standard, dual color/ unstained	Bio-Rad, München, DE
Restriktionsenzym EcoRI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Restriktionsenzym NotI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Restriktionsenzym Sall	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
RNase B	New England Biolabs, Frankfurt a.M., DE

B Methoden

B.1 Molekularbiologische Methoden

B.1.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die chemisch kompetenten *E. coli*-TOP10-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 μ L Plasmid-DNA versetzt. Nach dem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis und dann für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 5 min wurden 900 μ L SOC-Medium (*Super optimal broth with Catabolite repression*) steril hinzugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37 °C horizontal schüttelnd bei 225 rpm inkubiert. Auf vorgewärmte LB-Platten mit Kanamycin wurde der Transformationsansatz in unterschiedlichen Verdünnungen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

B.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Nach Kultivierung der Zellen wurde die Plasmid-DNA mittels QIAprep[®] Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt.

B.1.3 Restriktionsverdau

Der gerichtete Einbau des Gens TcolT in den Expressionsvektor pPIC9K wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI in einer *sticky end*-Klonierung durchgeführt. Dafür wurden in zwei Ansätzen jeweils ca. 1 μ g Plasmid DNA bzw. Gen-Template mit 2 μ L 10 \times FastDigest[®] Puffer, und jeweils 1 μ L von jedem Restriktionsenzyme versetzt und

anschließend auf 20 μ L mit Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 20 min und wurde anschließend durch Hitzedeaktivierung für 5 min bei 80 °C gestoppt.

B.1.4 Ligation

Die Ligation wurde mit dem Vektor und dem Gen-Template in einem Verhältnis von 1:5 durchgeführt. Dafür wurden zu Gen- und Plasmid DNA 2 μ L 10 \times T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 μ L T4-DNA-Ligase hinzugefügt und der Ansatz auf 20 μ L aufgefüllt. Daraufhin wurde die Ligationsreaktion für 10 min bei 16 °C inkubiert.

B.1.5 Kolonie-PCR

Um den Einbau des Zielgens in die *P. pastoris*-Zellen zu überprüfen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurde die zu untersuchende Kolonie steril von der Medienplatte gepickt und in 12 μ L gelöst.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	35
Anlagerung	58 °C	15 s	35
Verlängerung	72 °C	2,5 min	35
Schlussverlängerung	72 °C	7 min	1
Lagerung	4 °C	unendlich	1

B.2 Proteinexpression

B.2.1 Anlegen von Cryo-Kulturen

50 mL YPD-Medium wurden in einem 500 mL-Schüttelkolben mit Schikanen mit *P. pastoris*-Zellen angeimpft und für ca. 16 h bei 30 °C und 150 rpm kultiviert. Sobald die OD₆₀₀ einen

Wert von 10-14 erreichte, wurden die Zellen in 50 mL-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (5 min, $2000 \times g$) und in YPD mit 15 % Glycerin auf eine OD_{600} von 50 resuspendiert. Anschließend wurden 0,5 mL- und 1 mL-Aliquots in 2 mL-Cryo-Gefäße gegeben, und bei -80°C eingefroren.

B.2.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Für die Vorkultur wurde ein steriler 500 ml-Kolben mit 50 ml sterilem Medium gefüllt und mit einer Cryo-Kultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 30°C und 150 rpm kultiviert und am nächsten Tag genutzt, um eine 50 ml-Hauptkultur in Methanol-haltigem Medium auf eine $OD_{600} = 1$ anzuimpfen. Dafür wurden die Zellen der Vorkultur per Zentrifugation (5 min, $2000 \times g$) vom Glycerol-haltigen Medium getrennt, um eine reine Kohlenstoffversorgung über Methanol zu gewährleisten. Die Hauptkultur wurde über 3 Tage bei gleichen Bedingungen wie die Vorkultur inkubiert. Zweimal täglich wurde zusätzlich Methanol in einer Endkonzentration von 0,5 % zugegeben, um eine ununterbrochene Induktion und Kohlenstoffversorgung sicher zu stellen. Vor jeder Methanolzugabe wurden 3 ml Probe für die Analyse der optischen Dichte sowie der Proteinkonzentration entnommen. Zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße wurden mit je 1 ml Probe befüllt, zentrifugiert (5 min bei $13\,000 \times g$) und Zellpellet und Medienüberstände separat bei -20°C bis zur weiteren Analytik gelagert. Nach Beenden der Inkubation wurde die Kultivierungsbrühe für 20 min bei $4500 \times g$ zentrifugiert und Zellpellet und Medienüberstand separat bei -20°C gelagert.

B.2.3 Kultivierung im Bioreaktor

In einem 500 ml-Kolben wurden 100 ml Vorkulturmedium mit einer Cryo-Kultur angeimpft und über Nacht bei 30°C und 150 rpm kultiviert. Ein 2 L-Edelstahl-Bioreaktor wurde mit einer pH-Sonde (EasyFerm Plus K8 200, Hamilton), einer pO_2 -Sonde (InPro6820, Mettler-Toledo), einem Temperaturfühler sowie einem Methanolsensor (Methanol Sensor System, Raven) bestückt und mit 1 L Fermentationsmedium befüllt. Außerdem wurde ein Biostat B (Braun) zur Prozessüberwachung sowie eine peristaltische Pumpe (Ismatec)

für die Methanolzugabe angeschlossen. An den Methanolsensor wurde ein Ein-Platinen-Computer zur Verarbeitung der Messdaten sowie zur Steuerung der Pumpe angeschlossen.

Der Methanolsensor wurde vor der Kultivierung mit Methanol im Fermentationsmedium kalibriert. Dafür wurden verschiedene Messpunkte zwischen 0 und Nach Erreichen einer OD_{600} von mindestens 10 in der Vorkultur wurde der Reaktor auf eine OD_{600} von 1 angeimpft. Die Parameter der Kultivierung wurden auf 30 °C, 30 % DO (*dissolved oxygen*)-Sättigung und eine Gasflussrate von 2 ml/min eingestellt. Die Regulierung der Sauerstoffsättigung erfolgte über das Kaskadenrührsystem des Biostaten sowie über die Zugabe von reinem Sauerstoff nach Bedarf. Einige Parameter wurden bei den Kultivierungen verändert: der pH-Wert war in einigen Kultivierungen auf pH 3, in anderen auf pH 5 eingestellt. Außerdem wurde in manchen Kultivierungen 1 % Caseinhydrolysat zur Proteaseninhibierung zugegeben. Nach einer Batchphase zur Verstoffwechslung des zugegebenen Glycerols wurde nach komplettem Verbrauch der Kohlenstoffquelle (ca. 72 h) eine Fed-batch-Phase mit Methanol gestartet. Dazu wurden entweder feste Pumpraten an der Pumpe eingestellt (4-5 Stunden 3,6 mL/h, 2 Stunden 7,3 mL/h, restliche Kultivierungszeit 10,9 mL/h) oder das Feedback-System des Methanolsensor für festgelegte Methanolkonzentrationen im Reaktor genutzt. Die Kultivierung endete nach 160-170 h oder wenn das Maximum des Reaktorvolumens erreicht wurde.

Zwei mal täglich wurden 9 ml Probe für die Analyse der optischen Dichte, Biofeucht- und Biotrockenmasse sowie der Proteinkonzentration entnommen. Drei vorgewogene 2 mL-Reaktionsgefäße wurden mit je 2 mL Probe befüllt, zentrifugiert (5 min bei 13 000 × g), nach Verwerfen des Überstandes gewogen und anschließend für mind. 48 h bei 70 °C getrocknet, bevor sie erneut gewogen wurden. Zwei 1,5 mL-Reaktionsgefäße wurden mit je 1 ml Probe befüllt, zentrifugiert (5 min bei 13 000 × g) und Zellpellet und Medienüberstände separat bei -20 °C bis zur weiteren Analytik gelagert.

B.2.4 Methanol-Sensor Setup

Die Messeinheit des Sensors wurde über einen 25 mm-Port in den Bioreaktor integriert und die Luftschläuche an den Methanolsensor angeschlossen. Die Luftversorgung wurde

ebenfalls an den Sensor angeschlossen. Der Einplatinen-Computer wurde über serielle RS232-Schnittstellen mit dem Sensor und der peristaltischen Pumpe verbunden. Die Kontrollsoftware für die Eingabe der Sollwerte wurde auf einem Desktop Computer installiert, der an das gleiche Netzwerk wie der Einplatinen-Computer angeschlossen war.

B.3 Proteinanalytik

B.3.1 Proteinassay

Um den Proteingehalt der Proben zu bestimmen, wurde ein BCA-Assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Referenz wurde natives Kollagen I aus humaner Placenta (Nr. sc-136154, Santa Cruz Biotech) verwendet.

B.3.2 SDS-PAGE

Die Probenüberstände wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, um die Proteinzusammensetzung der Probe untersuchen zu können. Die Zusammensetzung der Gele ist in Abschnitt A.3 aufgelistet. Die Medienüberstände wurden zu gleichen Teilen mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Nach kurzer Abkühlungszeit wurden die Proben neben einem molekularen Größenstandard in die verschiedenen Taschen des Gels gegeben und die Gelelektrophorese zunächst mit 100 V, nach Durchlaufen des Sammelgels mit 150 V durchgeführt. Der Gellauf wurde beendet, wenn die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hat. Anschließend wurden die Proteine entweder über eine Commassie-Färbung oder eine Silberfärbung sichtbar gemacht, oder es wurde ein Western Blot für eine Antikörperbehandlung durchgeführt.

B.3.3 Coomassie-Färbung

Um die Proteinbanden in dem SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und anschließend schwenkend über Nacht in der Coomassie-Färbelösung (367 mL ddH₂O, 48 mL 85 % Phosphorsäure, 40,8 g Ammoniumsulfat, 490 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 82 mL Methanol) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung abgossen und das Gel solange in ddH₂O geschwenkt, bis der Hintergrund des Gels entfärbt war. Anschließend konnte das Gel mittels Flachbettscanner dokumentiert werden.

B.3.4 Silberfärbung

Um eine sensitivere Anfärbung der Proteinbanden zu erreichen, kann eine Silberfärbung durchgeführt werden. Dafür werden Silberionen an die Seitenketten der Proteine gebunden, die anschließend zu elementarem Silber reduziert werden um die Banden sichtbar machen. Zu Beginn wurde das Gel für 20 min in Entfärber- bzw. Fixierlösung inkubiert und danach zweimal kurz mit ddH₂O gespült. Dann wurde es für 2,5 min in *Farmers Reducer* geschwenkt und danach bis zur Entfärbung des Gels mit ddH₂O gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation in der Silberlösung für 30 min, auf die wiederum zwei kurze Waschschriffe (30 s) in ddH₂O folgten. Nach einem kurzen Schwenken in Na₂CO₃-Lösung wurde die Entwicklung der Banden durch Zugabe der Formaldehydlösung gestartet. Sobald deutliche Banden sichtbar wurden, wurde die Färbung des Gels durch die Zugabe von Essigsäurelösung gestoppt. Anschließend konnte das Gel mittels Flachbettscanner dokumentiert werden.

B.3.5 Western Blot

Für eine Antikörperdetektion der Proteinbanden wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei werden die Proteinbanden aus einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen, die

dann der weiteren Analytik dient. Dafür wurde eine PVDF-Membran sowie zwei Blotpapiere auf die Größe des Gels zugeschnitten. Nach 5 min Aktivierung der Membran in Methanol folgt eine 10 min Inkubation in Transferpuffer. Die Blotpapiere werden ebenfalls in Transferpuffer getränkt und anschließend in der Reihenfolge Blotpapier-Membran-Gel-Blotpapier (v. u.) auf die Blotapparatur gelegt. Bei 15 V werden die Proteine über 45 min von dem Gel auf die Membran übertragen. Danach werden die Kollagenbanden mit dem WesternBreeze Immunodetektion Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben und einem Kollagen-I-spezifischem Antikörper (Acris Antibodies, Nr. R1038) selektiv angefärbt.

B.4 Proteinisolierung und -charakterisierung

B.4.1 Proteinfällung

TCA-Fällung

Für eine undifferenzierte Fällung aller Proteine aus den Überständen der Kultivierungsproben wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Dazu wurden auf je 1 mL Überstand 250 μ L 8 M TCA-Lösung gegeben. Nach einer Inkubation für 10 min bei 4 °C wurden die Reaktionsgefäße bei 4 °C für 5 min bei 13 300 \times g zentrifugiert, um die ausgefallenen Proteine vom Kulturüberstand zu trennen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Proteinpellet mit 200 μ L eiskaltem Aceton gewaschen und erneut bei gleichen Bedingungen durch Zentrifugation von Aceton getrennt. Dieser Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und nach Verwerfen des Acetons das Reaktionsgefäß offen trocknen gelassen, um nicht erreichte Acetonreste verdunsten zu lassen. Das getrocknete Proteinpellet wurde für weitere Analytik eingefroren oder für eine SDS-PAGE mit Probenpuffer versetzt.

Aceton-Fällung

Zur Proteinlösung wurde das vierfache Volumen eiskaltes Aceton gegeben und die Mischung für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach einer Trennung per Zentrifugation (10 min bei

4 °C und 13 000 ×g) wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet mit 1 mL eiskaltem 80 % Aceton gewaschen und die Proteine erneut in der Zentrifuge vom Überstand getrennt. Nach einem erneuten Waschschriff und einer wiederholten Zentrifugation wurde das Proteinpellet luftgetrocknet und anschließend in gewünschtem Puffer gelöst.

Differenzierte Aceton-Fällung

Zur Proteinlösung wurde eiskaltes Aceton bis zu einer Konzentration von 40 % gegeben und die Mischung für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach einer Trennung per Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 13 000 ×g) wurde das Pellet verworfen und zum Überstand wurde eiskaltes Aceton bis 80 % aufgefüllt und die Proteine erneut in der Zentrifuge vom Überstand getrennt. Anschließend wurde das Proteinpellet mit eiskaltem 80 % Aceton gewaschen und die Proteine erneut in der Zentrifuge vom Überstand getrennt. Dann wurde das Proteinpellet luftgetrocknet und anschließend in gewünschtem Puffer gelöst.

Ammoniumsulfat-Aceton-Fällung

Der zellfreie Überstand wurde für 30 min auf 45 °C erhitzt, um mögliche Polymerisierungen des Zielproteins aufzulösen. Anschließend wurde Natriumhydroxid zugegeben, bis der pH-Wert 8 erreichte. Mit einer anschließenden Zentrifugation (30 min bei Raumtemperatur und 20 000 ×g) wurden die ausgefällten Mediensalze vom Medium abgetrennt und anschließend verworfen. Zum Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 40 % zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer folgenden Zentrifugation bei 4 °C und 20 000 ×g für 30 min wurde der Überstand zur Seite gestellt. Das Pellet wurde anschließend gelöst und 50 mM NaCl und 40 % Aceton zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 20 000 ×g für 30 min wurde das Pellet verworfen und der Überstand mit dem Überstand aus dem vorigen Schritt zusammen geführt. Anschließend wurde 80 % Aceton dazu gegeben und nach einer erneuten Zentrifugation (4 °C, 20 000 ×g und 30 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet luftgetrocknet, in gewünschtem Puffer gelöst und schließlich gegen ddH₂O dialysiert.

B.4.2 Chromatographie

Ionenaustauschchromatographie

Zur Vorbereitung auf die Chromatographie wurden einige Proben mittels Aceton- oder TCA-Fällung aufkonzentriert und anschließend in Laufpuffer gelöst. Die Chromatographiemembranen (Sartobind[®] S MA 75 und Sartobind[®] Q MA 75, Totvolumen 2,1 mL) wurden bei einer Flussrate von 1 mL/min mit 5 Säulenvolumen Laufpuffer äquibriert und anschließend bei gleicher Flussrate mit 5 mL Proteinlösung aus der Superloop beladen. Die Membran wurde mit 5 Säulenvolumen Laufpuffer gespült und das Protein anschließend mit einem steigenden Gradienten zwischen 0 % und 100 % Elutionspuffer über 20 Säulenvolumen eluiert. Im Anschluss wurde die Membran zum Waschen und zur Äquibrierung mit jeweils 5 Säulenvolumen Laufpuffer gespült.

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Zur Vorbereitung auf die Chromatographie wurden einige Proben mittels Aceton- oder TCA-Fällung aufkonzentriert und anschließend in Laufpuffer gelöst. Die Chromatographiesäule (HiTrap Phenyl FF, Totvolumen 0,962 mL) wurden bei einer Flussrate von 1 mL/min mit 5 Säulenvolumen Laufpuffer äquibriert und anschließend bei gleicher Flussrate mit 5 mL Proteinlösung aus der Superloop beladen. Die Membran wurde mit 5 Säulenvolumen Laufpuffer gespült und das Protein anschließend mit einem steigenden Gradienten zwischen 0 % und 100 % Elutionspuffer über 20 Säulenvolumen eluiert. Im Anschluss wurde die Membran zum Waschen und zur Äquibrierung mit jeweils 5 Säulenvolumen Laufpuffer gespült.

Größenausschlusschromatographie

Zur Vorbereitung auf die Chromatographie wurden einige Proben mittels Aceton- oder TCA-Fällung aufkonzentriert und anschließend in Laufpuffer gelöst. Die Chromatographiesäule (HiLoad 16/600 75 prep grade, Säulenvolumen 120,637 mL) wurden bei einer

Flussrate von 1 mL/min mit 30 mL Laufpuffer gewaschen und anschließend bei gleicher Flussrate mit 2 mL Proteinlösung aus der Capillary Loop beladen. Das Protein wurde isokratisch mit 180,96 mL Laufpuffer eluiert.

B.4.3 Glykosidasetest

Für die Reaktionsansätze wurde 1 μ L Proteinlösung mit 1 μ L 10 \times Glykoprotein Denaturierungspuffer und 8 μ L ddH₂O versetzt und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2 μ L 10 \times Glykopuffer 2, 2 μ L 10 % NP-40, 6 μ L ddH₂O sowie 1 μ L PNGase F zugesetzt und vorsichtig vermischt. Die Reaktion wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und zur Analyse per SDS-PAGE aufgetrennt.

B.4.4 Rheologie

Bei der Schwingungsrheometrie wird die Probe einer sinusförmigen Deformation ausgesetzt. Diese Messungen helfen unter anderem bei der Analyse des Gelierverhaltens von Proteinen. Die dialysierten Proteinproben werden für 30 min im Thermocycler auf 60 °C erhitzt. Anschließend werden 400 μ L der Probe in das Rheometer (Anton Paar MRC320 Rheometer mit einer Platte-Platte Messgeometrie) zwischen die beiden Messplatten appliziert und für weitere 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Größe des Messspaltes beträgt 1 mm. Nach der Inkubationszeit wird die Temperatur auf 5 °C, 15 °C bzw. 20 °C langsam abgesenkt, dann konstant gehalten, wodurch die Polymerisation eingeleitet wird. Eine Abdeckhaube minimiert die Probenverdunstung. Das Messintervall beträgt 30 s mit einer konstanten Frequenz von 1 Hz und 1 % Deformation.

C Weitere experimentelle Daten

Gensequenz des Kollagen-mimetischen Proteins

gaattccccgggtccgcctgggtccacctgggtccacctgggtccaccaggaccaccagggtccacctggaccaccggg
tcctcccgaccactagtagtactggttctccaggttctcctgggtccagatggtaaaactggacctccaggacctg
ctggacaagatggtagaccagggtcctccaggtccaccagggtgctagagggtcaagctgggtgttatgggtttcca
ggtcctaaagggtgctgctgggtgaacctggtaagctgggtgaaagagggtgtcctggacctcctgggtgctgttg
tcctgctggtaaggatggtagaggctgggtgctcaaggaccacctgggtcctgctgggtccagctgggtgagagagggtg
aacaagggtccagctgggttctcctgggtttcaagggttggcagggtccagctgggtccaccagggtgaagctggtaaa
ccagggtgagcaagggtgttccaggtgatttgggtgctccaggtccttctgggtgctagagggtgaaagaggattccc
tggagagagagggtgttccagggtcctcctgggtccagctgggtccaagagggtgctaattgggtgctcctggaaatgatg
gtgctaagggtgatgctgggtgctccaggtgctcctggatctcaagggtgctccaggattgcaaggatgccagggt
gaaagagggtgctgctgggttgcctgggtccaaaagggtgatagagggtgacgctggaccaaaagggtgctgatggatc
tccaggtaagatgggttagagggttggactggaccaatcgggtcctcctggacctgctgggtgctccagggtgata
agggtgaatctgggtccatccgggtcctgctgggtcctacagggtgctagagggtgctccagggtgacagagggtgaacca
ggacctccagggtccagctgggttttggctgggtccacctgggtgctgatgggtcaaccagggtgctaaagggtgagccagg
tgacgctgggtgctaaagggtgacgctgggtccaccagggtcctgctggacctgctgggtccacctgggtcctattggta
atggttgggtgctccagggtgctaaagggtgctagagggttctgctggacctccagggtgctactgggttttccagggtgct
gctggaagagttgggtcctccaggaccatctggtaatgctggacctcctgggtcctccagggtcctgctggtaaaga
agggtgtaagggtccaagagggtgaaactgggtccagctggtagacctgggtgaagttggacctccagggtccacctg
gtccagctgggtgaaaaagggttctccagggtgctgacttaattaaccccggtccgcctgggtccacctgggtccacct
gggtccaccaggaccaccagggtccacctggaccaccgggtcctcccgaccata

Anionenaustauschchromatographie

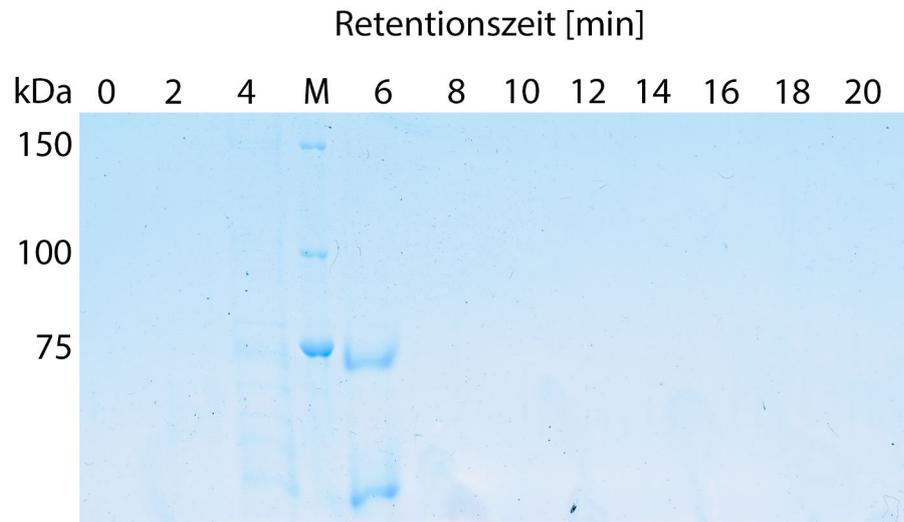


Abbildung C.1 SDS-Gel der Proben der AIEX mit der gefällten Probe. Aufgetragen sind ein Größenstandard und die Proben der Retentionszeiten 22 min bis 46 min.

Kationenaustauschchromatographie

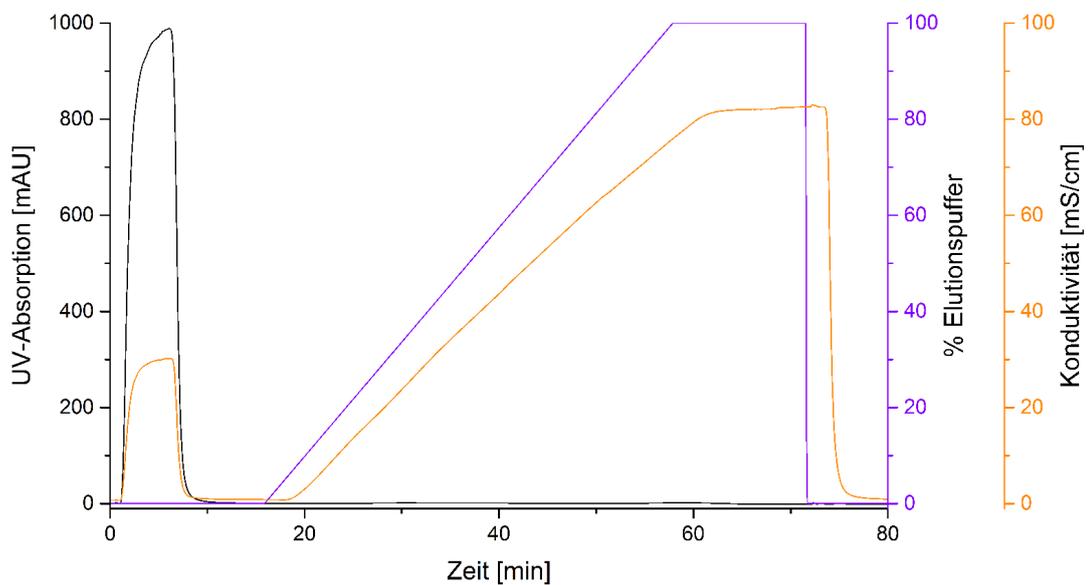


Abbildung C.2 Chromatogramm der CIEX mit der Aceton-gefällten Probe.

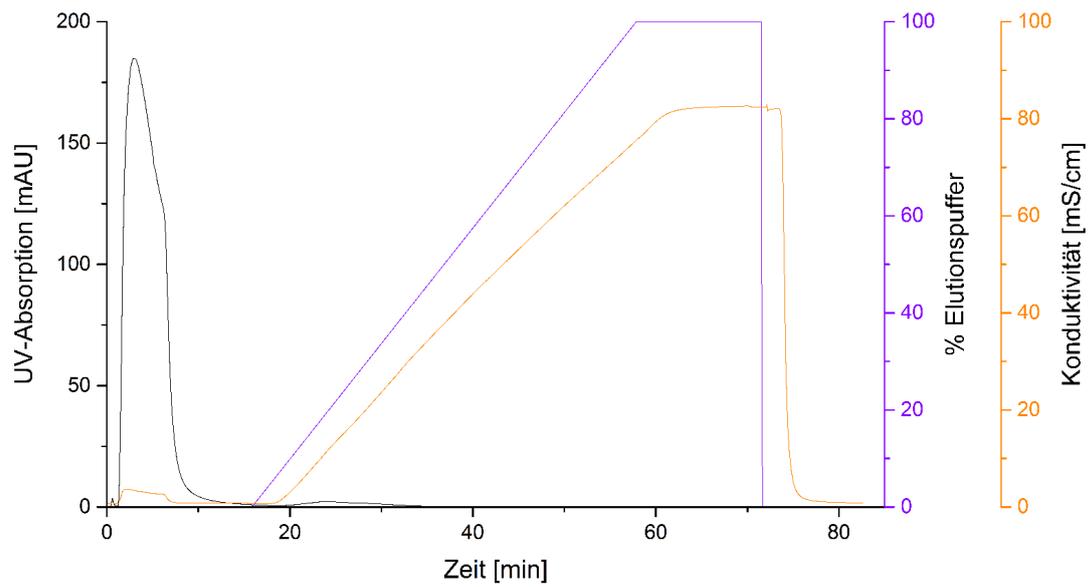


Abbildung C.3 Chromatogramm der CIEX mit der TCA-gefällten Probe.

Hydrophobe Interaktionschromatographie

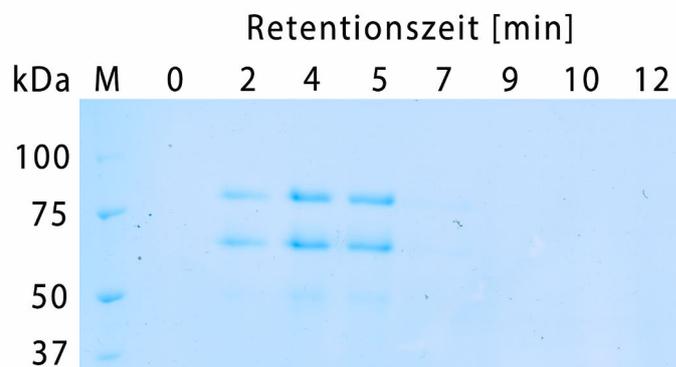


Abbildung C.4 SDS-Gel der Fraktionen 0 min bis 12 min der HIC mit NaCl in Laufpuffer.

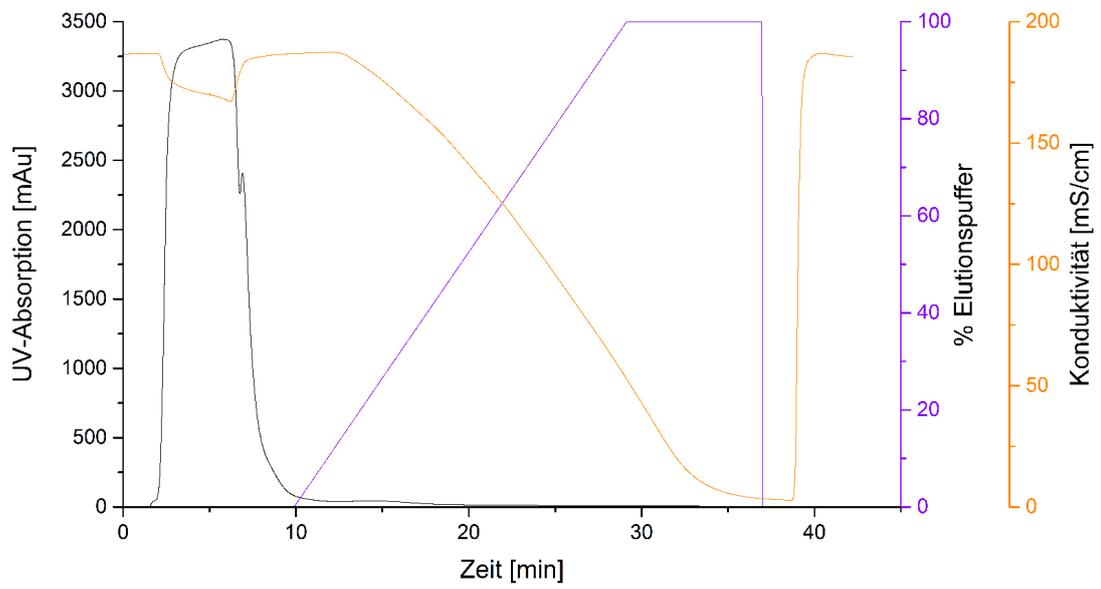


Abbildung C.5 Chromatogramm der HIC mit NaCl in Laufpuffer und Probe.

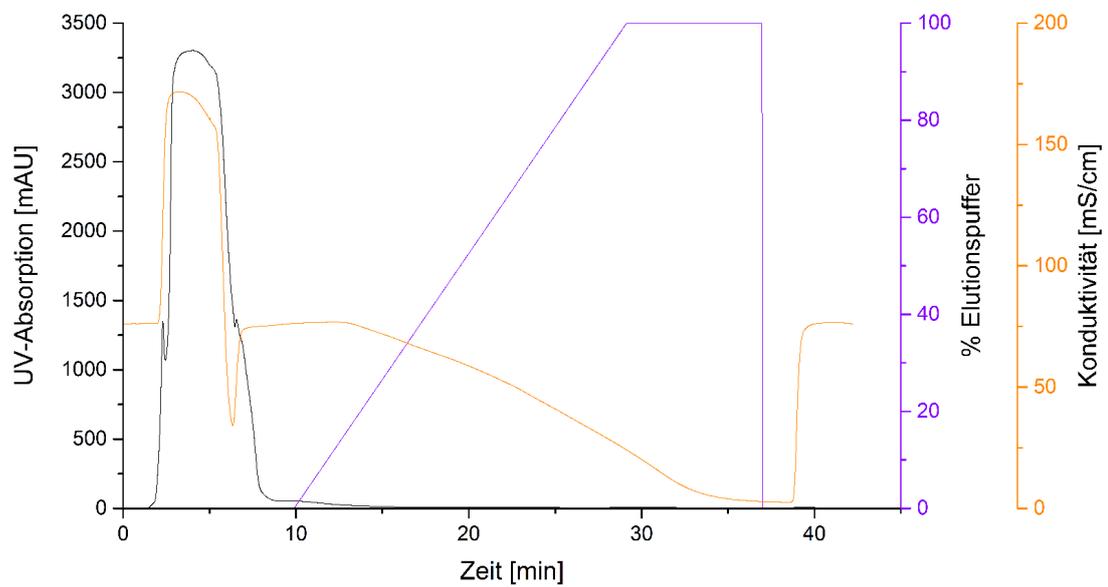


Abbildung C.6 Chromatogramm der HIC mit Na_2SO_4 im Laufpuffer und NaCl in der Probe.

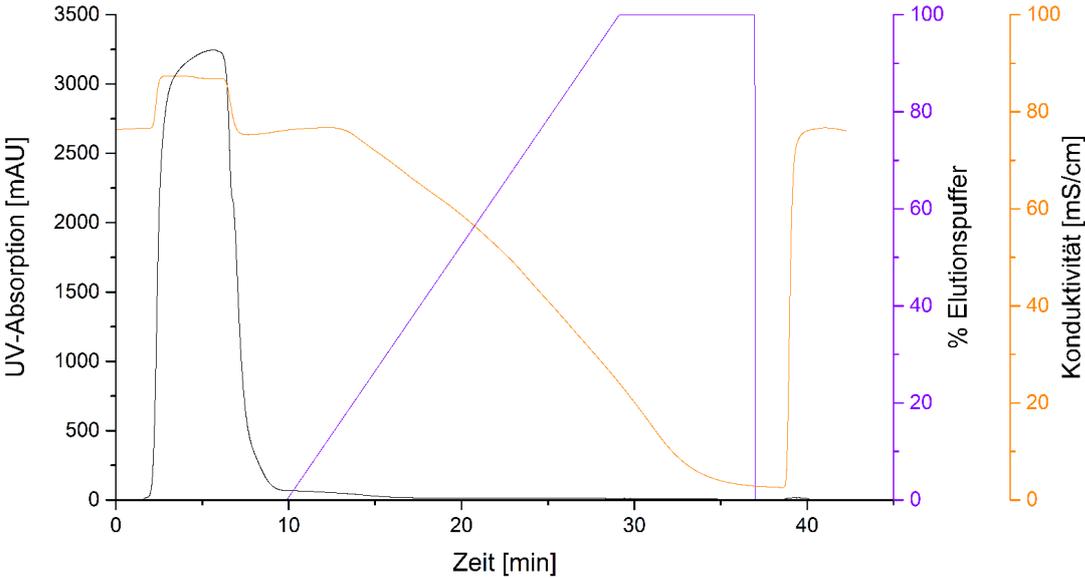


Abbildung C.7 Chromatogramm der HIC mit Na₂SO₄ in Laufpuffer und Probe.

Zusammenfassung der Chromatographieversuche

Tabelle C.1 Zusammenfassung der Parameter der unterschiedlichen Chromatographie-Versuche

Lauf	Elutionspuffer	pH	Fällung mit	Salz in Probe
1. AIEX	10 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl	8	-	-
2. AIEX	10 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl	8	Aceton	-
1. CIEX	10 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl	5	-	-
2. CIEX	10 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl	5	Aceton	-
3. CIEX	10 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl	5	TCA	-
1. HIC	10 mM Phosphatpuffer + 1 M NaCl	7	-	-
2. HIC	10 mM Phosphatpuffer + 3 M NaCl	7	-	3 M NaCl
3. HIC	10 mM Phosphatpuffer + 1 M Na ₂ SO ₄	7	-	3 M NaCl
4. HIC	10 mM Phosphatpuffer + 1 M Na ₂ SO ₄	7	-	1 M Na ₂ SO ₄
1. SEC	50 mM Phosphatpuffer + 0,15 M NaCl	7,2	-	-
2. SEC	50 mM Phosphatpuffer + 0,15 M NaCl	7,2	Aceton	-

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

AOX1	Alkoholoxidase 1
AOX2	Alkoholoxidase 2
BMG	<i>Buffered Minimal-Glycerol-Medium</i>
BMM	<i>Buffered Minimal-Methanol-Medium</i>
bp	Basenpaar(e)
CNT	<i>carbon nanotubes</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
IPN	<i>interpenetrating network</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MD, MM	<i>Minimal Dextrose Medium, Minimal Methanol Medium</i>
OD₆₀₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol

<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PVA	Polyvinylalkohol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SOC-Medium	<i>super optimal broth with catabolite repression</i> Medium
TCA	Trichloressigsäure
TcolT	Proteinkonstrukt aus trimerisierende Endblöcken und Kollagenmittelstück
TGS	TRIS-Glycin-SDS
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i> , Transfer-RNA
YPD, YEPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose Medium</i>

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung von Kollagen I, bestehend aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette.	17
2.2	Darstellung einer Kollagenfibrille mit Zerlegung in die unterschiedlichen Helicen.	17
2.3	Bandenmuster auf Kollagenfibrillen [61].	18
2.4	Bildung der Kollagenfibrille aus einzelnen α -Ketten.	19
2.5	Schematische Darstellung eines mit Zellen besiedelten Hydrogels. Ankerproteine sorgen für eine Bindung der Zellen an das Hydrogel.	22
2.6	Schematische Darstellung eines schlauchförmigen Kollagenkonstruktes zur Überbrückung einer Nervenverletzung und Abbildung des erwarteten Heilungsfortschritts.	24
2.7	<i>Pichia-pastoris</i> -Kolonien auf einer Agarplatte.	27
2.8	Schematische Darstellung der verschiedenen Expressionssysteme für rekombinantes Kollagen.	30
3.1	Schematische Darstellung des Kollagen-mimetischen Proteins, sowie der temperaturabhängigen Netzwerkbildung.	34
3.2	Aminosäuresequenz des Proteinkonstrukts, grün: trimerisierende Endblöcke, orange: Kollagenmittelstück.	35
3.3	Expressionsvektor pPIC9K für die Produktion des Kollagen-mimetischen Proteins.	37
3.4	Ergebnis der Ligation von pPIC9K und TcolT. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M) und verschiedene Ligationsansätze (A-F). Die erwarteten Größen liegen bei 9276 bp für den Vektor und 1398 bp für das Zielgen. . .	37
3.5	Homologe Rekombination zwischen dem nativen, mutierten His4-Gen und dem funktionsfähigen His4-Gen des Vektors	39
3.6	Nachweis der erfolgreichen Transformation mittels Kolonie-PCR. Aufgetragen sind ein molekularer Größenmarker (M), die Amplifikate der ausgewählten Kolonien (1-6), mit Leervektor transformierte <i>P. pastoris</i> -GS115-Zellen (Neg), aufgereinigtes Plasmid (pT) und Leerplasmid (p).	40

4.1	SDS-Gel der Probenüberstände von Klon 1, 4, 5 und einem Negativklon N bei Kultivierung im Schüttelkolben (30 °C, 150 rpm). Aufgetragen sind ein Größenstandard (M) und die Zeitproben der verschiedenen Kultivierungen (0 h, 32 h, 71 h), Comassiefärbung.	44
4.2	Aufgetragen sind die Probenüberstände der Kultivierung von Klon 4 (0-71 Stunden), ein molekularer Größenstandard (M), und zusätzlich beim Western Blot: humanes Kollagen I als Positivkontrolle (P), sowie der Probenüberstand aus der Kultivierung eines Klons transformiert mit Leervektor als Negativkontrolle (N).	45
4.3	Aufgetragen sind die aufgeschlossenen Zellpellets der Kultivierung von Klon 4 in <i>buffered minimal medium</i> (BMM) (0-72 Stunden), ein molekularer Größenstandard (M), humanes Kollagen I als Positivkontrolle (P), sowie das aufgeschlossene Zellpellet aus der Kultivierung eines Klons transformiert mit Leervektor als Negativkontrolle (N ₁ und N ₂)	46
4.4	Vergleich der Kultivierungsproben mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen, aufgetragen in SDS-Gelen. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M) und die Zeitproben der Kultivierungen (0 h bis 71 h), Coomassiefärbung.	47
4.5	Vergleich der OD-Werte bei Kultivierung in unterschiedlichen Fermentationsmedien.	51
4.6	SDS-Gel der Proben von Reaktorkultivierung A, aufgetragen wurden ein molekularer Größenstandard (M), eine Probe von Kultivierungsbeginn (-26 h) sowie die Kultivierungsproben nach Induktion (0-96 h), Coomassiefärbung.	54
4.7	Methanolkonzentration über den Verlauf von Kultivierung B mit festen Pumpraten des Methanolfeeds und Sollwert zum Vergleich.	55
4.8	Vergleich der Kultivierungsproben bei festen Methanolkumpraten. Aufgetragen sind ein Größenstandard (M), der Beginn der Kultivierung (-71 h) sowie die Zeitproben ab Induktion (0 h bis 94 h), Coomassiefärbung. . . .	56
4.9	Darstellung des Netzwerkplans für die Planung des Feedback-Loops des Methanolsensors.	58

4.10	Darstellung der Kontrollsoftware zur Eingabe des Sollwerts und zum Ablesen des aktuellen Sensorwerts.	59
4.11	Kalibrierung und Validierung des Methanolsensors.	60
4.12	Darstellung der Methanolkonzentration der Kultivierungen unter Kontrolle des Feedback-Loops.	61
4.13	Vergleich der SDS-Gele der verschiedenen Kultivierungen mit geregelter Methanolkonzentration. Aufgetragen wurden ein molekularer Größenstandard (M) sowie die Proben der Kultivierungen (0-95), Coomassiefärbung.	63
5.1	Schematischer Vergleich der verwendeten Fällungen: einfache Acetonfällung (A), fraktionierte Acetonfällung (B, nach [105]) und fraktionierte Acetonfällung mit Ammoniumsulfat-Schritt (C, nach [106]).	67
5.2	SDS-PAGE der Proben der Acetonfällung. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M), die Probe vor der Fällung (v) und die Probe nach der Fällung (F), Coomassiefärbung.	68
5.3	SDS-PAGE der Proben der fraktionierten Acetonfällung. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M), die Probe vor der Fällung (v), die Probe des ersten Fällungsschritts (40) und die Probe des zweiten Fällungsschritts (80), Coomassiefärbung.	69
5.4	SDS-PAGE der Proben der fraktionierten Acetonfällung mit Ammoniumsulfat. Aufgetragen wurden ein Größenstandard (M) sowie die Proben vor der Fällung (Pv), nach der Entsalzung (P2), nach dem Ammoniumsulfatschritt (P3), nach 80 % Aceton (P4) und nach der Dialyse aus zwei verschiedenen Dialyseschläuchen (D1 und D2), Coomassiefärbung.	70
5.5	Chromatogramm der AIEX mit der ungefällten Probe, dargestellt sind die Konduktivität (orange), die UV-Absorption (schwarz) und die Konzentration an Elutionslösung (violett).	73
5.6	SDS-Gel der Proben der AIEX, aufgetragen sind ein Größenstandard (M) und die Proben der Retentionszeiten 0 min bis 20 min, Coomassiefärbung.	73
5.7	Chromatogramm der AIEX mit der gefällten Probe, dargestellt sind die Konduktivität (orange), die UV-Absorption (schwarz) und die Konzentration an Elutionslösung (violett).	74

5.8	Chromatogramm der CIEX mit der ungefällten Probe, dargestellt sind die Konduktivität (orange), die UV-Absorption (schwarz) und die Konzentration an Elutionslösung (violett).	75
5.9	SDS-Gel der Proben der CIEX, aufgetragen sind ein Größenstandard (M) und die Proben der Retentionszeiten 0 min bis 22 min, Coomassiefärbung.	76
5.10	Chromatogramm der HIC der ungefällten Probe bei Zugabe von NaCl in den Laufpuffer, dargestellt sind die Konduktivität (orange), die UV-Absorption (schwarz) und die Konzentration an Elutionslösung (violett). .	77
5.11	Chromatogramm der SEC, dargestellt sind die UV-Absorption des Größenstandards (blau), die UV-Absorption der ungefällten Probe (violett) und die UV-Absorption der gefällten Probe (orange).	79
5.12	SDS-Gel der Fraktionen um den Peak bei 45 min. Aufgetragen sind ein Größenstandard (M), die Retentionszeiten 38 min bis 60 min sowie eine Vorher-Proteinprobe (P), Coomassiefärbung.	80
5.13	Schematische Darstellung der Proteinvernetzung zwischen mehreren CMP-Molekülen.	82
5.14	Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des Trimerisierungstests.	83
5.15	SDS-Gele der Trimerisierungsanalyse: vor (a) und nach (b) der Extraktion und Neuauftrag, Coomassiefärbung.	84
5.16	SDS-Gel der Proben mit verschiedenen Inkubationstemperaturen und -zeiten, Coomassiefärbung.	85
5.17	SDS-Gel der Probe für die MS-Messung, aufgetragen sind ein Größenstandard (M) sowie die Proteinprobe (P), Coomassiefärbung.	87
5.18	SDS-Gel des Glykosidasetests. Aufgetragen sind ein Größenstandard (M) sowie die unverdauten Proben P bzw. C für die Positivkontrolle bzw. das Kollagenprotein und die verdauten Proben Pv bzw. Cv für die Positivkontrolle bzw. das Kollagenprotein.	89
5.19	Einordnung der verschiedenen Stoffe, die rheologisch betrachtet werden können.	90
5.20	Darstellung der Rheologieergebnisse bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Puffer mit pH = 5.	91

5.21	Darstellung der Rheologieergebnisse bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Puffer mit pH = 3.	92
5.22	Darstellung der 7 h Rheologiemessung bei 20 °C in einem Puffer mit pH = 3.	93
C.1	SDS-Gel der Proben der AIEX mit der gefällten Probe. Aufgetragen sind ein Größenstandard und die Proben der Retentionszeiten 22 min bis 46 min.	119
C.2	Chromatogramm der CIEX mit der Aceton-gefällten Probe.	119
C.3	Chromatogramm der CIEX mit der TCA-gefällten Probe.	120
C.4	SDS-Gel der Fraktionen 0 min bis 12 min der HIC mit NaCl in Laufpuffer.	120
C.5	Chromatogramm der HIC mit NaCl in Laufpuffer und Probe.	121
C.6	Chromatogramm der HIC mit Na ₂ SO ₄ im Laufpuffer und NaCl in der Probe.	121
C.7	Chromatogramm der HIC mit Na ₂ SO ₄ in Laufpuffer und Probe.	122

Tabellenverzeichnis

2.1	Verteilung der Kollagentypen auf die unterschiedlichen Arten [80]	20
3.1	Screeningergebnisse der 6 ausgewählten Klone auf Geneticin [®] -haltigen YPD-Platten. Die Antibiotikakonzentration ist angegeben in mg·ml ⁻¹ (++ gutes Wachstum, + Wachstum, o kein Wachstum erkennbar).	41
4.1	Vergleich der wichtigsten Nährstoffquellen sowie des pH-Werts der analysierten Medien	50
4.2	Zusammenfassung der Parameter und Ergebnisse aller Kultivierung mit Methanolsensor	65
5.1	Auflistung der untersuchten Denaturierungstemperaturen und -zeiten	85
6.1	Datenblatt zu CMP	97
C.1	Zusammenfassung der Parameter der unterschiedlichen Chromatographie-Versuche	123

Literaturverzeichnis

- [1] Ensanya a. Abou Neel *et al.* „Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient“. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 65.4 (2013), S. 429–456.
- [2] L. Ala-Kokko *et al.* „Expression of a human cartilage procollagen gene (COL2A1) in mouse 3T3 cells“. In: *Journal of Biological Chemistry* 266.22 (1991), S. 14175–14178.
- [3] Miguel Álvaro-Benito *et al.* „Structural and Kinetic Analysis of Schwanniomyces occidentalis Invertase Reveals a New Oligomerization Pattern and the Role of Its Supplementary Domain in Substrate Binding“. In: *Journal of Biological Chemistry* 285.18 (Apr. 2010), S. 13930–13941. arXiv: NIHMS150003.
- [4] Julio Báez *et al.* „Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 69.3 (2005), S. 245–252.
- [5] E Bell *et al.* „Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76.3 (1979), S. 1274–1278.
- [6] A Bhattacharjee und M Bansal. „Collagen structure: the Madras triple helix and the current scenario“. In: *IUBMB Life* 57.3 (2005), S. 161–172.
- [7] Hans-Holger Bleß und Miriam Kip. *Weißbuch Gelenkersatz*. Hrsg. von H.-H. Bleß und M. Kip. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017.
- [8] A S de Boer *et al.* „Risk assessment for surgical site infections following total hip and total knee prostheses.“ In: *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 13 Spec No.1 (Nov. 2001), S. 42–7.
- [9] Shane Browne *et al.* „Collagen: finding a solution for the source.“ In: *Tissue engineering. Part A* 19.13-14 (2013), S. 1491–4.

- [10] Douglas D Buechter *et al.* „Co-translational incorporation of trans-4-hydroxyproline into recombinant proteins in bacteria“. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.1 (2003), S. 645–650.
- [11] Ralph J. Butkowski *et al.* „[19] Estimation of the size of collagenous proteins by electrophoresis and gel chromatography“. In: *Methods in Enzymology* 82.C (1982), S. 410–423.
- [12] J L Cereghino und J M Cregg. „Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.“ In: *FEMS microbiology reviews* 24.1 (2000), S. 45–66.
- [13] Burke K. Chan *et al.* „Robust and Semi-Interpenetrating Hydrogels from Poly(ethylene glycol) and Collagen for Elastomeric Tissue Scaffolds“. In: *Macromolecular Bioscience* 12.11 (2012), S. 1490–1501.
- [14] Florencia Chicatun *et al.* „Osteoid-mimicking dense collagen/chitosan hybrid gels“. eng TS - PubMed. In: *Biomacromolecules* 12.8 (2011), S. 2946–2956.
- [15] Oriol Cos *et al.* „Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review“. In: *Microbial Cell Factories* 5.1 (2006), S. 17.
- [16] R. Couderc und J. Baratti. „Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*, Purification and Properties of the Formaldehyde Dehydrogenase“. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 44.10 (Juli 1980), S. 2279–2289.
- [17] James M. Cregg *et al.* „Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*.“ In: *Molecular and cellular biology* 9.3 (1989), S. 1316–23.
- [18] James M Cregg *et al.* „Chapter 13 Expression in the Yeast *Pichia pastoris*.“ In: *Methods in enzymology* 463.09 (Jan. 2009), S. 169–189.
- [19] A.P. Davies. „An Unusual Lymphocytic Perivascular Infiltration in Tissues Around Contemporary Metal-on-Metal Joint Replacements“. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)* 87.1 (Jan. 2005), S. 18.

- [20] Paul Z. Elias und Myron Spector. „Characterization of a Bilateral Penetrating Brain Injury in Rats and Evaluation of a Collagen Biomaterial for Potential Treatment“. In: *Journal of Neurotrauma* 29.11 (Juli 2012), S. 2086–2102.
- [21] Felice Esposito *et al.* „Collagen-only biomatrix as a novel dural substitute. Examination of the efficacy, safety and outcome: clinical experience on a series of 208 patients.“ In: *Clinical neurology and neurosurgery* 110.4 (Apr. 2008), S. 343–51.
- [22] D. Eyre. „Cross-Linking in Collagen and Elastin“. In: *Annual Review of Biochemistry* 53.1 (Jan. 1984), S. 717–748.
- [23] Per Fagerholm *et al.* „A Biosynthetic Alternative to Human Donor Tissue for Inducing Corneal Regeneration: 24-Month Follow-Up of a Phase 1 Clinical Study“. In: *Science Translational Medicine* 2.46 (Aug. 2010), 46ra61–46ra61.
- [24] Roberto Gazzeri *et al.* „Transparent equine collagen biomatrix as dural repair. A prospective clinical study.“ In: *Acta neurochirurgica* 151.5 (Mai 2009), S. 537–43.
- [25] M. C. Gomez-Guillen *et al.* „Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review“. In: *Food Hydrocolloids* 25.8 (2011), S. 1813–1827.
- [26] Marion K Gordon und Rita A Hahn. „Collagens“. In: *Cell and Tissue Research* 339.1 (Jan. 2010), S. 247–257.
- [27] R. Grafstrom *et al.* „Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells“. In: *Science* 220.4593 (Apr. 1983), S. 216–218.
- [28] Lei Gu *et al.* „High-Level Extracellular Production of Glucose Oxidase by Recombinant *Pichia Pastoris* Using a Combined Strategy“. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175.3 (Feb. 2015), S. 1429–1447.
- [29] Donald Gullberg *et al.* „Analysis of alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 integrins in cell–collagen interactions: identification of conformation dependent alpha 1 beta 1 binding sites in collagen type I.“ In: *The EMBO journal* 11.11 (Nov. 1992), S. 3865–73.

- [30] Chandrasekhar Gurramkonda *et al.* „Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin.“ In: *Microbial cell factories* 9 (2010), S. 31.
- [31] Meinhard Hasslacher *et al.* „High-Level Intracellular Expression of Hydroxynitrile Lyase from the Tropical Rubber Tree *Hevea brasiliensis* in Microbial Hosts“. In: *Protein Expression and Purification* 11.1 (Okt. 1997), S. 61–71.
- [32] H Heslot, Hrsg. *6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms // Proceedings*. eng. Paris: Société française de microbiologie, 1990, S. 20.
- [33] David R Higgins und James M Cregg. *Pichia Protocols*. Hrsg. von James M. Cregg. Bd. 389. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2007, S. 271.
- [34] Feng Hong *et al.* „Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 79.4 (Aug. 2002), S. 438–449.
- [35] Invitrogen. „Pichia Expression Kit“. 2010.
- [36] Invitrogen Corporation. „Pichia Fermentation Process Guidelines“. In: (2002), S. 1–11.
- [37] Invitrogen Corporation. „Pichia Expression Kit“. 2014.
- [38] D C John *et al.* „Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk.“ In: *Nature biotechnology* 17.4 (1999), S. 385–389.
- [39] K Johnson. „Nitrous acid pretreatment of tendon xenografts cross-linked with glutaraldehyde and sterilized with gamma irradiation“. In: *Biomaterials* 20.11 (Juni 1999), S. 1003–1015.
- [40] K E Kadler *et al.* „Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I pC-collagen with procollagen C-proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen self-assembly is a classical example of an entropy-driven process.“ In: *The Journal of biological chemistry* 262.32 (Nov. 1987), S. 15696–701.

- [41] M Kierstan und C Bucke. „The immobilization of Microbial cell, Subcellular Organelles and Enzymes in Ca-Alginate Gels“. In: *Biotechnology and bioengineering* XIX.3 (1977), S. 387–397.
- [42] Jae-Kyung Kim *et al.* „Preparation and Properties of Collagen/Modified Hyaluronic Acid Hydrogel for Biomedical Application“. In: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7.11 (Nov. 2007), S. 3852–3856.
- [43] C Graham Knight *et al.* „Identification in Collagen Type I of an Integrin $\alpha 2 \beta 1$ -binding Site Containing an Essential GER Sequence“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273.50 (Dez. 1998), S. 33287–33294.
- [44] C Graham Knight *et al.* „The Collagen-binding A-domains of Integrins $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-helical) Collagens“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.1 (Jan. 2000), S. 35–40.
- [45] Antonios D Konitsiotis *et al.* „Characterization of High Affinity Binding Motifs for the Discoidin Domain Receptor DDR2 in Collagen“. In: *Journal of Biological Chemistry* 283.11 (März 2008), S. 6861–6868.
- [46] Cletus Paul Kurtzman. „Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis“. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36.11 (Sep. 2009), S. 1435–1438.
- [47] Arja Lamberg *et al.* „Characterization of human type III collagen expressed in a baculovirus system“. In: *Journal of Biological Chemistry* 271.20 (1996), S. 11988–11995.
- [48] Pingzuo Z Li *et al.* „Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*“. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142.2 (2007), S. 105–124.
- [49] Zhengjun Li *et al.* „Low-Temperature Increases the Yield of Biologically Active Herring Antifreeze Protein in *Pichia pastoris*“. In: *Protein Expression and Purification* 21.3 (Apr. 2001), S. 438–445.
- [50] Geoffrey P. Lin-Cereghino *et al.* „Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*“. In: *Curr Opin Biotech* 13.4 (2002), S. 329–332.

- [51] Joan Lin-Cereghino *et al.* „Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.“ In: *BioTechniques* 38.1 (Jan. 2005), S. 44, 46, 48.
- [52] V. Looser *et al.* „Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review“. In: *Biotechnology Advances* 33.6 (Nov. 2015), S. 1177–1193.
- [53] Sue Macauley-Patrick *et al.* „Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system.“ In: *Yeast (Chichester, England)* 22.4 (März 2005), S. 249–70.
- [54] Rebecca A. MacDonald *et al.* „Carbon nanotubes increase the electrical conductivity of fibroblast-seeded collagen hydrogels“. In: *Acta Biomaterialia* 4.6 (Nov. 2008), S. 1583–1592.
- [55] Abhishek Mandal *et al.* „Synthesis, characterization and evaluation of collagen scaffolds crosslinked with aminosilane functionalized silver nanoparticles: in vitro and in vivo studies“. In: *J. Mater. Chem. B* 3.15 (2015), S. 3032–3043.
- [56] M N Mason *et al.* „Entrapped collagen type 1 promotes differentiation of embryonic pancreatic precursor cells into glucose-responsive beta-cells when cultured in three-dimensional PEG hydrogels“. In: *Tissue Eng Part A* 15.12 (2009), S. 3799–3808.
- [57] Teruo Miyata *et al.* „Collagen engineering for biomaterial use“. In: *Clinical Materials* 9.3-4 (Jan. 1992), S. 139–148.
- [58] J Myllyharju *et al.* „Expression of wild-type and modified proalpha chains of human type I procollagen in insect cells leads to the formation of stable [α 1(I)] 2α 2(I) collagen heterotrimers and [α 1(I)] 3 homotrimers but not [α 2(I)] 3 homotrimers.“ In: *The Journal of biological chemistry* 272.35 (1997), S. 21824–21830.
- [59] J Myllyharju *et al.* „Expression of recombinant human type I–III collagens in the yeast *Pichia pastoris*.“ In: *Biochemical Society Transactions* 28.4 (2000), S. 353.
- [60] Antje Neubauer *et al.* „High-level production of human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*.“ In: *Matrix Biology* 24.1 (Feb. 2005), S. 59–68.

- [61] M Nokelainen *et al.* „High-level production of human type I collagen in the yeast *Pichia pastoris*.“ In: *Yeast (Chichester, England)* 18.9 (2001), S. 797–806.
- [62] Joseph P R O Orgel *et al.* „Microfibrillar structure of type I collagen in situ“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.24 (Juni 2006), S. 9001–9005.
- [63] Joseph P.R.O Orgel *et al.* „The In Situ Supramolecular Structure of Type I Collagen“. In: *Structure* 9.11 (Nov. 2001), S. 1061–1069.
- [64] Joseph P. Orgel *et al.* „The in situ conformation and axial location of the intermolecular cross-linked non-helical telopeptides of type I collagen“. In: *Structure* 8.2 (Feb. 2000), S. 137–142.
- [65] Outi Pakkanen *et al.* „Assembly of stable human type I and III collagen molecules from hydroxylated recombinant chains in the yeast *Pichia pastoris*. Effect of an engineered C-terminal oligomerization domain foldon“. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.34 (2003), S. 32478–32483.
- [66] Outi Pakkanen *et al.* „Selective expression of nonsecreted triple-helical and secreted single-chain recombinant collagen fragments in the yeast *Pichia pastoris*“. In: *Journal of Biotechnology* 123.2 (Mai 2006), S. 248–256.
- [67] Rémi Parenteau-Bareil *et al.* „Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications“. In: *Materials* 3.3 (2010), S. 1863–1887.
- [68] Sang Hyug Park *et al.* „Comparative analysis of collagens extracted from different animal sources for application of cartilage tissue engineering“. In: *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* 13.11 (2012), S. 2059–2066.
- [69] Jennifer Patterson *et al.* „Biomimetic materials in tissue engineering“. In: *Materials Today* 13.1-2 (2010), S. 14–22.
- [70] Zhiyuan Peng *et al.* „Preparation and Properties of Polyvinyl Alcohol/Collagen Hydrogel“. In: *Journal of Macromolecular Science, Part B* 51.10 (2012), S. 1934–1941.
- [71] Shiamalee Perumal *et al.* „Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.8 (Feb. 2008), S. 2824–2829.

- [72] John A.M Ramshaw *et al.* „Gly-X-Y Tripeptide Frequencies in Collagen: A Context for Host–Guest Triple-Helical Peptides“. In: *Journal of Structural Biology* 122.1-2 (1998), S. 86–91.
- [73] M van der Rest und R Garrone. „Collagen family of proteins“. In: *FASEB J* 5.13 (1991), S. 2814–2823.
- [74] Shaneen L. Rowe und Jan P. Stegemann. „Interpenetrating Collagen-Fibrin Composite Matrices with Varying Protein Contents and Ratios“. In: *Biomacromolecules* 7.11 (Nov. 2006), S. 2942–2948.
- [75] Maria Ruottinen *et al.* „Improved production of human type II procollagen in the yeast *Pichia pastoris* in shake flasks by a wireless-controlled fed-batch system.“ In: *BMC biotechnology* 8 (2008), S. 33.
- [76] Christoph Rutschmann *et al.* „Recombinant expression of hydroxylated human collagen in *Escherichia coli*“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98.10 (2014), S. 4445–4455.
- [77] T D Sargeant *et al.* „An in situ forming collagen-PEG hydrogel for tissue regeneration“. In: *Acta Biomater* 8.1 (2012), S. 124–132.
- [78] Caroline Schneider-Barthold *et al.* „Hydrogels based on collagen and fibrin - Frontiers and applications“. In: *BioNanoMaterials* 17.1-2 (2016), S. 3–12.
- [79] A. Schnieke *et al.* „Introduction of the human pro α 1(I) collagen gene into pro α 1(I)-deficient Mov-13 mouse cells leads to formation of functional mouse-human hybrid type I collagen“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84.3 (1987), S. 764–768.
- [80] M D Shoulders und R T Raines. „Collagen structure and stability“. In: *Annu Rev Biochem* 78 (2009), S. 929–958.
- [81] Catarina I F Silva *et al.* „Tuning of collagen triple-helix stability in recombinant telechelic polymers“. In: *Biomacromolecules* 13.5 (2012), S. 1250–1258.
- [82] Tiago Silva *et al.* „Marine Origin Collagens and Its Potential Applications“. In: *Marine Drugs* 12.12 (2014), S. 5881–5901.

- [83] K. Silvipriya *et al.* „Collagen: Animal Sources and Biomedical Application“. In: *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5.03 (2015), S. 123–127.
- [84] Peter A. Smethurst *et al.* „Structural Basis for the Platelet-Collagen Interaction“. In: *Journal of Biological Chemistry* 282.2 (Jan. 2007), S. 1296–1304.
- [85] Timothy N Snyder *et al.* „A fibrin/hyaluronic acid hydrogel for the delivery of mesenchymal stem cells and potential for articular cartilage repair“. In: *Journal of Biological Engineering* 8.1 (2014), S. 10.
- [86] Hanan Stein *et al.* „Production of Bioactive, Post-Translationally Modified, Heterotrimeric, Human Recombinant Type-I Collagen in Transgenic Tobacco †“. In: *Biomacromolecules* 10.9 (Sep. 2009), S. 2640–2645.
- [87] Jayne Stratton *et al.* „High cell-density fermentation.“ In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 103.1 (Jan. 1998), S. 107–20.
- [88] C S Szot *et al.* „3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels“. In: *Biomaterials* 32.31 (2011), S. 7905–7912.
- [89] Isao Takata *et al.* „Screening of matrix suitable for immobilization of microbial cells“. In: *Journal of solid-phase biochemistry* 2.199702109 (1977), S. 225–236.
- [90] Thermo Fisher Scientific. „Purify proteins from polyacrylamide gels“. 2009.
- [91] P. David Toman *et al.* „Production of Recombinant Human Type I Procollagen Trimers Using a Four-gene Expression System in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.30 (Juli 2000), S. 23303–23309.
- [92] P D Toman *et al.* „Production of recombinant human type I procollagen homotrimer in the mammary gland of transgenic mice“. In: *Transgenic research* 8.6 (1999), S. 415–427.
- [93] Masahiro Tomita *et al.* „Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons“. In: *Nature biotechnology* 21.1 (2003), S. 52–56.
- [94] Hongmin Tu *et al.* „Membrane-associated collagens with interrupted triple-helices (MACITs): evolution from a bilaterian common ancestor and functional conservation in *C. elegans*“. In: *BMC Evolutionary Biology* 15.1 (Dez. 2015), S. 281.

- [95] P R Vaughn *et al.* „Production of recombinant hydroxylated human type III collagen fragment in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *DNA Cell Biol* 17.6 (Juni 1998), S. 511–518.
- [96] Johanna Veijola *et al.* „Co-expression of the alpha subunit of human prolyl 4-hydroxylase with BiP polypeptide in insect cells leads to the formation of soluble and insoluble complexes. Soluble alpha-subunit-BiP complexes have no prolyl 4-hydroxylase activity.“ In: *The Biochemical journal* 315 (Pt 2 (Apr. 1996), S. 613–8.
- [97] Scott M Vickers *et al.* „Effects of Cross-linking Type II Collagen-GAG Scaffolds on Chondrogenesis In Vitro : Dynamic Pore Reduction Promotes Cartilage Formation“. In: *Tissue engineering* 12.5 (Mai 2006), S. 1345–1355.
- [98] A Vuorela *et al.* „Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type III collagen in the yeast *pichia pastoris*: formation of a stable enzyme tetramer requires coexpression with collagen and assembly of a stable collagen requires coexpression with prolyl 4-hydroxylase.“ In: *The EMBO journal* 16.22 (1997), S. 6702–6712.
- [99] L W Wagner *et al.* „Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*“. In: *Biotechnology Techniques* 11.11 (1997), S. 791–795.
- [100] B. D. Walters und J. P. Stegemann. „Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales“. In: *Acta Biomaterialia* 10.4 (2014), S. 1488–1501.
- [101] A Y Wang *et al.* „Spatio-temporal modification of collagen scaffolds mediated by triple helical propensity“. In: *Biomacromolecules* 9.7 (2008), S. 1755–1763.
- [102] Wei Wang *et al.* „Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats“. In: *Life Sciences* 82.3-4 (2008), S. 190–204.
- [103] C I Wedge und D S Rootman. „Collagen shields: efficacy, safety and comfort in the treatment of human traumatic corneal abrasion and effect on vision in healthy eyes.“ eng TS - PubMed T4 - Efficacy, safety, comfort in the treatment of human traumatic corneal abrasion und effect on vision in healthy eyes PM - 1451017 M4 -

- Citavi. In: *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie* 27.6 (Okt. 1992), S. 295–298.
- [104] Marc W T Werten *et al.* „High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*“. In: *Yeast* 15.11 (1999), S. 1087–1096. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [105] Marc W. T. Werten *et al.* „Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris*“. In: *Protein Eng* 14.6 (2001), S. 447–454.
- [106] Marc W. T. Werten *et al.* „Precision gels from collagen-inspired triblock copolymers“. In: *Biomacromolecules* 10.5 (2009), S. 1106–1113.
- [107] Ashley Wood *et al.* „Biochemical properties of alligator (*Alligator mississippiensis*) bone collagen“. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 151.3 (Nov. 2008), S. 246–249.
- [108] Xianghua Xiao *et al.* „In vivo study of the biocompatibility of a novel compressed collagen hydrogel scaffold for artificial corneas“. In: *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 102.6 (2014), S. 1782–1787.
- [109] Yuzo Yamada *et al.* „The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae)“. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59.3 (Jan. 1995), S. 439–444.
- [110] Hisayo Yamaoka *et al.* „Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials“. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 81.4 (2006), S. 771–780.
- [111] Juan Ye *et al.* „Chitosan-modified, collagen-based biomimetic nanofibrous membranes as selective cell adhering wound dressings in the treatment of chemically burned corneas“. In: *J. Mater. Chem. B* 2.27 (2014), S. 4226–4236.
- [112] Wenhui Zhang *et al.* „Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*“. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 5.4 (2000), S. 275–287.

- [113] Wenhui Zhang *et al.* „Glycerophosphate as a phosphorus source in a defined medium for *Pichia pastoris* fermentation“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 72.1 (2006), S. 139–144.
- [114] Yong-Guang Zhang *et al.* „Omentum-Wrapped Scaffold with Longitudinally Oriented Micro-Channels Promotes Axonal Regeneration and Motor Functional Recovery in Rats“. eng TS - PubMed. In: *PloS one* 6.12 (Dez. 2011). Hrsg. von Christophe Egles, e29184.

Liste der an dieser Arbeit beteiligten Personen

An einigen der beschriebenen Experimente und Entwicklungen in dieser Arbeit waren neben der Autorin noch weitere Personen beteiligt, diese werden hier aufgeführt.

Prof. Dr. Andreas Pich (Medizinische Hochschule Hannover)	Durchführung und Auswertung von Massenspektrometrie-messungen (Kapitel 5.4)
PD Dr. Ulrich Krings (LCI Uni Hannover)	Durchführung und Auswertung von Massenspektrometrie-messungen (Kapitel 5.4)
Dr. Iliyana Pepelanova (TCI Uni Hannover)	Durchführung der Rheologiemessungen (Kapitel 5.6)

Im Rahmen der Promotion betreute Abschlussarbeiten sind im Folgenden aufgeführt:

Sonja Scholz, Bachelorarbeit: Proteinproduktion eines Kollagenderivats in *Pichia pastoris*, im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 05/2015 - 07/2015.

Maximilian Wedde, Bachelorarbeit: Optimierung der Proteinproduktion eines Collagen-ähnlichen Proteins in *Pichia pastoris*, im Fach Biochemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 05/2016 - 07/2016. Dieser Bachelorarbeit sind experimentelle Daten für das Kapitel 4.2 entnommen.

Sascha Preuß, Bachelorarbeit: Isolierung und Charakterisierung eines rekombinant hergestellten Kollagenproteins, im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 08/2016 - 10/2016. Dieser Bachelorarbeit sind experimentelle Daten für die Kapitel 4.2 und 5.6 entnommen.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Caroline Schneider-Barthold
Geburtsdatum	27.12.1987
Geburtsort	Königstein/Ts.
Nationalität	Deutsch

Ausbildung

01.2014 - 02.2018	Promotionsstudium Chemie, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
10.2011 - 11.2013	Masterstudium Life Science, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
10.2008 - 09.2011	Bachelorstudium Life Science, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
06.2007	Allgemeine Hochschulreife , Hardtberg Gymnasium, Bonn

Publikationsliste

Fachartikel

C. Schneider-Barthold (50 %), S. Baganz, M. Wilhelmi, T. Scheper, I. Pepelanova, Hydrogels based in collagen and fibrin - frontiers and applications, *BioNanoMaterials*, **2016**

D. Marquard, C. Schneider-Barthold (20 %), S. Duesterloh, T. Scheper, P. Lindner, Online monitoring of cell concentration in high cell density *Escherichia coli* cultivations using In situ Microscopy, *Journal of Biotechnology*, **2017**

D. Marquard, J. Austerjost, C. Schneider-Barthold (10 %), S. Duesterloh, S. Beutel, T. Scheper, P. Lindner, A novel image analyzing algorithm for colony plate counting with handheld devices, *Engineering in Life Science*, **in progress**

P. Gellermann, C. Schneider-Barthold (50 %), T. Scheper, I. Pepelanova, Production of a collagen-mimetic protein in *Pichia pastoris*, **in preparation**

Posterbeiträge

F. Rüdinger, **C. Schneider-Barthold**, D. Seliktar, T. Scheper, Cultivation of Mammalian Cells in Hydrogels for 3D Cell Culture, *Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel*, Hannover, Deutschland, **2013**

C. Schneider-Barthold, I. Pepelanova, U. Rinas, T. Scheper, Heterologous Expression of Human Collagen Type I in *Pichia pastoris*, *Biofabrication for NIFE Retreat*, Hannover, Deutschland, **2014**

C. Schneider-Barthold, A. Stamm, S. Baganz, I. Pepelanova, T. Scheper, Biomaterials for Regenerative Medicine Applications, *Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel*, Hannover, Deutschland, **2015**

C. Schneider-Barthold, I. Pepelanova, P. Vogt, T. Scheper, Design of a Collagen-mimetic Peptide as a Novel Cell Scaffolding Material, *International Symposium of Biofabrication*, Hannover, Deutschland, **2015** (Posterpreis)

C. Schneider-Barthold, I. Pepelanova, T. Scheper, Heterologous Expression of a Collagen-mimetic Protein for Biomedical Application, *17th European Congress on Biotechnology*, Krakau, Polen, **2016**

C. Schneider-Barthold, T. Scheper, I. Pepelanova, Recombinant production of a collagen-mimetic protein, *6th Freiberg Collagen Symposium*, Freiberg, Deutschland, **2016**